

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
Oncologia e Patologia Sperimentale

Ciclo XXVII

Settore Concorsuale di afferenza: 06/A2

Settore Scientifico disciplinare: MED 04

Basi molecolari ed implicazioni fisio-patologiche dell'alterata
glicosilazione di IgG nell'invecchiamento

Presentata da: Dott.ssa Mariangela Catera

Coordinatore Dottorato

Prof. Pier Luigi Lollini

Relatore

Prof. Fabio Dall'Olio

Esame finale anno 2015

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 N-GLICOSILAZIONE	1
1.2 LE GLICOSILTRANSFERASI	6
1.2.1 L' α 2,6sialiltransferasi	6
1.2.2 La β 1,4galattosiltransferasi	9
1.3 IMMUNOGLOBULINE DI CLASSE G	11
1.3.1 IgG: struttura e funzioni	13
1.3.1.1 Attivazione del complemento	16
1.3.1.2 Interazione con recettori Fc γ	18
1.4 LA GLICOSILAZIONE DELLE IgG	20
1.5 EFFETTI DELLA GLICOSILAZIONE SULL' ATTIVITÀ DELLE IgG	21
1.5.1 Galattosilazione	21
1.5.1.1 Effetti patologici dovuti alla ridotta galattosilazione di IgG	22
- Legame a MBL e attivazione del complemento	24
- Interazione con cellule presentanti l'antigene (APC) e recettori Fc γ	25
- Formazione di aggregati di IgG-G0	26
1.5.2 Fucosilazione	26
1.5.3 Sialilazione	27
2. SCOPO DELLA TESI	31

3. MATERIALI E METODI	32
3.1 MISURA DELL'ATTIVITÀ DI GLICOSILTRANSFERASI PLASMATICHE	32
- Misura dell'attività α 2,6sialiltransferasica	32
- Misura dell'attività β 1,4galattosiltransferasica	33
3.2 STUDIO DELLO STATO DI GLICOSILAZIONE	
3.3 DELLE IgG	33
- Isolamento di proteine plasmatiche sialilate mediante precipitazione con SNA-agarose	33
- Identificazione di proteine SNA-positive mediante MALDI-TOF/TOF	34
- Lectin blot	35
- Digossigenilazione di lectine	36
3.4 GLYCOAGE TEST	36
4. RISULTATI	37
4.1 ATTIVITA' ST6GAL1 E β 1,4GALT IN PLASMA UMANO DI SOGGETTI SANI	37
4.2 ATTIVITA' ST6GAL1 E β 1,4GALT IN PLASMA UMANO DI SOGGETTI AFFETTI DA SINDROME DI DOWN	39
4.3 ATTIVITA' ST6GAL1 E β 1,4GALT IN PLASMA UMANO IN FIGLI DI CENTENARI	40

4.4	CORRELAZIONE TRA GLYCOAGE TEST E GLICOSILTRANSFERASI PLASMATICHE	41
4.5	ANALISI DELLO STATO DI GLICOSILAZIONE DI IgG MEDIANTE L'UTILIZZO DI LECTINE	43
5.	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	47
6.	RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	53

1. INTRODUZIONE

1.1 N-GLICOSILAZIONE

La glicosilazione enzimatica rappresenta uno dei principali meccanismi di modificazione co/post-traduzionale delle proteine e riveste un ruolo fondamentale per la struttura e/o funzione della proteina nascente (Aebi 2013; Dall'Olio et al. 2013). Basti ricordare che almeno l'1% del genoma umano codifica per proteine coinvolte nella biosintesi (glicosiltrasferasi), degradazione (glicosidasi) o riconoscimento di catene di zuccheri (Varki 1993) e che mutazioni di enzimi implicati nella biosintesi di catene glucidiche (glicosiltrasferasi) sono responsabili di gravi sindromi, spesso incompatibili con la vita e note, complessivamente, come "*Congenital Disorders of Glycosylation (CDGs)*" (Hansen et al. 2015). Le catene di zuccheri legate alle proteine svolgono un ruolo fondamentale nella vita della cellula e dell'intero organismo in quanto ne regolano importanti processi biologici quali ad esempio l'apoptosi e la sopravvivenza cellulare (Lee et al. 2008; Swindall & Bellis 2011), l'angiogenesi (Tei et al. 2002) e le funzioni effettrici degli anticorpi (Nimmerjahn & Ravetch 2008; Xue et al. 2013; Vidarsson et al. 2014). Ricordiamo infine che molte delle glicoproteine sono destinate ad essere proteine di membrana e la componente oligosaccaridica forma il glicocalice, ovvero la struttura più esterna della cellula, coinvolta quindi nei meccanismi di comunicazione cellula-cellula e cellula-ambiente.

La glicosilazione delle proteine consiste, dunque, nell'aggiunta di catene glucidiche a particolari amminoacidi di una catena peptidica, dando origine ad una

glicoproteina. Le catene di zuccheri legate alle proteine possono essere di diverso tipo, anche se le più comuni sono di tipo O-linked ed N-linked.

La biosintesi di catene O-linked avviene esclusivamente nell'apparato di Golgi e consiste nell'aggiunta di uno o pochi residui di zuccheri all'atomo di ossigeno di un residuo di treonina, serina o idrossilisina (Bennett et al. 2012).

Le catene N-linked sono invece sintetizzate nel reticolo endoplasmico rugoso (RER), successivamente modificate e completate nell'apparato di Golgi (Aebi 2013). La loro biosintesi, molto più complessa rispetto a quella delle catene O-linked, può essere suddivisa in due fasi: l'assemblaggio di una catena oligosaccaridica su un lipide (*lipid-linked oligosaccharide, LLO*) e il trasferimento dell'oligosaccaride ad un residuo di Asn di una catena peptidica nascente (Breitling & Aebi 2013) (Fig. 1). La biosintesi del LLO avviene nel RER, versante citoplasmatico, ad opera di specifici enzimi, appartenenti alla famiglia ALG (*Asparagine linked glycosylation*) che catalizzano il trasferimento di monosaccaridi, utilizzando nucleotidi-zuccheri come donatori, ad un lipide, il dolicolo fosfato. Questo lipide riveste un ruolo fondamentale nella biosintesi di catene N-linked in quanto assolve alla funzione di traslocatore di monosaccaridi o oligosaccaridi dal citoplasma al lume del RER. La sua biosintesi risulta essere un passaggio cruciale della N-glicosilazione, ed avviene sulla membrana del RER ad opera della cis-preniltrasferasi (Aebi 2013). Alterazioni del processo di biosintesi del dolicolo compromettono gravemente il processo di N-glicosilazione (Schenk et al. 2001) e tali alterazioni sono causa di alcune CDGs (Cantagrel & Lefeber 2011). La fase citoplasmatica della biosintesi del LLO termina con il dolicolo fosfato, ancorato alla membrana del RER, associato ad una catena oligosaccaridica formata da 2 residui di N-acetilglucosammina (GlcNAc) e 5 di mannosio (Man). A questo punto, l'enzima RFT1, trasferisce la catena

oligosaccaridica dall'esterno verso il lume del RER dove verrà modificata ad opera di altri enzimi appartenenti alla famiglia delle ALG che alla fine generano una struttura così composta: 2 residui di GlcNAc, 9 di Man e 3 di glucosio (Glc) legati al dolicholo fosfato (Aebi 2013). Questa struttura glucidica è poi trasferita dall'oligosaccariltrasferasi (OST) alla sequenza polipeptidica nascente, che riconosce una specifica sequenza consenso, Asn-X-Ser/Thr (dove X è un qualunque amminoacido ad eccezione della prolina) e crea un sito di N-glicosilazione tra il residuo amminico dell'Asn e la catena oligosaccaridica (Breitling & Aebi 2013).

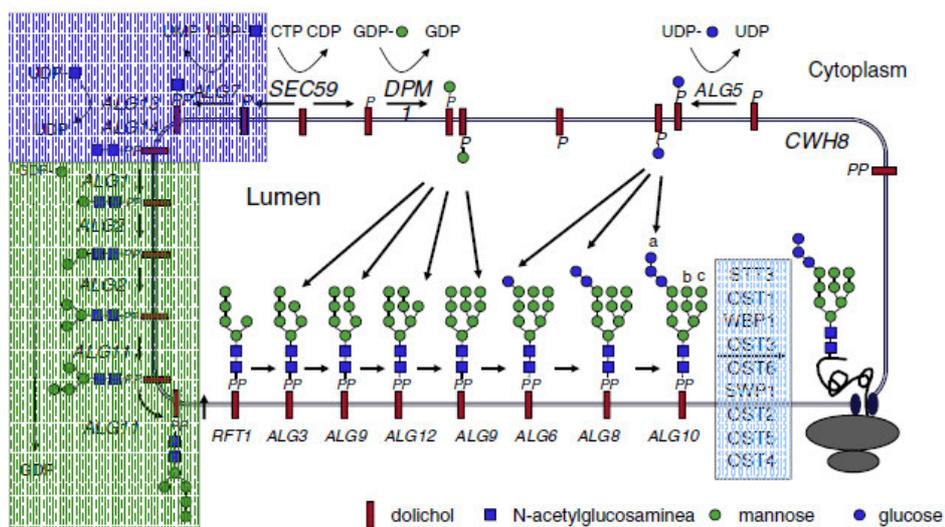


Fig.1: Rappresentazione schematica delle prime fasi della biosintesi di una catena N-linked. Durante la fase *lipid-linked oligosaccharide*, LLO (riquadro verde) la catena glucidica, legata al dolicholo fosfato, è formata ad opera delle ALG (*Asparagine linked glycosylation*). La struttura glucidica formata da 2 residui di GlcNAc e 5 di Man è poi trasportata sul versante luminale del RER, ad opera di una flippasi, la RFT1, dove subisce ulteriori modifiche operate da altri enzimi ALG. Infine la struttura composta di 2 residui di GlcNAc, 9 di mannosio e 3 di Glc è trasferita dal dolicholo fosfato al residuo di Asn della proteina dall'OST (oligosaccariltrasferasi) e successivamente al Golgi dove viene modificata nella sua struttura finale (Da: Aebi, 2013).

La struttura sopradescritta subisce ulteriori modifiche ad opera di glicosidasi, enzimi che catalizzano la rimozione di residui di zuccheri. Il primo step prevede la rimozione di 3 residui di Glc ad opera, rispettivamente delle α -glicosidasi I, e II,

seguito dalla rimozione di 4 residui di Man ad opera dell' α -mannosidasi I. A questo punto la glicosiltrasferasi GlcNAc trasferasi 1 (GlcNAcT1), implementa la catena glucidica con un residuo di GlcNAc, mentre altri due residui di mannosio sono poi rimossi dalla α -mannosidasi II; infine un secondo residuo di GlcNAc è aggiunto ad opera della GlcNAcT2 (Kornfeld & Kornfeld 1985). Questa struttura glicidica, composta da 2 residui di GlcNAc, 3 di mannosio e 2 di GlcNAc è la struttura base di tutte le catene N-linked e può essere successivamente completata nell'apparato di Golgi dove la catena N-linked è modificata in modo specifico (Fig. 2).

