

MeB – Pagine Elettroniche

Volume III

Giugno 2000

numero 6

CONTRIBUTI ORIGINALI - RICERCA

Inibizione dell'apoptosi da parte degli anticorpi monoclonali umani anti-transglutaminasili

A. Tommasini, M. Soban, I. Berti, C. Trevisiol, E. Panfili, D. Santon, J. Lenhardt, V. Baldas, E. Fragonas

IRCCS "Burlo Garofolo", Trieste.

Summary The celiac disease is characterized by the production of tTG (anti-transglutaminase) antibodies. These antibodies could only be a marker of the disease, or, which is more likely, could be involved in the pathogenesis of intestinal lesions (inhibition of enterocyte differentiation) as well as of a secondary tumour and immunologic disease (inhibition of apoptosis). To assay this possibility, apoptosis was induced in PHA pre-challenged lymphocyte cells and 3T3 cells, by adding dexamethasone and by subtracting serum to the medium. The cells were then incubated with anti-htTG monoclonal antibodies. Anti-HIV monoclonal antibodies were the controls. The addition of anti-htTG antibodies inhibited apoptosis in a very significant way. The results were consistent with the idea that, even in vivo, anti-htTG antibodies do have an anti-apoptotic effect on the immune system, thus favouring the development of self-aggressive clones.

INTRODUZIONE

La famiglia dei geni per la transglutaminasi include enzimi che catalizzano i legami crociati Ca-dipendenti delle catene polipeptidiche. L'enzima viene prodotto in grandi quantità durante i processi di apoptosi, cioè di morte cellulare programmata, in cui la transglutaminasi gioca un ruolo fondamentale attraverso l'impacchettamento e l'eliminazione dei detriti cellulari nei corpi apoptotici. Una risposta anticorpale contro la tTG è caratteristica dei soggetti con malattia celiaca. Sebbene la risposta umorale sia considerata meno importante di quella cellulo-mediata nella patogenesi del danno mucosale, alcuni dati suggeriscono che gli autoanticorpi anti-tTG di classe IgA dei soggetti celiaci non trattati possano avere un ruolo patogenetico nella malattia. Un esempio di questo potenziale effetto patogeno è dato dalla inibizione della differenziazione delle cellule epiteliali intestinali in vitro: in vivo, lo stesso effetto è probabilmente responsabile delle alterazioni istologiche della mucosa intestinale celiaca. Allargando la problematica alle cellule del sistema immunitario, si può ipotizzare che anche a questo livello gli anticorpi anti tTG possano esercitare un effetto patogeno disturbando la fisiologia cellulare e in particolare il processo apoptotico.

SCOPO DELLA RICERCA

Recentemente abbiamo ottenuto anticorpi ricombinanti contro la transglutaminasi umana htTG. Abbiamo voluto saggiare in vitro gli effetti di tali autoanticorpi su linfociti umani pre-stimolati con PHA e poi indotti all'apoptosi. L'ipotesi di lavoro era che gli autoanticorpi anti-htTG potessero influenzare negativamente il fenomeno apoptotico.

MATERIALI E METODI

Linfociti da sangue periferico venivano attivati con PHA 3 mcg/ml per 72 ore e dopo 5 giorni con IL-2 20 U/ml. L'apoptosi è stata indotta con desametasone a 10^{-7} M per 24 ore. Abbiamo valutato l'effetto sull'apoptosi degli anticorpi monoclonali anti-tTG e abbiamo utilizzato come controllo anticorpi monoclonali anti HIV. L'apoptosi è stata valutata mediante la citometria a flusso dopo colorazione con ioduro di propidio e annessina V coniugata con fluoresceina isotiocianato (FITC).

RISULTATI

I risultati preliminari hanno mostrato una riduzione significativa del livello apoptotico indotto in presenza di anticorpi anti-tTG rispetto ai controlli (anticorpi monoclonali anti-HIV). Risultati comparabili sono stati ottenuti utilizzando cellule 3T3 nelle quali l'apoptosi è stata indotta privandole del siero. Anche su queste cellule gli anticorpi anti-htTG hanno determinato una inibizione dell'apoptosi di entità simile a quella ottenuta sui linfociti trattati con desametasone.

CONCLUSIONI

Gli anticorpi anti-tTG inibiscono i fenomeni di apoptosi, in particolare quelli a livello linfocitario. In altre parole, si può ipotizzare che nei soggetti celiaci quei meccanismi (l'apoptosi, appunto) che conducono allo spegnimento della risposta immune quando questa cessa di essere utile, siano inceppati dagli autoanticorpi specifici che l'assunzione e probabilmente la digestione della gliadina inducono nei soggetti predisposti. Questo potrebbe spiegare come mai l'assunzione del glutine, in questi soggetti, faciliti, o consenta, lo sviluppo di cloni pericolosi, autoaggressivi, sviluppo non frenato dai normali meccanismi apoptotici, inceppati dagli anticorpi anti-tTG. Lo stesso meccanismo potrebbe spiegare anche la crescita di tumori (linfoma e cancro esofago-gastro-intestinale): infatti l'apoptosi è uno dei meccanismi che impediscono lo sviluppo di cloni tumorali. Gli anticorpi anti-tTG interferiscono sui meccanismi fisiologici dell'apoptosi, inibendoli. Questo risultato, che ha i limiti di una ricerca in vitro, in condizioni artificiali, apre la questione (fondamentale) se la risposta immune diretta contro la tTG sia in grado di perturbare la fisiologia cellulare e se questa perturbazione possa avere un

ruolo nell'aumentare il rischio di altre patologie autoimmuni (e di patologie tumorali) associate alla malattia celiaca non trattata.

Cellule

Controlli positivi		23.2%
Controlli mAb	21.0%	9.5%
Anti tTG 2.6	15.9%	31.5%
Anti tTG 3.7	14.3%	38.3%
Anti		

tTG 3.12

13.4%

42.2%