

Titolo esteso:

Lupus eritematoso sistemico (LES) e P2X7R: studio pilota di valutazione del ruolo patogenetico di P2X7 nelle sierositi lupus correlate.

Titolo breve:

Ruolo di P2X7 nella patogenesi del LES.

PREMESSE E OBIETTIVI

Lupus eritematoso sistemico (LES)

Il lupus eritematoso sistemico (LES) è il prototipo delle malattie autoimmuni sistemiche e si caratterizza per un largo spettro di manifestazioni cliniche.

1 Epidemiologia

L'incidenza del LES è quasi triplicata negli ultimi 40 anni, soprattutto a causa della migliore diagnosi di malattia nei casi meno severi. I tassi di incidenza stimati in Europa variano da 2 a 8 casi per 100 000 abitanti all'anno. Le donne sono interessate nove volte più frequentemente degli uomini e gli afroamericani e latinoamericani sono colpiti più frequentemente dei caucasici e hanno una maggiore morbilità. La maggioranza (65%) dei pazienti con LES presenta l'esordio di malattia tra i 16 ei 55 anni, nel 20% dei casi la diagnosi è formulata prima dell'età di 16 anni e nel 15% dei casi dopo i 55 anni di età.

2 Patogenesi

Nel lupus si osserva un'alterazione delle risposte immunitarie innate e adattative che conducono ad una perdita di tolleranza. La rottura irreversibile nella tolleranza immunologica si manifesta con le risposte immunitarie contro gli antigeni nucleari endogeni e la successiva formazione di autoanticorpi ed immunocomplessi (IC). Il LES è considerato classicamente una malattia autoimmune con un componente predominante del sistema immunitario adattivo in cui le cellule T e B hanno un importante ruolo patogenetico. Negli ultimi dieci anni sono stati compiuti notevoli progressi nella comprensione della complessità dei meccanismi patogenetici sottesi al LES, che hanno portato a sottolineare l'importanza dell'immunità innata nella patogenesi del LES.

2.1 L'inflammasoma ed il suo ruolo potenziale nella patogenesi del LES: rationale scientifico del progetto

L'area di ricerca inerente il ruolo dell'immunità innata nel LES è in rapida espansione. L'inflammasoma è un termine usato per descrivere un complesso di molecole che, quando indotto all'oligomerizzazione, provocano l'attivazione della caspasi-1, l'enzima primario responsabile dell'attivazione delle citochine pro-infiammatorie IL-1 β e IL-18 nelle loro forme attive.

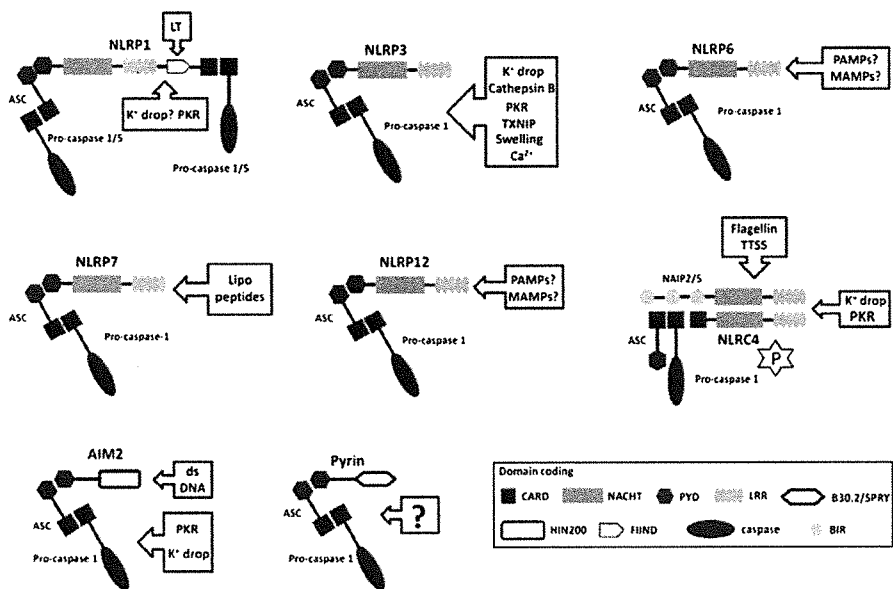
Il sistema immunitario innato è in grado di identificare un'ampia gamma di patogeni e segnali di pericolo coinvolti in molte malattie infiammatorie croniche. Ciò è possibile grazie alla presenza nei siti di infiammazione di molecole associate agli agenti patogeni (PAMP) e degli elementi molecolari associati a danno (DAMP) che sono riconosciuti da una vasta gamma di recettori chiamati collettivamente recettori di

riconoscimento di pattern (PRRs). I PRR includono ricettori di tipo toll-like (TLRs) e recettori NOD-like (NLR). La famiglia TLR è un sottotipo ben caratterizzato di PRR, espresso sia sulla membrana plasmatica che endosomale. TLR riconosce un'ampia gamma di ligandi derivanti da agenti patogeni come le lipoproteine, le proteine costituenti e gli acidi nucleici. Dopo l'attivazione, i TLR innescano le vie di segnalazione intracellulare che culminano nell'attivazione del fattore di regolazione dell'interferone (IRF) o del fattore nucleare di trascrizione NF- κ B.