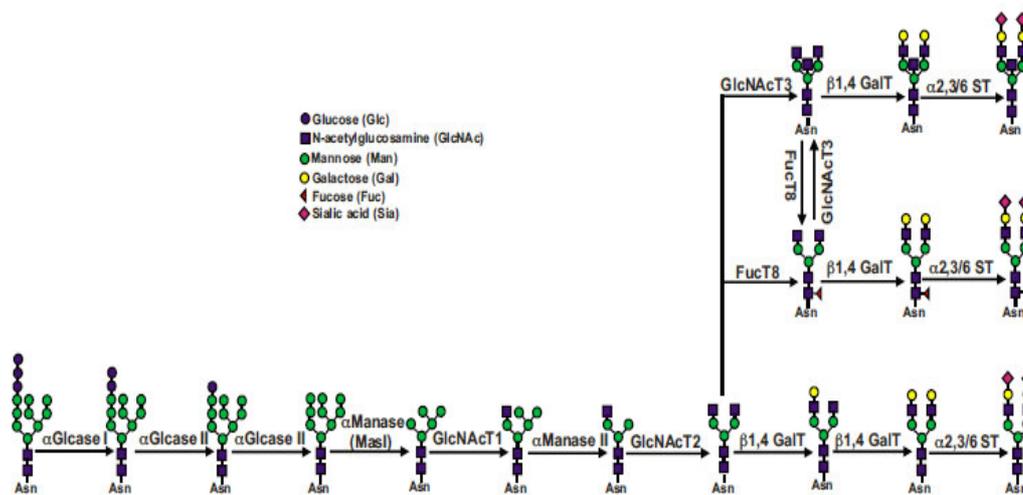


Fig.2: Rappresentazione schematica delle fasi finali di biosintesi di una catena N-linked. La struttura base di tutte le catene N-linked, data da 2 residui di N-acetilglucosammina (GlcNAc), 3 di mannosio (Man) e 2 di GlcNAc è il risultato di enzimi biosintetici (glicosiltrasferasi) e catabolici (glicosidasi). La struttura base, nel Golgi, può essere poi completata con l'aggiunta di altri zuccheri, quali galattosio (Gal), GlcNAc, fucosio (Fuc) o acido sialico (Sia). (Da: Dall'Olio et al. 2013)

In tal modo si ottiene una grande varietà di specie N-glicaniche, in grado di conferire una specifica funzione alla struttura proteica a cui sono associate (Aebi 2013). Nel Golgi, la struttura base può essere completata dall'enzima β 1,4 galattosiltrasferasi con l'aggiunta di galattosio ad un residuo di GlcNAc terminale

e/o dalla fucosiltrasferasi8 (FucT8) che catalizza il trasferimento con legame α 1,6 di un residuo di fucosio al residuo di GlcNAc legato all'Asn (*core fucose*). L'enzima GlcNAcT3 può trasferire un residuo di GlcNAc al residuo di Man in posizione centrale mediante un legame β 1-4, dando origine alla struttura nota come *bisecting GlcNAc* ed in questo caso la struttura non viene più modificata. Infine, le catene N-linked, dopo l'aggiunta del galattosio, possono terminare con uno o due residui di acido sialico legati con legame α 2,3 o 2,6 e i due tipi di legame sono il prodotto di due diverse classi di sialiltrasferasi.

Ricordiamo infine che il processo di N-glicosilazione, non è di tipo deterministico, come per la biosintesi delle proteine o degli acidi nucleici, bensì stocastico, in quanto dipende dalla concentrazione di enzimi (glicosiltrasferasi e glicosidasi) e donatori-zuccheri. Ne consegue che per una data proteina, la composizione della catena N-linked legata ad uno specifico sito di glicosilazione possa presentare un certo grado di variabilità (microeterogeneità) (Dall'Olio et al. 2013).

Dalla trattazione appena fatta si evince come il processo di N-glicosilazione sia localizzato all'interno della cellula ed in particolare nel reticolo endoplasmico rugoso e nel Golgi. Tuttavia recenti studi hanno evidenziato la possibilità di un meccanismo di glicosilazione extracellulare mediato dalle piastrine (Wandall et al. 2014; Lee et al. 2014). Le piastrine sono elementi corpuscolati del sangue che derivano dalla frammentazione del citoplasma di megacariociti e all'interno del loro citoplasma contengono dei granuli in cui sono presenti, tra l'altro, delle glicosiltrasferasi. Le piastrine attivate riversano il contenuto dei loro granuli in circolo e le glicosiltrasferasi rilasciate sono in grado di esplicare la loro attività enzimatica, incorporando residui di zuccheri a proteine plasmatiche (Wandall et al. 2014). Le piastrine, oltre a essere fonte di glicosiltrasferasi, possono assolvere

alla funzione di donatori di nucleotidi zuccheri per glicosiltransferasi plasmatiche. Recenti studi hanno dimostrato che le piastrine attivate dalla trombina, a concentrazioni fisiologiche, sono degli ottimi donatori di CMP-acido sialico, che può essere utilizzato dalla sialiltransferasi ST6Gal1 plasmatica per glicosilare la superficie di cellule target (Lee et al. 2014).

1.2 LE GLICOSILTRANSFERASI

Le glicosiltransferasi (GTs) vengono classificate in 65 famiglie diverse sulla base della loro attività catalica. La reazione catalizzata prevede il trasferimento di un monosaccaride da un donatore di zuccheri attivato, che può essere un nucleotide zucchero mono- o di- fosfato, ad un saccaride, lipide, proteina o DNA o piccole molecole accettrici e formano dunque glico-coniugati (Liu & Mushegian 2003). La loro localizzazione è a livello intracellulare ed in particolare nel RER e nel Golgi, laddove esiste una buona concentrazione di nucleotidi zuccheri, indispensabili per il funzionamento delle glicosiltransferasi. Tuttavia, anche nel plasma si ritrovano delle isoforme di particolari glicosiltrasferasi che assumono in alcuni casi un particolare significato clinico e che, che come detto in precedenza potrebbero svolgere un ruolo anche nella N-glicosilazione ecto-cellulare (Wandall et al. 2014; Lee et al. 2014).

1.2.1 α 2,6 sialiltrasferasi

L'enzima α 2,6sialiltransferasi (ST6Gal1) catalizza l' α 2,6 sialilazione degli N-glicani utilizzando come donatore di nucleotidi zuccheri il CMP-acido sialico e come accettore la struttura Gal β 1,4GlcNAc delle catene N-linked (Dall'Olio 2000). La ST6Gal1 fa parte della superfamiglia delle sialiltransferasi, di cui fanno parte più di 20 enzimi, coinvolti nella produzione di oligosaccaridi sialilati. Da un

punto di vista storico, il cDNA della ST6Gal1 venne isolato per la prima volta nel ratto da Weinstein *et al.* nel 1987 e tre anni più tardi, da Grundmann *et al.* venne isolato il cDNA umano (Weinstein *et al.* 1987; Grundmann *et al.* 1990). Le sialiltrasferasi sono glicoproteine transmembrana di tipo 2 in cui è possibile distinguere tre domini ben definiti: 1) una piccola coda in posizione NH₂ terminale rivolta verso il versante citoplasmatico 2) una porzione transmembrana di dimensioni variabili tra i 20-200 amminoacidi che termina con 3) la porzione C-terminale, rivolta nella parte luminale (del Golgi) e in cui è contenuto il dominio catalitico dell'enzima. Tutte le sialiltrasferasi umane pur essendo molto diverse tra loro da un punto di vista strutturale, condividono 3 sequenze consenso (L, S, VS), altamente conservate, dette sialil-motivi (Harduin-Lepers *et al.* 2001). Il significato funzionale di queste regioni è stato messo in evidenza da studi di mutagenesi sulla ST6Gal1 ed in particolare è emerso che l'alto grado di conservazione di queste sequenze abbia un significato funzionale molto importante. Infatti il dominio L lega il donatore di nucleotidi zuccheri, il CMP-acido sialico, il dominio S lega sia il donatore zucchero che l'accettore e infine il dominio VS, che consiste essenzialmente di due amminoacidi altamente conservati (una Glu ed una His separate da 4 amminoacidi), è coinvolto nel processo catalitico (Datta *et al.* 1998).

La localizzazione della ST6Gal1 è sia intracellulare e, più precisamente, nel trans-Golgi, sia plasmatica. Elevati livelli intracellulari di ST6Gal1 sono spesso presenti in diverse neoplasie come quella del colon (Dall'Olio *et al.* 1989) ed associate a diverse funzioni cellulari (Dall'Olio & Chiricolo; Dall'Olio *et al.* 2014). In particolare è stato dimostrato che l'incremento di attività α 2,6 sialiltransferasica intracellulare sia responsabile dell'aumentata sialilazione delle integrine in conseguenza della quale mostrerebbero una maggiore affinità per la fibronectina

(Semel et al. 2002; Chiricolo et al. 2006). La ST6Gal1 plasmatica invece, è il risultato del clivaggio e secrezione della forma epatica (Weinstein et al. 1987; Colley et al. 1989). Il clivaggio della ST6Gal1 epatica è operato dal *β -site amyloid precursor protein (APP)-cleaving enzyme 1* (BACE1) (Kitazume et al. 2001; Kitazume et al. 2003; Kitazume et al. 2005), lo stesso enzima coinvolto nella malattia di Alzheimer in quanto responsabile della produzione del peptide neurotossico β amiloide ($A\beta$) derivato dal clivaggio di APP (Yan et al. 1999; Hussain et al. 1999; Bennett et al. 2000). L'attività plasmatica dell'ST6Gal1 aumenta in condizioni infiammatorie, infatti studi condotti su topi, indicano che, in seguito a induzione di uno stato infiammatorio mediato da inoculazioni sottocutanee di acqueragia, si verifica un aumento dei livelli sierici di glicoproteine epatiche tra cui la ST6Gal1, che si mostra tra le prime proteine di fase acuta rilevabili in circolo (Kaplan et al. 1983; Dalziel et al. 2004). Altri studi, condotti su topi *Long-Evans Cinnamon* (LEC), caratterizzati da un difetto genetico del trasportatore ATPasico del Cu^{++} (ATP7B) e che incorrono spontaneamente in danno epatico (Mori et al. 1994; Suzuki et al. 1993), mostrano come i segni evidenti di epatite siano preceduti molto precocemente da un innalzamento dei livelli sierici di ST6Gal1 (Kitazume et al. 2005). In questo contesto, la ST6Gal1 sierica risulta essere un ottimo e sensibile marker di infiammazione epatica. Infine, studi condotti su pazienti affetti da epatite C, indicano chiaramente che i livelli sierici di ST6Gal1 correlano positivamente con il grado di infiammazione epatica (Kitazume et al. 2009).

