



A.D. MDLXII

## **UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI**

**DOTTORATO IN SCIENZE BIOMEDICHE**  
**Indirizzo in Farmacologia di Genere**  
(XXIII ciclo)

**Espressione del recettore  $\alpha$  degli estrogeni sulla  
membrana plasmatica dei linfociti: implicazioni  
nella patogenesi del Lupus Eritematoso Sistemico**

COORDINATORE: Prof. Eusebio Tolu

TUTORE: Prof.ssa Flavia Franconi

TESI DI DOTTORATO DI:

Dr.ssa Angela Maselli

Anno Accademico 2009 – 2010

# INDICE

<b>INDICE</b>	2
<b>SOMMARIO</b>	4
<b>INTRODUZIONE</b>	6
ESTROGENI	6
Recettori degli estrogeni e loro meccanismo d'azione	8
Ruolo degli estrogeni nella modulazione della risposta immunitaria	14
AUTOIMMUNITA'	17
LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO (LES)	20
<b>SCOPO DEL LAVORO</b>	26
<b>MATERIALI E METODI</b>	27
Pazienti	27
Isolamento dei linfociti e condizioni di coltura	28
Trattamenti	29
Purificazione delle proteine di membrana	32
Saggio ELISA	32
Purificazione di anticorpi anti-ER $\alpha$ dal siero di pazienti LES	34
Analisi mediante citometria a flusso	35
Estrazione proteica e analisi mediante Western Blot	40
Analisi statistica	42
<b>RISULTATI</b>	43
<b>Espressione sulla membrana plasmatica linfocitaria dell'isoforma ER<math>\alpha</math>46</b>	43

<b>Funzionalità di mER<math>\alpha</math>46 dopo trattamento con E2-BSA</b>	46
<b>Presenza di anticorpi anti-ER<math>\alpha</math> nel siero di pazienti con LES</b>	52
<b>Effetti immunologici di anticorpi anti-ER<math>\alpha</math> isolati dal siero di pazienti con LES</b>	55
<i>Legame degli anticorpi anti-ER<math>\alpha</math> al recettore mER<math>\alpha</math>46</i>	55
<i>Attivazione di ERK</i>	57
<i>Apoptosi ed espressione di molecole di attivazione e di morte cellulare (i.e. HLA-DR, CD95, CD95L, Bcl-2)</i>	59
<i>Proliferazione cellulare</i>	65
<b>DISCUSSIONE</b>	67
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	74

## SOMMARIO

Numerose evidenze epidemiologiche, immunologiche e cliniche suggeriscono che gli ormoni sessuali, in modo particolare gli estrogeni, svolgono un ruolo importante nell'insorgenza e nel decorso delle malattie autoimmuni. In particolare è stato dimostrato che gli estrogeni ed il loro recettore  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) sono implicati nella patogenesi del lupus eritematoso sistemico (LES). Nel LES è stata dimostrata una profonda alterazione dell'omeostasi linfocitaria che porta alla produzione di differenti autoanticorpi IgG patogenetici, inclusi autoanticorpi anti-ER. Lo studio del possibile ruolo degli anticorpi anti-ER nel modulare l'omeostasi linfocitaria attraverso il legame a recettori di membrana potrebbe aprire nuove prospettive alla comprensione della patogenesi del LES. Per tale motivo abbiamo inizialmente verificato l'espressione e la funzionalità di ER a livello della membrana plasmatica linfocitaria. Successivamente, abbiamo indagato la presenza di anticorpi anti-ER nel siero dei pazienti con LES ed analizzato il loro ruolo nell'omeostasi T linfocitaria. Abbiamo dimostrato la presenza di anticorpi anti-ER $\alpha$  nel siero del 45% dei pazienti con LES. Questi anticorpi sono in grado di indurre apoptosi e attivazione dei linfociti T "resting" ed, inoltre, di aumentare la proliferazione dei linfociti T stimolati con anti-CD3. Abbiamo, anche, osservato che i livelli di anticorpi anti-ER $\alpha$  sono associati, significativamente, all'attività della malattia, i.e. "Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index", SLEDAI.

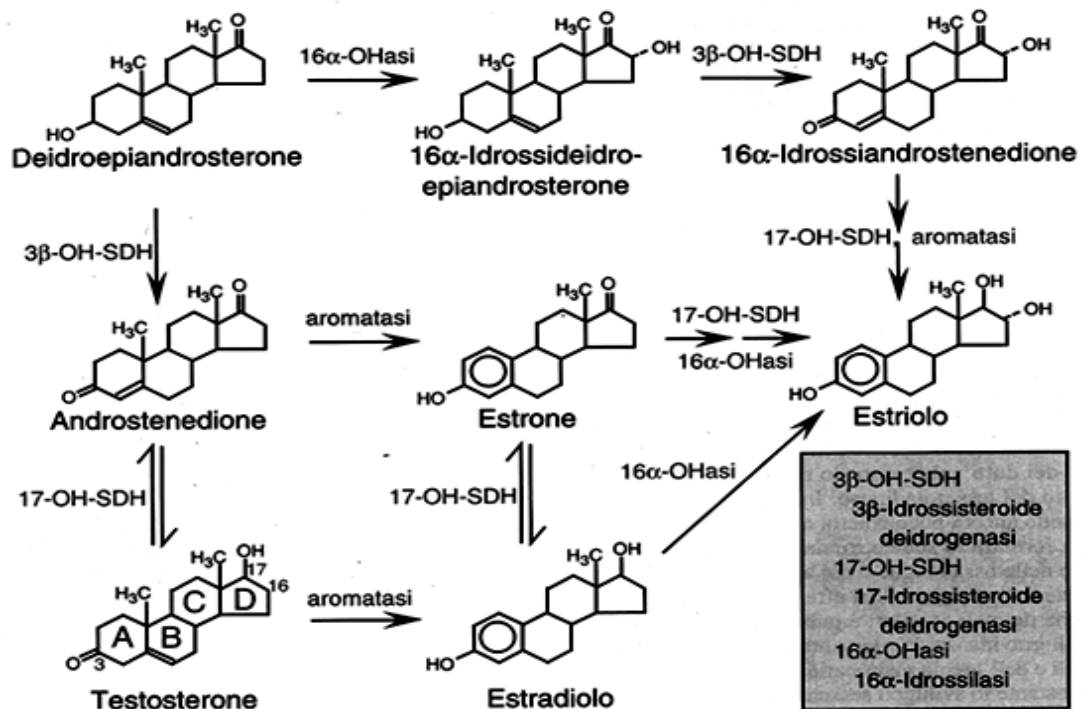
In conclusione, i risultati ottenuti, evidenziano un ruolo patogenetico degli anticorpi anti-ER $\alpha$  nel LES. Quindi, una terapia mirata a modulare le risposte immunitarie mediate dagli anticorpi anti-ER $\alpha$  potrebbe essere utile a contrastare l'attività della malattia.

# INTRODUZIONE

## ESTROGENI

Gli estrogeni sono ormoni sessuali steroidei che giocano un ruolo importante nel regolare la maturazione e l'attività funzionale dei linfociti, sebbene i meccanismi attraverso i quali agiscono non sono ancora ben compresi <sup>1 2 3</sup>.

Essi sono steroidi a 18 atomi di carbonio (C<sub>18</sub>), contenenti 3 cicloesani (A, B, C) ed un ciclopentano (D); l'anello A è fenolico (un anello aromatico con un gruppo idrossilico sul carbonio 3) e l'anello D può avere un gruppo β-idrossilico o un chetone in posizione 17. Gli estrogeni sono formati a partire dal colesterolo e l'androstenedione o il testosterone sono i precursori immediati. La reazione coinvolge l'aromatizzazione dell'anello A ed è catalizzata in 3 tappe dal complesso enzimatico monoossigenasi (aromatasi) che utilizza come co-substrati il NADPH e l'ossigeno molecolare <sup>4</sup>. I precursori estrogenici vengono principalmente sintetizzati nelle ovaie, nei testicoli e nelle ghiandole surrenali. Gli estrogeni naturali più potenti nella specie umana sono il 17β-estradiolo (E2), seguito dall'estrone (E1) e dall'estriolo (E3) (Fig. 1). L'anello fenolico A è la principale caratteristica strutturale responsabile del legame selettivo ad alta affinità ai recettori per gli estrogeni <sup>5 6</sup>.



Goodman A., (ed. 1997), McGraw-Hill<sup>7</sup>

### Fig. 1. La via biosintetica degli estrogeni.

La reazione di sintesi degli estrogeni dai precursori immediati (androstenedione o testosterone) coinvolge l'aromatizzazione dell'anello A ed è catalizzata in tre tappe dal complesso enzimatico monoossigenasi (aromatasi). I precursori immediati sono sintetizzati dal colesterolo, in seguito ad una serie di reazioni biochimiche specifiche (non mostrato).

Accanto al principale ruolo nella regolazione dello sviluppo e delle funzioni nel sistema riproduttivo, gli estrogeni esplicano importanti effetti anche in altri tessuti e sistemi, essendo fattori che regolano la trascrizione genica <sup>3</sup>. Le osservazioni riguardanti l'azione svolta dagli estrogeni sul sistema immunitario, anche se ampiamente dimostrate, ancora risultano non chiare e in alcuni casi contraddittorie, e questo, probabilmente, a causa di numerose variabili come il tipo di estrogeno, la concentrazione ormonale ematica e/o tissutale, il legame con il recettore, l'ambiente neuroendocrino in cui avviene la reazione, e le diverse metodiche utilizzate nelle analisi.

## **Recettori degli estrogeni e loro meccanismo d'azione**

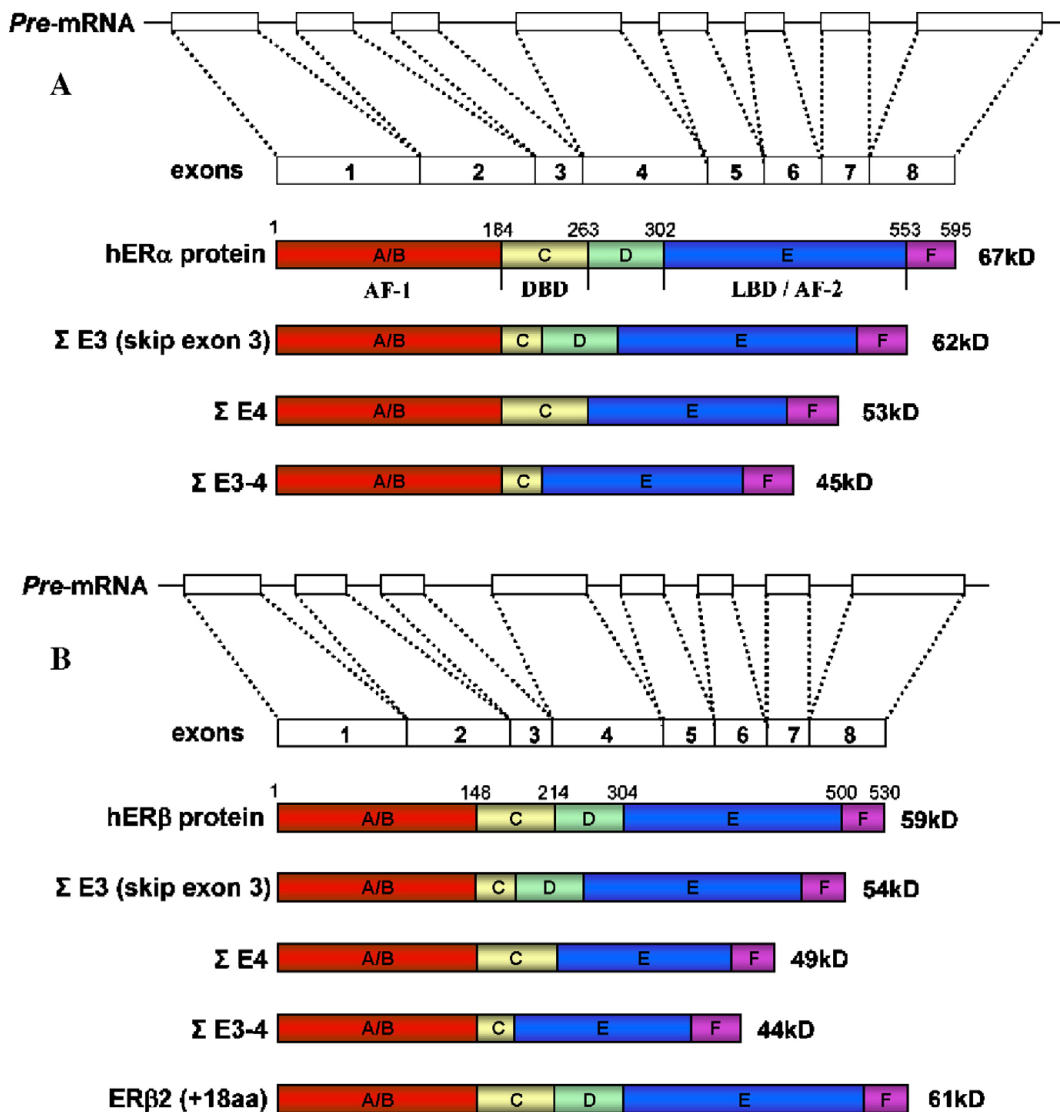
Gli effetti biologici degli estrogeni sono mediati dal legame di questi ormoni ad uno specifico recettore (ER) intracellulare, appartenente alla superfamiglia dei recettori nucleari dei fattori di trascrizione, che esiste in due isoforme, ER $\alpha$  (peso molecolare di 66 kDa) ed ER $\beta$  (peso molecolare di 56 kDa). Entrambe le isoforme hanno una struttura conservata che consta di cinque diversi domini: i) la regione ammino-terminale, detta "A/B domain", che è la meno conservata e che contiene un dominio detto AF-1 ("Activation Function 1"), che stimola la trascrizione dei geni bersaglio in modo indipendente dal ligando; ii) il dominio C o di legame al DNA ("DNA Binding Domain", DBD), che è il più conservato; iii) il dominio D, una regione cerniera ("hinge"), che collega il dominio C al dominio E e può



anche contenere sequenze di localizzazione nucleare (“Nuclear Localization Signal”, NLS); iv) la regione E che, oltre ad essere il dominio di legame del ligando (“Ligand Binding Domain”, LBD), contiene un dominio per la dimerizzazione recettoriale; a livello dell’LBD è localizzato il dominio AF-2 (“Activation Function 2”), coinvolto nella trascrizione ligando-dipendente; v) la regione carbossi-terminale F che è poco conservata ed è presente solo in alcuni recettori nucleari, tra cui entrambe le isoforme dei recettori per gli estrogeni (Fig. 2) <sup>8 9</sup>. Nel momento in cui l’ormone si lega al proprio recettore, quest’ultimo dimerizza, dal citoplasma trasloca nel nucleo, e si lega a specifiche sequenze di DNA dette “estrogen response elements” (ERE), che sono localizzate a livello dei promotori di geni specifici, dando luogo ad effetti definiti “genomici” <sup>10</sup>. L’attività trascrizionale dei due ER dipende dalla loro capacità di reclutare coattivatori e corepressori, che regolano in maniera opposta l’assemblaggio del complesso di inizio della trascrizione <sup>9</sup>.

In recenti studi è stata messa in evidenza l’esistenza di varianti di ER $\alpha$  a più basso peso molecolare rispetto a quella di 66 kDa (Fig. 2) <sup>8</sup>. Tra queste varianti l’isoforma di 46 kDa è stata identificata in vari tipi cellulari come linee cellulari di carcinoma mammario umano (MCF-7), osteoblasti, e cellule endoteliali vascolari; tale proteina, priva della regione ammino-terminale (“A/B domain”), contenente il dominio AF-1, è in grado di formare eterodimeri con l’isoforma di 66 kDa, inibendo in maniera competitiva il legame di quest’ultima al DNA <sup>11 12 13</sup>. Sebbene tale attività

sembra essere importante nella regolazione della proliferazione cellulare, il ruolo specifico dell'isoforma di 46 kDa non è stato ancora ben chiarito.



Zhao L. et al, *Brain Res Brain Res Rev*, 2005<sup>8</sup>

**Fig. 2. Organizzazione del gene, domini di struttura proteica e varianti di splicing delle due isoforme ER $\alpha$  e ER $\beta$ .**

I geni di entrambe le isoforme sono costituiti da 8 esoni interrotti da lunghe sequenze di introni. Le varianti di splicing, sia di ER $\alpha$  che di ER $\beta$ , mostrano delle delezioni a livello degli esoni 3 e 4.

Negli ultimi anni è stato dimostrato che gli estrogeni possono indurre molto rapidamente, entro anche pochi minuti, alcune risposte cellulari, che non hanno, quindi, il tempo di poter essere mediate da proteine trascritte e sintetizzate *ex novo*, in seguito al legame con i recettori intracellulari. Questi effetti così rapidi, mediati dagli estrogeni, e definiti “non genomici”, avvengono attraverso l’attivazione di ER presenti sulla membrana plasmatica cellulare (mER). Essi presentano una struttura simile a quella dei recettori intracellulari ed innescano rapidamente una cascata di trasduzione del segnale mediata da proteine chinasi come la proteina chinasi attivata da mitogeni/regolata dai segnali extracellulari (MAPK/ERK), le proteine chinasi A e C (PKA e PKC) e la fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K) <sup>14 15</sup>. Gli effetti rapidi indotti dal legame degli estrogeni con i mER possono interferire e modulare quelli “genomici” mediati dai ER intracellulari, coinvolgendo segnali sia intermedi che a valle della cascata di trasduzione del segnale <sup>16 17</sup>. Alcuni studi hanno dimostrato che i mER sono localizzati all’interno delle caveole, piccole invaginazioni della membrana plasmatica, ricche di colesterolo e sfingolipidi, e caratterizzate dalla presenza di proteine denominate caveoline, che, interagendo con le molecole della via di trasduzione del segnale, ne innescano l’attivazione. Il trasporto del recettore degli estrogeni all’interno di tali strutture è consentito dal legame tra il suo residuo di serina 522 e la caveolina-1 <sup>18</sup>. Marino e collaboratori hanno inoltre osservato che il residuo di cisteina 447, presente nella regione E dell’isoforma ER $\alpha$ , può subire una modificazione post-traduzionale di palmitoilazione, ossia legarsi, mediante

legame tioestereo, ad una unità di acido palmitico. Anche tale modificazione consente il legame con la caveolina-1<sup>14</sup>. Il processo di palmitoilazione, oltre ad essere necessario per la localizzazione dei ER a livello della membrana plasmatica, svolge un ruolo importante nell'induzione dei segnali rapidi di trasduzione che modulano la proliferazione cellulare, mediante le proteine chinasi ERK e PI3<sup>19</sup>. E' stato dimostrato che il legame di mER al proprio ligando modula la palmitoilazione di ER $\alpha$  e di ER $\beta$ ; in particolare, in linee tumorali, la stimolazione con estradiolo consente, da un lato, la dissociazione di ER $\alpha$  dalla caveolina-1, con conseguente innesco di segnali di proliferazione cellulare, e, dall'altro, aumenta l'associazione tra ER $\beta$  e caveolina-1, con conseguente attivazione della proteina chinasi p38, e quindi induzione del processo apoptotico<sup>20 21</sup>. ER sulla membrana plasmatica rappresentano il 5-10% del totale di ER in vari tipi cellulari. Tale percentuale include sia ER $\alpha$  che ER $\beta$ , ma è stata osservata una diversa espressione delle due isoforme a seconda del tipo cellulare. Ad esempio, nelle cellule endoteliali vascolari sono state rilevate in membrana entrambe le isoforme<sup>22</sup>, mentre nelle linee cellulari MCF-7 risulta essere espressa in membrana principalmente ER $\alpha$  e scarsamente ER $\beta$ <sup>19</sup>.

Per quanto riguarda i linfociti, diversi studi hanno dimostrato l'espressione intracellulare di entrambe le isoforme ER $\alpha$  ed ER $\beta$ , sia come mRNA<sup>23</sup>, sia come proteina<sup>24</sup>. Un nostro recente studio ha evidenziato, in linfociti B e T ed in cellule NK, derivati dal sangue periferico umano di

donatori sani, l'espressione a livello intracellulare, sia di ER $\alpha$ , in particolar modo della variante ER $\alpha$ 46, sia di ER $\beta$  <sup>25</sup>.