Nel LES, i complessi immunitari formati a seconda del riconoscimento anticorpale degli antigeni di DNA o RNA, attivano TLR7 e TLR9 localizzati a livello endosomale. Ciò provoca l'attivazione TLR-dipendente di NF κ B e la successiva sintesi dell'infiammasoma NLRP3 e, inoltre, la produzione di entrambe le INF-alfa e degli autoanticorpi mediante l'attivazione di cellule dendritiche e cellule B.

Oltre ai TLR, anche i recettori NOD (NLR) sembrano essere coinvolti nella patogenesi SLE, anche se il loro ruolo è ancora poco chiaro. NLR sono presenti nel citoplasma e sono divisi in diverse sottoclassi 1.

Inflammasome subtypes



La maggior parte degli infiammasomi, inclusi NLRP3, comprendono una porzione NLR che contiene un dominio C-terminale ricco di leucine (LRR), un dominio nucleotidico-legante NACHT (NOD) e un dominio pirin-N terminale, in grado di interagire con il dominio pirinico del Molecola dell'adattatore ASC. Il reclutamento da parte di ASC della caspasi-1, attraverso i loro domini CARD, provoca l'attivazione di caspasi-1 stessa che cliva l'immaturo pro-IL-1 β e IL-18 per produrre le forme mature delle due citochine pro-infiammatorie.

NLRP3 e IL-1 β non sono espressamente costituiti. La loro trascrizione richiede una fase di "priming", normalmente rappresentata da una stimolazione da ligandi TLR, che attivano NF κ B. L'attivazione dell'infiammazione successivamente dipende dalla presenza di ligandi specifici o cambiamenti metabolici cellulari, che determinano l'assemblaggio dell'infiammasoma. I nucleotidi extracellulari, come ATP, i componenti batterici, e materiali cristallini, come i sali urici, rappresentano i possibili stimoli di attivazione dell'infiammasoma.

I polimorfismi di NLRP1 sono stati fortemente associati allo sviluppo del LES e correlano con la presenza di coinvolgimento renale, di artrite e di manifestazioni cutanee. Questi polimorfismi portano ad una maggiore produzione di IL-1 β da parte dei monociti circolanti (2-3).

Una maggiore espressione di componenti dell'infiammasoma, tra cui NLRP3 e caspasi-1, è stata riportata nelle biopsie di nefrite lupica, suggerendo un possibile ruolo nella genesi di tale interessamento (4).

Il frammento C3a, che viene rilasciato durante l'attivazione del complemento nei tessuti, promuove l'attivazione infiammasoma attraverso l'upregulation della secrezione di ATP. La deposizione ed il consumo di complemento negli organi affetti da LES possono promuovere l'attivazione infiammasomica contribuendo così al danno d'organo. Oltre al NLRP3, è stata riconosciuta l'importanza della caspasi-1 nello sviluppo del lupus murino. In uno studio recente, i topi caspasi-1 - / - sono risultati resistenti allo sviluppo del lupus utilizzando il modello di nefrite lupus indotta dal pristano. Rispetto ai topi wild type, i topi caspasi-1 - / - avevano riduzioni significative nel titolo anticorpale di anti-dsDNA e anti-RNP, ed erano protetti dalla deposizione di immunocomplessi e dalla infiammazione a livello renale.