1.2.2 β 1,4Galattosiltransferasi

Le glicosiltransferasi β 1,4galattosiltransferasi (β 1,4GalTs) catalizzano il trasferimento di galattosio dall'UDP-galattoso a residui terminali di GlcNAc durante l'allungamento della catena oligosaccaridica di glicoproteine, tra cui le IgA e le IgG (McGuire et al. 1989). La localizzazione dell'enzima è sia intracellulare che extracellulare; in particolare all'interno della cellula si trova o inserito nella membrana dell'apparato di Golgi (Berger et al. 1987) o sulla superficie della membrana plasmatica, mentre, a livello extracellulare lo ritroviamo in diversi liquidi biologici tra cui latte, liquido amniotico e cerebrospinale, urina, saliva e siero (Axford et al. 1992). Il gene che codifica per la β 1,4GalT è sul cromosoma 9 (Shaper et al. 1986) e viene trascritto in più di una molecola di mRNA (Russo et al. 1990) per dare origine a diverse isoforme, caratterizzate ognuna per la specificità dell'accettore. Studi eseguiti su omogenati di cellule B derivati da pazienti affetti da artrite reumatoide (AR), che presentano una ridotta galattosilazione delle Immunoglobuline G (IgG), dimostrano una riduzione dell'attività enzimatica β 1,4GalT se si utilizzano le IgG come accettore, mentre, fornendo l' α -lattoalbumina come accettore glicoproteico, l'attività resta costante (Furukawa et al. 1990). Altri studi hanno riportato che l'attività galattosiltrasferasica è invariata nei B linfociti dei pazienti con AR (Delves et al. 1990; Furukawa et al. 1990). La famiglia delle β 1,4GalTs comprende, infatti, 7 isoforme (I-VII) (Amado 1999) e, da studi in vitro, eseguiti misurando l'attività enzimatica utilizzando diversi accettori è emerso che : 1) le isoforme II e V operano la galattosilazione di catene N-linked (Almeida et al. 1999); 2) le β 1,4GalT IV e V lavorano su catene O-linked (Ujita et al. 1998); 3) le forme III, IV, V e VI catalizzano il trasferimento di Gal a residui di GlcNAc o Glu di

glicolipidi (Almeida et al. 1997; T. Nomura et al. 1998; Schwientek et al. 1998);

4) l'isoforma VII catalizza la galattosilazione dello xilosio dei proteoglicani (Almeida et al. 1999). La struttura glucidica formata dalla $\beta 1,4\text{GalT}$ è di tipo $\text{Gal}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}$ ed è spesso associata al dominio esterno di glicoproteine di membrana (Guo et al. 2001) in quanto gioca un ruolo molto importante nei contatti cellula-cellula (K. H. Nomura et al. 1998). Il galattosio terminale, infatti, è riconosciuto e legato da diverse proteine come le galectine (Perillo et al. 1995), la contatto-inibina (Wieser & Oesch 1992) e il recettore delle asialoglicoproteine epatico (Lodish 1991) ed è pertanto coinvolto nella regolazione di numerosi processi biologici quali apoptosi, crescita cellulare o clearance di glicoproteine sieriche (Guo et al. 2001). Topi knock-out per il gene $\beta 1,4\text{GalT}$ mostrano una crescita embrionale ritardata e mortalità precoce, evidenziando l'importanza della galattosilazione delle glicoproteine nel processo di crescita e sviluppo dell'animale (Asano et al. 1997; Lu et al. 1997). Tuttavia difetti del processo di galattosilazione di proteine si riscontrano anche in alcuni quadri patologici quali malattie infiammatorie croniche come la già citata AR, dove, l'alterata galattosilazione riguarda in modo specifico le IgG. Studi di cinetica enzimatica su linfociti B di pazienti con AR, hanno dimostrato che causa della ridotta galattosilazione delle IgG è la scarsa affinità dell'enzima per l'UDP-Gal, ma non per l'asialo-agalatto-IgG, mentre l'affinità per il donatore e accettore nel caso dell' α -lattoalbumina è paragonabile tra cellule B di pazienti AR e individui sani (Furukawa et al. 1990), dimostrando ancora una volta la specificità dell'enzima per all'accettore.

1.3 IMMUNOGLOBULINE DI CLASSE G

Le immunoglobuline (Ig) sono tra le proteine plasmatiche più abbondanti e sono divise in 5 classi : IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Tra le Ig plasmatiche, le più rappresentate sono le IgG che da sole, costituiscono circa l'85% delle Ig totali e il 10-20% delle proteine sieriche (Vidarsson et al. 2014). Le immunoglobuline sono glicoproteine costituite per l' 82-96% dalla componente proteica e per il 4-18% da quella glicidica (Vidarsson et al. 2014). Studi iniziati nel 1960 utilizzando uno specifico anti-siero di coniglio contro proteine prodotte da cellule di mieloma umano, hanno messo in evidenza 4 classi di IgG classificate come: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (Schur 1988). Tutte e 4 le sottoclassi, pur condividendo il 90% della sequenza amminoacidica, si differenziavano tra loro per le seguenti proprietà: vita media, capacità di formare immunocomplessi e attivare il complemento, abilità ad attraversare la placenta e legame all'antigene (Schur 1988). Un calo selettivo di alcune sottoclassi di IgG, che si manifesta più di consueto in una riduzione delle IgG2 e/o IgG4 in individui sani, non è critico per la salute dell'individuo, ma può essere responsabile di una maggiore suscettibilità verso alcuni patogeni (Vidarsson et al. 2014). Esaminiamo brevemente le diverse classi di IgG: **1)** Le IgG1 sono le più abbondanti e risultano essere anche le prime, tra le IgG, ad essere prodotte in risposta alla presenza di un antigene e spesso, la loro presenza è associata a bassi livelli di IgG3 e IgG4 (Ferrante et al. 1990). La riduzione di IgG1 spesso si traduce in un calo della concentrazione totale di IgG sieriche (ipogammaglobulinemia) e, se accompagnata da riduzione di IgG appartenenti ad altre sottoclassi, si associa facilmente ad infezioni ricorrenti (Jefferis & Kumararatne 1990); **2)** Le IgG2 riconoscono in modo selettivo e specifico molecole glucidiche e sono, pertanto, associate principalmente alla difesa

dell'organismo contro batteri capsulati, in quanto ne riconoscono in modo specifico, la componente polisaccaridica (Hammarström & Smith 1983). La riduzione di IgG2, sebbene spesso compensata con un aumento di altre sottoclassi, si manifesta con una maggiore suscettibilità alle infezioni sostenute da particolari batteri (Kuijpers et al. 1992) **3** le IgG3, sono l'unica classe ad essere diretta contro rari antigeni eritrocitari come il caso degli antigeni P e P^k (Söderström et al. 1985). Inoltre, in associazione con le IgG1, guidano le risposte immunitarie contro alcuni antigeni eritrocitari (fattore RhD) (Pollock & Bowman 1990) e piastrinici (*human platelet antigen 1a*) in caso di incompatibilità trasfusionale o madre/figlio durante la gravidanza. (Brouwers et al. 1988; Mawas et al. 1997); **4** le IgG4, come le IgE, sono indotte spesso da allergeni. In caso di patologie allergiche, la desensibilizzazione può essere effettuata, talvolta, eseguendo una terapia immunologica, ovvero somministrando al paziente dosi minime e crescenti dell'allergene purificato al fine di indurre tolleranza. Le IgG4 rivestono un ruolo cruciale in questa pratica clinica, in quanto è stato osservato che, il miglioramento dei sintomi coincide con l'induzione della sottoclasse 4 di IgG che può essere modulata dall'IL-10 (Aalberse et al. 2009). Le IgG4 sono anche alla base di una rara patologia nota come *IgG4 related disease* (IgG4-RD) caratterizzata da un'elevata concentrazione plasmatica di IgG4 seguita da infiltrazione tissutale da parte di plasmacellule IgG4-positive e può riguardare numerosi organi e tessuti (Yamamoto et al. 2012).

1.3.1 IgG : struttura e funzioni

Le IgG sono prodotte da cellule del sistema immunitario adattativo, le plasmacellule e sono formate da 4 catene polipetidiche a due a due uguali (Fig.3). Ogni IgG è costituita da 2 catene leggere (L) di tipo κ o λ , ciascuna di 25kD e da due catene pesanti (H) di tipo γ , da 50 kDa e legate tra loro mediante ponti disolfuro. Le catene H sono caratterizzate dalla presenza di una regione N-terminale variabile (VH) e tre costanti (CH1, CH2 e CH3). Allo stesso modo le catene L hanno una regione N-terminale variabile (VL) ed una costante (CL). La porzione costante della catena leggera è associata alla catena pesante mediante VH e CH1 e forma il Fab (*Fragment antigen binding*), una struttura molto importante sia da un punto di vista strutturale che funzionale. Il Fab, ed in particolare la regione V delle due catene, è deputato al riconoscimento dell'antigene. La porzione compresa fra CH1 e CH2 prende il nome di regione cerniera ed è caratterizzata dall'essere molto flessibile in modo da permettere il legame simultaneo di più antigeni. Infine, le regioni CH2 e CH3 si uniscono a formare la porzione Fc (*fragment crystalline*).

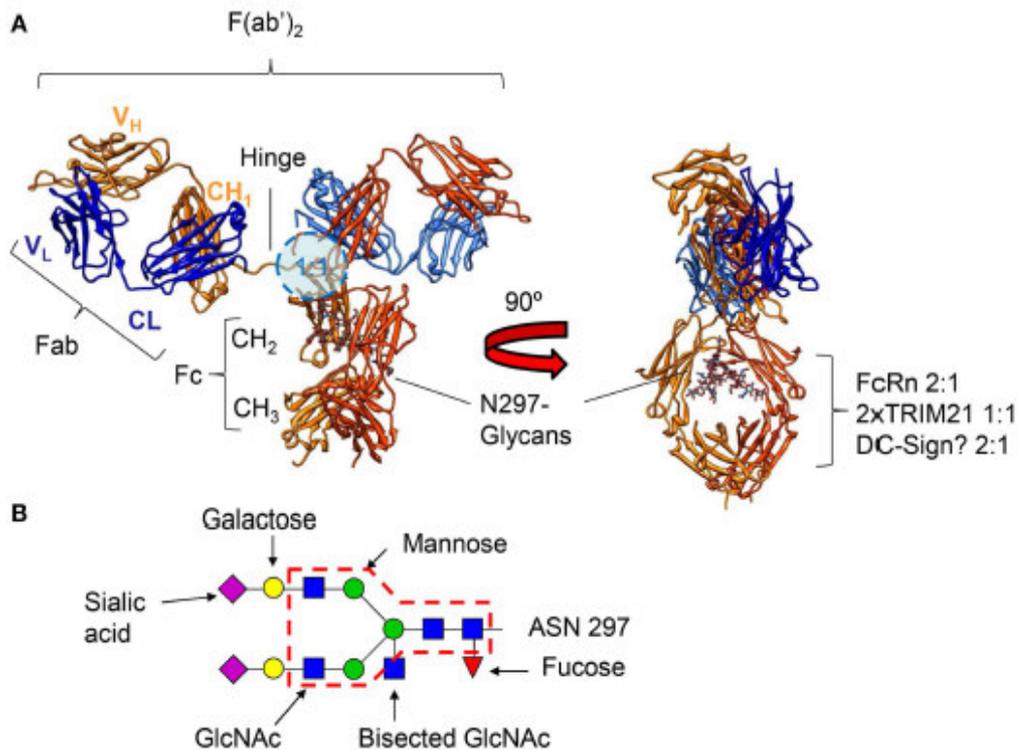


Fig.3: Rappresentazione schematica della struttura di IgG e della catena N-linked associata all'Asn297. Le IgG sono formate da due catene leggere (L) e due pesanti (H). Le catene leggere hanno due domini, uno variabile (VL) e uno costante (CL), invece le catene pesanti hanno un dominio variabile (VH) e tre costanti (CH1, CH2 e CH3). La porzione Fab (*Fragment antigen binding*) riconosce e lega l'antigene ed è costituita dai domini VL, CL, VH e CH1. La zona compresa tra CH1 e CH2 forma la cerniera, mentre l'associazione tra CH2 e CH3 genera il frammento cristallizzabile (Fc). Viene inoltre evidenziato il residuo amminoacidico Asn 297 nell'interfaccia tra CH2 e CH3, importante per essere il principale sito di N-glicosilazione delle IgG (A). Le catene N-linked associate alle IgG (B) possono essere completate con l'aggiunta di galattosio, acido sialico, *core fucose* o *bisecting GlcNAc*. (Da: Vidarsson et al, 2006)

Come detto in precedenza, gli anticorpi sono in grado di riconoscere una grande varietà di antigeni, anche molto diversi tra loro e questa capacità è delegata alla porzione Fab. In particolare ciò è reso possibile grazie al riassortimento genico di tre segmenti genici posti sui locus delle catene pesanti e leggere: V (*Variable*), D (*Diversity*) e J (*Joining*). In particolare, i loci per le Ig nell'uomo sono 3 di cui uno per la catena pesante sul cromosoma 14, uno sul cromosoma 2 per la catena leggera di tipo κ e uno per quella di tipo λ sul cromosoma 22. Ogni locus, partendo dall'estremità 3' possiede una regione costante C e due variabili (V e J), e per le catene pesanti, ma non per le leggere, la porzione V è separata da quella J

da una regione D. Ciascuna regione è formata da un numero diverso di segmenti V, (D), J che vanno incontro a ricombinazione durante la maturazione delle plasmacellule. In particolare il locus della catena λ possiede 30 segmenti V, 4 J tutti in posizione 5' rispetto ai 4 segmenti C. Il locus κ è composto da 40 segmenti V, 5J e un solo C ed è molto simile a quello della catena pesante che presenta 40 segmenti V, 27D, 6J ed uno C. La struttura finale della porzione variabile sarà costituita da un frammento V e uno J per le catene leggere e da un segmento VDJ per le catene pesanti. Il DNA codificante per i diversi loci, così riarrangiato, sarà trascritto in un trascritto primario che subirà uno splicing alternativo e darà origine all'RNA maturo che verrà tradotto. La proteina matura sarà dunque il risultato di un meccanismo di ricombinazione genico e/o mutazioni somatiche che generano una grande variabilità della porzione variabile delle Ig (Potter 1983).

