

XXXIII Congresso Sezione SIAAIC Toscana

I Congresso Sezione Toscana-Emilia Romagna
e San Marino- Umbria e Marche

Convitto della Calza

Firenze 10-11 novembre 2017



Società Italiana di
Allergologia, Asma ed
Immunologia Clinica

MEETING SERIES

Lupus ed anti-DNA: significato e diagnostica

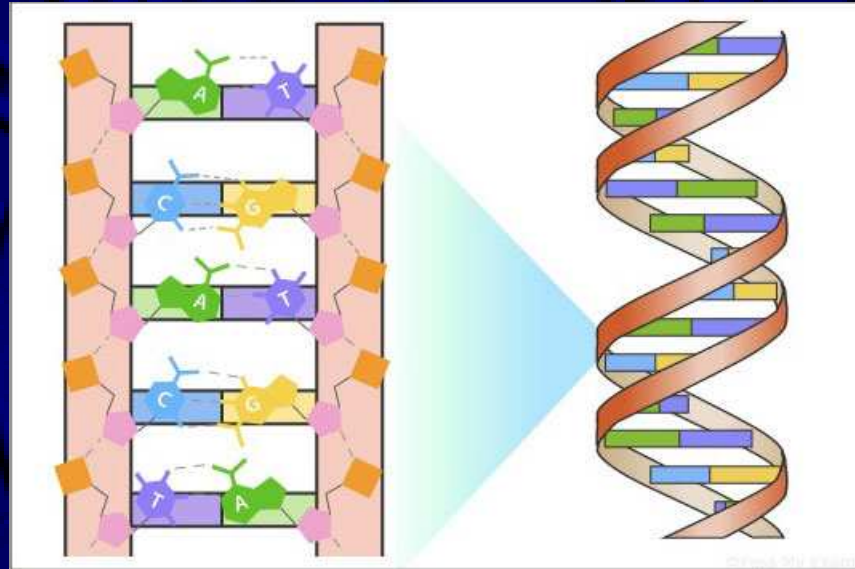
Paola Migliorini
Immunoallergologia
Università di Pisa



Anticorpi anti-DNA: la storia

- Miescher P, Straessler R. New serological methods for the detection of LE factor. *Vox Surg* 1957;2:283–87.
- Ceppellini R, Polli E, Celada F. A DNA-reaction factor in serum of a patient with lupus erythematosus diffuses. *Proc Soc Exp Biol Med* 1957;96:572–74.
- Robbins WD, Holman HR, Deicher H, Kunkel HG. Complement fixation with cell nuclei and DNA in lupus erythematosus. *Proc Soc Exp Biol* 1957;9:575–9.
- Seligmann M. Evidence in the serum of patients with systemic lupus erythematosus of a substance producing a precipitation reaction with DNA. (Original in French). *CR Soc Biol (Paris)* 1957;245:328–33.