La presenza di tali recettori a livello della membrana plasmatica nelle cellule del sistema immunitario è stata scarsamente indagata. In modelli murini, Benten e collaboratori hanno dimostrato l'espressione di mER nei linfociti T <sup>26</sup> e nei macrofagi <sup>27</sup>, ma non nei linfociti B <sup>28</sup>. A tutt'oggi non esistono dati in letteratura che dimostrano la presenza di tali recettori a livello della membrana plasmatica linfocitaria nell'uomo.

## **Ruolo degli estrogeni nella modulazione della risposta immunitaria**

Gli estrogeni rivestono un ruolo importante nelle differenze di genere riscontrate nella suscettibilità alle infezioni, virali e parassitarie, e nell'insorgenza di malattie autoimmuni <sup>9 29 30 31</sup>. La donna presenta una risposta immune, sia umorale che cellulo-mediata, più forte rispetto all'uomo; in particolare, nella donna, sono state dimostrate più alte concentrazioni sieriche di immunoglobuline, un numero più elevato di linfociti T, e maggiore produzione di citochine in risposta ad agenti infettivi, con la conseguenza che le donne sono più resistenti ad infezioni e tumori <sup>2 32</sup>.

Nell'immunità innata è stato osservato che gli estrogeni inducono un aumento del numero dei granulociti ed una diminuzione del numero dei monociti e delle cellule NK <sup>2</sup>. In particolare, nei monociti è stato dimostrato che gli estrogeni regolano l'apoptosi, e quindi il numero di queste cellule,

incrementando l'espressione della proteina pro-apoptotica FasL<sup>33</sup>. Inoltre gli estrogeni sembrano influenzare la produzione di citochine da parte dei monociti<sup>34</sup>, diminuire l'attività chemotattica ed aumentare l'espressione dell'ossido nitrico sintasi nei neutrofili<sup>35 36</sup>, sopprimere l'attività delle cellule NK<sup>37 38</sup>.

Per quanto riguarda l'immunità acquisita, in particolare il comparto T cellulare, è stato dimostrato che gli estrogeni influenzano in primo luogo lo sviluppo dei timociti. Infatti, è stato osservato che gli estrogeni sono in grado di indurre atrofia timica con una diminuzione della porzione corticale rispetto alla midollare e conseguente riduzione dei timociti<sup>39 40 41</sup><sup>42</sup>. I meccanismi che intervengono in questo processo sono molteplici: i) la diminuzione dei precursori che migrano dal midollo osseo al timo; ii) la deplezione dei progenitori timici precoci; iii) la iporesponsività dei timociti a proliferare in risposta a stimoli recettoriali. Gli estrogeni potrebbero contribuire agli effetti sui timociti modulando la produzione dell'interleuchina-7 (IL-7), importante nella linfopoiesi, e svolgendo un'azione pro-apoptotica, agendo sul sistema Fas/FasL<sup>43 41 44</sup>.

Numerosi studi hanno dimostrato, inoltre, che gli estrogeni favoriscono la differenziazione del fenotipo CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup> e sono in grado di influenzare le risposte di Tipo1 (mediate da IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$ , IL-2) e di Tipo2 (mediate da IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13)<sup>45 46</sup>. In alcuni casi è stato osservato un aumento della risposta di Tipo1, mentre in altri un aumento della risposta di Tipo2. Questo doppio effetto degli estrogeni sembra esser correlato alla concentrazione sierica dell'ormone stesso. Infatti, basse dosi di estrogeni

promuovono una risposta di Tipo1 e favoriscono l'immunità cellulo-mediata; è stato dimostrato che la risposta di Tipo1 indotta da un basso dosaggio degli estrogeni, *in vivo*, richiede la presenza di ER $\alpha$ , ma non di ER $\beta$ , a livello del compartimento ematopoietico <sup>45</sup>. Alte dosi dell'ormone, invece, promuovono una risposta di Tipo2. Questo potrebbe spiegare in gravidanza: i) il prevalere della risposta immunitaria umorale, che protegge il feto da un attacco immune cellulo-mediato; ii) il miglioramento della sintomatologia di malattie autoimmuni mediate da risposte di Tipo1 (ad es. l'artrite reumatoide e la sclerosi multipla); iii) l'aggravarsi del quadro clinico delle pazienti affette da lupus eritematoso sistemico (LES), patologia mediata da risposte di Tipo2 <sup>47 48 49 24</sup>.

Per quanto riguarda il comparto B cellulare, alcuni studi su modelli animali hanno mostrato che gli estrogeni svolgono un ruolo importante anche nello sviluppo dei linfociti B. In particolare, tali ormoni, da un lato, sembrano essere responsabili di una difettosa selezione dei progenitori delle cellule B nel midollo osseo e, dall'altro, invece, favoriscono la sopravvivenza dei linfociti B maturi nella milza <sup>50 51</sup>. Studi, *in vitro*, hanno inoltre dimostrato che gli estrogeni inducono un'attivazione policlonale dei linfociti B umani, causando un aumento della produzione di IgG ed IgM. In aggiunta, essi stimolano i linfociti B di pazienti affetti da LES a produrre autoanticorpi <sup>52</sup>. Studi su modelli animali hanno evidenziato che gli estrogeni inducono anche uno "switch" isotipico degli anticorpi favorendo la produzione di IgG, soprattutto delle sottoclassi IgG2b e IgG1 <sup>53</sup>.



## AUTOIMMUNITA'

Una delle caratteristiche più rilevanti del sistema immunitario è la capacità di discriminare tra antigeni "self" e non "self". La mancata responsività del sistema immune verso i componenti autologhi dell'organismo è chiamata tolleranza al "self". Si distingue una tolleranza centrale, a livello degli organi linfoidei primari (nell'adulto, milza e midollo osseo), ed una tolleranza periferica, negli organi linfoidei secondari (linfonodi, milza e tessuto linfoide associato alle mucose)<sup>54</sup>. Uno dei principali meccanismi responsabili del mantenimento della tolleranza centrale e periferica è l'apoptosi ed un suo difetto conduce a risposte immuni verso i propri costituenti antigenici<sup>55 56</sup>. L'inefficienza dei normali meccanismi responsabili della tolleranza al "self" si traduce nell'autoimmunità e le malattie ad essa legate vengono denominate malattie autoimmuni<sup>57</sup>.

Le malattie autoimmuni possono essere: i) organo-specifiche, caratterizzate dalla presenza di infiltrati linfocitari in un solo organo e/o tessuto, e dovute prevalentemente a risposte, autoanticorpali o mediate da cellule T, contro antigeni con distribuzione tissutale limitata (es. tiroidite di Hashimoto, diabete giovanile); ii) sistemiche, caratterizzate da lesioni estese in tutto l'organismo, e dovute alla formazione in circolo degli immunocomplessi (lupus eritematoso sistemico, artrite reumatoide, sclerodermia)<sup>58</sup>.

Le malattie autoimmuni possono essere causate da: i) anticorpi che si legano ad antigeni espressi da particolari cellule o tessuti; ii) complessi antigene-anticorpo (immunocomplessi) circolanti che si depositano a livello tissutale; iii) linfociti T diretti contro antigeni presenti nei tessuti. I meccanismi effettori del danno tissutale mediato da anticorpi rivolti contro antigeni espressi da cellule o tessuti sono: i) l'opsonizzazione e la fagocitosi delle cellule; ii) l'infiammazione mediata dall'attivazione del complemento e da cellule esprimenti recettori per Fc; iii) l'interferenza con le normali funzioni fisiologiche della cellula. Gli immunocomplessi possono attivare la via classica del complemento e, di conseguenza, le cellule infiammatorie, in particolare i neutrofili, che innescano il danno tissutale. Infine i linfociti T provocano danno tissutale innescando o una reazione di ipersensibilità ritardata (DTH), mediata dai macrofagi, o, direttamente, la morte nelle cellule bersaglio <sup>58</sup>.

In particolare, gli anticorpi associati alle malattie autoimmuni, definiti autoanticorpi, sono stati raggruppati in tre categorie funzionali <sup>59</sup>:

1) *patogenetici*, che correlano significativamente con l'andamento clinico della malattia, diminuendo di titolo e scomparendo con la guarigione o la remissione, e ripresentandosi in caso di recidiva della malattia; il trasferimento passivo di tali anticorpi in modelli animali induce le alterazioni tipiche della malattia stessa;

2) *non patogenetici*, che correlano con la malattia ma non sono in grado di provocarla nè *in vitro*, nè *in vivo* e possono essere presenti sia prima dell'insorgenza della malattia, sia dopo la guarigione clinica della stessa;

inoltre, possono essere presenti in soggetti apparentemente sani, molti dei quali non svilupperanno mai la malattia;

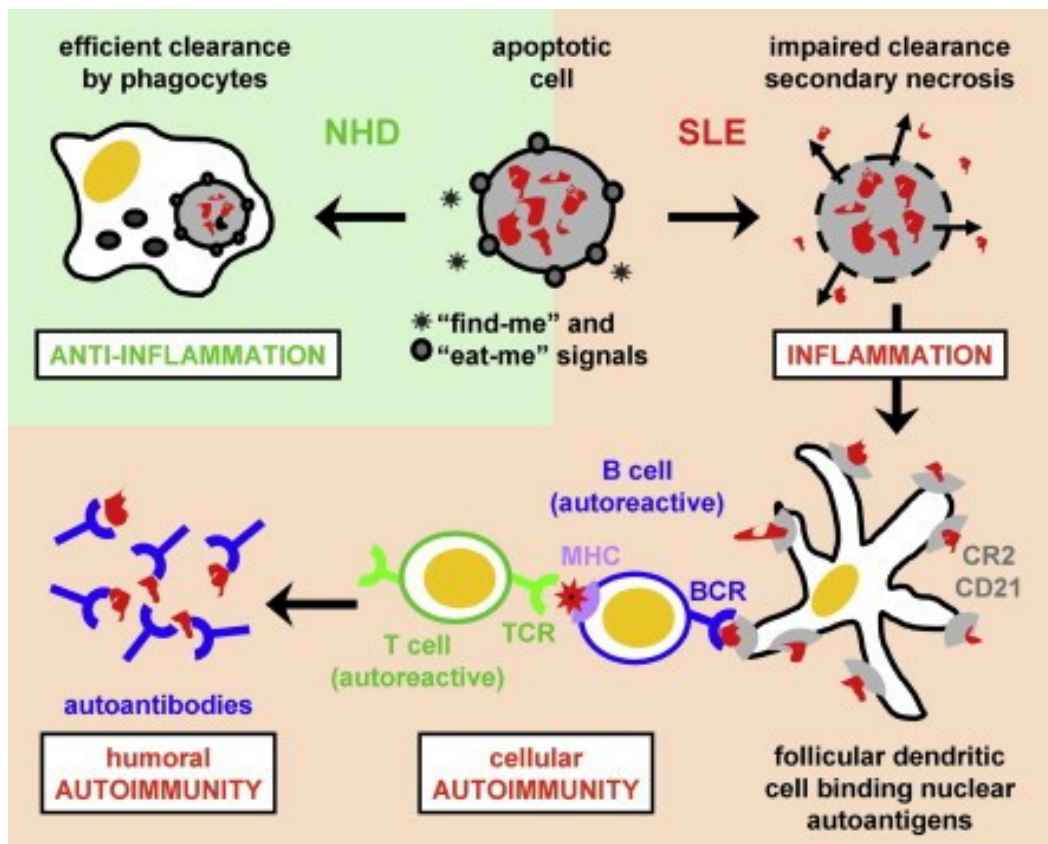
3) *epifenomeni*, che possono comparire in corso di patologia non autoimmune, come conseguenza di necrosi tissutale non immunologicamente mediata (vascolari, batteriche, virali); sono transitori, presenti a basso titolo nei soggetti sani e potrebbero svolgere un ruolo fisiologico utile per l'eliminazione degli autoantigeni.

L'eziologia delle malattie autoimmuni è multifattoriale in quanto influenzata da fattori genetici, ambientali (virus, batteri, farmaci, UV, sostanze alimentari, stress) ed ormonali <sup>60</sup>. Evidenze cliniche e sperimentali suggeriscono che le differenze di genere, ed in particolare gli ormoni sessuali steroidei, abbiano un ruolo fondamentale nell'insorgere dell'autoimmunità. Oltre alle osservazioni sulla modulazione del sistema immunitario da parte degli estrogeni, ampiamente descritte in precedenza, le statistiche di incidenza delle patologie autoimmuni mostrano come la maggior parte di tali patologie siano più frequenti nelle donne. In particolare, l'80% dei soggetti affetti da LES, tiroiditi e sindrome di Sjogren, ed il 60-75% di quelli affetti da sclerosi multipla, miastenia grave ed artrite reumatoide, è di sesso femminile. Alcune malattie autoimmuni, comunque, presentano la stessa incidenza nell'uomo e nella donna (i.e. diabete mellito, sindrome di Bechet) <sup>61</sup>.

## LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO (LES)

Il LES è una malattia flogistica cronica, a patogenesi immunologica, caratterizzata sul piano clinico dall'interessamento di numerosi organi ed apparati <sup>62</sup>. La sintomatologia del LES appare particolarmente multiforme e variabile. Il quadro clinico più frequente è rappresentato dalla comparsa di febbre, dolori articolari, fotosensibilità, pleuropericardite, convulsioni e sindrome nefrosica. Nonostante i numerosi studi finora effettuati, l'eziologia del LES rimane ancora sconosciuta. E' stato ampiamente dimostrato, sia nell'uomo sia in modelli animali, che tale patologia è caratterizzata da profonde alterazioni funzionali dei linfociti tra cui: i) iperattività delle cellule T e B; ii) anomalie nei segnali di interazione tra linfociti T e B; iii) alterata produzione di citochine nei linfociti T; iv) produzione di autoanticorpi patogenetici <sup>63 64 65 66 67</sup>. Inoltre, nel LES, sono stati riscontrati difetti nella rimozione delle cellule apoptotiche da parte dei fagociti, sia *in vitro* che *ex vivo*, con conseguente smascheramento di autoantigeni e loro persistenza in circolo <sup>68 69 70 55</sup>. Le conseguenze immunologiche di questa difettosa rimozione di corpi apoptotici sono rappresentate da un'alterazione nella tolleranza a carico dei linfociti B e T <sup>71 72</sup>. In particolare, Baumann e colleghi hanno dimostrato che, nei pazienti affetti da LES, cellule apoptotiche si accumulano nei centri germinativi dei linfonodi ed il materiale apoptotico rimane legato sulla superficie delle cellule follicolari dendritiche (FDC). Le FDC sono in grado di presentare gli autoantigeni alle cellule B, le quali, dopo essere migrate nella zona

midollare del linfonodo, interagiscono con le cellule T, per poi differenziarsi in plasmacellule produttrici di autoanticorpi e cellule B di memoria <sup>73</sup>. La successione di eventi che, a seguito di una inefficiente eliminazione dei corpi apoptotici, porta allo sviluppo di autoanticorpi è mostrata in figura 3.



Schulze C. et al., *Autoimmun Rev.*, 2008 <sup>55</sup>

**Fig. 3. Effetti dell'inefficace rimozione dei corpi apoptotici nel LES.**

In condizioni normali, l'efficiente rimozione di corpi apoptotici da parte dei fagociti previene la persistenza di autoantigeni in circolo e fenomeni infiammatori. Nei pazienti con il LES le cellule apoptotiche non prontamente eliminate si differenziano in cellule necrotiche secondarie. Queste ultime, perdendo l'integrità di membrana, rilasciano autoantigeni nucleari che vengono presentati alle cellule B autoreattive mediante le FDC. In seguito all'interazione con le cellule T autoreattive, i linfociti B si differenziano in plasmacellule produttrici autoanticorpi, che danno il via alla risposta autoimmune.

Nel LES, modificazioni a livello dei meccanismi epigenetici sembrano inoltre svolgere un ruolo importante nel modulare l'espressione di mediatori della risposta immunitaria; l'accessibilità al DNA, e quindi l'espressione dei geni, è regolata da due processi, la metilazione del DNA e le modificazioni degli istoni. I pazienti affetti da LES presentano un'ipometilazione del DNA nei linfociti T e B, con conseguente aumento dell'espressione di una serie di geni che sono coinvolti nell'incrementata produzione di citochine da parte dei linfociti T CD4<sup>+</sup> e nell'aumentata produzione delle IgG da parte delle cellule B <sup>74 75</sup>.

Fattori genetici, ambientali (infezioni, soprattutto virali, stress, agenti fisici o chimici, raggi UV) ed ormonali svolgono un ruolo chiave nel favorire i disordini dell'immunoregolazione, sopra descritti, che sono alla base della patogenesi della malattia <sup>67</sup>.

L'influenza genetica sull'insorgenza del LES è dovuta all'effetto combinato tra un elevato numero di geni diversi; più è alto il numero di questi geni presenti contemporaneamente, maggiore è il rischio di sviluppare la malattia. La funzione di questi geni associati alla patogenesi del LES è variabile; alcuni sono coinvolti nella produzione di interferoni (IFN), altri nelle vie di segnalazione dei linfociti T o B. Tuttavia, ad oggi, ancora non è chiaro il contributo di tali geni al fenotipo e alla severità della malattia.

La relazione con fattori ormonali, invece, viene evidenziata dal fatto che la maggiore incidenza della patologia si riscontra nelle donne giovani, quando è massima la secrezione di estrogeni (in età fertile l'incidenza

della malattia è 9:1 nelle donne rispetto agli uomini); invece, con l'aumentare dell'età, la suscettibilità al LES decresce nella donna ed aumenta nell'uomo. Inoltre, le pazienti affette da tale patologia presentano un peggioramento del quadro clinico durante la gravidanza, quando gli estrogeni raggiungono elevati livelli plasmatici. In modelli murini è stato recentemente dimostrato che anche i cromosomi sessuali svolgono un ruolo importante nel decorso del LES. Infatti, in topi sottoposti a gonadectomia, geneticamente modificati per esprimere XX o XO (femmine) e XY o XXY (maschi), è stato osservato che la presenza di due cromosomi X aumenta la severità della malattia <sup>76</sup>. In particolare, per quanto riguarda le alterazioni a livello della risposta immunitaria mediata dai linfociti B, studi effettuati *in vitro* hanno dimostrato che gli estrogeni sono capaci di: i) indurre un'attivazione policlonale delle cellule B potenzialmente autoreattive, cioè "istruite" per la produzione di autoanticorpi, anche in assenza del segnale stimolatorio, che dovrebbe essere loro apportato dalle cellule T helper (CD4<sup>+</sup>) <sup>77 78</sup>; ii) incrementare il numero delle cellule che producono citochine pro-infiammatorie (per es. IL-6, citochina importante nell'attivazione funzionale delle cellule B); iii) favorire la resistenza all'apoptosi in cellule B autoreattive aumentando l'espressione della proteina anti-apoptotica Bcl-2 <sup>79 80</sup>; ciò significa che tali cellule sopravvivono in numero e per tempi maggiori rispetto a quelle che non hanno subito l'effetto degli estrogeni, con conseguente iperproduzione di autoanticorpi <sup>81</sup>. Infatti, il LES, rappresenta il prototipo di malattia autoimmune caratterizzata dalla produzione di autoanticorpi, in particolare



anticorpi anti-DNA a doppia elica dell'isotipo IgG, che costituiscono, per l'appunto, i marcatori sierologici di tale patologia <sup>67</sup>. Nel siero di pazienti affetti da LES, inoltre, sono stati caratterizzati un numero elevato di altri autoanticorpi, con diverse specificità antigeniche e, tra questi, anche autoanticorpi specifici per ER <sup>82 83</sup>. Come già detto in precedenza, gli estrogeni sono in grado di modulare, in base alle concentrazioni plasmatiche, le risposte T linfocitarie di Tipo1 e di Tipo2 <sup>24</sup>; è stato osservato che il LES è caratterizzato da un'alterazione dell'equilibrio nella produzione di citochine di Tipo1 e quelle di Tipo2, con evidente sbilanciamento verso le citochine di Tipo2; infatti, il siero di pazienti affetti da LES presenta, da un lato, elevati livelli di IL-4, IL-6, e IL-10 (citochine di Tipo2), mentre, dall'altro, mostra un decremento dei livelli di IL-2 e IFN- $\gamma$  (citochine di Tipo1) <sup>84</sup>. Le alte dosi di estrogeni, presenti in gravidanza, promuovendo una risposta di Tipo2, potenziano lo sbilanciamento sopra descritto, contribuendo all'aggravarsi del quadro clinico delle pazienti con LES <sup>47 48 24</sup>. Il trattamento con tamoxifene (antiestrogeno) migliora la sintomatologia nelle donne in gravidanza affette da LES <sup>85</sup>. E' stato, inoltre, dimostrato che i linfociti T isolati da pazienti con LES, in presenza di estrogeni, mostrano un'aumentata espressione del ligando di CD40 (CD40L), molecola presente sulla membrana plasmatica linfocitaria e importante nella produzione di anticorpi mediata dalle cellule T <sup>86</sup>; l'alterata espressione di CD40L potrebbe svolgere un ruolo fondamentale nella patogenesi del LES, in quanto potrebbe contribuire all'iperattività delle cellule B, osservata in tale patologia <sup>87</sup>.