Due regioni della molecola particolarmente importanti sono: la parte più prossimale della cerniera al dominio CH2, in quanto sito di legame del fattore C1q del complemento ed i recettori della porzione Fc delle IgG (Fc γ Rs) ed il residuo Asn 297 situato all'interfaccia tra CH2 e CH3 in quanto principale sito di N-glicosilazione delle IgG (Fig.3). La glicosilazione riveste un ruolo fondamentale nelle attività effettrici delle IgG in quanto ne modula in modo significativo la propria attività in senso pro-/anti-infiammatorio. Anche la regione V ha dei siti di glicosilazione, in particolare circa il 10-15% del totale degli anticorpi risultano glicosilati nella porzione variabile e la presenza di catene di zuccheri insieme al meccanismo di ricombinazione V(D)J è alla base della capacità degli anticorpi di riconoscere una moltitudine di antigeni anche molto diversi tra loro (Wright et al. 1991). Gli anticorpi rappresentano il link tra l'immunità innata e quella di tipo adattativa e sono in grado di riconoscere e neutralizzare agenti patogeni quali virus, batteri, tossine. In alcuni casi, possono reagire nei confronti di antigeni self

e dare origine a quadri patologici noti come malattie autoimmuni: un esempio è dato dall'artrite reumatoide, una patologia autoimmune caratterizzata, in una grossa percentuale di casi, dalla presenza, nel siero, del fattore reumatoide, ossia auto-anticorpi diretti contro la porzione Fc delle IgG. Inoltre gli anticorpi possono riconoscere anche degli antigeni non patogeni, come ad esempio il polline e dare origine a manifestazioni allergiche. In condizioni fisiologiche, gli anticorpi rivestono un ruolo fondamentale per la difesa dell'organismo, esplicito fondamentalmente mediante l'attivazione del complemento ed il legame con i recettori Fc γ su linfociti B, cellule dendritiche, macrofagi, neutrofilo, basofili, eosinofili e cellule natural killer.

1.3.1.1 Attivazione del complemento

Il sistema del complemento consta di oltre 30 proteine e al momento della sua attivazione alcune proteine risultano solubili e altre legate alla membrana del patogeno. L'attivazione del complemento comporta una serie di reazioni a cascata e può avvenire mediante tre vie: classica, alternativa e lectinica, attraverso una serie di reazioni a cascata, come nel caso della coagulazione e che convergono tutte nell'attivazione del fattore C3 che genera i prodotti attivati C3a, C3b e C5a ed infine il MAC (*Membrane Attack Complex*) (Fig.4) (Sarma & Ward 2012). Le IgG, insieme alle IgM, attivano il complemento attraverso la via classica: in seguito al riconoscimento dell'antigene, mediato dalla porzione Fc, legano C1, un complesso multimerico composto di 3 subunità: C1q, C1r e C1s. La componente C1q riconosce la porzione Fc dell'anticorpo legato all'antigene e dal legame simultaneo di C1q con 2 o più porzioni Fc dell'anticorpo attiva C1r che svolge un'azione proteasica scindendo C1s. C1s, anch'essa una proteasi, cliva il fattore C4 in C4a che è rilasciato in circolo e C4b che si lega alla membrana del patogeno

garantendo il proseguimento del processo di attivazione del complemento. C4b recluta il fattore C2 che viene scisso anch'esso in C2a, rilasciato in circolo e C2b che resta legato alla membrana dove forma con C4b la C3 convertasi (C4bC2b), ossia un enzima che lega e scinde il fattore C3 in C3a e C3b. Quest'ultimo svolge due funzioni: **a)** coadiuva il processo di fagocitosi del patogeno, fungendo da opsonina e **b)** lega il complesso C3 convertasi formando il complesso C5 convertasi che cliva il fattore C5 in C5a che è riversato nel torrente circolatorio, e C5b che si lega alle altre proteine già presenti sulla membrana e recluta i fattori C6, 7, 8 e 9 conducendo alla formazione del MAC (Fig.4) (C5b-9). Il MAC si inserisce nella membrana del patogeno e ne causa la lisi (Sarma & Ward 2012).

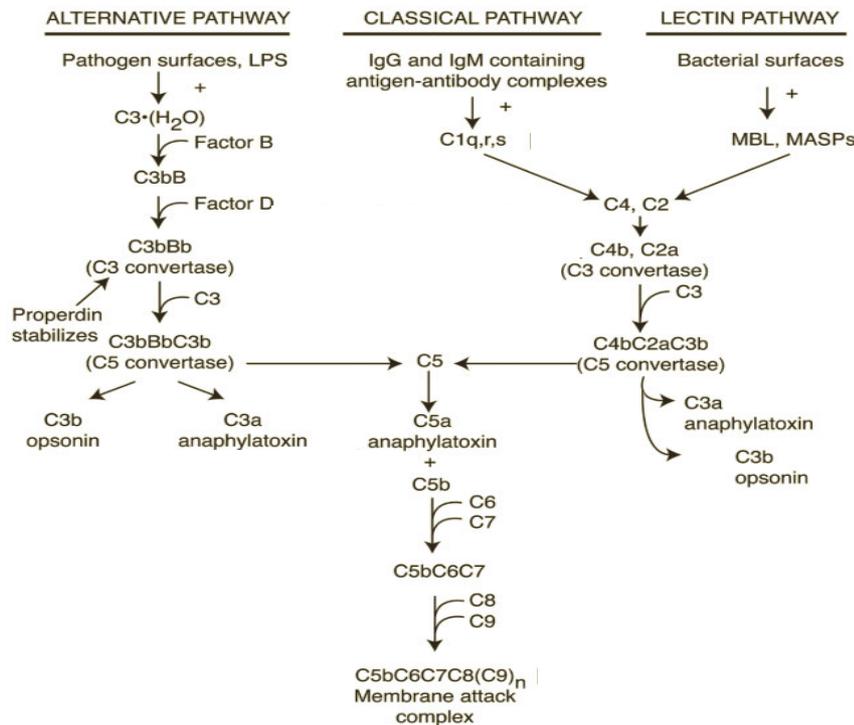


Fig.4: Rappresentazione schematica del sistema del complemento. L'attivazione può avvenire mediante tre vie: classica, alternativa e lectinica che convergono tutte nell'attivazione della componente C3 ed infine nella formazione del Membrane attack complex (MAC) (Da: Sarma and Ward, 2011).

Per quanto riguarda le IgG abbiamo visto essere in grado di legare e attivare il fattore C1q, sebbene non tutte le sottoclassi siano in grado di farlo allo stesso modo. In particolare le IgG1 e IgG3 legano con alta efficienza il C1q mentre le IgG2 e IgG4 con meno efficienza e solo in alcuni casi. La capacità di legare C1q sembra essere legata ad una particolare struttura e composizione della catena peptidica a livello della regione CH2. Ad esempio è stato dimostrato che la sostituzione di una leucina con una alanina in posizione 235 è causa di una ridotta affinità delle IgG2 verso il C1q (Morgan et al. 1995).

1.3.1.2 Interazione con FcγRs

I recettori Fcγ (FcγRs) sono localizzati su diverse cellule del sistema immunitario dove svolgono funzioni diverse. In particolare FcγRs si trovano su monociti e macrofagi, neutrofilo ed eosinofili, cellule Natural Killer (NK) e linfociti B e, da un punto di vista funzionale, sono divisi in due grandi gruppi: **a)** gli attivatori, che comprendono i FcγRI, FcγRIIa e FcγRIIIa e **b)** gli inibitori di cui ne fa parte FcγRIIb (Nimmerjahn & Ravetch 2006; Schwab & Nimmerjahn 2013) (Fig.5).

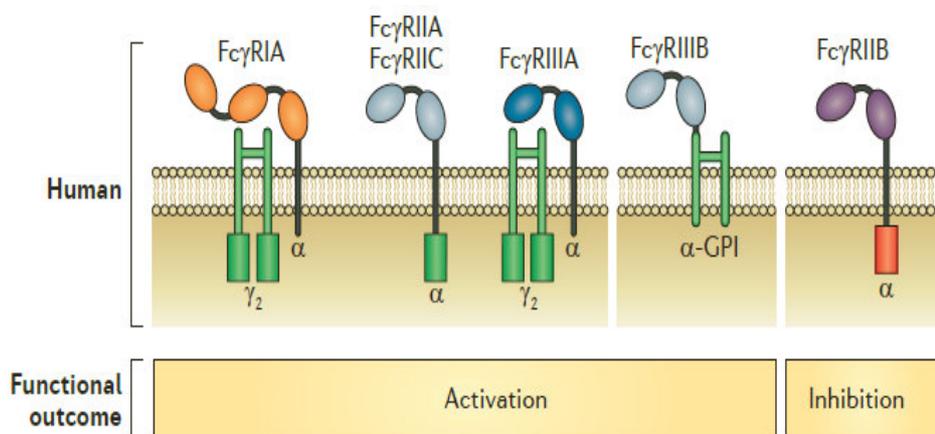


Fig.5: Visione schematica delle due grandi classi di FcγRs nell'uomo. [Da: (Schwab & Nimmerjahn 2013)]

Le classi attivatorie sono caratterizzate dalla presenza di motivi ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*), ovvero contengono due sequenze formate da una tirosina separata da due amminoacidi da una leucina e le due sequenze sono separate di solito da 6-8 amminoacidi (Barrow & Trowsdale 2006). Tali sequenze sono importantissime per la trasduzione del segnale in quanto, in seguito al legame con il recettore, la tirosina è fosforilata e dà l'avvio alla funzione effettrice. I recettori inibitori hanno invece, all'estremità citoplasmatica, delle sequenze ITIM (S/I/V/LxYxxI/V/L) (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif*) ed in seguito al legame col ligando i motivi ITIM vengono fosforilati e reclutano fosfatasi che inibiscono la trasduzione del segnale (Ravetch 2000). Il sito di legame delle IgG a Fc γ Rs è lo stesso che lega il fattore C1q e comprende i seguenti residui : 234-239,265-269,297-299,327-330 (Vidarsson et al. 2014). Ciascuna sottoclasse di IgG ha un profilo di legame unico alle varie classi di Fc γ R, ad esempio le IgG1 e IgG3 interagiscono molto bene con diverse classi Fc γ R, al contrario delle IgG2 e IgG4 che ne legano solo alcune. L'effetto del legame delle IgG alle diverse classi di Fc γ Rs ha degli effetti diversi a seconda sia del tipo di recettore coinvolto sia del tipo cellulare a cui è legato. Ad esempio l'attivazione del recettore Fc γ RIII posto su cellule NK induce la citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC). In particolare il legame di IgG, legate alla struttura target, con Fc γ RIII, induce sia il rilascio di citochine infiammatorie come l'IFN γ che stimolano altre cellule del sistema immunitario, sia la produzione di granzimi e perforine responsabili della morte della cellula target (Sun 2003). Al contrario, il legame dell'anticorpo al recettore Fc γ RIIB sui linfociti B è responsabile della soppressione dell'attività immunitaria.