ATP e altri nucleotidi, così come i nucleosidi, sono importanti molecole di segnalazione extracellulare che operano attraverso una complessa rete di segnalazione purinergica. Questa rete è composta da un numero di recettori di membrana ed ectoenzimi, che includono il recettore P2X7 (P2X7R). La famiglia P2X dei canali cationici trimerici è costituita da sette membri distinti (P2X1-7). Della famiglia P2X, la subunità monomerica P2X7 è la più grande. La subunità P2X7 è caratterizzata da una relativamente breve e lunga terminazione intracellulare amino- e carbossi terminale rispettivamente, così come da due segmenti idrofobici che attraversano la membrana (domini transmembrana) separati da un lungo dominio extracellulare per il legame di ATP. La breve esposizione di P2X7R ad ATP provoca un'apertura veloce (millisecondi) di un canale che rende la membrana plasmatica permeabile a ioni caricati positivamente, causando un aumento di Ca²⁺ e Na⁺ intracellulare e una diminuzione simultanea delle concentrazioni intracellulari di K⁺. Al contrario, l'esposizione prolungata all'ATP del P2X7R causa l'apertura di un grande poro transmembrana permeabile a

molecole idrofile di peso molecolare fino a 900 Da. Molte vie di segnalazione intracellulare sono state associate all'attivazione P2X7R. Queste includono l'attivazione dell'infimmasoma NLRP3 contenente caspasi-1 e la successiva elaborazione e rilascio di citochine pro-infiammatorie IL-1b e IL-18, nonché la produzione di specie di ossigeno reattivo (ROS) e azoto (NO) e la formazione di fagolisosomi e la successiva eliminazione di patogeni intracellulari. L'attivazione dell'infimmasoma NLRP3 dopo il coinvolgimento di P2X7R dipende dall'efflusso di K⁺ che è, infatti, considerato l'evento più cruciale nell'attivazione di NLRP3. Inoltre, anche il ROS generato dopo l'attivazione di P2X7R è responsabile della reclutamento dell'infimmasoma NLRP3 e della produzione di IL-1b. Risultati preliminari inediti del nostro gruppo hanno rivelato la presenza di P2X7R nel plasma e una correlazione con i livelli di proteina C reattiva (CRP). L'inibizione del P2X7R ha inoltre mostrato effetti benefici nella nefrite lupica sia nei topi MRL / lpr che NZM 2328. Infatti, l'inibizione di questo recettore attraverso brilliant blue G o attraverso il siRNA di P2X7R ha bloccato lo sviluppo di anticorpi anti-dsDNA, la deposizione di immunocomplessi e l'infiammazione renale⁵.

2.2 Effetto della colchicina su P2X7R

La colchicina, un farmaco usato per curare la gotta e la febbre mediterranea familiare, può inibire il pori P2X7R. I recettori purinergici si associano alla matrice citoscheletrica mediante legame di b-tubulina e sono in grado di formare un complesso proteico. I microtubuli sono in grado di influenzare la permeabilizzazione. La colchicina e relativi estratti vegetali sono stati utilizzati per più di 2000 anni per trattare la gotta e prevenire nuovi attacchi. Il suo target molecolare principale è la b-tubulina, con la quale forma un complesso che impedisce la polimerizzazione del microtubulo e, a concentrazioni elevate, provoca la depolimerizzazione del microtubulo. Le proprietà anti-infiammatorie della colchicina sono ben caratterizzate in vari modelli di infiammazione.

Diverse attività dipendenti dal P2X7R dipendono dal trattamento con colchicina. In particolare la distruzione del microtubulo nei macrofagi da parte della colchicina inibisce il rilascio di IL-1b dipendente dal P2X7 attivato da ATP⁶

ORIGINALITA' DEL PROGETTO

Il lupus costituisce il prototipo della patologia autoimmune con ampio spettro di manifestazioni cliniche. Una tipica manifestazione della malattia è la sierosite (pericardica, pleurica e addominale) che risponde prontamente alla terapia con colchicina e steroide. Le sierositi sono spesso associate con un marcato incremento degli indici di flogosi come la proteina C reattiva (PCR), un evento infrequente nel lupus se non nei casi di eventi infettivi. Anche se considerata il prototipo di patologia autoimmune mediata da linfociti B e T, studi recenti hanno focalizzato l'attenzione sul coinvolgimento dell'immunità innata nella patogenesi del LES. I modelli murini di glomerulonefrite lupica infatti, hanno evidenziato come l'attivazione di NLRP3 infiammasoma attivato tramite P2X7R possa esercitare un ruolo patogenetico importante. E' nota inoltre l'azione della colchicina nelle malattie mediate da IL-1 β attraverso l'effetto sui microtubuli durante l'assemblamento di P2X7R. La colchicina riduce inoltre il rilascio di IL1b mediata da P2X7R ed è un ottimo farmaco nel trattamento delle sierositi lupiche.

DISEGNO DELLO STUDIO

Studio pilota caso-controllo di valutazione dell'espressione di P2X7R nei pazienti lupici che sviluppano sierosite.

OBIETTIVO PRIMARIO

Lo scopo del presente studio è quello di esplorare in modo più approfondito il ruolo del sistema immunitario innato in SLE in primo luogo valutando l'espressione e l'attività di P2X7R e NLRP3 nei pazienti con lupus con una storia di serositi.