## SCOPO DEL LAVORO

La molteplicità dei meccanismi patogenetici coinvolti nel LES, come anche la mancanza di biomarcatori affidabili e l'eterogeneità clinica della malattia, hanno ostacolato lo sviluppo di terapie efficaci per questa patologia. E' molto probabile che gli anticorpi anti-ER possano avere degli effetti sulle cellule del sistema immunitario, mediante il legame ai recettori di membrana, ma, ad oggi, non sono stati effettuati studi in tal senso. La spiegazione del possibile ruolo svolto dagli anticorpi anti-ER nella modulazione delle risposte immunitarie potrebbe contribuire ad una migliore comprensione della patogenesi del LES e più in generale delle malattie autoimmuni.

Sulla base di queste osservazioni, l'obiettivo del nostro studio è stato quello di analizzare: i) l'espressione e la funzionalità dei recettori ER $\alpha$  e ER $\beta$  sulla membrana plasmatica dei linfociti umani isolati dal sangue periferico di donatori sani; ii) la presenza di anticorpi anti-ER nel siero di pazienti affetti da LES; iii) il ruolo degli anticorpi anti-ER nella modulazione dell'omeostasi T linfocitaria, valutando, in particolare, l'attivazione, la proliferazione e l'apoptosi dei linfociti T. Abbiamo, inoltre, indagato un possibile legame tra la presenza di anticorpi anti-ER nel siero dei pazienti con LES e le caratteristiche cliniche della malattia, allo scopo di fornire nuovi strumenti prognostici e nuovi bersagli terapeutici.

# MATERIALI E METODI

## Pazienti

Per le analisi fenotipiche e funzionali abbiamo arruolato 10 donatori sani di sesso maschile, escludendo soggetti di sesso femminile, per ovviare alle variazioni di concentrazione sierica degli estrogeni, dipendenti dalla fase del ciclo mestruale, che avrebbero potuto influenzare l'espressione dei recettori nelle popolazioni cellulari analizzate.

Per le analisi di titolazione anticorpale sul siero, invece, sono stati arruolati nello studio 44 pazienti affetti da lupus eritematoso sistemico (LES) (40 donne, 4 uomini, di età compresa tra 19 e 58 anni, con una media di età di 36.5) diagnosticato sulla base dei criteri dell' "American College of Rheumatology" <sup>88</sup>. Glucocorticoidi sono stati utilizzati nell'83% dei pazienti, idrossiclorochina nel 48% dei pazienti e farmaci immunosoppressori (azatioprina, ciclofosfamide, ciclosporina A, metotrexato, mofetil micofenolato) nel 37% dei pazienti; 13 pazienti non sono stati sottoposti ad alcuna terapia. Inoltre, sono stati inclusi nello studio 30 pazienti con artrite reumatoide (AR), diagnosticata sulla base dei criteri dell' "American Rheumatism Association" per l'AR <sup>89</sup> e 22 pazienti con sindrome di Behcet (SB), diagnosticata sulla base dell' "International Study Group criteria" per la SB <sup>90</sup>. Tutti i pazienti sono stati arruolati dal Dipartimento di Reumatologia dell'Università degli Studi di Roma "La Sapienza" dopo aver dato il consenso informato. Lo studio è stato approvato dal comitato etico. Abbiamo, inoltre, inserito nelle analisi 35

donatori sani, correlati per sesso ed età ai pazienti studiati, come gruppo di controllo (32 donne, 3 uomini, di età compresa tra i 19 e i 56 anni, con una media di età di 38 anni). I sieri sono stati ottenuti con procedura standard e conservati a -20 °C fino al momento dell'utilizzo.

## **Isolamento dei linfociti e condizioni di coltura**

Cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) sono state isolate dal sangue di donatori sani di sesso maschile mediante stratificazione su gradiente di Ficoll (Cedarlane Laboratories, Hornby, Ontario, Canada). I linfociti del sangue periferico (PBL) sono stati ottenuti eliminando la componente monocitaria tramite aderenza su plastica. I linfociti T sono stati purificati mediante metodica di selezione immunomagnetica con il "Pan T Cell isolation Kit II" (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany). In seguito all'attivazione dei PBMC, per 72 ore, con fitoemagglutinina (PHA; 1 µg/ml; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), e al mantenimento in coltura, per 10 giorni, con interleuchina-2 umana (IL-2; 60 UI/ml; PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, USA), come descritto in precedenza<sup>91</sup>, abbiamo ottenuto linee cellulari di linfociti T; l'analisi mediante citometria a flusso ha dimostrato che tali linee sono costituite per più del 99% di cellule T e che sono positive al 100% per la molecola CD95/Fas.

Le cellule sono state coltivate in RPMI-1640 senza rosso fenolo (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA), addizionato al 10% di siero fetale bovino (FBS) trattato con il carbone (Euroclone, Pero, Milano, Italia), 2 mM

di L-glutammina (Sigma-Aldrich), 50 µg/ml di gentamicina (Sigma-Aldrich), e 20 mM di HEPES (Sigma-Aldrich), in un incubatore con atmosfera controllata (5% di CO<sub>2</sub>, 90% di umidità, temperatura di 37°C).

Per tutti gli esperimenti le cellule sono state seminate alla densità di  $2 \times 10^6$ /ml. I trattamenti sono stati effettuati mediante cappa a flusso laminare verticale, nella quale l'ambiente di lavoro è protetto da un flusso continuo e stabile di aria sterile.

## Trattamenti

L'estradiolo coniugato con albumina di siero bovino (E2-BSA; rapporto molare E2:BSA = 30:1; Sigma-Aldrich), incapace di passare attraverso la membrana plasmatica per via dell'ingombro sterico creato dalla BSA, è stato ricostituito, subito prima degli esperimenti, in una soluzione fisiologica HEPES-NaCl (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM), in modo da ottenere una concentrazione finale di 100 µM. Successivamente è stato ulteriormente diluito in RPMI-1640 senza rosso fenolo per ottenere differenti concentrazioni (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM). Come controllo sono state incluse cellule trattate solo con BSA (Sigma-Aldrich), ad una concentrazione corrispondente a quella presente nel composto E2-BSA.

I linfociti sono stati, inoltre, incubati con anticorpi anti-ER $\alpha$ , purificati dal siero di pazienti affetti da LES, mediante la metodica descritta in seguito, alla concentrazione di 50 µg/ml, (selezionata in base ai risultati ottenuti in esperimenti preliminari di dose-risposta), e per tempi diversi, a seconda della valutazione effettuata. Come controllo abbiamo incluso

cellule trattate con immunoglobuline umane per somministrazione endovenosa (IVIg), alla stessa concentrazione di 50 µg/ml.

In particolare, l'attivazione di ERK è stata valutata, dopo trattamento dei PBL con E2-BSA alle concentrazioni di 1 nM, 10 nM, 100 nM, e 1 µM, per 15 e 30 minuti, e dopo trattamento con anticorpi anti-ERα e IVIg, entrambi alla concentrazione di 50 µg/ml e per 15 minuti.

Per quanto riguarda la proliferazione cellulare, i PBL sono stati marcati, seguendo il protocollo fornito dalla ditta, con carbossifluoresceina succinimidil estere diacetato (CFSE; 10 µM; Molecular Probes, Eugene, OR, USA), un colorante apolare che diffonde passivamente all'interno delle cellule ed ha la caratteristica di distribuirsi equamente nelle cellule figlie ad ogni divisione cellulare, diminuendo di concentrazione, e quindi di intensità di fluorescenza emessa, in modo proporzionale al numero delle divisioni a cui le cellule vanno incontro. Successivamente i PBL sono stati trattati come segue:

- i) con E2-BSA alla concentrazione di 1 µM o con BSA, alla stessa concentrazione, in presenza di concentrazioni ottimali o sub-ottimali di un anticorpo monoclonale anti-CD3 (4 µg/ml o 0.4 µg/ml; clone OKT3; Immunotech, Marseilles, Francia) per 3 giorni;
- ii) con E2-BSA alla concentrazione di 1 µM o con BSA, alla stessa concentrazione, in presenza di concentrazioni ottimali o sub-ottimali di CpG oligodeossinucleotide(ODN)-2006 (2.5 µg/ml o 0.25 µg/ml; MWG; Biotech, M-Medical, Milano, Italia), IL-2 (50 UI/ml; Peprotech), e anticorpi

monoclonali anti-immunoglobuline (2 µg/ml; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Suffolk, Regno Unito) per 5 giorni;

iii) con anticorpi anti-ER $\alpha$  o IVIg, entrambi alla concentrazione di 50 µg/ml, in assenza o in presenza di concentrazioni ottimali o sub-ottimali di un anticorpo monoclonale anti-CD3 (vedi sopra) per 3 giorni.

Per valutare la produzione di IFN- $\gamma$  da parte delle cellule NK (CD3 $^{-}$  CD56 $^{+}$ ), i PBL trattati con E2-BSA 1 µM o con sola BSA, sono stati stimolati per 16 ore con concentrazioni ottimali o sub-ottimali di ionomicina (1 µg/ml o 0.1 µg/ml, rispettivamente; Sigma-Aldrich) e forbolo miristato acetato (PMA; 25 µg/ml o 2.5 µg/ml, rispettivamente; Sigma-Aldrich), in presenza di brefeldina A, alla concentrazione di 10 µM, che inibisce la secrezione delle citochine agendo sull'apparato del Golgi.

L'apoptosi ed il fenotipo linfocitario sono stati studiati dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento delle cellule con anticorpi anti-ER $\alpha$ , purificati dal siero di pazienti con LES, o IVIg, entrambi alla concentrazione di 50 µg/ml. Inoltre, alla stessa concentrazione e dopo 48 ore, abbiamo analizzato l'apoptosi nelle linee cellulari di linfociti T dopo trattamento con anti-ER $\alpha$  o IVIg.

In ogni esperimento abbiamo incluso cellule non trattate come controllo.

Le concentrazioni ottimali e sub-ottimali sono state determinate in precedenti esperimenti di dose-risposta.

## **Purificazione delle proteine di membrana**

Le proteine della membrana plasmatica dei PBL sono state purificate mediante l'utilizzo del kit "Pierce Cell Surface Protein Isolation" (Pierce, Rockford, Inghilterra), seguendo il protocollo fornito dalla ditta con lievi modifiche. In breve,  $1 \times 10^7$  di cellule sono state incubate in 1 ml di soluzione di biotinilazione ("Sulfo-NHS-SS-Biotin"; Pierce). Avvenuta la biotinilazione, i linfociti sono stati lavati due volte in un tampone Tris salino (TBS; 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl) e sottoposti a sonicazione. Le proteine biotinilate, così ottenute, sono state incubate con una resina di neutroavidina, precedentemente lavata, ("Immobilized NeutrAvidin Gel"; Pierce), consentendo il legame non covalente tra le due molecole. A questo punto le proteine sono state eluite dal gel secondo protocollo.

## **Saggio ELISA**

Il saggio ELISA è stato condotto con metodo indiretto per l'evidenziazione e la titolazione di anticorpi.

L'antigene ricombinante ER $\alpha$  (Sigma-Aldrich) è stato diluito in tampone carbonato (0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.6, 0.02% NaN<sub>3</sub>) e, alla concentrazione di 20  $\mu$ g/ml, è stato adsorbito su una fase solida, rappresentata dalle pareti di un pozzetto di piastre per microtitolazione in polistirene (Maxisorp; Nunc, Roskilde, Danimarca), per circa 18 ore e a 4 °C. Dopo tre lavaggi con PBS contenente 0.05% di Tween 20 (PBS-T), la piastra è stata saturata, per 1 ora a 37 °C, con PBS-T contenente il 3% di



latte. Quindi, dopo ulteriori lavaggi, sono stati aggiunti i sieri, sia di soggetti sani, sia di soggetti affetti da LES, AR e SB, diluiti 1:100 in PBS-T all'1% di latte, per 1 ora a 30 °C (la diluizione è stata stabilita in esperimenti preliminari scegliendo la concentrazione sensibilizzante ottimale in base alla massima differenza nei valori di densità ottica (D.O.) tra i sieri positivi e quelli negativi al saggio). Ogni campione è stato caricato in triplicato.

Successivamente, la piastra è stata lavata con PBS-T, per allontanare l'eccesso di siero, e messa ad incubare con anticorpi secondari anti-IgG umani coniugati con la perossidasi di Rafano (Bio-Rad Laboratories, Monaco, Germania) e diluiti 1:3000 in PBS-T contenente l' 1% di latte, per 1 ora e a 30 °C. Dopo lavaggio, è stato aggiunto il substrato della perossidasi orto-fenilendiammina-diidrocloreuro (OPD, Sigma-Aldrich) in presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e, trascorsi 15 minuti, la reazione è stata interrotta mediante l'aggiunta di acido solforico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 2 M. La quantità di substrato degradata, che è proporzionale alla concentrazione degli anticorpi presenti nel siero in esame ed è indicata da una modificazione di colore espressa come densità ottica, è stata rilevata mediante lettura spettrofotometrica (Microplate reader 550, Bio-Rad) ad una lunghezza d'onda di 490 nm. Tutti i valori ottenuti sono stati espressi come media di densità ottica e ad essi è stato sottratto il valore ottenuto da pozzetti di controllo non adsorbiti con l'antigene. Il livello minimo di positività ("cut-off") è stato calcolato aggiungendo alla media dei valori di densità ottica, ottenuti dai sieri dei donatori sani, tre volte la deviazione standard. Tutti

quei sieri dei soggetti analizzati che hanno dato valori di D.O. superiori al “cut-off” sono stati considerati positivi.

Per dimostrare che gli anticorpi provenienti dai sieri dei pazienti con LES legano in maniera specifica l'antigene ER $\alpha$ , è stato condotto un saggio di inibizione. I sieri dei due pazienti risultati maggiormente positivi al saggio ELISA sono stati incubati per 18 ore a temperatura ambiente con 10  $\mu$ g/ml dell'antigene, secondo il metodo riportato da Huang e colleghi<sup>92</sup>. Come controllo negativo al saggio gli stessi sieri sono stati pre-incubati con 10  $\mu$ g/ml di un antigene non specifico o con 40  $\mu$ g/ml di BSA.

### **Purificazione di anticorpi anti-ER $\alpha$ dal siero di pazienti LES**

Abbiamo ritagliato una serie di strisce di nitrocellulosa aventi, ciascuna, lunghezza di circa 9 cm e larghezza di circa 0.5 cm, e su ognuna sono stati adsorbiti 50  $\mu$ g di ER $\alpha$  ricombinante (Sigma-Aldrich). Una volta asciugate, le strisce sono state saturate con latte al 3%, a temperatura ambiente, e dopo 1 ora, centrifugate per 1 minuto a 14000 rpm. Dopo aver aspirato il latte al 3%, le strisce di nitrocellulosa sono state lavate per tre volte con TBS contenente 0.05% di Tween 20 (TBS-T). I filtri sono stati, quindi, incubati 18 ore a temperatura ambiente con un siero proveniente da un paziente LES altamente reattivo verso ER $\alpha$  ricombinante (stabilito mediante saggio ELISA), diluito 1:2 in TBS-T.

Il giorno dopo, il siero diluito è stato rimosso e i filtri sono stati centrifugati 1 minuto, a 14000 rpm, a temperatura ambiente. Dopo tre lavaggi in TBS-T, i filtri sono stati incubati con 400  $\mu$ l di glicina 100 mM a pH 2.5, per 15

minuti e, dopo agitazione, la soluzione di glicina contenente gli anticorpi è stata recuperata ed aggiunta ad una quantità di Tris 1 M pH 8, pari a 1:10 del volume totale, per neutralizzare il pH della soluzione.

Infine, la densità ottica degli anticorpi è stata letta mediante uno spettrofotometro UV-1204 (Shimadzu) ad una lunghezza d'onda di 280 nm e la relativa concentrazione è stata calcolata secondo la Legge di Lambert-Beer, descritta dalla formula:

$$A = \epsilon_{\lambda}lc$$

dove  $\epsilon_{\lambda}$  è il coefficiente di estinzione molare,  $l$  è il cammino ottico, e  $c$  rappresenta la concentrazione molare del campione.

Gli anticorpi così ottenuti sono stati conservati in  $\text{NaN}_3$  1:100 a 4 °C.

## **Analisi mediante citometria a flusso**

Espressione di ER $\alpha$  e ER $\beta$  di membrana. I PBMC sono stati lavati con PBS ed incubati a 4 °C con gli anticorpi primari monoclonali di topo anti-ER $\alpha$  (clone F-10; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) ed anti-ER $\beta$  (clone 1531; Santa Cruz), entrambi diretti verso la porzione C-terminale del recettore. Come controllo isotipico è stato utilizzato un appropriato anticorpo murino anti-IgG<sub>2a</sub> (Sigma-Aldrich). Dopo 1 ora di incubazione le cellule sono state lavate e marcate, per 30 minuti, a 4 °C, con un anticorpo secondario specie specifico coniugato con fluoresceina isotiocianato (FITC; Sigma-Aldrich).

Inoltre, i PBMC sono stati lavati in PBS ed incubati con appropriate miscele di anticorpi monoclonali di topo anti-CD3 direttamente coniugato

con ficoeritrina (PE), anti-CD4, direttamente coniugato con allofococianina (APC) ed anti-CD8, direttamente coniugato con peridinclorofillina (PerCP) (tutti distribuiti da BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA), e con gli anticorpi anti-ER $\alpha$ , purificati dal siero dei pazienti LES, o con anti-IgG umane (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), come controllo isotipico, precedentemente coniugati con FITC, mediante “Zenon Human IgG Labeling Kit” (Molecular Probes), seguendo il protocollo fornito dalla ditta.

In tutte le marcature di superficie, 1  $\mu$ g di anticorpo è stato utilizzato per 1 X 10<sup>6</sup> di cellule, e dopo lavaggio in PBS al 2% di FBS, i campioni sono stati analizzati mediante citometro a flusso FACSAria (BD Immunocytometry Systems). Per ogni campione sono stati acquisiti almeno 50.000 eventi. L'analisi dei dati è stata condotta mediante il programma Cell Quest Pro (BD Immunocytometry Systems).

Produzione IFN- $\gamma$ . I PBL non trattati e trattati con E2-BSA o BSA, dopo stimolo di 16 ore con ionomicina, PMA e brefeldina A, come precedentemente descritto, sono stati lavati, fissati in paraformaldeide al 4% per 5 minuti ed a temperatura ambiente, permeabilizzati con una soluzione di permeabilizzazione (BD Immunocytometry Systems) per 10 minuti e, quindi, lavati ed incubati per 30 minuti, a 4 °C, con una miscela di anticorpi monoclonali di topo anti-IFN- $\gamma$ , direttamente coniugato con FITC, anti-CD3, direttamente coniugato con APC, ed anti-CD56, direttamente coniugato con PE, tutti distribuiti da BD Immunocytometry Systems. Dopo lavaggio in PBS al 2% di FBS, i campioni sono stati analizzati mediante

citometro a flusso FACSCalibur (BD Immunocytometry Systems). Per ogni campione sono stati acquisiti almeno 20.000 eventi. L'analisi dei dati è stata condotta mediante il programma Cell Quest Pro (BD Immunocytometry Systems). I risultati sono stati espressi come percentuale di IFN- $\gamma$  prodotto dalla popolazione di NK considerate come il 100%.