1.4 LA GLICOSILAZIONE DELLE IgG

Le Immunoglobuline G hanno diversi siti di N-glicosilazione sia nel Fab (10-20% del totale delle IgG circolanti) sia nella porzione Fc dove è presente, peraltro, il principale sito N-linked delle IgG: il residuo Asn 297 (Fig. 3A) (Vidarsson et al. 2014). L’N-glicosilazione del Fab e del Fc presenta delle importanti differenze in termini di composizione, dovuta, in parte, alla diversa capacità da parte di glicosidasi e glicosiltransferasi, di accedere ai potenziali siti di N-glicosilazione; infatti, la porzione Fab, rispetto al sito Asn297 della porzione Fc risulta più facilmente accessibile. Inoltre, come visto in precedenza, la glicosilazione è un processo stocastico e quindi dipendente dalla disponibilità di donatori zuccheri e di glicosiltransferasi e/o glicosidasi, pertanto, la presenza di particolari glicoforme dipende dall’espressione di glicosiltransferasi nei linfociti B che, a sua volta, può essere influenzata da meccanismi epigenetici (Menni et al. 2013) dipendenti da diversi fattori quali età, ormoni o citochine (Chen et al. 2012). Le catene N-linked associate al Fab sono frequentemente galattosilate e sialilate (spesso presentano una di-sialilazione) e presentano strutture tipo la *bisecting GlcNAc*. Diversamente, la fucosilazione caratterizza maggiormente le catene N-linked Fc-associate (90% delle IgG totali) rispetto a quelle associate al Fab (70% delle IgG totali) (Vidarsson et al. 2014). Le catene N-linked legate alla Asn297 sono di tipo bi-antennario la cui struttura di base (2GlcNAc,5Man, 2GlcNAc) può essere completata con l’aggiunta di galattosio e acido sialico su una o entrambe le antenne, *bisecting GlcNAc* e *core fucose* (Huhn et al. 2009). Nel siero di individui sani, tuttavia, le catene N-linked IgG-associate maggiormente presenti sono fucosilate con antenne: a) prive di galattosio; 2) con uno/due residui di galattosio o 3) con due residui di galattosio e uno di acido sialico (Vidarsson et al. 2014). La

maggior variabilità riguarda, comunque, la presenza/assenza del galattosio e, di conseguenza dell'acido sialico, su una o entrambe le antenne ed in particolare, a seconda della presenza di catene N-linked completate con una, due o nessuna molecola di galattosio le IgG sono classificate come G2, G1 o G0 rispettivamente (Huhn et al. 2009).

1.5 EFFETTI DELLA GLICOSILAZIONE SULL'ATTIVITA' DELLE IgG

1.5.1 Galattosilazione

La presenza del galattosio terminale sulla catena N-linked Fc-associata conferisce alle IgG un'attività di tipo anti-infiammatorio. Ad esempio, in seguito a somministrazione di vaccini contro il virus influenzale o la tossina tetanica, è stato dimostrato che le IgG prodotte contro l'antigene, ma non le totali, risultano più galattosilate inducendo quindi una risposta immunitaria, ma non infiammatoria (Selman et al. 2012). Al contrario, nell'artrite reumatoide (RA), si osserva una diminuzione di IgG galattosilate nella porzione Fc (IgG-G0) (Parekh et al.) e la reversione del fenotipo IgG-G0 la si osserva invece in donne affette da AR in corso di gravidanza, soprattutto durante il terzo trimestre (Rook et al. 1991), condizione a cui è spesso associata la remissione della sintomatologia (Pekelharing et al. 1988; Bondt et al. 2013).

Alterazioni della glicosilazione delle IgG sono state osservate anche in un processo fisiologico quale l'invecchiamento. In particolare i primi studi in tal senso furono condotti alla fine degli anni '80 da Parekh et al. che analizzarono il siero di 151 individui sani, di entrambi i sessi e di età compresa tra 1 e 70 anni.

L'analisi riguardava in modo selettivo il grado di galattosilazione delle IgG al netto del contributo conferito dall'aggiunta di acido sialico, fucosio o N-acetilglucosammina (Parekh et al.). Lo studio, pubblicato nel 1988 mise in evidenza che: 1) circa il 30% dei bambini analizzati presentava IgG con catene N-linked prive del galattosio terminale, 2) nei giovani (età media 25 anni) solo nel 20% dei casi entrambe le antenne delle catene N-linked delle IgG terminavano con la GlcNAc, 3) mentre in soggetti anziani, la percentuale di IgG-G0 sale al 40% (Parekh et al.). Più tardi, un gruppo di ricerca giapponese analizzò un campione più cospicuo (176 donne e 227 uomini) di età compresa fra 0 e 84 anni e confermò la correlazione negativa tra l'età anagrafica e il grado di galattosilazione delle IgG (Yamada et al. 1997).

1.5.1.1 Effetti patologici dovuti alla ridotta galattosilazione di IgG

Come descritto già in precedenza, le IgG-G0, sono delle particolari glicoforme di IgG le cui antenne della catena N-linked legata all'Asn 297 (porzione Fc), sono prive del Gal in posizione terminale e terminano pertanto con un residuo di GlcNAc. La perdita di galattosio, oltre a modificarne la struttura, conferisce alle IgG un'attività di tipo pro-infiammatorio attraverso almeno quattro meccanismi (Fig.6): **1)** interazione con il recettore MBL (*Mannose Binding Lectin*) e successiva attivazione della cascata del complemento mediante la via lectinica; **2)** attivazione delle cellule APC (*Antigen Presenting Antigen*) mediata da recettori lectinici; **3)** interazione con Fc γ Rs su cellule NK e macrofagi; **4)** formazione di aggregati di anticorpi (Dall'Olio et al. 2013).

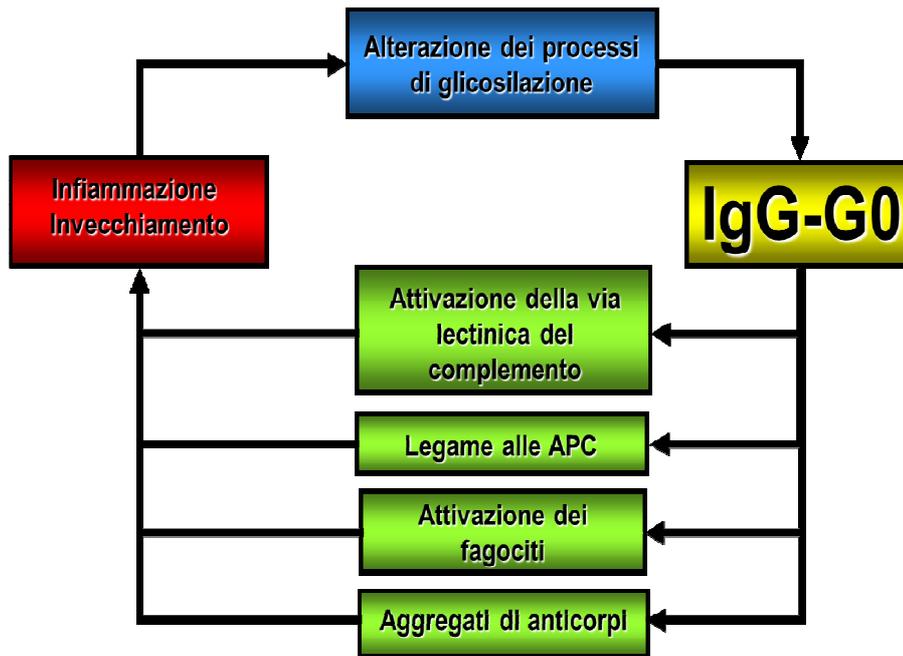


Fig.6: Le IgG-G0 come causa ed effetto dell'infiammazione. Il diagramma mostra come le IgG-G0 siano il risultato di una alterata glicosilazione e causa di infiammazione attraverso quattro meccanismi distinti: 1) attivazione del complemento, mediata dal legame a MBL; 2) attivazione delle cellule presentanti l'antigene (APC) mediata dal legame a recettori DC-SIGN o recettori per il mannosio (MBP); 3) attivazione di fagociti mediata dall'interazione con recettori Fc γ ; 4) formazione di aggregati di anticorpi. L'attivazione del processo infiammatorio agisce poi sull'apparato glicosintetico, causandone delle aberrazioni funzionali che generano le IgG-G0 [Da: (Dall'Olio et al. 2013)].

È stato proposto che le alterazioni della glicosilazione di IgG nell'invecchiamento siano causa ed effetto dell'infiammazione (Fig.6). In particolare le IgG-G0 attraverso i meccanismi sopraelencati attiverrebbero il processo infiammatorio il quale influenzerebbe e modificherebbe l'apparato glicosintetico e tali modificazioni si tradurrebbero in un'ulteriore produzione di IgG con alterata glicosilazione (Dall'Olio et al. 2013).

Legame a MBL e attivazione del complemento

Il recettore MBL è una proteina di origine epatica, analoga al fattore C1q del complemento (Malhotra et al. 1995) e capace di riconoscere residui di mannosio e GlcNAc sulla superficie di microrganismi patogeni (Troelsen et al. 2007). Il recettore MBL svolge una duplice funzione in quanto funge da proteina opsonizzatrice, incentivando l'attività di cellule ad azione fagocitaria ed è in grado di attivare la cascata del complemento (Troelsen et al. 2007). I livelli sierici di MBL sono determinati geneticamente e variano molto all'interno della popolazione in quanto determinati da almeno tre configurazioni alleliche sull'esone 1 del gene MBL2 posto sul cromosoma 10 (Garred 2003). L'effetto patogeno che, in pazienti AR, le IgG-G0 esplicano mediante il legame con MBL è legato alla loro forza di interazione, almeno cinque volte superiore rispetto alle IgG normo-glicosilate (Malhotra et al. 1995) e la conseguente capacità di attivare il complemento mediante la via lectinica contribuisce ad incrementare il processo infiammatorio nelle giunzioni sinoviali (Malhotra et al. 1995). Infine studi condotti su pazienti RA hanno dimostrato che la simultanea presenza di MBL e IgG-G0 in concentrazioni elevate è associata ad una aumentata mortalità in seguito ad eventi ischemici e/o infarti del miocardio. Tale associazione è correlata alla persistenza del processo infiammatorio cronico che aggrava i danni dovuti alla ri-perfusione dei tessuti colpiti da ischemia (Troelsen et al. 2007).