OBIETTIVI SECONDARI

- valutare un possibile legame tra espressione P2X7R e NLRP3 e attività di malattia.
- valutare eventuali variazioni dell'espressione P2X7R in corso di sierosite e dopo la remissione dello stessa.
- valutare un possibile rapporto tra espressione P2X7R e NLRP3 e positività autoanticorpali (anti-dsDNA, complemento) e marcatori infiammatori.
- Esaminare una possibile correlazione dell'espressione P2X7R con i livelli sierici delle più importanti citochine infiammatorie, cioè IL-1b, IL-6 e IL-18.

RICADUTE CLINICHE: BENEFICI PER I PAZIENTI AFFETTI DA LES

Il LES è una malattia eterogenea con un ampio spettro di manifestazioni cliniche. Questo studio si propone di analizzare una possibile pathway patogenetica (P2X7R) implicata nella comparsa di sierositi. Dal punto di vista clinico P2X7R potrebbe diventare un nuovo biomarcatore di malattia in grado di identificare un sottogruppo di pazienti potenzialmente a rischio per lo sviluppo di sierosite e candidabili a nuovi target terapeutici.

DURATA DELLO STUDIO

Due anni: 3 mesi per procedure di approvazione del comitato etico, 18 mesi per arruolamento ed esecuzione delle procedure richieste dallo studio, 3 mesi per analisi dei dati.

RISULTATI ATTESI

I pazienti affetti da lupus con sierositi dovrebbero presentare un'espressione di P2X7R aumentata sulle cellule mononucleari o un aumento del rilascio di IL-1b rispetto ai pazienti affetti da lupus liberi da sierositi. Inoltre, livelli più alti di P2X7R nel plasma, sia solubili o associati a microvesicole, dovrebbero correlare con il livello PCR e l'attività della malattia.

METODOLOGIA

ARRUOLAMENTO

I pazienti saranno reclutati consecutivamente dalla clinica dedicata alla LES dell'Unità Reumatologica dell'Ospedale Universitario di Sant'Anna di Ferrara (Italia). Lo studio dovrà essere approvato dal Comitato Etico locale dell'Ospedale Universitario di Ferrara (Italia) ed ottenuto il consenso scritto di ciascun partecipante in conformità ai principi descritti nella Dichiarazione di Helsinki

CRITERI DI INCLUSIONE

Gruppo testato: 30 pazienti lupici di età superior ai 18 anni soddisfacenti i criteri classificativi del 1997 dell' American College of Rheumatology con storia di sierosite.

Gruppo di controllo: 30 pazienti lupici di età superiore ai 18 anni soddisfacenti i criteri classificativi del 1997 dell' American College of Rheumatology senza storia di sierosite..

Controlli santi: appaiati per sesso e per età.

CRITERI DI ESCLUSIONE

Pazienti trattati nei sei mesi precedent i con colchicina.

Pazienti con patologia autoimmune concomitante (artrite reumatoide, altre connettiviti, gotta ecc), neoplasia o infezioni..

VALUTAZIONE CLINICA

- Variabili demografiche: sesso, età, durata della malattia
- Storia di malattia: tipo di interessamento
- Laboratorio: anticorpi, complemento, markers della infiammazione
- Clinimetria: SLEDAI-2K, SLICC-DI, VAS-PhGA,
- Dosaggio complemento (C3, C4), ANA, ENA, anti-dsDNA, VES, PCR
- Terapia: storia farmacologica (trattamenti pregressi e in atto)

TEST CELLULARI

I campioni venosi periferici saranno prelevati in EDTA. Il plasma verrà separato per centrifugazione a 2500 giri / min per 15 minuti a 4 ° C e conservato a -80 ° C fino all'impiego per rilevazione P2X7R solubile (sP2X7R) mediante ELISA. In alcuni casi, una parte del campione di plasma verrà centrifugata a 25.000 g per 60 minuti a 4 ° C per ottenere la separazione dei micro-vescicole. Le vescicole saranno risospese in tampone salino con inibitori della proteasi e lisati da cicli di congelamento e scongelamento ripetuti.