Proliferaazione cellulare. In seguito ai diversi trattamenti precedentemente descritti, la proliferazione cellulare è stata quantificata monitorando la perdita sequenziale dell'intensità di fluorescenza verde delle cellule marcate con CFSE, nelle varie sottopopolazioni linfocitarie, marcando i PBL, per 30 minuti, a 4 °C, con appropriate miscele di anticorpi monoclonali di topo anti-CD3 coniugato con PE, anti-CD4 coniugato con APC, anti-CD8 coniugato con PerCP, anti-CD19 coniugato con APC (tutti distribuiti da BD Immunocytometry Systems). Le cellule morte sono state escluse mediante colorazione con "Sytox Blue" (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Dopo lavaggio in PBS al 2% di FBS, i campioni sono stati analizzati mediante citometro a flusso FACSAria (BD Immunocytometry Systems). Per ogni campione sono stati acquisiti almeno 20.000 eventi. I dati sono stati analizzati con il programma FlowJo versione 7.2.5 (Tree Star, Ashland, OR, USA).

I linfociti non trattati sono stati considerati il punto di partenza per l'analisi della proliferazione. Ciascuna generazione cellulare viene rappresentata con un picco. Oltre ad una rappresentazione grafica vengono fornite anche delle indicazioni statistiche tra cui l'indice di divisione (ID) che

rappresenta il numero medio di divisioni a cui una cellula è andata incontro, ed è stato determinato per ciascun campione trattato attraverso il confronto con i risultati ottenuti nelle cellule non trattate<sup>93</sup>.

Apoptosi ed espressione di Bcl-2. La valutazione quantitativa dell'apoptosi è stata effettuata mediante l'utilizzo di un kit per la colorazione con Annessina V e Ioduro di Propidio (Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA, USA), seguendo il protocollo fornito dalla ditta. In breve, i PBMC, dopo 24, 48 e 72 ore, e le linee cellulari di linfociti T, dopo 48 ore, di trattamento con gli anticorpi anti-ER $\alpha$  o con le IVIg, entrambe alla concentrazione di 50  $\mu$ g/ml, sono stati lavati, incubati per 10 minuti con Annessina V e Ioduro di Propidio ed analizzati mediante citometro a flusso FACSCalibur (BD Immunocytometry Systems). Per ogni campione sono stati acquisiti almeno 10.000 eventi. L'analisi dei dati è stata condotta mediante il programma Cell Quest Pro (BD Immunocytometry Systems). Per analizzare, in particolare, l'apoptosi nell'ambito delle due sottopopolazioni T linfocitarie, dopo 24, 48, e 72 ore di trattamento con anti-ER $\alpha$  o IVIg, abbiamo marcato, prima, superficialmente i linfociti con anti-CD4 APC e anti-CD8 PerCP (entrambi BD Immunocytometry Systems), e, successivamente, abbiamo effettuato l'incubazione con la sola Annessina V, secondo il protocollo fornito dalla ditta. L'Annessina V si lega preferenzialmente ai fosfolipidi carichi negativamente come la fosfatidilserina, molecola che nelle cellule vitali è localizzata sullo strato interno della membrana plasmatica, mentre nella fase precoce del processo apoptotico, viene esposta sullo strato esterno

della membrana. Durante l'apoptosi le cellule si colorano con l'Annexina V dopo la condensazione della cromatina ma prima della perdita della capacità della membrana plasmatica di escludere lo Ioduro di Propidio. Quindi, mediante la colorazione delle cellule con Annexina V e Ioduro di Propidio, è possibile identificare le cellule vive non apoptotiche (negative sia per Annexina V che per Ioduro di Propidio), cellule apoptotiche precoci (positive per Annexina V e negative per Ioduro di Propidio) e cellule in apoptosi avanzata o necrotiche (positive per Annexina V e/o Ioduro di Propidio).

Le linee cellulari dei linfociti T, trattate per 48 ore con l'anticorpo anti-ER $\alpha$  o con le IVIg, sono state lavate ed incubate per 30 minuti a 4 °C con appropriate miscele di anticorpi monoclonali di topo anti-CD3 coniugato con PE, anti-CD4 coniugato con APC, anti-CD8 coniugato con PerCP (tutti distribuiti da BD Immunocytometry Systems) e anti-Bcl-2 coniugato con FITC (DAKO, Glostrup, Danimarca); come controllo isotipico è stato utilizzato l'anticorpo di topo anti-IgG<sub>1</sub>, direttamente coniugato con FITC (BD Immunocytometry Systems).

I campioni sono stati, quindi, analizzati mediante citometro a flusso FACSCalibur (BD Immunocytometry Systems). Per ogni campione sono stati acquisiti almeno 20.000 eventi. L'analisi dei dati è stata condotta mediante il programma Cell Quest Pro (BD Immunocytometry Systems).

*Espressione molecole di attivazione (CD95, CD95L, HLA-DR) di membrana.* I PBMC, trattati con gli anticorpi anti-ER $\alpha$  o con le IVIg, entrambe alla concentrazione di 50  $\mu$ g/ml, per 48 ore, sono stati lavati ed

incubati per 30 minuti a 4 °C con una miscela di anticorpi monoclonali di topo, direttamente coniugati con differenti fluorocromi: anti-CD4 APC, anti-CD8 PerCP, anti-CD95 FITC, anti-HLA-DR PE, tutti distribuiti da BD Immunocytometry Systems. Inoltre, i PBMC sono stati incubati per 1 ora a 4 °C con l'anticorpo di topo anti-CD95L, non coniugato. Dopo l'ora di incubazione, le cellule sono state lavate e marcate, per 30 minuti, a 4 °C, con un anticorpo secondario specie specifico coniugato con FITC (entrambi BD Immunocytometry Systems). Come controllo isotipico è stato utilizzato un appropriato anticorpo murino anti-IgG<sub>2a</sub> (Sigma-Aldrich). Dopo lavaggio in PBS al 2% di FBS, i campioni sono stati analizzati mediante citometro a flusso FACSCalibur (BD Immunocytometry Systems). Per ogni campione sono stati acquisiti almeno 20.000 eventi. L'analisi dei dati è stata condotta mediante il programma Cell Quest Pro (BD Immunocytometry Systems).

### **Estrazione proteica e analisi mediante Western blot**

I PBL, sia non trattati, sia trattati con E2-BSA, per 15 e 30 minuti, alle diverse concentrazioni descritte in precedenza, ed i linfociti T trattati con gli anticorpi anti-ER $\alpha$  o con le IVIg, per 15 minuti, alla concentrazione di 50  $\mu$ g/ml, sono stati lavati due volte con PBS freddo e quindi lisati in RIPA buffer (100 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM MgCl), addizionato con una miscela di inibitori delle proteasi (Sigma-Aldrich). I lisati così ottenuti sono stati centrifugati per 20 minuti, a 4 °C, a 14000 rpm. La concentrazione proteica dei sopranatanti è stata



determinata con il saggio “Bio-Rad Protein Assay” (Bio-Rad Laboratories), secondo le istruzioni della ditta.

I lisati cellulari (30 µg /campione) e le proteine di membrana isolate mediante biotinilazione, sono stati separati su gel di poliacrilammide SDS-PAGE<sup>94</sup> al 10% e successivamente trasferiti elettricamente su membrana di nitrocellulosa (Bio-Rad Laboratories). Dopo aver saturato i siti liberi con TBS-T contenente il 5% di latte, le membrane sono state incubate per circa 18 ore a 4 °C con i seguenti anticorpi antigene-specifici diluiti in TBS-T al 5% di latte:

1. Anticorpo monoclonale di topo anti-ER $\alpha$  (clone F-10; Santa Cruz);
2. Anticorpo monoclonale di topo anti-ER $\beta$  (clone 1531; Santa Cruz);
3. Anticorpo policlonale di coniglio anti-pERK-1/2 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA).

Dopo 3 lavaggi in TBS-T, alle membrane è stato aggiunto come anticorpo secondario un antisiero specie-specifico coniugato con la perossidasi di Rafano (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). In seguito i complessi immuni sono stati rilevati mediante il saggio “Pierce SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate”, basato su una reazione di chemiluminescenza (Pierce).

Le lastre sono state “scannerizzate” utilizzando il densitometro “Imaging Densitometer GS-700” (Bio-Rad Laboratories) e quantificate mediante il programma “MultiAnalist” (Bio-Rad Laboratories). La quantità di proteina per singolo campione è stata normalizzata in funzione della quantità di  $\beta$ -tubulina degli stessi.

## **Analisi statistica**

I dati sono espressi come media  $\pm$  la deviazione standard (DS) di esperimenti indipendenti ripetuti almeno tre volte. La significatività statistica tra i diversi campioni è stata calcolata utilizzando il test  $t$  di Student ed il test  $U$  di Mann-Whitney. Un valore di  $p$  inferiore a 0.05 è stato considerato significativo. La statistica dei risultati ottenuti in citometria a flusso è stata valutata mediante il test di Kolmogorov-Smirnov e il valore di  $D/s(n) \geq 15$  è stato considerato significativo<sup>95</sup>.

La correlazione tra i valori sierici di anticorpi anti-ER $\alpha$  in pazienti con LES e alcuni parametri epidemiologici e clinici (i.e. età, attività della malattia, valutata secondo “Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index” (SLEDAI), ecc.), è stata effettuata calcolando l’indice di correlazione  $r$  per ranghi di Spearman.

# RISULTATI

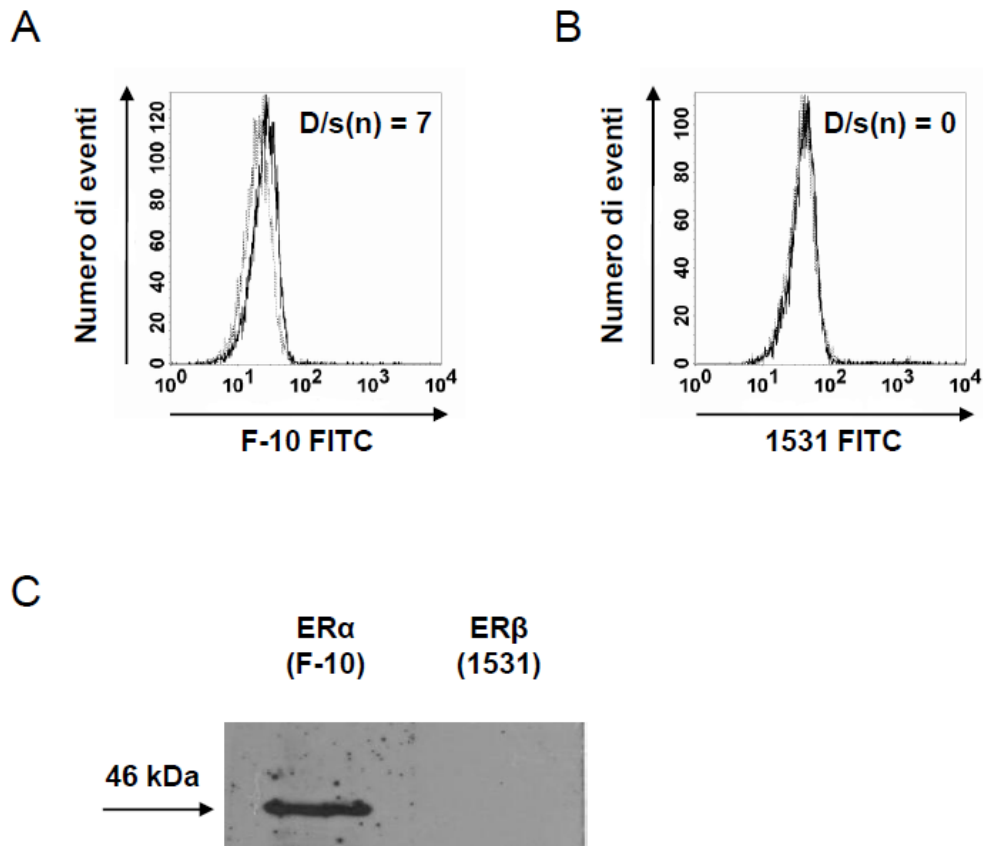
## **Espressione sulla membrana plasmatica linfocitaria dell'isoforma ER $\alpha$ 46**

Come descritto nell'introduzione, nei linfociti umani, l'espressione intracellulare di ER è stata dimostrata in vari studi, mentre ad oggi non è nota l'espressione di tali recettori a livello della membrana plasmatica. È stato, quindi, nostro interesse verificarne la presenza.

A tal fine, abbiamo inizialmente condotto uno studio, sui linfociti isolati dal sangue periferico di donatori sani di sesso maschile, mediante citometria a flusso, utilizzando anticorpi disponibili in commercio, i.e. anticorpo monoclonale anti-ER $\alpha$  (clone F-10) ed anti-ER $\beta$  (clone 1531). Abbiamo osservato sulla membrana linfocitaria una debole, ma non significativa, espressione di ER $\alpha$  ma non di ER $\beta$  (Fig. 1, rispettivamente A e B).

L'analisi mediante Western Blot, effettuata dopo aver purificato le proteine presenti sulla superficie linfocitaria, ha confermato la presenza di ER $\alpha$  e l'assenza di ER $\beta$ . In particolare, l'anticorpo anti-ER $\alpha$  ha rilevato una banda al peso molecolare di 46 kDa, dimostrando l'espressione dell'isoforma mER $\alpha$ 46 (Fig. 1C). In un nostro precedente lavoro abbiamo dimostrato che l'isoforma ER $\alpha$ 46 risulta essere quella maggiormente espressa anche a livello intracellulare nei linfociti<sup>25</sup>. Come detto nell'introduzione, è stato osservato, in altri tipi cellulari, che tale proteina è in grado di formare eterodimeri con l'isoforma di 66 kDa, inibendo in maniera competitiva il

legame di quest'ultima al DNA, e anche se tale attività sembra essere importante nella regolazione della proliferazione cellulare, la sua funzione specifica non è stata ancora ben chiarita. E' stato interessante, quindi, valutare, nei linfociti, il ruolo funzionale di mER $\alpha$ 46 essendo l'unica isoforma rilevata a livello della membrana plasmatica.



**Fig. 1. Analisi dell'espressione di ER sulla membrana plasmatica dei PBL.**

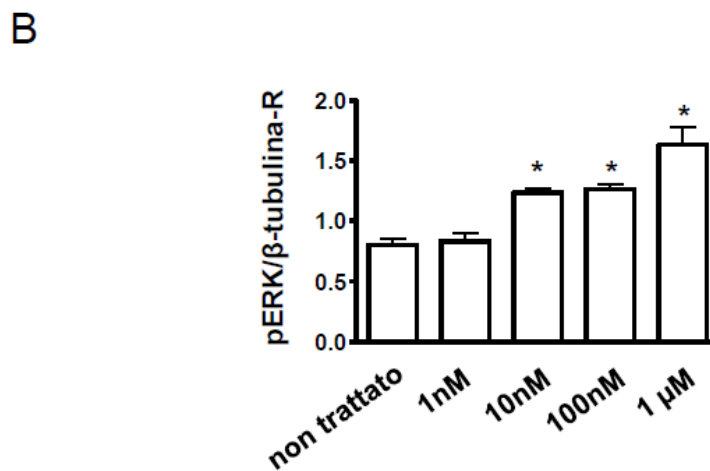
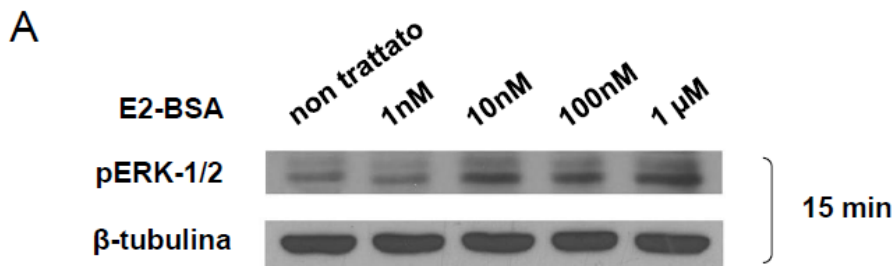
(A-B) L'espressione superficiale di ER è stata valutata mediante citometria a flusso in PBL isolati da donatori sani, di sesso maschile, marcati con anti-ER $\alpha$  (clone F-10) ed anti ER- $\beta$  (clone 1531) e, successivamente, con un anticorpo secondario specie specifico coniugato con fluoresceina isotiocianato (FITC). L'analisi dei dati è stata effettuata sui linfociti totali in base ai parametri fisici "forward scatter" vs "side scatter". E' mostrato, in figura, l'istogramma ottenuto da un esperimento rappresentativo, di tre effettuati. Il picco di fluorescenza, che rappresenta il numero di cellule positive per ER (linea continua), mostra un debole, ma non significativo, spostamento rispetto al controllo isotipico (linea tratteggiata) per ER $\alpha$  (A) ma non per ER $\beta$  (B). La significatività statistica è stata valutata con il test di Kolmogorov-Smirnov ( $D/s(n) \geq 15$  è significativo).

(C) Analisi delle proteine purificate dalla membrana plasmatica dei PBL di donatori sani, di sesso maschile, mediante Western Blot, utilizzando gli anticorpi anti-ER $\alpha$  (clone F-10) ed anti ER- $\beta$  (clone 1531). E' possibile osservare unicamente l'espressione di ER $\alpha$ , in particolare della variante del peso molecolare di 46 kDa.

## **Funzionalità di mER $\alpha$ 46 dopo trattamento con E2-BSA**

Dopo aver dimostrato la presenza dell'isoforma ER $\alpha$ 46 a livello della membrana plasmatica linfocitaria, abbiamo valutato la funzionalità di questo recettore.

A tale scopo abbiamo analizzato, mediante Western Blot, eventi precoci della via di trasduzione del segnale, in particolare l'attivazione della proteina chinasi ERK, in seguito al trattamento dei PBL con E2 coniugato alla BSA, incapace di passare attraverso la membrana plasmatica, a concentrazioni fisiologiche e farmacologiche (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1  $\mu$ M) e a tempi brevi (15 e 30 minuti), non compatibili con un coinvolgimento del meccanismo genomico. Abbiamo osservato che E2-BSA ha indotto una fosforilazione della proteina chinasi ERK in maniera dose-dipendente, dopo 15 minuti di trattamento (Fig. 2) mentre tale effetto già non è stato più evidente dopo 30 minuti di trattamento (dato non mostrato). Questo risultato suggerisce l'espressione di un mER $\alpha$ 46 funzionale, in grado di innescare la via di trasduzione del segnale in seguito al legame con il proprio ligando.



**Fig. 2. Analisi dell'attivazione di ERK in PBL trattati con E2-BSA.**

L'espressione della forma fosforilata della proteina chinasi ERK (pERK1/2) è stata valutata, mediante Western Blot, dopo 15 minuti di trattamento con E2-BSA, a diverse concentrazioni (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM), nei PBL isolati da donatori sani, di sesso maschile. La β-tubulina è stata utilizzata per normalizzare le quantità proteiche caricate.

(A) Esperimento rappresentativo di tre effettuati. E' possibile osservare un aumento dose dipendente dell'espressione di pERK1/2.

(B) Il grafico mostra l'incremento, concentrazione dipendente, del rapporto pERK/β-tubulina (pERK/β-tubulina-R) dei valori ottenuti dall'analisi di densitometria, dopo il trattamento con E2-BSA. I risultati sono espressi come media ± DS di tre esperimenti indipendenti. \*,  $P < 0.05$  valore di significatività rispetto alle cellule di controllo non trattate.

Per verificare il coinvolgimento di mER $\alpha$ 46 nella modulazione della funzione linfocitaria, abbiamo valutato l'effetto di E2-BSA, alla concentrazione di 1  $\mu$ M, su: i) la proliferazione dei linfociti T e B, sia non stimolati, sia in seguito allo stimolo, rispettivamente, con anti-CD3 e con anti-Ig e CpG; ii) la produzione di IFN- $\gamma$  da parte delle cellule NK, in seguito all'attivazione con PMA e ionomicina (vedi Materiali e Metodi). Tutti gli esperimenti condotti hanno incluso un campione di cellule trattate con la sola BSA ed i risultati ottenuti non hanno mostrato differenze significative rispetto alle cellule non trattate. Per quanto riguarda la proliferazione, il trattamento con E2-BSA ha indotto un aumento dell'indice di divisione in risposta ad uno stimolo sub-ottimale di anti-CD3 nei linfociti T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, rispetto alle cellule trattate con sola BSA (Tabella 1). Nei linfociti non stimolati con anti-CD3, non abbiamo osservato una variazione significativa della proliferazione in seguito al trattamento con E2-BSA (dato non mostrato).