Di contro, studi condotti su pazienti RA portatori di una particolare variante allelica di MBL, descritta come incapace di attivare il complemento, non mostrano alcun tipo di protezione o miglioramento di sintomi legati al processo infiammatorio a livello delle giunzioni sinoviali (Stanworth et al. 1998). Pertanto, secondo questi dati, l'attivazione del complemento, mediata dal legame MBL-IgG-G0, non avrebbe un ruolo da protagonista nella fisiopatologia dell'artrite

reumatoide (Stanworth et al. 1998). Inoltre, studi più recenti, dimostrano che, in topi a cui è stato deletato il gene per la MBL, l'attività infiammatoria delle IgG-G0 non ne risulta compromessa (Nimmerjahn et al. 2007).

Interazione con cellule presentanti l'antigene (APC) e recettori $Fc\gamma$

Le IgG-G0, in seguito all'esposizione della GlcNAc terminale, sono in grado di attivare cellule dendritiche e macrofagi mediante il loro legame ai recettori per il mannosio, una lectina di tipo C e analoga, dal punto di vista funzionale, a MBL (Dong et al. 1999). I recettori per il mannosio sono in grado di riconoscere e legare diverse strutture di carboidrati tra cui i residui di GlcNAc (Lennartz et al. 1987) e di conseguenza le IgG-G0. In seguito al legame, le IgG-G0 vengono internalizzate nel citoplasma dove subiscono una particolare processazione che si conclude con la produzione di piccoli peptidi con caratteristiche antigeniche che, in seguito all'associazione con molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di tipo II (MCH II), vengono esposti sulla superficie cellulare al fine di stimolare una risposta immunitaria mediata dai linfociti T (Dong et al. 1999).

Le IgG-G0 stimolano il processo infiammatorio anche mediante il legame ed attivazione delle cellule dendritiche attraverso il recettore DC-SIGN (anche conosciuto come recettore CD209) (Yabe et al. 2010), un recettore appartenente alla superfamiglia delle lectine di tipo C (Soilleux et al. 2002). Il DC-SIGN è un recettore che presenta 3 domini: uno citoplasmatico, uno transmembrana ed uno extracellulare che contiene dei motivi CRD (*carbohydrate-recognition domain*) in grado di riconoscere residui terminali di Man, Fuc e GlcNAc attraverso un meccanismo Ca^{2+} -dipendente (Mitchell et al. 2001).

I recettori Fc γ , descritti in precedenza, subiscono anch'essi gli esiti dell'alterata glicosilazione delle IgG. In particolare, la perdita del galattosio terminale sembra essere cruciale nell'indurre, nella porzione Fc delle IgG, un cambio conformazionale tale da rendere più agevole il legame, e, successiva attivazione dei recettori Fc γ (Krapp et al. 2003).

Formazione di aggregati di IgG-G0

La presenza di aggregati di IgG è stata messa in evidenza nel liquido sinoviale di pazienti AR, dove le IgG-G0 (Leader et al. 1996) tendono ad aggregarsi e a peggiorare il processo infiammatorio a livello delle giunzioni sinoviali. In particolare è emerso che il grado di galattosilazione sembra ridursi sensibilmente nelle IgG che formano aggregati rispetto a quanto osservato per IgG in forma libera (Leader et al. 1996) confermando che la perdita di galattosio in posizione terminale facilita l'aggregazione di molecole anticorpali.

1.5.2 Fucosilazione

Le IgG prodotte in seguito a vaccinazione o normali risposte immunitarie risultano in gran parte fucosilate nella porzione Fc e ciò spiega perché circa il 94% delle IgG circolanti risulta fucosilato (Vidarsson et al. 2006). Nella catena N-linked legata all'Asn 297, il fucosio può essere trasferito al residuo di GlcNAc legato al peptide, dalla α 1,6fucosiltrasferasi-8 (FUT8) a formare il *core fucose* (Miyoshi et al. 1999). La presenza di un residuo di fucosio sulla catena CH2 dell'anticorpo si ripercuote sulla capacità di indurre ADCC, capacità che per altro non sembra essere influenzata dalla presenza di acido sialico, galattosio o *bisecting GlcNAc* (Mimura et al. 2000; Iida et al. 2006). Osservazioni sperimentali

dimostrano infatti che in malattie immunitarie come la trombocitopenia alloimmune fetale, si ha un incremento di anticorpi non fucosilati di origine materna diretti verso antigeni piastrinici (Wuhrer et al. 2009). L'effetto anti-infiammatorio che conferisce la presenza del fucosio alle IgG dipende dall'interazione con il recettore Fc γ RIIIa sui fagociti. La perdita del *core fucose*, infatti produce dei cambiamenti conformazionali che si traducono in una maggiore capacità di legare Fc γ RIIIa e quindi di indurre l'ADCC (Shields et al. 2002). Tale capacità viene sfruttata anche in clinica, per potenziare l'effetto terapeutico di alcuni anticorpi monoclonali (Jefferis 2009).

1.5.3 Sialilazione

La sialilazione conferisce alle IgG un'attività anti-infiammatoria che è alla base di una comune pratica clinica, la IVIG (*Intravenous Immunoglobulin*), utilizzata per attenuare i sintomi correlati a quadri clinici caratterizzati da autoimmunità associata ad infiammazione cronica (Schwab & Nimmerjahn 2013). La IVIG consiste nella somministrazione intravenosa di alte dosi di IgG purificate (1-3g/kg) (Gelfand 2006) dal siero di 5-10000 donatori (Dwyer 1992). Le IgG contenute nella soluzione inoculata comprendono tutte le sottoclassi (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) e più di 30 glicovarianti (Anthony et al. 2008). La somministrazione di IgG in pazienti affetti da malattie autoimmuni è controintuitiva e potrebbe sembrare paradossale in quanto sono le IgG stesse responsabili del quadro sintomatologico di patologie autoimmunitarie come il lupus eritematoso sistemico o l'artrite reumatoide (Schwab & Nimmerjahn 2013). In realtà l'attività terapeutica è relegata ad una piccola percentuale di IgG, ovvero a glicoforme che presentano la catena N-linked, legata all'Asn297, con una o entrambe le antenne terminanti con residui di acido sialico (Kaneko et al. 2006). Studi in vitro hanno

dimostrato che, in seguito al trattamento di IgG con Neuraminidasi, enzima che rimuove selettivamente l'acido sialico in posizione terminale, si ha la perdita dell'attività anti-infiammatoria IVIG-specifica (Böhm et al. 2012), mentre l'arricchimento di dosi di IVIG con IgG precipitate con SNA, (una lectina estratta da *Sambucus nigra*, che riconosce l'acido sialico in posizione $\alpha 2,6$), ne incrementa l'attività anti-infiammatoria (Kaneko et al. 2006). Da un punto di vista molecolare, l'attività anti-infiammatoria di IgG sialilate è legata all'interazione con il recettore dei macrofagi Fc γ RIIB (Fig.7) che è associato ad un'attività di tipo inibitorio (Böhm et al. 2012).

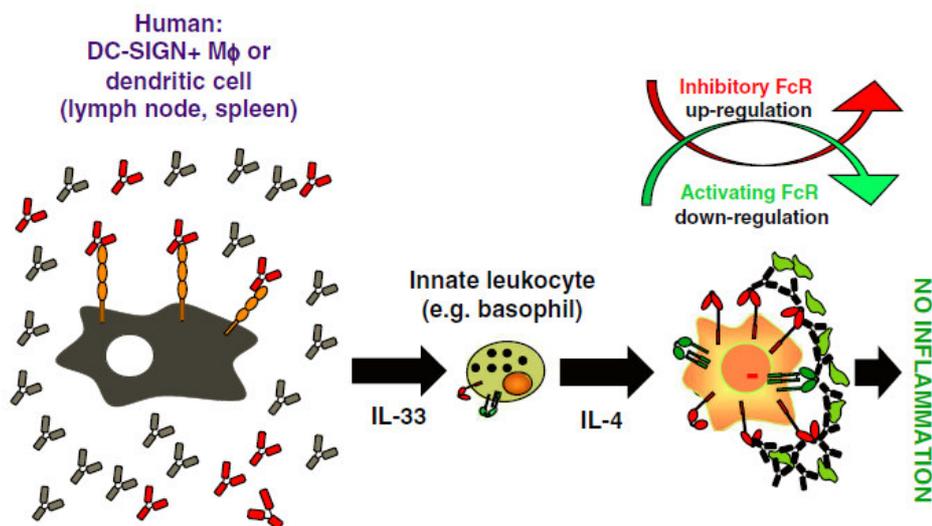


Fig.7: Effetto anti-infiammatorio di IgG sialilate. Le IgG sialilate riducono l'infiammazione attraverso un meccanismo che vede coinvolti i recettori DC-SIGN. Il legame di IgG sialilate ai recettori DC-SIGN sulle cellule dendritiche induce la produzione di IL-33, che a livello dei basofili, stimola la produzione di IL-4 e quindi un pathway Th2. L'IL-4 infine, stimola sui macrofagi l'esposizione di Fc γ RIIB (inibitori) e riduce quella di Fc γ R di tipo attivatorio. In seguito al legame del complesso autoantigene- anticorpo, tipico di malattie autoimmuni, l'abbondanza di Fc γ R inibitori blocca il processo infiammatorio. [Da: (Böhm et al. 2012)]

In particolare studi eseguiti su modelli murini indicano che la presenza di Fc γ RIIB su macrofagi o cellule della linea mieloide, presenti nel sito di infiammazione,

aumenta significativamente dopo trattamento con IVIG, mentre altre isoforme di Fc γ R di tipo attivatorio tendono a diminuire (Kaneko et al. 2006). Più nel dettaglio, il pathway indotto dalle IgG sialilate coinvolge, su cellule dendritiche, il recettore murino SIGNR1, ortologo del recettore umano DC-SIGN. Le IgG sialilate, ma non le de-sialilate, legano con grande affinità il recettore SIGNR1 e inducono il rilascio di Interleuchina 33 (IL-33) la quale stimola i basofili a produrre Interleuchina 4 (IL-4). L'effetto dell'IL-4 sui macrofagi è quello di stimolare l'esposizione di Fc γ RIIB (inibitorio) e inibire quella di Fc γ Rs di tipo attivatorio (Pricop et al. 2001; Nimmerjahn & Ravetch 2006). In tal modo, in seguito al legame del complesso autoantigene-anticorpo con i recettori Fc γ RIIB, a questo punto più abbondanti sui macrofagi attivati, riduce sensibilmente il processo infiammatorio (Fig.7).

Da quanto discusso finora, la sialilazione della porzione Fc conferirebbe alle IgG un'attività di tipo anti-infiammatoria che vede coinvolti il recettore DC-SIGN, i basofili e i recettori Fc γ di tipo inibitorio. Tuttavia tale visione viene messa in discussione da altri studi, sia su modelli murini che umani. Studi funzionali dimostrano che il grado di sialilazione non interferisce sulla capacità delle IgG di legare Fc γ Rs o DC-SIGN. In particolare è stato evidenziato che il legame di glicoforme di IgG (di classe 1 e 3) de-sialate o agalattosilate ai polimorfonucleati (PMN), mediato dal recettore Fc γ RIIB (di tipo attivatorio), non risulta più basso rispetto alle isoforme native (Adler et al.) e che l'affinità tra la porzione Fc delle IgG e il recettore DC-SIGN sia indipendente dal grado di sialilazione, e più in generale di glicosilazione, della porzione Fc delle IgG (Yu et al. 2013). Studi più recenti, eseguiti su pazienti affetti da trombocitopenia autoimmune, patologia caratterizzata dalla opsonizzazione (IgG-dipendente) e successiva fagocitosi di

cellule del sangue da parte dei macrofagi, mostrano che, in seguito a IVIG, si ha riduzione della fagocitosi, non dipendente dal grado di sialilazione della porzione Fc delle IgG né da un incremento dell' espressione di Fc γ RIIb (Nagelkerke et al. 2014). Tali studi risultano in accordo con i dati ottenuti su un modello murino di trombocitopenia autoimmune: anche in questo caso dal confronto tra somministrazioni di IVIG arricchite di glicoforme de-sialilate o iper-sialilate non emerge alcun tipo di differenza sull'effetto clinico manifestato e, da un punto di vista molecolare, la somministrazione di alte dosi di IgG non provoca un incremento dell'mRNA di Fc γ RIIb a livello splenico, ma solo a livello del midollo osseo (Leontyev et al. 2012). Infine Campbell et al. hanno dimostrato, su un modello murino di artrite, che l'attività anti-infiammatoria delle IVIG non dipende dai basofili (Campbell et al. 2014).