Anti-DNA antibodies: epitopes



Anti-ssDNA

- Purine and pyrimidine bases
- Nucleosides

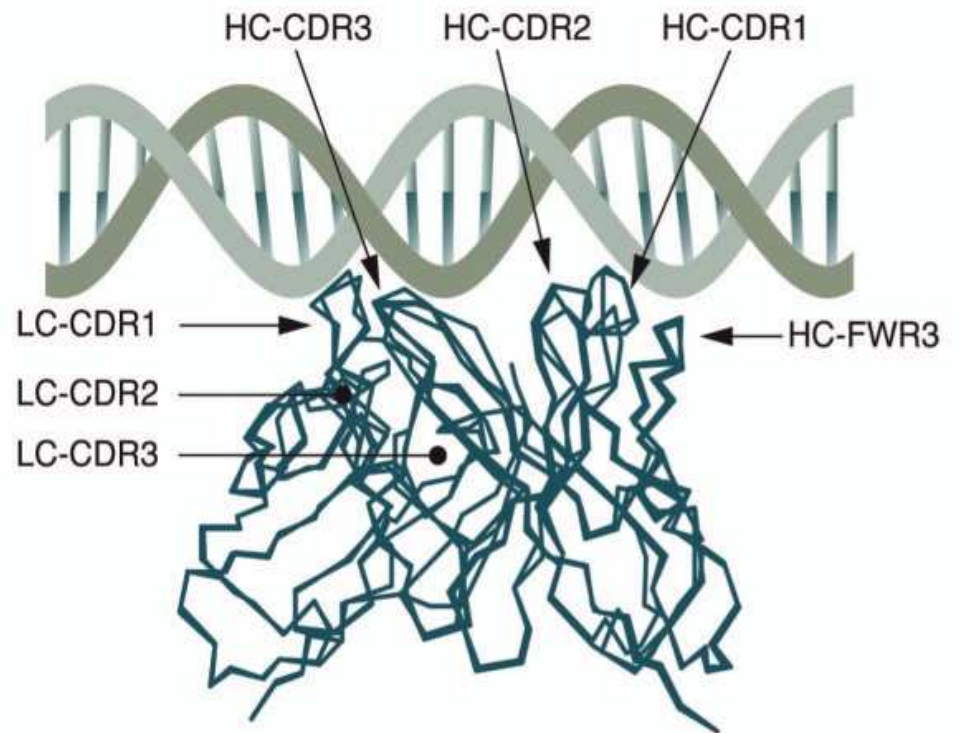
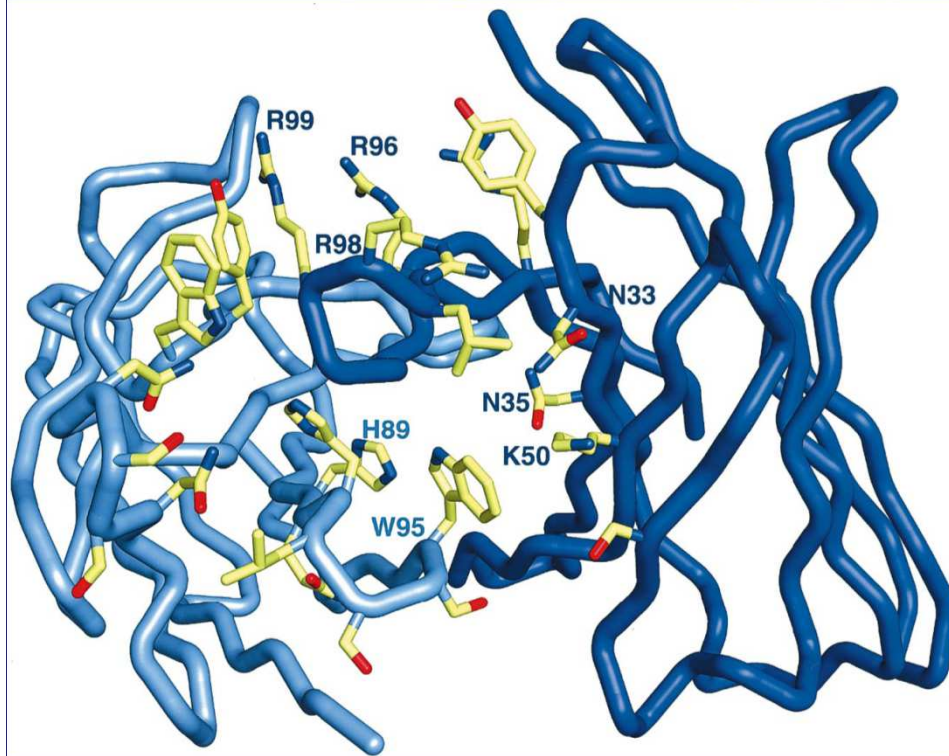
Anti-dsDNA