Inoltre, il trattamento con E2-BSA non ha mostrato un effetto significativo sulla proliferazione dei linfociti B stimolati con anti-Ig e CpG (dato non mostrato).

Nella figura 3 è mostrato un esperimento rappresentativo che evidenzia come l'intensità di fluorescenza del CFSE diminuisce nei linfociti T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, trattati con E2-BSA, ripartendosi nelle cellule figlie indicando un aumento della quota di cellule proliferanti (Fig. 3).

Infine, il trattamento con E2-BSA ha indotto un'aumentata produzione di IFN- $\gamma$  da parte delle cellule NK CD56<sup>bright</sup>, attivate con concentrazioni sub-



ottimali di PMA e ionomicina, rispetto a quelle trattate con sola BSA (Tabella 1) (esperimento rappresentativo Fig. 4).

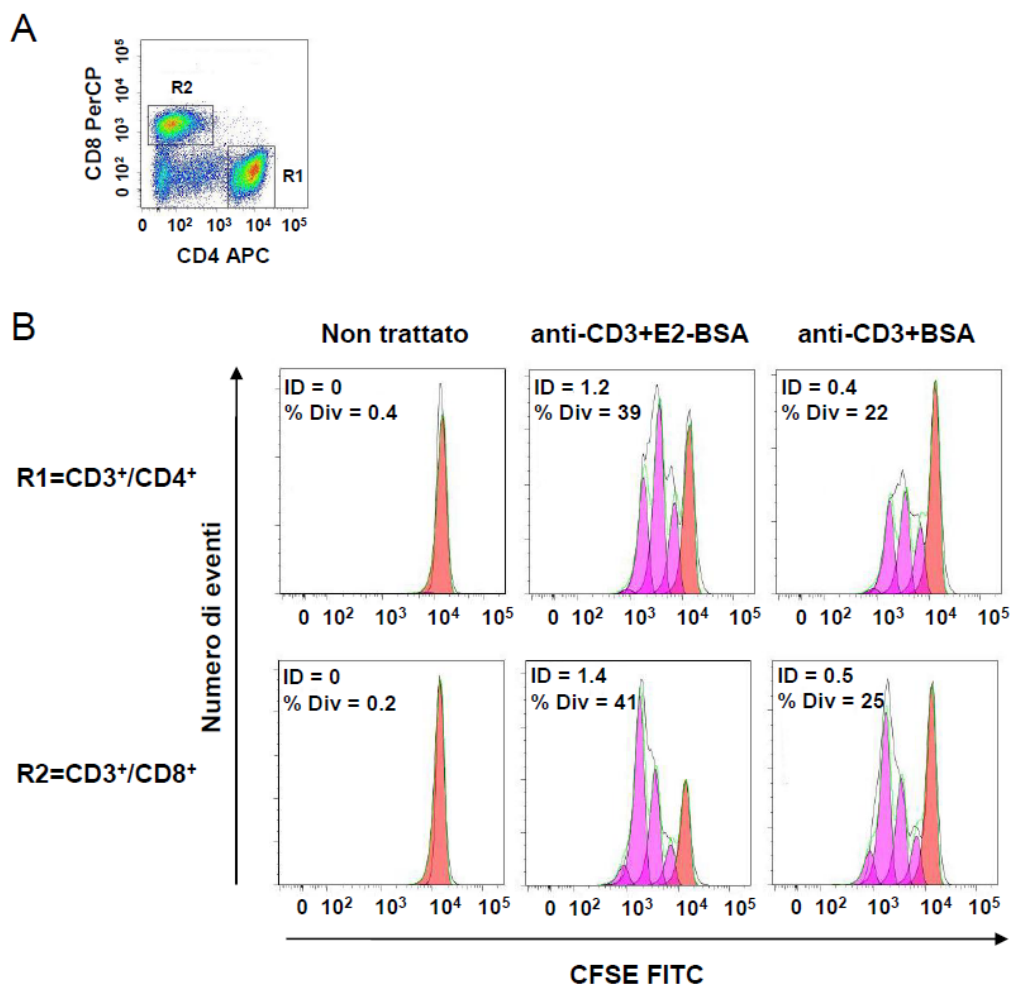
L'E2-BSA non ha prodotto alcun effetto sulla proliferazione e la produzione di citochine nei linfociti utilizzando i diversi stimoli alle concentrazioni ottimali, in quanto l'attivazione cellulare, in tali condizioni, ha raggiunto probabilmente il livello massimo (dato non mostrato).

### Tabella 1

#### Effetto dell'E2-BSA sulle funzioni immunologiche.

	<b>BSA</b>	<b>E2-BSA</b>	<b>P</b>
ID linfociti T CD4 <sup>+</sup>	0.46 ± 0.11	1.4 ± 0.15	<0.0001
ID linfociti T CD8 <sup>+</sup>	0.56 ± 0.11	1.6 ± 0.10	< 0.0001
% IFN-γ prodotto da NK CD56 <sup>+</sup>	19 ± 2	32 ± 3	0.02

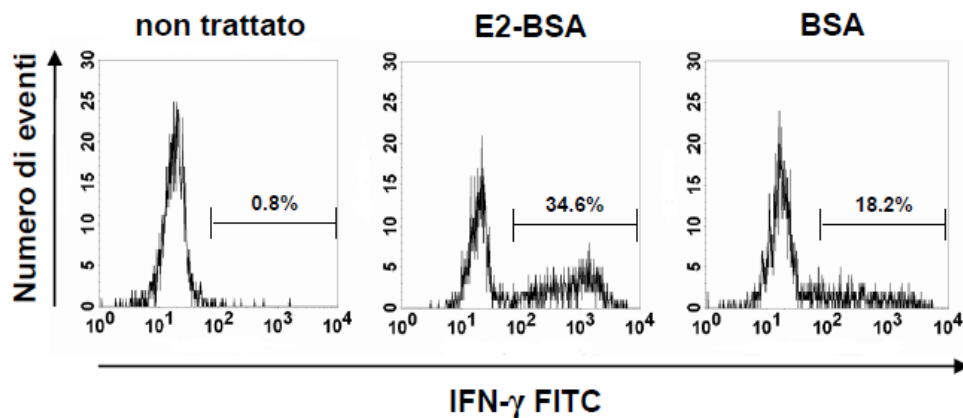
I risultati sono espressi come media ± DS di 5 esperimenti indipendenti. PBL di donatori sani, di sesso maschile, stimolati con anti-CD3 o con PMA+ionomicina e trattati con E2-BSA (1 μM) o BSA (alla stessa concentrazione) per 72 ore. *P*, valore di significatività relativo alle cellule trattate con E2-BSA rispetto alle cellule trattate con BSA. ID, indice di divisione.



**Fig. 3. Analisi della proliferazione dei PBL stimolati con anti-CD3 e trattati con E2-BSA.**

La proliferazione è stata valutata mediante citometria a flusso in PBL isolati da donatori sani, di sesso maschile, prima marcati con il colorante CFSE FITC, poi, per 72 ore, stimolati con anti-CD3 (clone OKT3; 0.4 µg/ml) e trattati con E2-BSA (1 µM) o sola BSA (alla stessa concentrazione); trascorse le 72 ore, le cellule sono state marcate con gli anticorpi anti-CD3 PE, anti-CD4 APC e anti-CD8 PerCP. L'analisi dei dati è stata effettuata nell'ambito delle regioni R1 e R2 (A), che rappresentano, rispettivamente, le due sottopopolazioni T linfocitarie, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.

(B) In figura è mostrato un esperimento rappresentativo, di cinque effettuati. E' possibile osservare, in entrambe le sottopopolazioni T linfocitarie, una diminuzione dell'intensità di fluorescenza del CFSE, in seguito al trattamento con E2-BSA, rispetto alle cellule trattate con BSA. E' evidente l'effetto dell'anti-CD3 dal confronto con le cellule non trattate, che sono considerate il punto di partenza per l'analisi della proliferazione. E' possibile osservare, in entrambe le sottopopolazioni T linfocitarie, una diminuzione dell'intensità di fluorescenza del CFSE, in seguito al trattamento con E2-BSA, rispetto alle cellule trattate con BSA. ID, indice di divisione; %Div, % di divisione.



**Fig. 4. Analisi della produzione di IFN- $\gamma$  da parte delle cellule NK in PBL trattati con E2-BSA.**

La produzione di IFN- $\gamma$  è stata valutata mediante citometria a flusso in PBL isolati da donatori sani, di sesso maschile, stimolati con PMA (2.5  $\mu\text{g/ml}$ ) e ionomicina (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) e trattati con E2-BSA (1  $\mu\text{M}$ ) e sola BSA (alla stessa concentrazione), per 16 ore; le cellule, quindi, sono state marcate con gli anticorpi anti-CD3 APC e anti-CD56 PE. L'analisi dei dati è stata effettuata nell'ambito delle cellule NK (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>). In figura è rappresentato un esperimento rappresentativo di tre effettuati ed i valori riportati indicano la percentuale di IFN- $\gamma$  prodotto nella popolazione CD3<sup>+</sup>CD56<sup>bright</sup>. E' possibile osservare un aumento della produzione di IFN- $\gamma$  nelle cellule stimulate e trattate con E2-BSA rispetto a quelle trattate con BSA.

## **Presenza di anticorpi anti-ER $\alpha$ nel siero di pazienti con LES**

Abbiamo valutato mediante saggio ELISA la presenza nel siero di pazienti con LES di anticorpi anti-ER $\alpha$  e anti-ER $\beta$ . Abbiamo dimostrato che 21/44 (45%) dei pazienti presenta un'alta reattività per ER $\alpha$  ricombinante. Al fine di valutare la specificità della presenza di questi anticorpi nei pazienti con LES, abbiamo utilizzato anche sieri di pazienti con AR e con SB oltre a sieri di donatori sani. Abbiamo rilevato una positività degli anticorpi anti-ER $\alpha$  in 1 su 30 dei pazienti con AR (3,3%) e in 1 su 22 dei pazienti con SB (4%), mentre nessuno dei sieri dei donatori sani ha mostrato una positività per questi anticorpi (Fig. 5A). Il pre-assorbimento dei sieri dei due pazienti con LES, risultati maggiormente reattivi verso ER $\alpha$  al saggio ELISA, ha completamente inibito la reattività anticorpale, confermando la specificità del saggio stesso (dato non mostrato). Al contrario, non abbiamo rilevato anticorpi anti-ER $\beta$  in alcun siero dei vari gruppi di pazienti analizzati.

Per valutare se la presenza di anticorpi anti-ER $\alpha$  possa avere un ruolo nel decorso clinico della malattia, abbiamo raggruppato i pazienti correlando tale dato con i parametri epidemiologici e clinici del LES (Tabella 2); abbiamo, così, osservato, un'associazione tra la presenza nel siero di tali anticorpi e l'attività della malattia (i.e., SLEDAI, "Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index"). Infatti, l'analisi statistica, mediante il metodo di Spearman, ha evidenziato una correlazione significativa tra i valori degli anticorpi anti-ER $\alpha$  presenti nel siero dei pazienti con LES e i

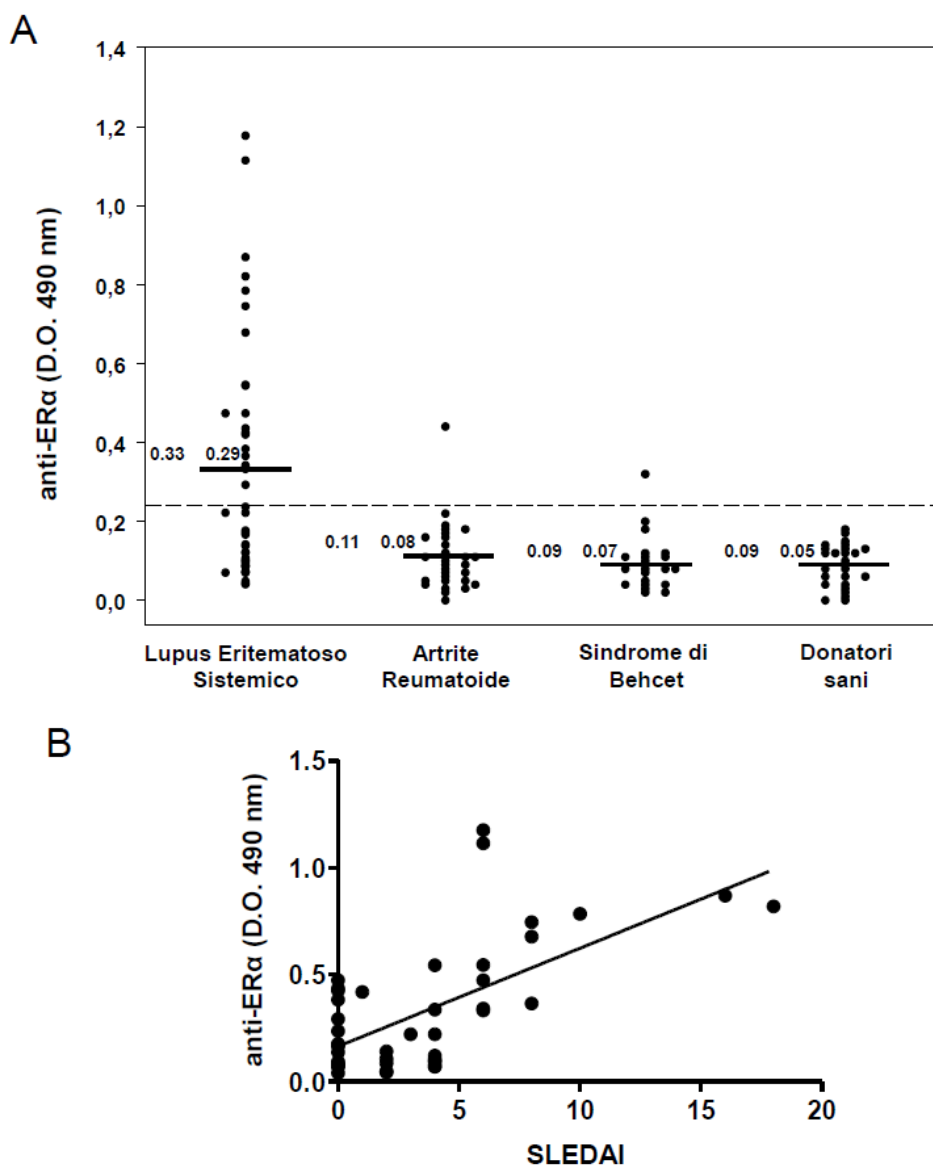
valori di SLEDAI,  $r = 0.51$ ,  $P = 0.0004$  (Fig. 5B). Inoltre, abbiamo osservato una significativa associazione tra la presenza di tali anticorpi e l'età dei pazienti ( $P = 0.01$ ).

**Tabella 2**

**Caratteristiche epidemiologiche e cliniche dei pazienti con LES , suddivisi in base alla presenza nel siero degli anticorpi anti-ER $\alpha$ .**

	<b>anti-ER<math>\alpha</math> IgG positivi (n = 20)</b>	<b>anti-ER<math>\alpha</math> IgG negativi (n = 24)</b>	<b><i>P</i></b>
Età (anni)	32 (19-52)	41 (21-58)	0.01*
Sesso (maschi/femmine)	2/18	2/22	< 0.05**
Durata della malattia (mesi)	108 (6-312)	111 (0-276)	< 0.05*
SLEDAI	6 (0-18)	2 (0-4)	0.002*

I risultati sono espressi come valore di mediana. n, numero dei pazienti. \*, test di Mann Whitney.



**Fig. 5. Anticorpi anti-ER $\alpha$  nel siero di pazienti e donatori sani.**

(A) Analisi, mediante saggio ELISA, della presenza di anticorpi anti-ER $\alpha$  in pazienti con LES, AR, SB e in donatori sani di pari età e sesso. I campioni che presentano densità ottica (D.O. 490 nm), superiore al valore di "cut-off" (calcolato aggiungendo alla media tre volte la deviazione standard dei valori di D.O. ottenuti dai sieri dei donatori sani) sono considerati positivi per gli anticorpi anti-ER $\alpha$ . La linea tratteggiata rappresenta il "cut-off". I livelli di anticorpi anti-ER $\alpha$  sono significativamente più alti nei pazienti con LES rispetto agli altri gruppi ( $P < 0.0001$ ).

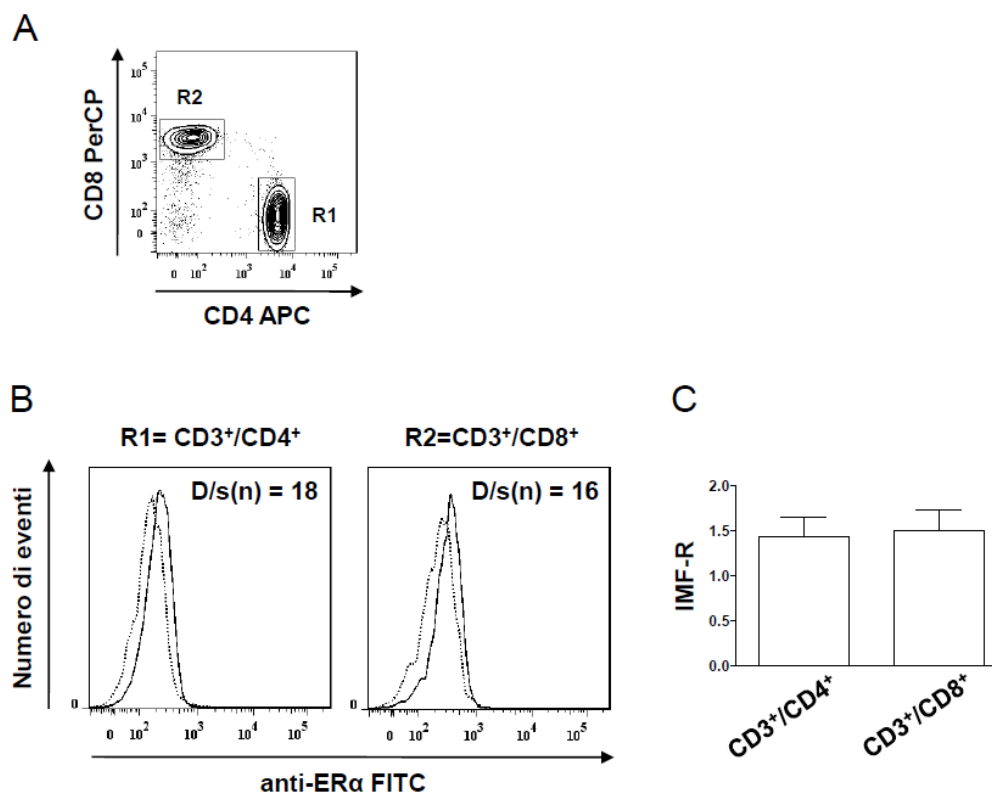
(B) Correlazione, mediante metodo di Spearman, e retta di regressione lineare tra la presenza di anticorpi anti-ER $\alpha$  e i valori di SLEDAI, in pazienti con LES. La correlazione risulta essere significativa ( $r=0.51$ ,  $P=0.0004$ ).

## **Effetti immunologici di anticorpi anti-ER $\alpha$ isolati dal siero di pazienti con LES**

Dai sieri dei pazienti affetti da LES maggiormente reattivi all'ER $\alpha$  ricombinante commerciale abbiamo purificato gli anticorpi anti-ER $\alpha$  (vedi Materiali e Metodi) e ne abbiamo verificato la capacità sia di legarsi a mER $\alpha$ 46, sia di modulare la funzione immunologica, attraverso tale legame, in particolare nell'ambito dei linfociti T, considerando il ruolo svolto da tali cellule nella patogenesi del LES.