2. SCOPO DELLA RICERCA

Scopo della ricerca è studiare lo stato di glicosilazione delle proteine plasmatiche con particolare riferimento alle IgG e indagare i possibili meccanismi alla base della loro alterata glicosilazione nell'invecchiamento. Abbiamo studiato l'attività di glicosiltransferasi plasmatiche, con particolare riferimento alla β 1,4GalT e ST6Gal1, in modo da valutare, sulla base della più recente letteratura (Wandall et al. 2014; Lee et al. 2014), un eventuale ruolo di queste isoforme plasmatiche nella glicosilazione delle IgG. Lo studio è stato eseguito su plasmi derivati da individui sani di ambo i sessi e di diversa età e, come modello di invecchiamento precoce, saranno utilizzati plasmi di soggetti ambo sessi, di diversa età e affetti da Sindrome di Down.

3. MATERIALI E METODI

3.1 MISURA DELL'ATTIVITA' DI GLICOSILTRANSFERASI PLASMATICHE

Misura dell'attività α 2,6sialiltrasferasica

L'attività α 2,6sialiltrasferasica (ST6GalT) veniva misurata utilizzando come accettore l'asialotransferrina. La de-sialilazione della transferrina veniva eseguita mediante una blanda idrolisi acida con acido solforico (H_2SO_4) 50mM per 1 h a 80°C. Il campione veniva poi dializzato e liofilizzato e successivamente risospeso in H_2O alla concentrazione di 20mg/ml. Per misurare l'attività ST6Gal-T1 veniva preparata una miscela di reazione che conteneva, in un volume finale di 50 μ l: 80 μ M tampone Na-cacodilato a pH 6.5, 5 μ M di CMP-acido sialico e 1 μ l di CMP-[3H]-acido sialico (0.001mCi/ml), 500 μ g di asialotransferrina come accettore glicoproteico e 5 μ l di plasma umano. Dopo 3h di incubazione a 37°C, la componente glicoproteica veniva precipitata aggiungendo 1ml di acido fosfotungstico (FTA) 1%. Il precipitato ottenuto veniva lavato due volte con FTA 1% e una con metanolo, risospeso in HCl 1M e infine bollito per 15 min. La radioattività presente nelle glicoproteine, misura diretta dell'attività della ST6Gal-T1, veniva rilevata mediante l'utilizzo dello scintillatore *Guardian 1414 Liquid Scintillation Counter (PerkinElmer)*.

Misura dell'attività β 1,4galattosiltrasferasica

L'attività β 1,4galattosiltrasferasica (β 1,4Gal-T) veniva misurata su 5 μ l di plasma umano utilizzando, come accettore ovalbumina estratta da uovo di pollo. La reazione veniva eseguita in un volume finale di 20.5 μ l e contenente: 97.5mM Tris/HCl pH 8, 9.75mM Mn₂Cl, 4.9mM CDP-Colina, 1 μ l di UDP-[³H]-galattosio (0.025mCi/ml), 0.4mM ATP e 550 μ g di ovalbumina. Dopo 3h di incubazione a 37°C la rilevazione della radioattività associata all'accettore glicoproteico veniva eseguita come descritto in precedenza per l'attività ST6Gal1.

3.2 STUDIO DELLO STATO DI GLICOSILAZIONE DELLE IgG

Isolamento di proteine plasmatiche sialilate mediante precipitazione con SNA-agarose

A 400 μ l di plasma umano venivano aggiunti 100 μ l di PBS contenente 1% NONIDET-P40, 1% acido deossicolico e inibitori di proteasi. In seguito, venivano aggiunti 20 μ l di una soluzione SNA-biotina (2mg/ml) (Vector Laboratories) e il campione veniva incubato per 5h a 4°C in agitazione. Venivano poi aggiunti 50 μ l di Streptavidina-Agarose (1mg/ml) (Vector Laboratories) e il campione veniva incubato *overnight* a 4°C in agitazione. Dopo centrifugazione il pellet ottenuto veniva lavato 3 volte con PBS contenente 1% NONIDET-P40, 1% acido deossicolico e inibitori delle proteasi e una con Tris-HCl 50mM/NaCl 15mM. In seguito a centrifugazione il campione veniva risospeso con 70 μ l di H₂O e 50 μ l di

sample buffer riducente e incubato a 60°C per 15min, prima di sottoporlo ad elettroforesi secondo il metodo di Laemmli (Laemmli 1970).

Identificazione di proteine SNA-positive mediante MALDI-TOF/TOF

Le bande di interesse venivano isolate dal gel e processate per l'analisi MALDI MS, eseguita presso l'Unità di Proteomica dell'IPATIMUP (Università di Porto), al fine di identificare le proteine in esse contenute. Le bande escisse dal gel venivano lavate, decolorate (nel caso in cui fossero state precedentemente colorate con Blue Comassico), digerite con Tripsina e i peptidi venivano estratti secondo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice della Tripsina (Promega, USA). Le proteine digerite venivano desalinizzate, concentrate e caricate sulla piastra del MALDI usando ZipTips (Millipore, USA) seguendo le indicazioni del produttore. Per la preparazione della matrice veniva utilizzata una soluzione di 6-8mg/ml di acido α -ciano-4-idrossicinnamico in 50%ACN/0.1%TFA. I campioni venivano analizzati utilizzando un 4700 Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF (AB SCIEX, USA). I dati relativi alla *peptide mass fingerprint* (PMF) venivano acquisiti in un riflettore positivo MS in un range di 700-4000 (m/z) e la calibrazione interna dello strumento veniva eseguita utilizzando picchi derivati dall'autolisi della tripsina. Se necessario, per l'analisi MS/MS, venivano selezionati degli altri picchi, di più alta intensità, non derivati dalla digestione con tripsina. Gli spettri MS e MS/MS venivano analizzati utilizzando il software GPS Explorer (Version 3.6, AB SCIEX, USA) e, utilizzando il *Mascot search engine* (Version 2.1.04, Matrix Science, UK), le sequenze venivano ricercate nei seguenti database: UniProtKB/Swiss-Prot, UniProtKB/TrEMBL e NCBI *Inr*. L'inclusione del picco avveniva solo se il rapporto tra il segnale/rumore di fondo era maggiore di 10. L'associazione tra il picco ottenuto e la proteina identificata avveniva con

un intervallo di confidenza (CI), calcolato con il software AB SCIEX GPS, di almeno il 99%.

Lectin-blot

Le proteine contenute in 10µl di plasma umano, diluito 100X, venivano separate mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti e riducenti secondo il protocollo di Laemmli (1970). In ogni gel venivano caricate due quantità note (2,5 e 5 µg) di IgG standard (Sigma), necessarie per normalizzare l'intensità del segnale. Le proteine così separate venivano trasferite su membrana di nitrocellulosa. Il blocco dei siti aspecifici era eseguito a temperatura ambiente incubando il filtro per 1h con una soluzione di BSA 3% in PBS contenente Tween-20 0,1% (PBS-T). I lavaggi del filtro, dopo ogni incubazione, venivano effettuati con PBS-T e le soluzioni di lectine e/o di anticorpo secondario venivano diluite in PBS-T contenente BSA 10mg/ml. Si eseguivano due lavaggi da 10min ciascuno seguiti dall'incubazione con la lectina digossigenilata. Per identificare le diverse strutture glicidiche sono state utilizzate le seguenti lectine: A seconda del tipo di indagine, le lectine utilizzate sono state le seguenti: *Sambucus nigra* (SNA), *Griffonia simplicifolia II* (GSII), *Erythrina cristagalli* (ECL), *Ulex Europeans I* (UEA), *Phaseolus vulgaris erythroagglutinin* (PHA-E) [Vector Laboratories]. Le incubazioni con le lectine venivano eseguite in tutti i casi per 1h a temperatura ambiente, con soluzioni d'uso 0.5µg/ml. Si proseguiva con 2 lavaggi da 10 minuti ciascuno e infine si eseguiva, per 1h a temperatura ambiente, l'incubazione con anti-digossigenina coniugata con la perossidasi. Dopo 2 lavaggi si procedeva con la rilevazione del segnale con SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific). L'intensità del segnale corrispondente alla catena pesante delle IgG veniva

quantificato spettrofotometricamente e normalizzato con quello delle quantità note di IgG standard, ottenendo un valore assoluto che consentiva la comparazione di gel diversi.

Digossigenilazione di lectine

Le lectine da noi utilizzate per l'analisi lectin blot, venivano preventivamente coniugate con Digossigenina. Le lectine venivano risospese in H₂O alla concentrazione 1mg/ml e ad ogni ml di soluzione venivano aggiunti 9µl di una soluzione di Digossigenina (41mg/ml in etanolo). Dopo 2h di incubazione a temperatura ambiente, si dializzava esaustivamente.

3.3 GLYCOAGE TEST

Il GlycoAge test viene calcolato in seguito allo studio del profilo degli N-glicani legati a glicoproteine plasmatiche effettuato mediante DSA-FACE (*DNA Sequencer-assisted fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis*) come descritto da Callewaert *et al.* (Callewaert et al. 2001). La procedura è suddivisa in 5 steps: deglicosilazione delle glicoproteine plasmatiche mediante l'enzima N-glicosidasi F (PNGasi F), derivatizzazione con acido 8-ammino-1,3,6-PireneTriSolfonico (APTS), desialilazione delle catene N-linked mediante Neuraminidasi, separazione delle specie glicaniche mediante un sequenziatore di DNA e analisi dei dati. La procedura sopra descritta veniva eseguita secondo il metodo messo a punto da Vanhooren *et al.* (Vanhooren et al. 2008). Il GlycoAge test veniva inteso come il rapporto tra la concentrazione di catene N-linked agalattosilate (NGA2F) e di-galattosilate (NA2F), in entrambi i casi *core fucosilated* (Vanhooren et al. 2010).

4. RISULTATI

4.1 ATTIVITA' ST6Gal1 e β 1,4GalT IN PLASMA UMANO DI SOGGETTI SANI

Su un campione di 123 plasmi, derivati da individui sani di entrambi i sessi e di diversa età, è stata misurata l'attività di due glicosiltrasferasi che intervengono nelle fasi finali di biosintesi di catene N-linked: la α 2,6sialiltrasferasi (ST6Gal1) e la β 1,4galattosiltrasferasi (β 1,4GalT).

La ST6Gal1 catalizza il trasferimento di un residuo di acido sialico a livello di un residuo di galattosio terminale, mentre la β 1,4GalT trasferisce ad un residuo di GlcNAc terminale, un residuo di galattoso.