- Ribose-phosphate backbone:
- linear epitopes
 - conformational epitopes

Anticorpi anti-ssDNA e dsDNA

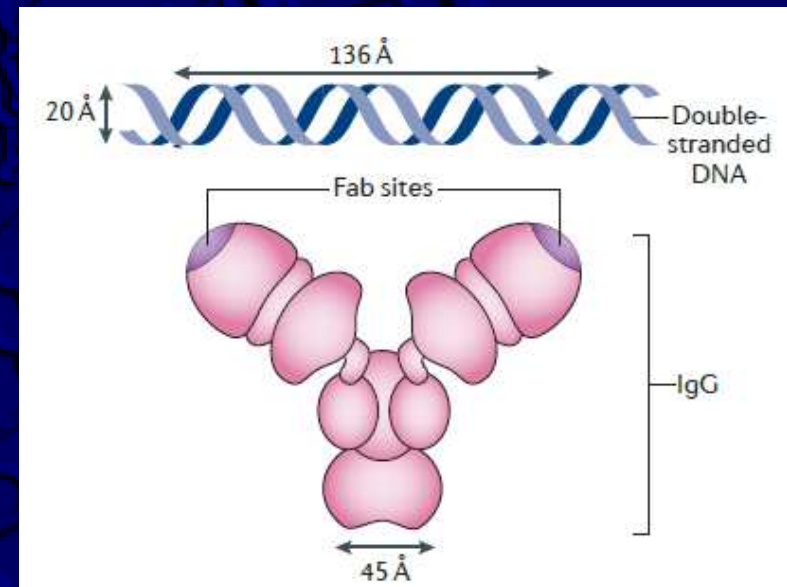
- Anticorpi anti-ssDNA: quasi totalità dei pazienti con lupus con alti titoli (ma presenti anche in altre connettiviti, in malattie infettive e neoplastiche)
- Anticorpi anti-dsDNA: titoli più bassi e frequenza variabile in rapporto ad attività di malattia (ma presenti pressochè esclusivamente nel lupus)

Anticorpi anti-dsDNA: il sito di legame



Interazione anticorpi-DNA

- La specificità di legame dipende da catena pesante ma è modificata da catena leggera
- Spesso coinvolta un'ampia superficie planare
- In alcuni casi dimostrata flessibilità e plasticità del CDR3