### ***Legame degli anticorpi anti-ER $\alpha$ al recettore mER $\alpha$ 46.***

I linfociti isolati dal sangue periferico di donatori sani di sesso maschile, non permeabilizzati, sono stati marcati con l'anticorpo anti-ER $\alpha$  e con gli anticorpi commerciali anti-CD4 e anti-CD8, e analizzati mediante citometria a flusso. In entrambe le sottopopolazioni T linfocitarie, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, è stata evidenziata una significativa espressione del recettore, valutata statisticamente mediante il test di Kolmogorov-Smirnov, suggerendo che l'anticorpo anti-ER $\alpha$  è in grado di legarsi a mER $\alpha$ 46 (Fig. 6). La media  $\pm$  DS dei valori ottenuti rapportando l'intensità media di fluorescenza (IMF) dell'anticorpo specifico a quella del controllo isotipico è  $1.4 \pm 0.2$  e  $1.5 \pm 0.2$ , rispettivamente per i linfociti T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (Fig. 6).



**Fig. 6. Analisi del legame tra gli anticorpi anti-ER $\alpha$ , purificati da pazienti con LES, e mER $\alpha$  espresso nei PBL di donatori sani.**

PBL isolati da donatori sani, di sesso maschile, non permeabilizzati, sono stati marcati con anticorpi anti-ER $\alpha$ , purificati da pazienti con LES o con anticorpi anti-IgG umane, entrambi coniugati con FITC, e con gli anticorpi anti-CD3 PE, anti-CD4 APC ed anti-CD8 PerCP.

(A-B) Le figure sono ottenute da un esperimento rappresentativo, di cinque effettuati, in cui l'intensità di fluorescenza dell'anticorpo anti-ER $\alpha$  (linea continua) è confrontata con quella del controllo isotipico (IgG umane) (linea tratteggiata). L'analisi dei dati è stata effettuata nell'ambito dei linfociti T CD4<sup>+</sup> (R1) e CD8<sup>+</sup> (R2) (A), facendo prima una selezione dei linfociti totali in base ai parametri fisici "forward scatter" vs "side scatter" e poi una selezione dei linfociti T in base alla positività all'anticorpo anti-CD3 (non mostrato). E' possibile osservare uno spostamento significativo dell'intensità di fluorescenza dell'anti-ER $\alpha$  rispetto al controllo isotipico in entrambe le sottopopolazioni T linfocitarie (B). La significatività statistica è stata valutata con il test di Kolmogorov-Smirnov (D/s(n)  $\geq 15$  è significativo).

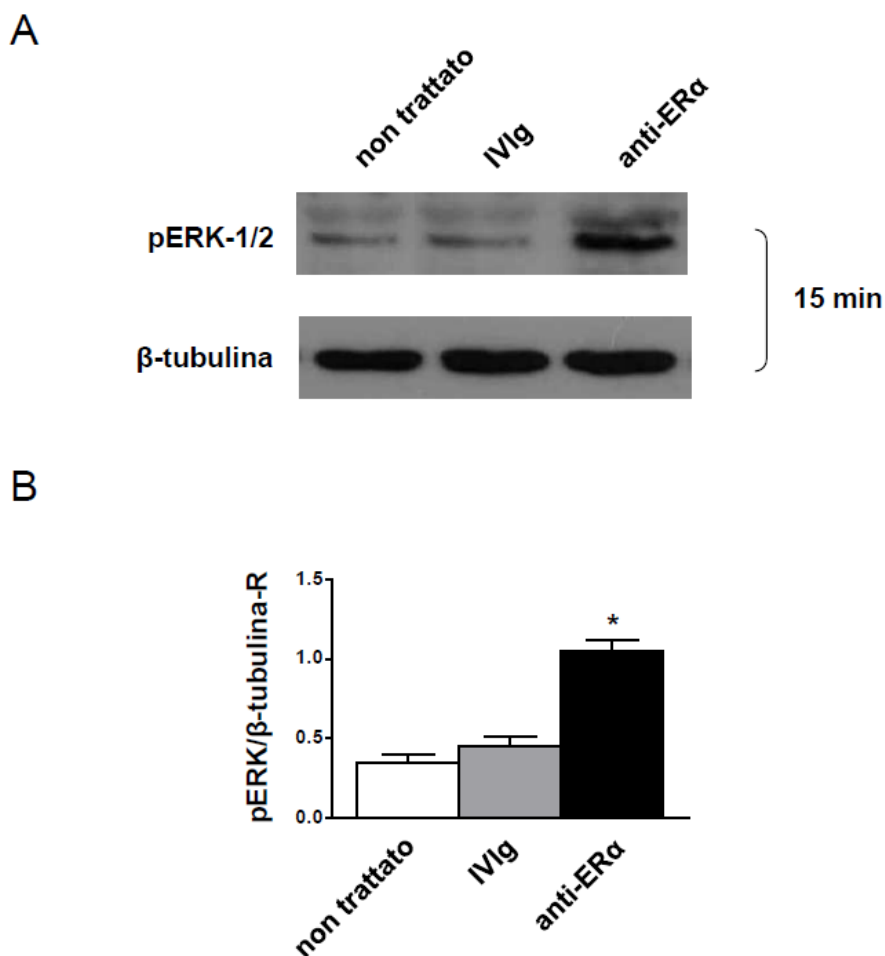
(C) Rappresentazione del rapporto tra i valori di intensità media di fluorescenza (IMF) ottenuti con l'anticorpo anti-ER $\alpha$  e quelli ottenuti con le anti IgG umane (IMF-R), in cinque esperimenti indipendenti.



Abbiamo quindi valutato i possibili effetti degli anticorpi anti-ER $\alpha$  purificati dal siero dei pazienti con LES sulla funzionalità T linfocitaria. A questo scopo, abbiamo analizzato nei linfociti T, l'attivazione della proteina chinasi ERK, l'espressione di marcatori di attivazione e di morte cellulare (i.e. HLA-DR, CD95, CD95L), l'apoptosi e la proliferazione cellulare. In parallelo abbiamo trattato le cellule con IVIg e, in ogni analisi condotta, non sono state riscontrate variazioni tra le risposte a questo trattamento e le cellule non trattate.

#### ***Attivazione di ERK.***

L'analisi, mediante Western Blot, dei linfociti T trattati con anti-ER $\alpha$  o IVIg, entrambi alla concentrazione di 50  $\mu$ g/ml e per 15 minuti, ha dimostrato che il trattamento con gli anticorpi anti-ER $\alpha$  ha indotto una rapida fosforilazione di ERK (rappresentata dalla banda al peso molecolare di 42 kDa), non altrettanto evidenziabile nelle cellule non trattate o trattate con IVIg (Fig. 7). Il dato suggerisce la capacità di tali anticorpi di innescare la via di trasduzione del segnale in seguito al legame con mER $\alpha$ 46.



**Fig. 7. Analisi dell'attivazione di ERK in PBL di donatori sani trattati con gli anticorpi anti-ER purificati da pazienti con LES.**

L'espressione della forma fosforilata della proteina chinasi ERK (pERK1/2) è stata valutata, mediante Western Blot, dopo trattamento dei PBL isolati da donatori sani, di sesso maschile, con gli anticorpi anti-ER $\alpha$  o IVIg, entrambi alla concentrazione 50  $\mu$ g/ml, per 15 minuti. La  $\beta$ -tubulina è stata utilizzata per normalizzare le quantità proteiche caricate.

(A) Esperimento rappresentativo di cinque effettuati. E' possibile osservare un aumento dell'espressione di pERK1/2 nelle cellule trattate con gli anticorpi anti-ER $\alpha$  rispetto a quelle non trattate o trattate con IVIg.

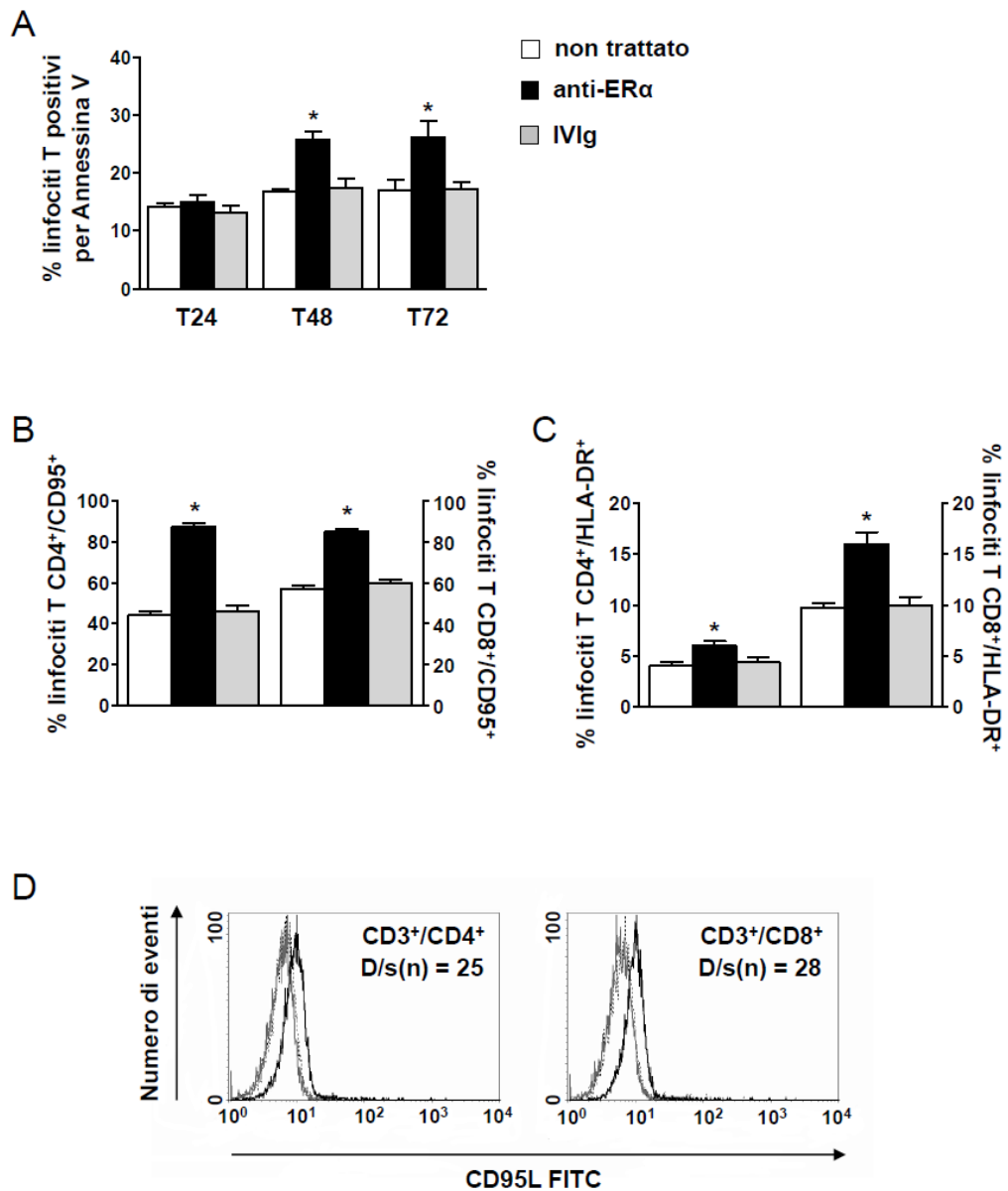
(B) Il grafico mostra l'incremento significativo del rapporto pERK/ $\beta$ -tubulina-R (pERK/ $\beta$ -tubulina-R) dei valori ottenuti dall'analisi di densitometria, dopo il trattamento con gli anticorpi anti-ER $\alpha$ . I risultati sono espressi come media  $\pm$  DS di cinque esperimenti indipendenti. \*,  $P < 0.05$  valore di significatività rispetto alle cellule non trattate o trattate con IVIg.

***Apoptosi ed espressione di molecole di attivazione e di morte cellulare (i.e. HLA-DR, CD95, CD95L, Bcl-2).***

Inizialmente abbiamo valutato la capacità degli anticorpi anti-ER $\alpha$  di modulare la suscettibilità dei linfociti T all'apoptosi. La percentuale di cellule apoptotiche è stata valutata mediante una marcatura con Annexina V e Ioduro di Propidio (vedi Materiali e Metodi). Abbiamo osservato che il trattamento con gli anticorpi anti-ER $\alpha$  ha indotto un incremento significativo del livello di apoptosi entro 48 ore di coltura ( $26 \pm 3\%$  vs  $17 \pm 3\%$  delle cellule trattate con IVIg,  $P < 0.001$ ) che persiste fino alle 72 ore ( $26 \pm 5\%$  vs  $17 \pm 3\%$  delle cellule trattate con IVIg,  $P < 0.001$ ), (Fig. 8A). Per entrambi i trattamenti e per tutti e tre i tempi considerati, la percentuale di cellule necrotiche è  $<$  al 3%. Un'analisi più dettagliata delle sottopopolazioni T CD4 $^{+}$  e CD8 $^{+}$  ha confermato, in entrambe, l'andamento osservato sulla popolazione T linfocitaria totale (dato non mostrato).

Successivamente, abbiamo analizzato l'espressione di superficie di importanti marcatori associati all'attivazione e al destino cellulare (i.e., HLA-DR, CD95, e CD95L), dopo 48 ore di trattamento con gli anticorpi anti-ER $\alpha$ , nelle cellule T CD4 $^{+}$  e CD8 $^{+}$ . Come mostrato in figura 8, gli anticorpi anti-ER $\alpha$  determinano un aumento significativo dell'espressione di superficie delle molecole CD95 e HLA-DR, rispetto alle cellule trattate con IVIg, sia nell'ambito dei CD4 $^{+}$  (per CD95,  $87 \pm 3\%$  vs  $44 \pm 4\%$ ,  $P < 0.001$ ; per HLA-DR,  $6 \pm 1\%$  vs  $4 \pm 1\%$ ,  $P < 0.05$ ), sia nell'ambito dei CD8 $^{+}$  (per CD95,  $85 \pm 3\%$  vs  $57 \pm 3\%$ ,  $P < 0.001$ ; per HLA-DR,  $16 \pm 2\%$  vs  $10 \pm 1\%$ ,  $P < 0.001$ ) (Fig. 8 B-C). Anche l'espressione di CD95L, molecola

importante nell'induzione dell'apoptosi mediata dal recettore Fas/CD95<sup>96</sup>, dopo il trattamento con gli anticorpi anti-ER $\alpha$ , risulta essere aumentata, rispetto alle cellule trattate con IVIg, sulla membrana plasmatica di entrambe le sottopopolazioni dei linfociti T, CD4<sup>+</sup> (IMF 9.2  $\pm$  0.5 vs 5.9  $\pm$  0.2, D/s(n) > 15) e CD8<sup>+</sup> (IMF 9.5  $\pm$  0.3 vs 5.8  $\pm$  0.4, D/s(n) > 15) (Fig. 8D). Nell'ambito di questi esperimenti, abbiamo studiato l'espressione intracellulare di Bcl-2, proteina che svolge un ruolo importante nell'inibizione del processo di morte cellulare per apoptosi<sup>97</sup>. L'analisi mediante citometria a flusso ha mostrato una debole diminuzione dell'espressione di Bcl-2 dopo 48 ore di trattamento delle cellule T con gli anticorpi anti-ER $\alpha$ , rispetto ai linfociti trattati con IVIg (nei CD4<sup>+</sup>, IMF 57  $\pm$  3 vs 69  $\pm$  4, D/s < 15; nei CD8<sup>+</sup>, IMF 55  $\pm$  1 vs 66  $\pm$  2, D/s < 15, dato non mostrato). Questo risultato suggerisce che l'apoptosi indotta nei linfociti T "resting", dagli anticorpi anti-ER $\alpha$ , potrebbe seguire la via estrinseca, ossia essere mediata dai recettori di morte (i.e., CD95/CD95L).

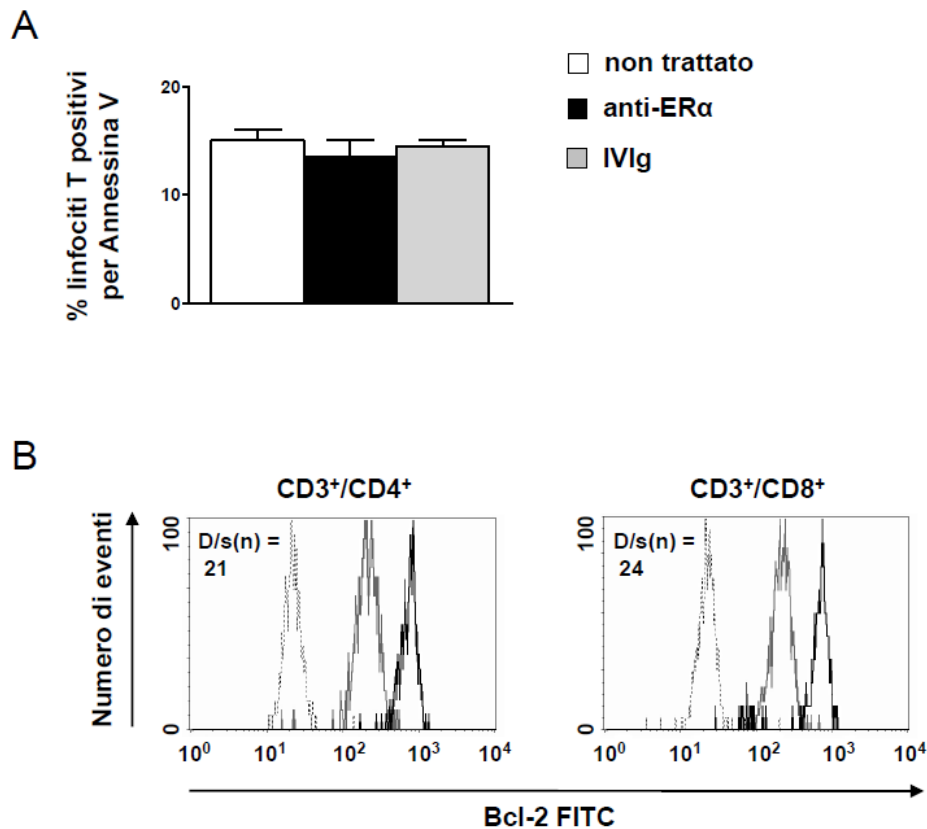


**Fig. 8. Analisi dell'induzione di apoptosi e della variazione di espressione di CD95, CD95L, HLA-DR, in PBL "resting" di donatori sani trattati con gli anticorpi anti-ER $\alpha$  purificati da pazienti con LES.**

(A) La percentuale di cellule apoptotiche è stata valutata in citometria a flusso mediante marcatura con Annessina V e Ioduro di Propidio dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento con gli anticorpi anti-ER $\alpha$  o con IVIg (entrambi 50  $\mu$ g/ml). L'apoptosi è espressa come percentuale dei linfociti T positivi all'Annessina V. Nel grafico è rappresentata la media  $\pm$  DS di 10 esperimenti indipendenti. Gli anticorpi anti-ER $\alpha$  inducono un aumento significativo del livello di apoptosi dopo 48 ore di trattamento e l'effetto persiste fino alle 72 ore. \*,  $P < 0.05$  valore di significatività rispetto alle cellule non trattate o trattate con IVIg.

(B-D) L'espressione superficiale di CD95, CD95L e HLA-DR è stata valutata in citometria a flusso mediante marcatura con una appropriata miscela di anticorpi, dopo 48 ore di trattamento con gli anticorpi anti-ER $\alpha$  o con IVIg (entrambi 50  $\mu$ g/ml). Nei grafici B e C, i risultati sono espressi come la percentuale di linfociti T, CD4 $^{+}$  o CD8 $^{+}$ , positivi al CD95 (B) e a HLA-DR (C); i dati sono espressi come media  $\pm$  DS di 10 esperimenti indipendenti. E' possibile osservare che anticorpi anti-ER $\alpha$  inducono un aumento significativo dell'espressione di CD95 e HLA-DR, in entrambe le sottopopolazioni T linfocitarie. \*,  $P < 0.05$  valore di significatività rispetto alle cellule non trattate o trattate con IVIg. L'istogramma, in figura D, rappresenta l'intensità di fluorescenza dell'anticorpo anti-CD95L FITC in cellule trattate con IVIg (linea grigia) o con anticorpi anti-ER $\alpha$  (linea nera); il controllo isotipico è rappresentato dalla linea tratteggiata. L'analisi è stata effettuata nell'ambito dei linfociti T CD4 $^{+}$  e CD8 $^{+}$ , facendo prima una selezione dei linfociti totali in base ai parametri fisici "forward scatter" vs "side scatter" e poi una selezione dei linfociti T in base alla positività agli anticorpi anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 (grafico non mostrato). E' possibile osservare uno spostamento significativo dell'intensità di fluorescenza dell'anti-CD95L rispetto al controllo isotipico. La significatività statistica è stata valutata con il test di Kolmogorov-Smirnov ( $D/s(n) \geq 15$  è significativo).