Le cellule mononucleari (linfo-monociti) saranno isolate dal sangue intero per centrifugazione su gradiente Ficoll. Dopo tre lavaggi con PBS le cellule saranno placcate su 12 pozzetti a densità di 5x10⁵ cellule per pozzetto in 1 ml di RPMI + 10% FBS senza antibiotici. I monociti saranno fatti aderire alla piastra dopo incubazione di notte a 37 ° C in 5% di CO₂. Le cellule saranno trattate per 4 ore con 1 µg / ml di LPS in RPMI. Successivamente l'agonista P2X7R, ATP o Benzoyl-ATP (Bz-ATP) sarà aggiunto a diverse concentrazioni alle cellule. In alcuni esperimenti, le cellule saranno pre-trattate colchicina per 1 ora prima dell'incubazione di ATP o Bz-ATP. Alla fine della stimolazione, il supernatante verrà raccolto, centrifugato e conservato a -80 ° C

fino a quando l'impiego per la misurazione di IL-1 β mediante ELISA. Le cellule saranno risospese in tampone salino con inibitori della proteasi e lisati come sopra. I lisati saranno sottoposti a SDS-PAGE seguiti da un'analisi di western-blot con anti-P2X7R, anticorpi anti-NLRP3 o anti-ASC. In alternativa, le cellule saranno risospese in Trizol per l'estrazione di RNA e successiva RT-PCR per rilevare mRNA per P2X7R e NLRP3.

P2X7R e IL-1 β ELISA

sP2X7R nei campioni di plasma verrà rilevato utilizzando il kit P2IS P2X purinoceptore 7, P2RX7 Kit ELISA di Cusabio, seguendo le istruzioni del produttore.

I livelli di IL-1 β , IL-6 e IL-18 nei seri o nei supernatanti ottenuti da colture di cellule mononucleari saranno misurate utilizzando il kit ELISA Quantikine IL-1 beta / IL-1F2, il kit ELISA umano IL-6 e il kit ELISA IL-18 / IL-1F4 rispettivamente, tutti da R & D Systems, seguendo le istruzioni del produttore.

BUDGET COMPLESSIVO

Stima dei costi

MATERIALI E CONSUMABILI: REAGENTI

Ficoll Paque plus 6x500 ml	750 euro
Kit ELISA R&D per IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-8	3500 euro
Benzoil ATP (Sigma) (2x25 mg)	750 euro
Kit per estrazione RNA (50 estrazioni)	300 euro
Kit per retrotrascrizione (200 retrotrascrizioni)	730 euro

TOTALE MATERIALE E CONSUMABILI **6030 euro**

PERSONALE: costi borsa di studio per personale dedicato/anno

(impegno orario previsto 12 ore/settimana) **8000 euro**

TOTALE PERSONALE **16000 euro**

COSTI AMMINISTRATIVI E DI GESTIONE **2000 euro**

TOTALE **24030 euro**

DICHIARAZIONE DI ASSENZA DI CONFLITTI DI INTERESSE

La sottoscritta Alessandra Bortoluzzi nata a Belluno il 06/05/1981 e residente a Ferrara (FE) in Corso Ercole I d'Este N° 14, CF. BRTLSN81E46A757Y, in qualità di proponente scientifico del progetto dal titolo "Lupus eritematoso sistemico (LES) e P2X7R: studio pilota di valutazione del ruolo patogenetico di P2X7 nelle sierositi lupus correlate" e consapevole che chiunque rilasci dichiarazioni mendaci è punito a norma del codice penale e delle leggi speciali in materia, DICHIARA ai sensi e per gli effetti dell'art. 48, comma 25, del d.l. 269/2003, convertito in legge 25/11/2003 n. 326, l'assenza di conflitto di interessi e l'assenza di legami di parentela con i membri del Consiglio Direttivo del Gruppo LES Italiano.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Pattern recognition receptors as potential therapeutic targets in inflammatory rheumatic disease. Lisa M Mullen et al. *Arthritis Research and Therapy* (2015) 17:122
- 2 The Inflammasome and lupus- another innate immune mechanism contributing to disease pathogenesis?
J. Michelle Kahlenberg¹ and Mariana J. Kaplan. *Curr Opin Rheumatol*. 2014 September ; 26(5): 475–481
- 3 Pontillo A, Girardelli M, Kamada A, et al. Polymorphisms in inflammasome genes are involved in the predisposition to systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*. 2012; 45(4):271–8
- 4 Kahlenberg JM, Thacker SG, Berthier CC, et al. Inflammasome activation of IL-18 results in endothelial progenitor cell dysfunction in systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 2011 Dec 1; 187(11):6143–56
- ⁵ P2X7 Blockade Attenuates Murine Lupus Nephritis by Inhibiting Activation of the NLRP3/ASC/Caspase 1 Pathway. Jijun Zhao et al. *Arthritis Rheum*. 2013 December ; 65(12): 3176–3185
- 6 Many ways to dilate the P2X7 receptor pore. Pelegrín P et al. *Br J Pharmacol*. 2011 Jul;163(5):908-11.