Struttura degli anticorpi anti-dsDNA

Pochissimi sono codificati da geni di linea germinale non mutati

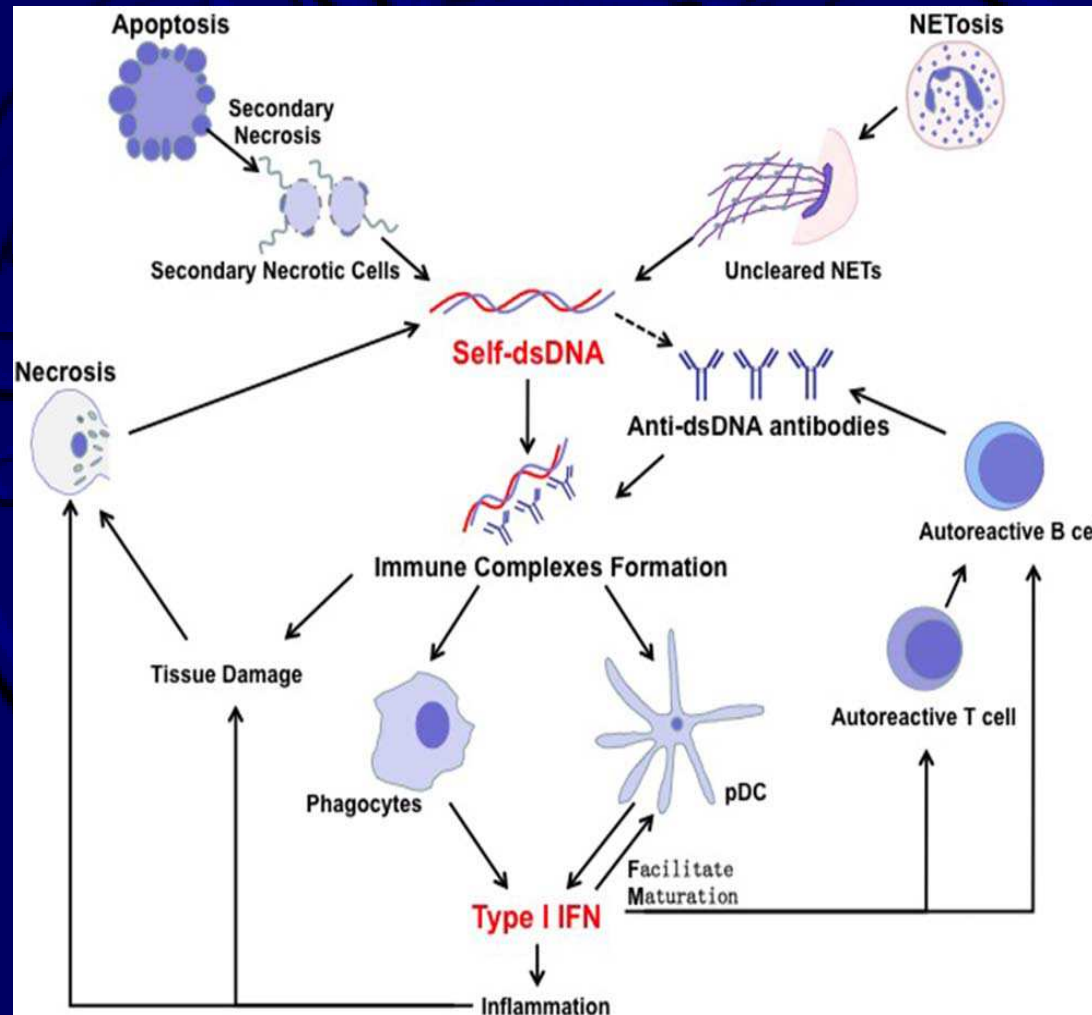
- In massima parte sono:
 - Mutati nella terza regione ipervariabile
 - Elevato rapporto mutazioni espresse/silenti
 - Le mutazioni si verificano nella cellula B (a livello di centro germinativo?)
 - Aumento di arginine e asparagine (60% delle mutazioni converte serina ad arginina)

La produzione di anticorpi anti-dsDNA

La risposta autoimmune al DNA è simile a quella ad antigeni esogeni:

- Espansione di numero limitato di cloni B
- Switch da IgM a IgG
- Accumulo mutazioni che aumentano l'affinità per il DNA