Abbiamo, inoltre, valutato l'effetto degli anticorpi anti-ER $\alpha$  sulla modulazione dell'apoptosi in linfociti T attivati con PHA/IL-2. Questi anticorpi, dopo 48 ore di trattamento, non risultano avere un effetto pro-apoptotico ( $14 \pm 1\%$  vs  $13 \pm 2\%$ ,  $P > 0.05$ , Fig. 9A) ma inducono un aumento significativo dell'espressione di Bcl-2, rispetto alle cellule trattate con IVIg, nei linfociti T CD4<sup>+</sup> (IMF  $809 \pm 25$  vs  $224 \pm 7$ , D/s(n) >15) e CD8<sup>+</sup> (IMF  $795 \pm 45$  vs  $228 \pm 7$ , D/s(n) > 15) (Fig. 9B).



**Fig. 9. Analisi degli effetti sull'apoptosi e sull'espressione di Bcl-2, in PBL di donatori sani attivati con PHA/IL-2 trattati con anticorpi anti-ER $\alpha$  purificati da pazienti con LES.**

(A) La percentuale di cellule apoptotiche è stata valutata in citometria a flusso mediante marcatura con Annessina V e Ioduro di Propidio dopo 48 ore di trattamento con gli anticorpi anti-ER $\alpha$  o con IVIg (entrambi 50  $\mu$ g/ml). L'apoptosi è espressa come percentuale dei linfociti T positivi all'Annessina V. Nel grafico è rappresentata la media  $\pm$  DS di 5 esperimenti indipendenti. Gli anticorpi anti-ER $\alpha$  non inducono variazioni sull'apoptosi rispetto alle cellule non trattate o trattate con IVIg.

(B) L'espressione intracellulare di Bcl-2 è stata valutata in citometria a flusso mediante marcatura con una appropriata miscela di anticorpi, dopo 48 ore di trattamento con gli anticorpi anti-ER $\alpha$  e con IVIg (entrambi 50  $\mu$ g/ml). Il grafico rappresenta l'intensità di fluorescenza dell'anticorpo anti-Bcl-2 FITC in cellule trattate con IVIg (linea grigia) o con anticorpi anti-ER $\alpha$  (linea nera); il controllo isotipico è rappresentato dalla linea tratteggiata. L'analisi è stata effettuata nell'ambito dei linfociti T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, facendo prima una selezione dei linfociti totali in base ai parametri fisici "forward scatter" vs "side scatter" e poi una selezione dei linfociti T in base alla positività agli anticorpi anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 (grafico non mostrato). E' possibile osservare uno spostamento significativo dell'intensità di fluorescenza dell'anti-Bcl-2 rispetto al controllo isotipico. La significatività statistica è stata valutata con il test di Kolmogorov-Smirnov ( $D/s(n) \geq 15$  è significativo).



### **Proliferaazione cellulare.**

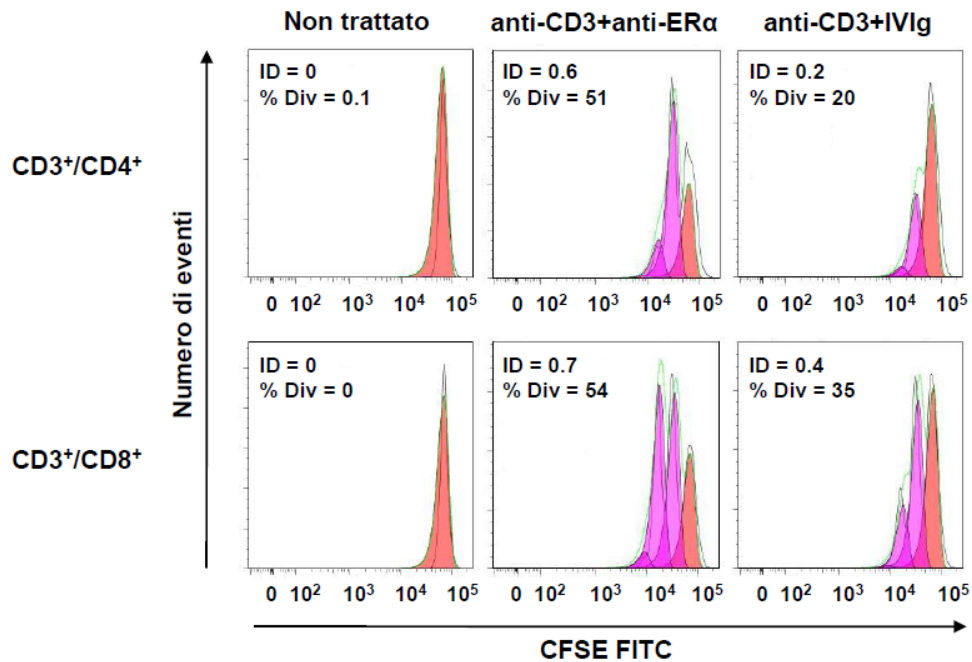
Infine, abbiamo analizzato, sempre mediante citometria a flusso, l'effetto degli anticorpi anti-ER $\alpha$  sulla proliferazione cellulare dei linfociti T, nell'ambito delle sottopopolazioni CD4 $^+$  e CD8 $^+$ . Il trattamento con gli anticorpi anti-ER $\alpha$  non ha indotto di per sé proliferazione ma, in risposta ad uno stimolo sub-ottimale di anti-CD3, è stato osservato un aumento significativo dell'indice di divisione, ossia del numero medio di divisioni a cui una cellula è andata incontro, rispetto alle cellule non trattate o trattate con IVIg, sia nei linfociti T CD4 $^+$ , sia in quelli CD8 $^+$  (Tabella 3). Nella figura 10 è possibile osservare un esperimento rappresentativo che evidenzia come l'intensità di fluorescenza del CFSE diminuisce nei linfociti T, CD4 $^+$  e CD8 $^+$ , trattati con gli anticorpi anti-ER $\alpha$ , ripartendosi nelle cellule figlie, rispetto alle cellule trattate con IVIg (Fig. 10).

### **Tabella 3**

**Proliferaazione indotta dagli anticorpi anti-ER $\alpha$  purificati da pazienti LES nei linfociti T, CD4 $^+$  e CD8 $^+$ , isolati da donatori sani.**

	ID		% Div	
	CD4 $^+$	CD8 $^+$	CD4 $^+$	CD8 $^+$
Non trattato	0	0	0.11 $\pm$ 0.03	0.05 $\pm$ 0.05
anti-CD3 + anti-ER $\alpha$	0.55 $\pm$ 0.01*	0.75 $\pm$ 0.01*	50 $\pm$ 4*	56 $\pm$ 2*
anti-CD3 + IVIg	0.16 $\pm$ 0.01	0.4 $\pm$ 0.02	19 $\pm$ 1.5	34 $\pm$ 2

I risultati sono espressi come media  $\pm$  DS di 5 esperimenti indipendenti. I PBL sono stati trattati, come indicato, per 72 ore. E' possibile osservare un aumento significativo della proliferazione dopo trattamento con anti-ER $\alpha$ , in entrambe le sottopopolazioni T linfocitarie. \*,  $P < 0.001$  valore di significatività rispetto alle cellule trattate con anti-CD3+IVIg. ID, indice di divisione; % Div, % di divisione.



**Fig. 10. Analisi della proliferazione dei PBL di donatori sani stimolati con anti-CD3 e trattati con anticorpi anti-ER $\alpha$  purificati da pazienti con LES.**

La proliferazione è stata valutata mediante citometria a flusso in PBL precedentemente marcati con il colorante CFSE FITC, poi, per 72 ore, stimolati con anti-CD3 (clone OKT3; 0.4  $\mu$ g/ml) e trattati con gli anticorpi anti-ER $\alpha$  o con IVIg (entrambi 50  $\mu$ g/ml); trascorse le 72 ore, le cellule sono state marcate con gli anticorpi anti-CD4 APC e anti-CD8 PerCP. L'analisi è stata effettuata nell'ambito dei linfociti T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, facendo prima una selezione dei linfociti totali in base ai parametri fisici "forward scatter" vs "side scatter" e poi una selezione dei linfociti T in base alla positività agli anticorpi anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 (grafico non mostrato). In figura è mostrato un esperimento rappresentativo, di cinque effettuati. E' evidente l'effetto dell'anti-CD3 dal confronto con le cellule non trattate, che sono considerate il punto di partenza per l'analisi della proliferazione. E' possibile osservare, in entrambe le sottopopolazioni T linfocitarie, una diminuzione dell'intensità di fluorescenza del CFSE, in seguito al trattamento con gli anticorpi anti-ER $\alpha$  rispetto alle cellule trattate con IVIg. ID, indice di divisione; %Div, % di divisione.

## DISCUSSIONE

In questo studio abbiamo analizzato la presenza di anticorpi specifici per ER $\alpha$  e/o ER $\beta$  in sieri di pazienti con LES e abbiamo osservato che gli anticorpi anti-ER $\alpha$  sono presenti in circa il 45% di questi pazienti, mentre nessun siero è risultato positivo per ER $\beta$ . Analizzando gli effetti degli anticorpi anti-ER $\alpha$  sull'omeostasi T linfocitaria, abbiamo osservato che sono in grado, da un lato, di attivare i linfociti e causarne la morte cellulare per apoptosi e, dall'altro, di indurre la proliferazione in linfociti T stimolati con anti-CD3. Inoltre, i livelli sierici degli anticorpi anti-ER $\alpha$  nei pazienti con LES risultano essere significativamente associati all'attività della malattia (SLEDAI).

Già da molti anni, nel siero umano, sono stati rilevati bassi livelli di anticorpi naturali anti-ER<sup>98</sup>; in linee cellulari umane, è stato, anche, osservato che tali anticorpi hanno un effetto paragonabile a quello degli estrogeni e la loro attività biologica è neutralizzata da ICI164,384, steroide antagonista dell'estradiolo<sup>99 100</sup>. Kelly e Vertosick hanno osservato, inoltre, che gli anticorpi anti-ER sono significativamente più alti nel siero di pazienti affetti da LES rispetto ai sieri di donatori sani, di pari età e sesso<sup>83</sup>. E' interessante notare che gli anticorpi anti-ER $\alpha$  trovati nei pazienti con LES erano definiti come anticorpi antinucleo mentre si dovrebbe riconsiderare il recettore degli estrogeni come possibile antigene di superficie in questa malattia. Come descritto nell'introduzione, l'esistenza di mER nei linfociti T è stata dimostrata in modelli murini ma

non nell'uomo <sup>26</sup>. In questo lavoro, abbiamo osservato, per la prima volta, la presenza di una forma funzionale di mER nei linfociti umani, in particolare dell'isoforma mER $\alpha$ 46. Inoltre abbiamo dimostrato che anticorpi anti-ER $\alpha$  purificati dal siero di pazienti con LES sono in grado di riconoscere mER $\alpha$  sui linfociti T, sia CD4<sup>+</sup> che CD8<sup>+</sup>. Il livello di espressione di mER $\alpha$  non differisce tra le due sottopopolazioni T linfocitarie. Dati recenti, ottenuti nell'uomo e nel topo, hanno evidenziato un ruolo di mER $\alpha$ 46 nella modulazione di molti eventi biologici soprattutto nel tessuto osseo, nel sistema nervoso centrale e cardiovascolare, e in alcuni tipi di cancro mentre il ruolo di mER $\alpha$ 46 nella regolazione delle funzioni immunitarie rimane ancora poco esplorato <sup>15</sup>.

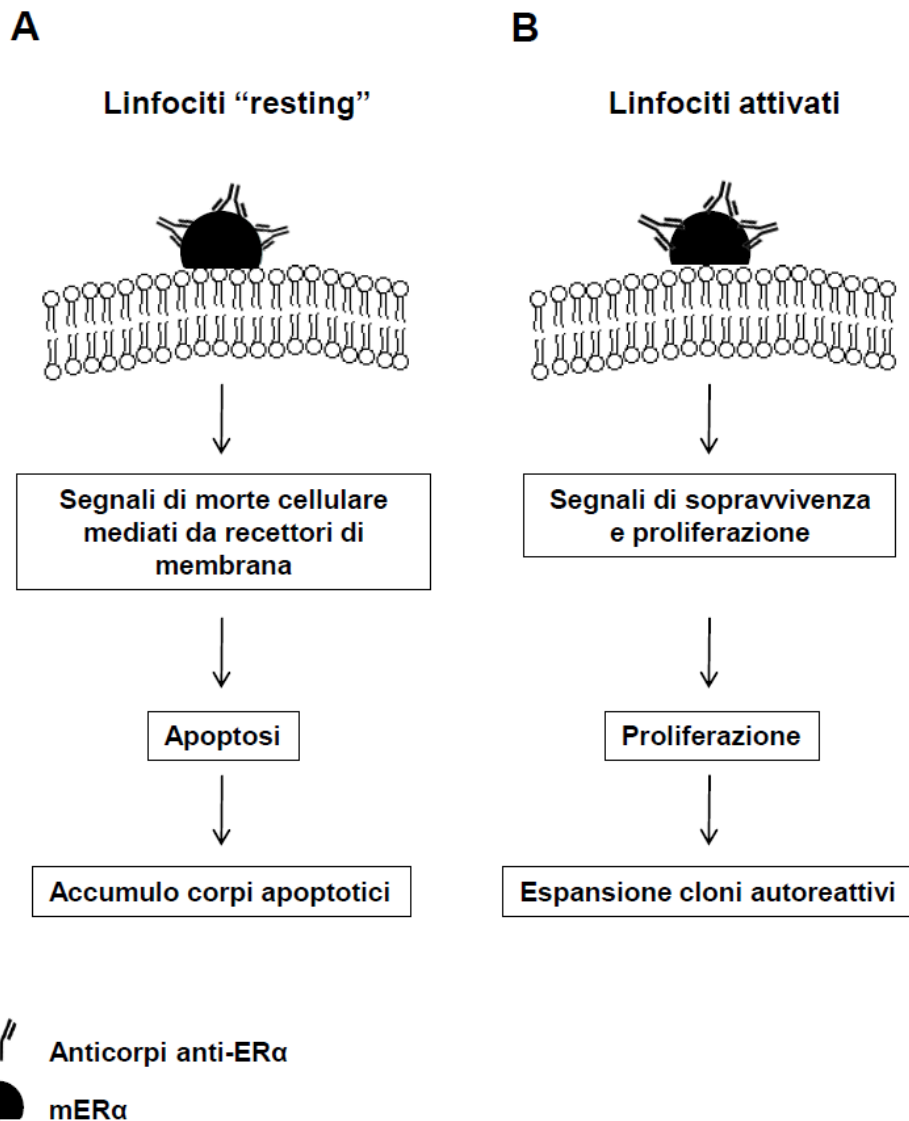
In questo lavoro abbiamo osservato che gli anticorpi anti-ER $\alpha$  inducono l'attivazione di ERK1/2 in linfociti T isolati dal sangue periferico di donatori sani. Questa osservazione è importante in quanto la via di trasduzione del segnale mediata dalle proteine ERK/MAPK ha un ruolo fondamentale nella selezione, nel differenziamento e nella maturazione delle cellule T e, pertanto, è profondamente coinvolta nell'induzione e nel mantenimento della tolleranza al "self" <sup>101 102 103</sup>. Inoltre, è stato osservato che l'attivazione persistente di ERK può indurre apoptosi che risulta essere profondamente alterata nel LES <sup>104 105</sup>. I nostri dati suggeriscono che gli anticorpi anti-ER $\alpha$ , agendo da anticorpi stimolanti, giocano un ruolo importante nell'attivazione della via di segnale mediata da ERK e, di conseguenza, possono influenzare la modulazione dell'apoptosi nei linfociti. Questi risultati potrebbero essere rilevanti anche alla luce delle

recenti osservazioni che hanno evidenziato una correlazione positiva tra l'attività di ERK e lo SLEDAI nei pazienti con LES <sup>106</sup>.

L'equilibrio tra apoptosi e proliferazione periferica svolge un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi del sistema immunitario <sup>107</sup> <sup>108</sup>. In questo studio, abbiamo dimostrato che anticorpi anti-ER $\alpha$  inducono apoptosi in linfociti "resting", ossia non stimolati, probabilmente inducendo un aumento dell'espressione sulla membrana plasmatica cellulare delle molecole Fas/CD95 e FasL/CD95L. L'effetto pro-apoptotico degli anticorpi anti-ER $\alpha$  sui linfociti "resting" potrebbe contribuire al rilascio di materiale nucleare e, quindi, esser fonte di autoantigeni, se questi non vengono tempestivamente rimossi. A riguardo, nel LES è stata dimostrata una difettiva rimozione delle cellule morte con conseguente accumulo di autoantigeni nucleari che contribuiscono a stimolare il sistema immunitario a produrre autoanticorpi <sup>71</sup> <sup>109</sup>. Inoltre, il materiale apoptotico non è solo fonte di autoantigeni ma anche di molecole endogene che possono essere potenti induttori della produzione di citochine infiammatorie, contribuendo quindi alla patogenesi della malattia <sup>110</sup>.

Nei linfociti T attivati con PHA/IL-2, il trattamento con anticorpi anti-ER $\alpha$  non ha mostrato alcun effetto sull'apoptosi, mentre ha indotto un aumento significativo della proteina anti-apoptotica Bcl-2. La morte cellulare indotta dall'attivazione è un meccanismo di regolazione cruciale nell'eliminazione delle cellule T attivate "autoreattive" <sup>111</sup>. In cellule T attivate di pazienti affetti da LES è stato osservato un difetto nella morte cellulare mediata da CD3 <sup>112</sup>. L'aumento della molecola anti-apoptotica

Bcl-2, che abbiamo osservato in questo studio, ha un ovvio significato fisiologico, perché potrebbe contribuire alla mancata eliminazione dei linfociti T "autoreattivi". I nostri dati mostrano anche un aumento significativo della proliferazione dei linfociti T attivati, pre-trattati con gli anticorpi anti-ER $\alpha$ , suggerendo un ulteriore ruolo patogenetico di questi autoanticorpi, in quanto agiscono direttamente sul meccanismo di espansione clonale delle cellule T "autoreattive" (Fig. 11).



**Fig. 11. Potenziale ruolo patogenetico degli anticorpi anti-ER $\alpha$  purificati da pazienti con LES.**

Un modello che mostra l'effetto degli anticorpi anti-ER $\alpha$  sui linfociti T.

(A) Gli anticorpi anti-ER $\alpha$  attivano i linfociti T "resting" e inducono la morte cellulare per apoptosi favorendo un accumulo dei corpi apoptotici che possono amplificare la risposta infiammatoria.

(B) Gli anticorpi anti-ER $\alpha$  inducono la proliferazione di linfociti T attivati promuovendo l'espansione clonale dei linfociti T autoreattivi.

E' stato dimostrato che gli estrogeni contribuiscono, almeno in parte, alla maggiore incidenza del LES nelle donne <sup>113</sup>. In questo studio abbiamo esteso le attuali conoscenze riguardo al ruolo di ER $\alpha$  nella patogenesi del LES, fornendo l'evidenza che gli anticorpi anti-ER $\alpha$ , interferendo con l'attività dei linfociti T, possono contribuire alla progressione della malattia. Infatti, abbiamo osservato una significativa correlazione positiva tra la presenza di tali autoanticorpi e lo SLEDAI. I nostri risultati suggeriscono due potenziali implicazioni cliniche. In primo luogo, l'utilizzo degli anticorpi anti-ER $\alpha$  come ulteriori biomarcatori dell'attività della malattia nei pazienti con LES. Molti fattori (i.e. anti-dsDNA, molecole del complemento attivate, livelli di citochine, marcatori di attivazione endoteliale, ecc.) sono stati indicati, nel LES, come biomarcatori dell'attività della malattia. Tuttavia, la maggior parte di questi risultano avere una limitata utilità nella pratica clinica <sup>114</sup>. Ciò sottolinea la necessità di trovare ulteriori biomarcatori di malattia. In secondo luogo, i nostri risultati potrebbero essere utilizzati per sviluppare nuovi interventi terapeutici mirati alla riduzione dell'attività del LES. Un valido approccio terapeutico, in questa malattia, potrebbe essere quello di ridurre o bloccare le risposte immunologiche mediate dagli anticorpi anti-ER $\alpha$ .