Sorgenti di DNA nel lupus

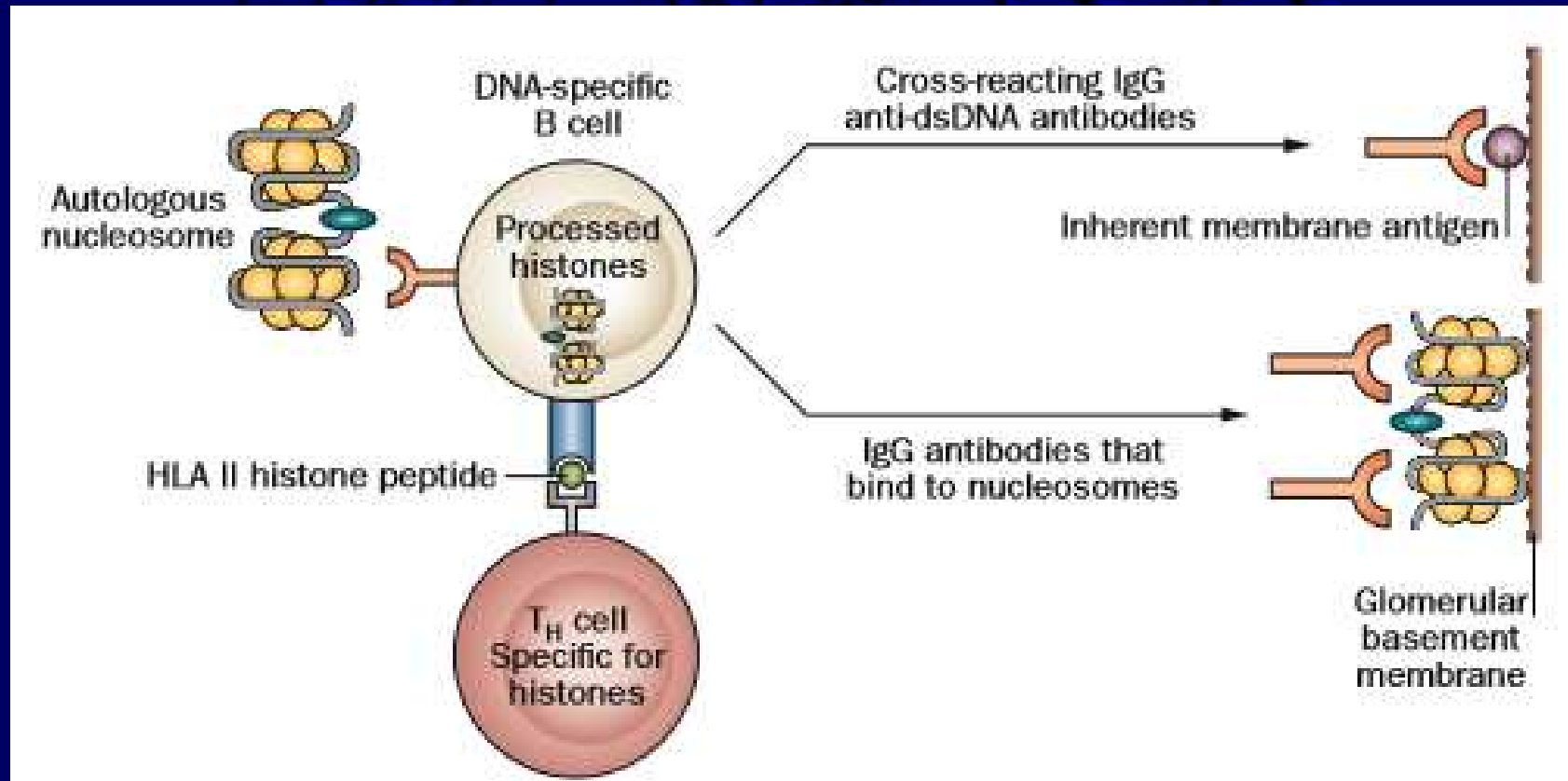


Bai, Clin Exp Immunol 2017

Ma il DNA è l'antigene che induce anti-DNA?

- DNA nativo poco immunogenico anche se complessato con mBSA e in adiuvante.
- DNA batterico induce anticorpi non crossreattivi con DNA di mammifero.
- dsDNA complessato con polipeptidi induce anticorpi anti-DNA
- Polispecifici perchè legano con alta affinità:
 - Acidi nucleici
 - Cardiolipina e fosfolipidi
 - Proteine

Patogenicit  degli anti-DNA



Rekvik O, Nat Rev Rheumatol 2015

Analisi dei depositi immuni a livello renale

- Depositi elettrondensi nella matrice mesangiale e nella membrana basale glomerulare
- Analisi con immunoelettromicroscopia e Tunel-IEM

Risultato: anticorpi colocalizzano con istoni e DNA (probabilmente nucleosomi)

Berden, Rekvig

- I depositi immuni contengono anticorpi anti-DNA polireattivi e molti anticorpi di altre specificità (anti-enolasi, anti annessina)

Madaio, Eilat, Ghiggeri

Anti-dsDNA: altri meccanismi di danno

Gli anticorpi anti-dsDNA possono indurre la produzione di citochine e chemochine in cellule dell'epitelio tubulare renale

Yung, Clin Sci 2016

Anticorpi anti-dsDNA nel lupus

Anti-dsDNA sono associati con

- malattia attiva
- nefrite attiva

Tuttavia, la nefrite può svilupparsi in assenza di anti-DNA e non tutti gli anti-dsDNA sono nefritogenici

Misura di anticorpi anti-dsDNA

- FARR assay: *sensibile e specifico*
- Crithidia luciliae: *specifico, bassa sensibilità*
- ELISA: *sensibile, specificità variabile*

Il test di Farr a confronto con un test ELISA

- Frequenza simile di risultati positivi nella malattia attiva
- Aumento simile del titolo anticorpale nelle riacutizzazioni della nefrite
- Specificità più elevata per ELISA (minor frequenza di risultati positivi nelle malattie di controllo)

De Leeuw, Rheumatol 2017

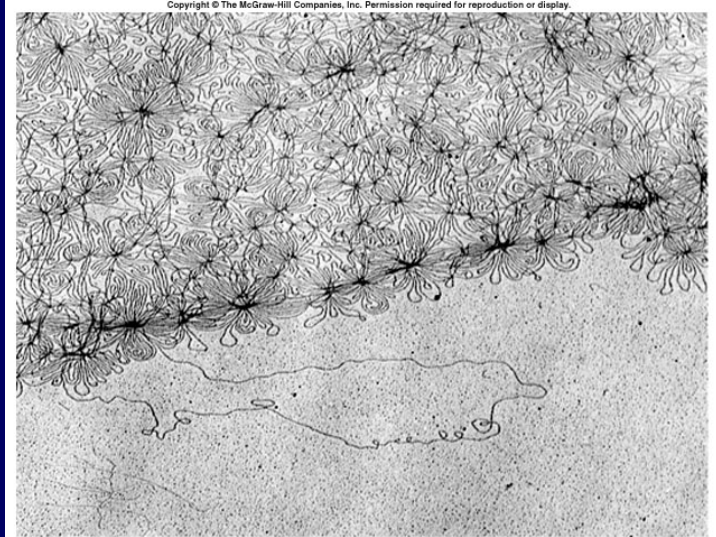
Crithidia Fasciculata var. Luciliae

- DNA circolare non complessato con istoni nel kinetoplasto
- DNA con elevato grado di curvatura, simile al DNA nucleosomiale
- Test in immunofluorescenza: semiquantitativo, manuale

Misura di anticorpi anti-dsDNA: confronto fra ELISA

- Numerosi lavori hanno confrontato differenti metodiche per la determinazione di anti-dsDNA
- I risultati dimostrano una correlazione non elevata fra metodiche diverse
- Le diverse metodiche ELISA differiscono sotto vari aspetti:
 - tipo di DNA (genomico, plasmidico)
 - immobilizzazione alla fase solida
 - esecuzione del test
- Fissando la specificità al 95%, la sensibilità può variare fra 60% e 80%

Come mantenere la specificità del CLIF in un test ELISA?



- Utilizzare DNA di *Crithidia* contenente microcircoli
- Costruire complessi simili a nucleosomi utilizzando peptidi istonici