In conclusione, riteniamo che i nostri dati possano contribuire alla comprensione del complesso meccanismo patogenetico alla base del LES. Studi longitudinali, comprendenti una più ampia casistica di soggetti, sono necessari al fine di traslare i risultati ottenuti nella pratica clinica.



## ***Ringraziamenti***

Ringrazio il Dott. Walter Malorni per il supporto e la disponibilità a svolgere la tesi di Dottorato presso il Reparto di Farmacologia dei Processi Degenerativi e dell'Invecchiamento da lui diretto, Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità di Roma.

## BIBLIOGRAFIA

1. Cutolo, M. *et al.* Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. *Lupus* **13**, 635-638 (2004).
2. Bouman, A., Heineman, M.J. & Faas, M.M. Sex hormones and the immune response in humans. *Hum Reprod Update* **11**, 411-423 (2005).
3. Karpuzoglu, E. & Zouali, M. The Multi-faceted Influences of Estrogen on Lymphocytes: Toward Novel Immuno-interventions Strategies for Autoimmunity Management. *Clin Rev Allergy Immunol* (2009).
4. Miller, W.L. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev* **9**, 295-318 (1988).
5. Jordan, V.C., Mittal, S., Gosden, B., Koch, R. & Lieberman, M.E. Structure-activity relationships of estrogens. *Environ Health Perspect* **61**, 97-110 (1985).
6. Duax, W.L., Griffin, J.F., Weeks, C.M. & Wawrzak, Z. The mechanism of action of steroid antagonists: insights from crystallographic studies. *J Steroid Biochem* **31**, 481-492 (1988).
7. Goodman, A. *Le Basi Farmacologiche della Terapia* (ed. 1997). McGraw-Hill.

8. Zhao, L., O'Neill, K. & Diaz Brinton, R. Selective estrogen receptor modulators (SERMs) for the brain: current status and remaining challenges for developing NeuroSERMs. *Brain Res Brain Res Rev* **49**, 472-493 (2005).
9. Ascenzi, P., Bocedi, A. & Marino, M. Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Mol Aspects Med* **27**, 299-402 (2006).
10. Nilsson, S. *et al.* Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* **81**, 1535-1565 (2001).
11. Flouriot, G. *et al.* Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. *EMBO J* **19**, 4688-4700 (2000).
12. Denger, S. *et al.* ERalpha gene expression in human primary osteoblasts: evidence for the expression of two receptor proteins. *Mol Endocrinol* **15**, 2064-2077 (2001).
13. Li, L., Haynes, M.P. & Bender, J.R. Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4807-4812 (2003).
14. Marino, M. & Ascenzi, P. Membrane association of estrogen receptor alpha and beta influences 17beta-estradiol-mediated cancer cell proliferation. *Steroids* **73**, 853-858 (2008).

15. Levin, E.R. Plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab* (2009).
16. Bjornstrom, L. & Sjoberg, M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol* **19**, 833-842 (2005).
17. Zhang, D. & Trudeau, V.L. Integration of membrane and nuclear estrogen receptor signaling. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **144**, 306-315 (2006).
18. Razandi, M. *et al.* Identification of a structural determinant necessary for the localization and function of estrogen receptor alpha at the plasma membrane. *Mol Cell Biol* **23**, 1633-1646 (2003).
19. Pedram, A., Razandi, M. & Levin, E.R. Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. *Mol Endocrinol* **20**, 1996-2009 (2006).
20. Acconcia, F. *et al.* Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol. *Mol Biol Cell* **16**, 231-237 (2005).
21. Galluzzo, P., Caiazza, F., Moreno, S. & Marino, M. Role of ERbeta palmitoylation in the inhibition of human colon cancer cell proliferation. *Endocr Relat Cancer* **14**, 153-167 (2007).
22. Guo, X., Razandi, M., Pedram, A., Kassab, G. & Levin, E.R. Estrogen induces vascular wall dilation: mediation through kinase

- signaling to nitric oxide and estrogen receptors alpha and beta. *J Biol Chem* **280**, 19704-19710 (2005).
23. Phiel, K.L., Henderson, R.A., Adelman, S.J. & Elloso, M.M. Differential estrogen receptor gene expression in human peripheral blood mononuclear cell populations. *Immunol Lett* **97**, 107-113 (2005).
  24. Pernis, A.B. Estrogen and CD4+ T cells. *Curr Opin Rheumatol* **19**, 414-420 (2007).
  25. Pierdominici, M. *et al.* Estrogen receptor profiles in human peripheral blood lymphocytes. *Immunol Lett* **132**, 79-85 (2010).
  26. Benten, W.P., Lieberherr, M., Giese, G. & Wunderlich, F. Estradiol binding to cell surface raises cytosolic free calcium in T cells. *FEBS Lett* **422**, 349-353 (1998).
  27. Benten, W.P., Stephan, C., Lieberherr, M. & Wunderlich, F. Estradiol signaling via sequesterable surface receptors. *Endocrinology* **142**, 1669-1677 (2001).
  28. Benten, W.P., Stephan, C. & Wunderlich, F. B cells express intracellular but not surface receptors for testosterone and estradiol. *Steroids* **67**, 647-654 (2002).
  29. Deroo, B.J. & Korach, K.S. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest* **116**, 561-570 (2006).
  30. Cutolo, M. *et al.* The immunomodulatory effects of estrogens: clinical relevance in immune-mediated rheumatic diseases. *Ann N Y Acad Sci* **1193**, 36-42 (2010).

31. Rubtsov, A.V., Rubtsova, K., Kappler, J.W. & Marrack, P. Genetic and hormonal factors in female-biased autoimmunity. *Autoimmun Rev* **9**, 494-498 (2010).
32. Nalbandian, G. & Kovats, S. Understanding sex biases in immunity: effects of estrogen on the differentiation and function of antigen-presenting cells. *Immunol Res* **31**, 91-106 (2005).
33. Mor, G. *et al.* Interaction of the estrogen receptors with the Fas ligand promoter in human monocytes. *J Immunol* **170**, 114-122 (2003).
34. Capellino, S. *et al.* [17beta-Estradiol and testosterone influence the mRNA expression and the time course of inflammatory cytokines in activated human monocytic cell line (THP-1)]. *Reumatismo* **57**, 193-196 (2005).
35. Miyagi, M., Aoyama, H., Morishita, M. & Iwamoto, Y. Effects of sex hormones on chemotaxis of human peripheral polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J Periodontol* **63**, 28-32 (1992).
36. Garcia-Duran, M. *et al.* Estrogen stimulates neuronal nitric oxide synthase protein expression in human neutrophils. *Circ Res* **85**, 1020-1026 (1999).
37. Ferguson, M.M. & McDonald, F.G. Oestrogen as an inhibitor of human NK cell cytotoxicity. *FEBS Lett* **191**, 145-148 (1985).
38. Yovel, G., Shakhar, K. & Ben-Eliyahu, S. The effects of sex, menstrual cycle, and oral contraceptives on the number and activity of natural killer cells. *Gynecol Oncol* **81**, 254-262 (2001).

39. Staples, J.E. *et al.* Estrogen receptor alpha is necessary in thymic development and estradiol-induced thymic alterations. *J Immunol* **163**, 4168-4174 (1999).
40. Tanriverdi, F., Silveira, L.F., MacColl, G.S. & Bouloux, P.M. The hypothalamic-pituitary-gonadal axis: immune function and autoimmunity. *J Endocrinol* **176**, 293-304 (2003).
41. Yao, G. & Hou, Y. Thymic atrophy via estrogen-induced apoptosis is related to Fas/FasL pathway. *Int Immunopharmacol* **4**, 213-221 (2004).
42. Zoller, A.L., Schnell, F.J. & Kersh, G.J. Murine pregnancy leads to reduced proliferation of maternal thymocytes and decreased thymic emigration. *Immunology* **121**, 207-215 (2007).
43. Ryan, M.R. *et al.* An IL-7-dependent rebound in thymic T cell output contributes to the bone loss induced by estrogen deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 16735-16740 (2005).
44. Wang, C. *et al.* GPR30 contributes to estrogen-induced thymic atrophy. *Mol Endocrinol* **22**, 636-648 (2008).
45. Maret, A. *et al.* Estradiol enhances primary antigen-specific CD4 T cell responses and Th1 development in vivo. Essential role of estrogen receptor alpha expression in hematopoietic cells. *Eur J Immunol* **33**, 512-521 (2003).
46. Delpy, L. *et al.* Estrogen enhances susceptibility to experimental autoimmune myasthenia gravis by promoting type 1-polarized immune responses. *J Immunol* **175**, 5050-5057 (2005).

47. Krishnan, L. *et al.* Pregnancy impairs resistance of C57BL/6 mice to *Leishmania major* infection and causes decreased antigen-specific IFN-gamma response and increased production of T helper 2 cytokines. *J Immunol* **156**, 644-652 (1996).
48. Buyon, J.P. The effects of pregnancy on autoimmune diseases. *J Leukoc Biol* **63**, 281-287 (1998).
49. Takeuchi, T. *et al.* T cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* **38**, 339-346 (2005).
50. Medina, K.L., Strasser, A. & Kincade, P.W. Estrogen influences the differentiation, proliferation, and survival of early B-lineage precursors. *Blood* **95**, 2059-2067 (2000).
51. Grimaldi, C.M., Hill, L., Xu, X., Peeva, E. & Diamond, B. Hormonal modulation of B cell development and repertoire selection. *Mol Immunol* **42**, 811-820 (2005).
52. Kanda, N. & Tamaki, K. Estrogen enhances immunoglobulin production by human PBMCs. *J Allergy Clin Immunol* **103**, 282-288 (1999).
53. Latham, K.A. *et al.* Estradiol treatment redirects the isotype of the autoantibody response and prevents the development of autoimmune arthritis. *J Immunol* **171**, 5820-5827 (2003).
54. Starr, T.K., Jameson, S.C. & Hogquist, K.A. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* **21**, 139-176 (2003).
55. Schulze, C. *et al.* Clearance deficiency--a potential link between infections and autoimmunity. *Autoimmun Rev* **8**, 5-8 (2008).



56. Nagata, S., Hanayama, R. & Kawane, K. Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell* **140**, 619-630.
57. Davies, A.J. Immunological tolerance and the autoimmune response. *Autoimmun Rev* **7**, 538-543 (2008).
58. Abbas, A.K. *Immunologia Cellulare e Molecolare* (ed. 2002). Piccin.
59. Betterle, C. *Le malattie autoimmuni* (ed. 2001). Piccin.
60. Brickman, C.M. & Shoenfeld, Y. The mosaic of autoimmunity. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* **235**, 3-15 (2001).
61. Whitacre, C.C. Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol* **2**, 777-780 (2001).
62. Rahman, A. & Isenberg, D.A. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* **358**, 929-939 (2008).
63. Yurasov, S., Hammersen, J., Tiller, T., Tsuiji, M. & Wardemann, H. B-cell tolerance checkpoints in healthy humans and patients with systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci* **1062**, 165-174 (2005).
64. Tenbrock, K., Juang, Y.T., Kyttaris, V.C. & Tsokos, G.C. Altered signal transduction in SLE T cells. *Rheumatology (Oxford)* **46**, 1525-1530 (2007).
65. Zhang, J. *et al.* Polyreactive autoantibodies in systemic lupus erythematosus have pathogenic potential. *J Autoimmun* **33**, 270-274 (2009).
66. Peng, S.L. Altered T and B lymphocyte signaling pathways in lupus. *Autoimmun Rev* **8**, 179-183 (2009).

67. Crispin, J.C. *et al.* Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. *Trends Mol Med* **16**, 47-57 (2010).
68. Kuenkele, S., Beyer, T.D., Voll, R.E., Kalden, J.R. & Herrmann, M. Impaired clearance of apoptotic cells in systemic lupus erythematosus: challenge of T and B cell tolerance. *Curr Rheumatol Rep* **5**, 175-177 (2003).
69. Bijl, M., Reefman, E., Horst, G., Limburg, P.C. & Kallenberg, C.G. Reduced uptake of apoptotic cells by macrophages in systemic lupus erythematosus: correlates with decreased serum levels of complement. *Ann Rheum Dis* **65**, 57-63 (2006).
70. Hepburn, A.L. *et al.* In vivo evidence for apoptosis in the bone marrow in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* **66**, 1106-1109 (2007).
71. Grossmayer, G.E. *et al.* Removal of dying cells and systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol* **15**, 383-390 (2005).
72. Gaip, U.S. *et al.* Clearance deficiency and systemic lupus erythematosus (SLE). *J Autoimmun* **28**, 114-121 (2007).
73. Baumann, I. *et al.* Impaired uptake of apoptotic cells into tingible body macrophages in germinal centers of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **46**, 191-201 (2002).
74. Ballestar, E., Esteller, M. & Richardson, B.C. The epigenetic face of systemic lupus erythematosus. *J Immunol* **176**, 7143-7147 (2006).

75. Strickland, F.M. & Richardson, B.C. Epigenetics in human autoimmunity. Epigenetics in autoimmunity - DNA methylation in systemic lupus erythematosus and beyond. *Autoimmunity* **41**, 278-286 (2008).
76. Smith-Bouvier, D.L. *et al.* A role for sex chromosome complement in the female bias in autoimmune disease. *J Exp Med* **205**, 1099-1108 (2008).
77. Grimaldi, C.M. Sex and systemic lupus erythematosus: the role of the sex hormones estrogen and prolactin on the regulation of autoreactive B cells. *Curr Opin Rheumatol* **18**, 456-461 (2006).
78. Nicholas, M.W. *et al.* A novel subset of memory B cells is enriched in autoreactivity and correlates with adverse outcomes in SLE. *Clin Immunol* **126**, 189-201 (2008).
79. Bynoe, M.S., Grimaldi, C.M. & Diamond, B. Estrogen up-regulates Bcl-2 and blocks tolerance induction of naive B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2703-2708 (2000).
80. Grimaldi, C.M., Cleary, J., Dagtas, A.S., Moussai, D. & Diamond, B. Estrogen alters thresholds for B cell apoptosis and activation. *J Clin Invest* **109**, 1625-1633 (2002).
81. McMurray, R.W., Suwannaroj, S., Ndebele, K. & Jenkins, J.K. Differential effects of sex steroids on T and B cells: modulation of cell cycle phase distribution, apoptosis and bcl-2 protein levels. *Pathobiology* **69**, 44-58 (2001).

82. Sherer, Y., Gorstein, A., Fritzler, M.J. & Shoenfeld, Y. Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: more than 100 different antibodies found in SLE patients. *Semin Arthritis Rheum* **34**, 501-537 (2004).
83. Kelly, R.H. & Vertosick, F.T., Jr. Systemic lupus erythematosus: a role for anti-receptor antibodies? *Med Hypotheses* **20**, 95-101 (1986).
84. Lourenco, E.V. & La Cava, A. Cytokines in systemic lupus erythematosus. *Curr Mol Med* **9**, 242-254 (2009).
85. Whitacre, C.C., Reingold, S.C. & O'Looney, P.A. A gender gap in autoimmunity. *Science* **283**, 1277-1278 (1999).
86. Rider, V. *et al.* Estrogen increases CD40 ligand expression in T cells from women with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* **28**, 2644-2649 (2001).
87. Crow, M.K. & Kirou, K.A. Regulation of CD40 ligand expression in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* **13**, 361-369 (2001).
88. Hochberg, M.C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **40**, 1725 (1997).
89. Arnett, F.C. *et al.* The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **31**, 315-324 (1988).

90. Criteria for diagnosis of Behcet's disease. International Study Group for Behcet's Disease. *Lancet* **335**, 1078-1080 (1990).
91. Pierdominici, M. *et al.* Pyrimethamine (2,4-diamino-5-p-chlorophenyl-6-ethylpyrimidine) induces apoptosis of freshly isolated human T lymphocytes, bypassing CD95/Fas molecule but involving its intrinsic pathway. *J Pharmacol Exp Ther* **315**, 1046-1057 (2005).
92. Huang, X., Johansson, S.G., Zargari, A. & Nordvall, S.L. Allergen cross-reactivity between *Pityrosporum orbiculare* and *Candida albicans*. *Allergy* **50**, 648-656 (1995).
93. Angulo, R. & Fulcher, D.A. Measurement of *Candida*-specific blastogenesis: comparison of carboxyfluorescein succinimidyl ester labelling of T cells, thymidine incorporation, and CD69 expression. *Cytometry* **34**, 143-151 (1998).
94. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
95. Young, I.T. Proof without prejudice: use of the Kolmogorov-Smirnov test for the analysis of histograms from flow systems and other sources. *J Histochem Cytochem* **25**, 935-941 (1977).
96. Nagata, S. & Golstein, P. The Fas death factor. *Science* **267**, 1449-1456 (1995).
97. van Delft, M.F. & Huang, D.C. How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis. *Cell Res* **16**, 203-213 (2006).

98. Mudarris, A. & Peck, E.J., Jr. Human anti-estrogen receptor antibodies: assay, characterization, and age- and sex-related differences. *J Clin Endocrinol Metab* **64**, 246-254 (1987).
99. Borkowski, A., Gyling, M., Muquardt, C., Body, J.J. & Leclercq, G. Estrogen-like activity of a subpopulation of natural antiestrogen receptor autoantibodies in man. *Endocrinology* **128**, 3283-3292 (1991).
100. Tassignon, J., Haeseleer, F. & Borkowski, A. Natural antiestrogen receptor autoantibodies in man with estrogenic activity in mammary carcinoma cell culture: study of their mechanism of action; evidence for involvement of estrogen-like epitopes. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 3464-3470 (1997).
101. Downward, J., Graves, J.D., Warne, P.H., Rayter, S. & Cantrell, D.A. Stimulation of p21ras upon T-cell activation. *Nature* **346**, 719-723 (1990).
102. Genot, E. & Cantrell, D.A. Ras regulation and function in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* **12**, 289-294 (2000).
103. Zhong, X.P. *et al.* Regulation of T cell receptor-induced activation of the Ras-ERK pathway by diacylglycerol kinase zeta. *J Biol Chem* **277**, 31089-31098 (2002).
104. Carr, B.I., Wang, Z. & Kar, S. K vitamins, PTP antagonism, and cell growth arrest. *J Cell Physiol* **193**, 263-274 (2002).
105. Rapoport, M.J. *et al.* Amelioration of SLE-like manifestations in (NZBxNZW)F1 mice following treatment with a peptide based on

- the complementarity determining region 1 of an autoantibody is associated with a down-regulation of apoptosis and of the pro-apoptotic factor JNK kinase. *Clin Immunol* **117**, 262-270 (2005).
106. Molad, Y., Amit-Vasina, M., Bloch, O., Yona, E. & Rapoport, M.J. Increased ERK and JNK activities correlate with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* **69**, 175-180 (2010).
107. Krammer, P.H., Arnold, R. & Lavrik, I.N. Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol* **7**, 532-542 (2007).
108. Giovannetti, A. *et al.* Apoptosis in the homeostasis of the immune system and in human immune mediated diseases. *Curr Pharm Des* **14**, 253-268 (2008).
109. Gaip, U.S. *et al.* Clearance of apoptotic cells in human SLE. *Curr Dir Autoimmun* **9**, 173-187 (2006).
110. Kontaki, E. & Boumpas, D.T. Innate immunity in systemic lupus erythematosus: sensing endogenous nucleic acids. *J Autoimmun* **35**, 206-211 (2010).
111. Green, D.R., Droin, N. & Pinkoski, M. Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev* **193**, 70-81 (2003).
112. Kovacs, B., Vassilopoulos, D., Vogelgesang, S.A. & Tsokos, G.C. Defective CD3-mediated cell death in activated T cells from patients with systemic lupus erythematosus: role of decreased intracellular TNF-alpha. *Clin Immunol Immunopathol* **81**, 293-302 (1996).

113. Sekigawa, I. *et al.* A new hypothesis of the possible mechanisms of gender differences in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* **28**, 419-423 (2010).
114. Illei, G.G., Tackey, E., Lapteva, L. & Lipsky, P.E. Biomarkers in systemic lupus erythematosus. I. General overview of biomarkers and their applicability. *Arthritis Rheum* **50**, 1709-1720 (2004).