Histone 4 (14-34): GAK**RHRK**VLRDNIQGITKPAI

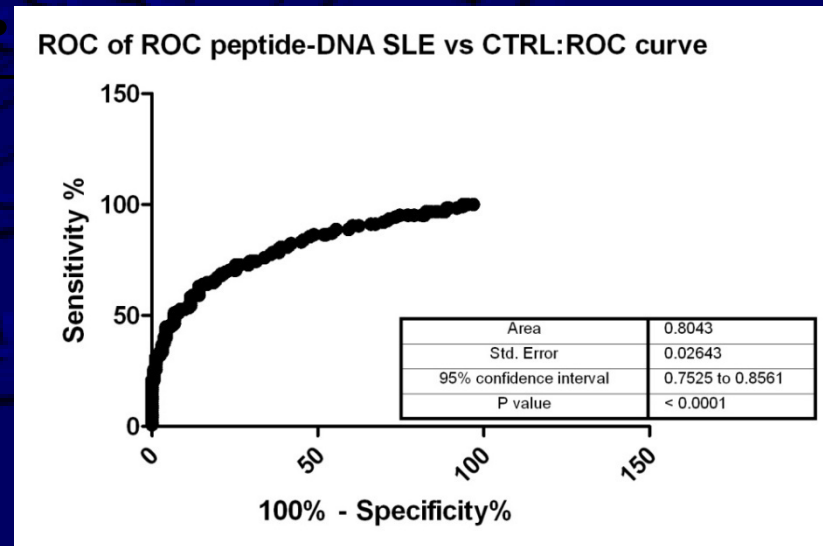
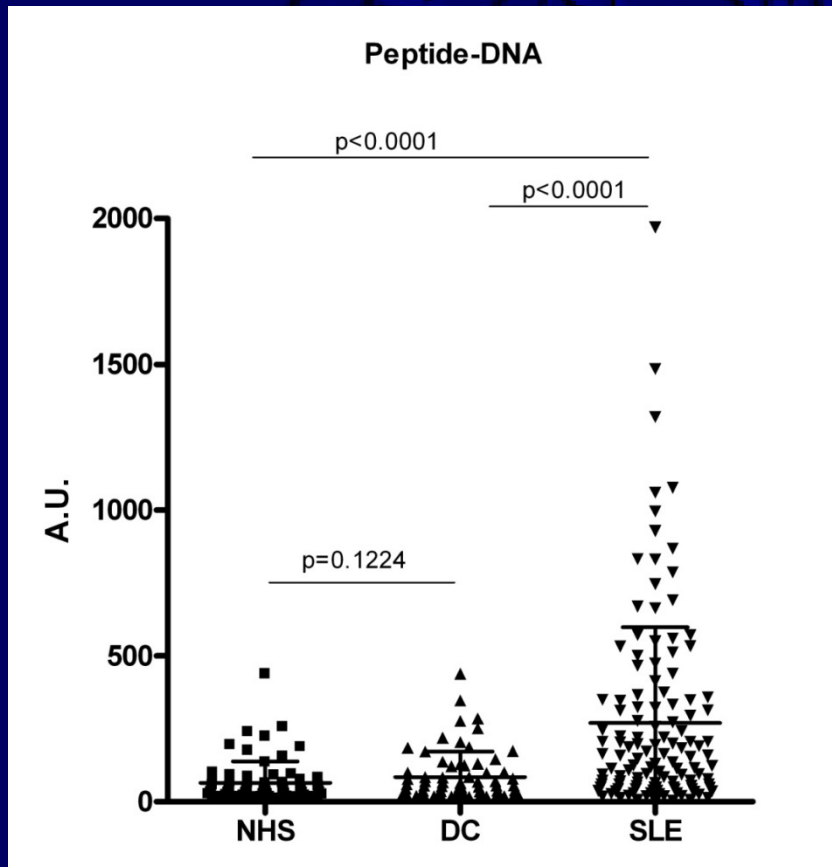
Histone 4 (7-22): GKGLGKGGAK**RHRK**VL



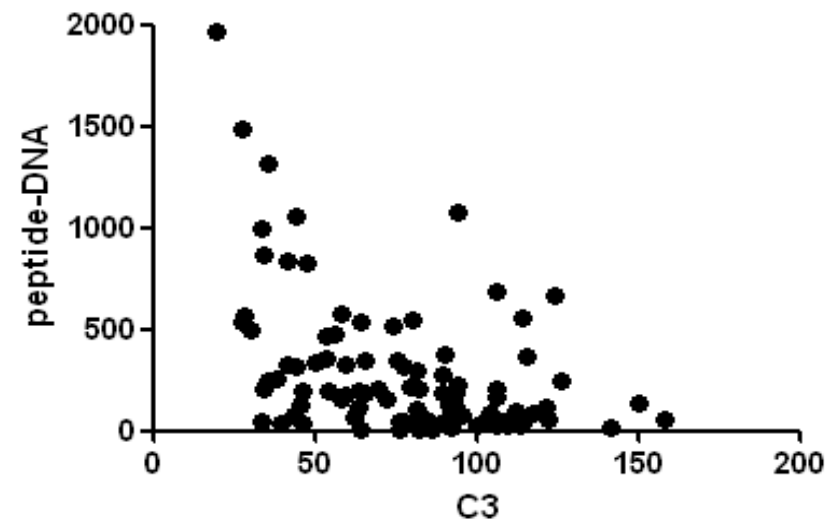
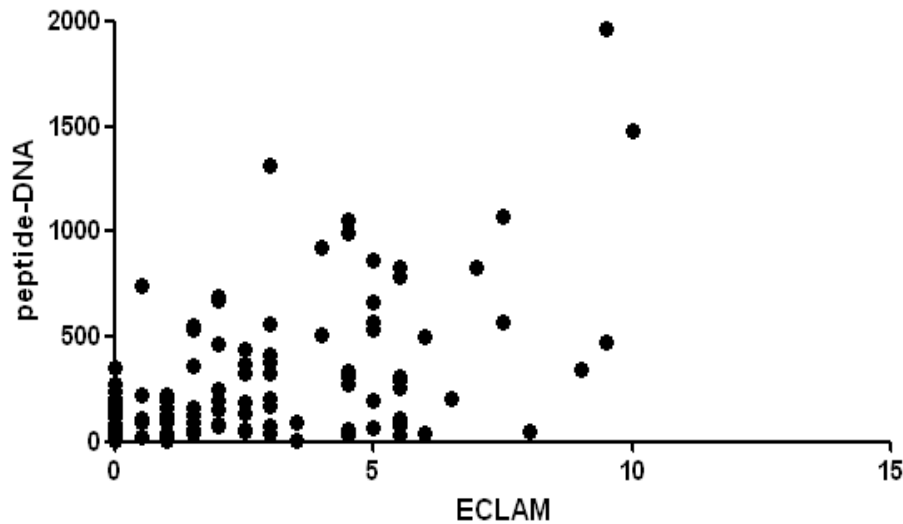
Il complesso H4-plasmide:

- Misura di anticorpi IgG

- Curva ROC



Il complesso H4-plasmide: correlazioni clinico-sierologiche



Correlazione con ECLAM ($p= 0.00000002$); C3 ($p= 0,000008$);
con nefrite attiva ($p= 0,02$)

Anti-dsDNA: metodi a confronto

Analisi della concordanza

	Anti-H4/PK vs Anti-dsDNA	Anti-H4/PK vs CLIF	Anti-dsDNA vs CLIF
Concordanza	0,684	0,643	0,611
Cohen K	0,317	0,314	0,289

K 0,21-0,40 =concordanza modesta; 0,41-0,60 moderata ; 0,61-0,80 sostanziale

Frequenza di positività e impegno d'organo

	Anti-dsDNA	Anti-H4/PK	CLIF
Impegno cutaneo	0,048		
Artrite		0,048	
Nefrite			0,039

Take-home messages

- Gli anticorpi anti-dsDNA sono un gruppo eterogeneo di autoanticorpi
- Nessun metodo di determinazione individua solo il subset patogenico
- Metodiche diverse evidenziano anticorpi anti-dsDNA di differente potenziale patogeno
- L'uso contemporaneo di più metodiche può ampliare la gamma di autoanticorpi che possono essere misurati

Aknowledgements

Federico Pratesi
Ilaria Puxeddu
Filomena Panza

**Clinical Immunology Unit
University of Pisa**

Paolo Rovero
Claudia Alcaro
Ilaria Paolini

Laboratory of Peptide and
Protein Chemistry and Biology,
Department of Pharmaceutical
Sciences, University of
Florence