La popolazione analizzata è stata suddivisa in cinque classi di età: **a)** bambini di età compresa fra i 5 e i 12 anni; **b)** giovani tra i 24 e i 39 anni; **c)** adulti tra i 40 e i 60 anni ; **d)** anziani di età compresa fra i 61 e 80 anni ed **e)** over 80, comprensivi dei centenari (età > 98anni).

Dai dati ottenuti si evince che le attività di entrambe le glicosiltransferasi sono in relazione con l'età, sebbene con modalità differenti (Fig. 8A e C).

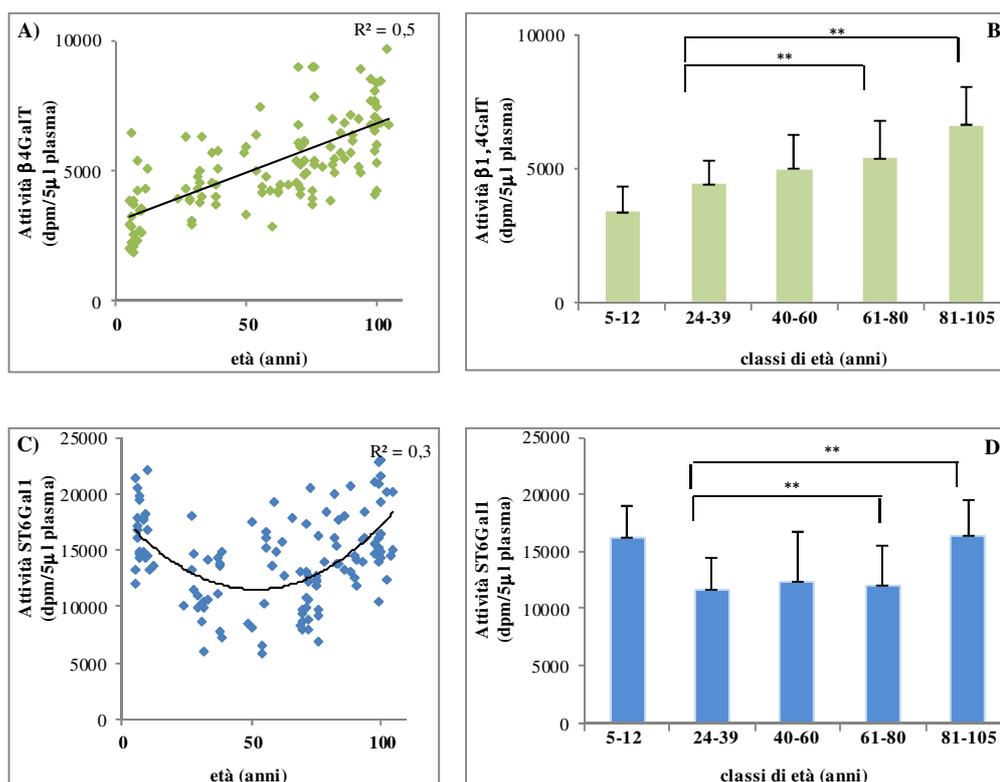


Fig. 8: Attività di glicosiltransferasi plasmatiche misurate in soggetti sani di diversa età. L'attività β 1,4GalT e ST6GalI sono state misurate in 5 μ l di plasma derivato da soggetti sani di età compresa tra 5 e 105 anni. L'attività β 1,4GalT mostra una relazione di tipo lineare con l'età (A) al contrario di quanto osservato per l'attività ST6GalI (C). I valori massimi e minimi di attività β 1,4GalT si riscontrano negli over-80 e nei bambini rispettivamente (B), mentre l'attività ST6GalI resta costante in tutte le classi di età ad eccezione dei bambini e degli over-80 in cui si registrano i valori massimi (D) (** Differenze statistiche misurate con il test T di Student; $p < 0.01$).

In particolare l'attività galattosiltransferasica cresce linearmente con l'età (Fig. 8 A) mostrando valori minimi nei bambini e massimi negli over 80 (Fig. 8B). Al contrario l'attività sialiltransferasica, non correla linearmente con l'età (Fig. 8C), i valori massimi sono associati alle classi a) ed e) mentre per tutte le altre fasce d'età l'attività tende a restare pressoché costante e risulta essere più bassa di circa il 30% rispetto a quanto osservato nei bambini e negli over 80 (fig. 8D).

4.2 ATTIVITA' ST6Gal1 E β 1,4GalT IN PLASMA UMANO DI SOGGETTI AFFETTI DA SINDROME DI DOWN

L'attività enzimatica della ST6Gal1 e β 1,4GalT sono state misurate su plasmi derivati da soggetti affetti da sindrome di Down (SD), in quanto tale condizione patologica è considerata un buon modello di invecchiamento precoce. La popolazione analizzata è stata suddivisa in due classi di età : < 30anni e > 30anni. I giovani affetti da SD (< 30anni) mostrano un'attività β 1,4GalT inferiore di circa il 20% rispetto a quanto osservato per il gruppo > 30 anni (Fig. 9A), mentre l'attività ST6Gal1 tende ad aumentare in modo statisticamente significativo di circa il 20% nei gruppo di età > 30 anni (Fig.9B).

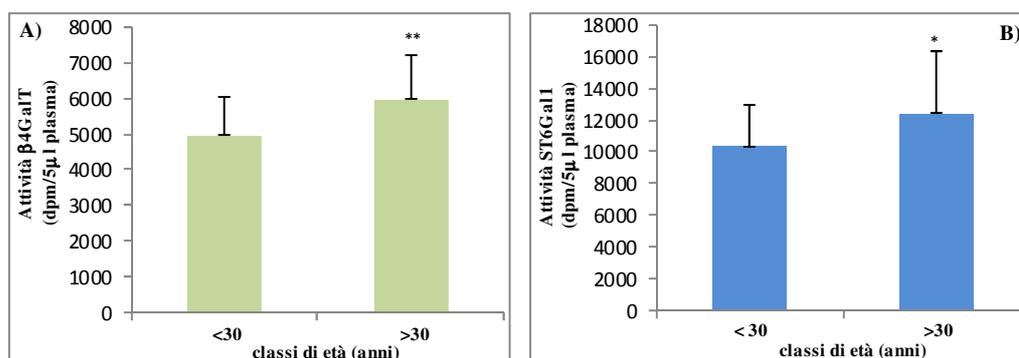


Fig. 9: Attività di glicosiltransferasi plasmatiche in soggetti di diversa età affetti da Sindrome di Down. L'attività β 1,4GalT e ST6Gal1 sono state misurate in 5 μ l di plasma. Entrambe le attività enzimatiche aumentano del 20% in soggetti di età superiore ai 30 anni e affetti da Sindrome di Down. * Differenze statistiche misurate mediante il test T di Student per campioni indipendenti tra soggetti con Sindrome di Down di età < 30 anni o > 30 anni (*p<0.05; **p<0.01)

Dal confronto con la popolazione sana, emerge che il gruppo SD < 30 anni mostra valori di attività galattosiltransferasica simili a quanto osservato in soggetti sani di età compresa tra i 40 e i 60 anni (Fig. 8B), mentre l'attività β 1,4GalT misurata in soggetti SD e con più di 30 anni è paragonabile a quanto riscontrato nella popolazione anziana (< 80 anni) ma non negli over-80 (Fig.8B). Per quanto

riguarda l'attività ST6Gal1, i valori ottenuti per soggetti SD con età > 30anni sono paragonabili a quanto misurato in soggetti sani nelle fasce d'età che vanno dai 24 agli 80 anni (Fig. 8D).

4.3 ATTIVITA' ST6Gal1 E β 1,4GalT IN PLASMA UMANO IN FIGLI DI CENTENARI

Al fine di valutare se eventuali modifiche dell'attività enzimatica potessero essere associate ad un particolare background genetico associato alla longevità, le attività plasmatiche dei due enzimi (ST6Gal1 e β 1,4GalT) sono state misurate in individui di età media pari a 70 anni caratterizzati dall'aver almeno un genitore sopravvissuto oltre l'aspettativa di vita relativa al periodo in cui viveva (longevo). Tale gruppo è stato classificato come "figli di centenari". I dati ottenuti sono stati poi confrontati con i relativi controlli, ossia individui di età paragonabile ai figli di centenari, che condividevano lo stesso ambiente di vita, ma differivano solamente per non avere genitori longevi.

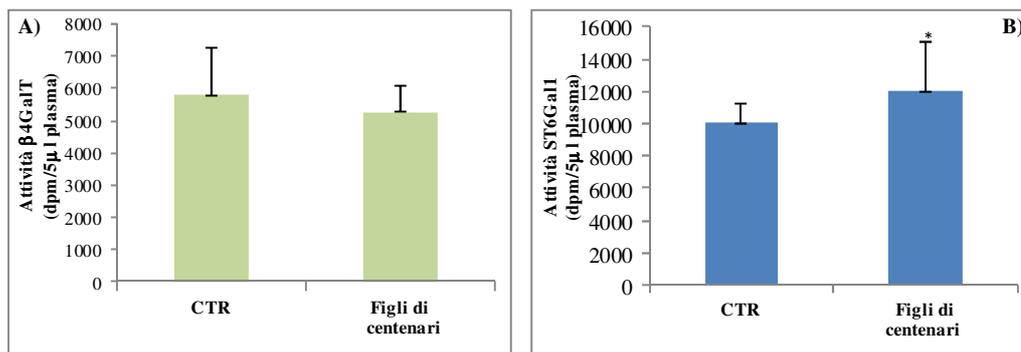


Fig. 10: Attività di glicosiltransferasi plasmatiche misurate in figli di centenari e controlli. L'attività β 1,4GalT e ST6Gal1 sono state misurate in 5µl di plasma. L'attività β 1,4GalT non mostra variazioni significative tra i due gruppi analizzati (A), mentre l'attività ST6Gal1 risulta più elevata nei figli di centenari di circa il 20% rispetto ai controlli (B). * Differenze statistiche misurate mediante il test T di Student per campioni indipendenti tra figli di centenari e relativi controlli (p < 0.05).

Come mostrato in Fig. 10A, l'attività galattosiltrasferasica risulta essere paragonabile tra i due gruppi analizzati, mentre l'attività sialiltrasferasica è più alta di circa il 20 % nei figli di centenari rispetto ai controlli (Fig. 10B).

4.4 CORRELAZIONE TRA GlycoAge test E GLICOSILTRANSFERASI PLASMATICHE

Il GlycoAge test è una misura del rapporto tra catene N-linked agalattosilate e digalattosilate associate a glicoproteine plasmatiche ed è riconosciuto come un ottimo marcatore di invecchiamento. In Fig 11A viene infatti mostrata la relazione tra il GlycoAge test, misurato su un campione di 125 individui di età compresa tra i 5 e i 105 anni, e l'età anagrafica. La correlazione risulta essere lineare e molto significativa ($R^2 = 0,6$).

Tale relazione con l'età è diversa rispetto a quanto osservato per le due glicosiltrasferasi analizzate in precedenza (Fig.11 A) e non si ha una relazione significativa tra il GlycoAge test e l'attività ST6Gal1 (Fig. 11D), mentre si osserva una debole e poco significativa relazione di tipo lineare con l'attività galattosiltrasferasica (Fig.11C). Inoltre, sebbene entrambe le glicosiltrasferasi siano in relazione, anche se con modalità differenti, con l'età, il dot-plot in Fig. 11B in cui si correlano le attività ST6Gal1 e β 1,4GalT, mostra una completa indipendenza tra i due enzimi.

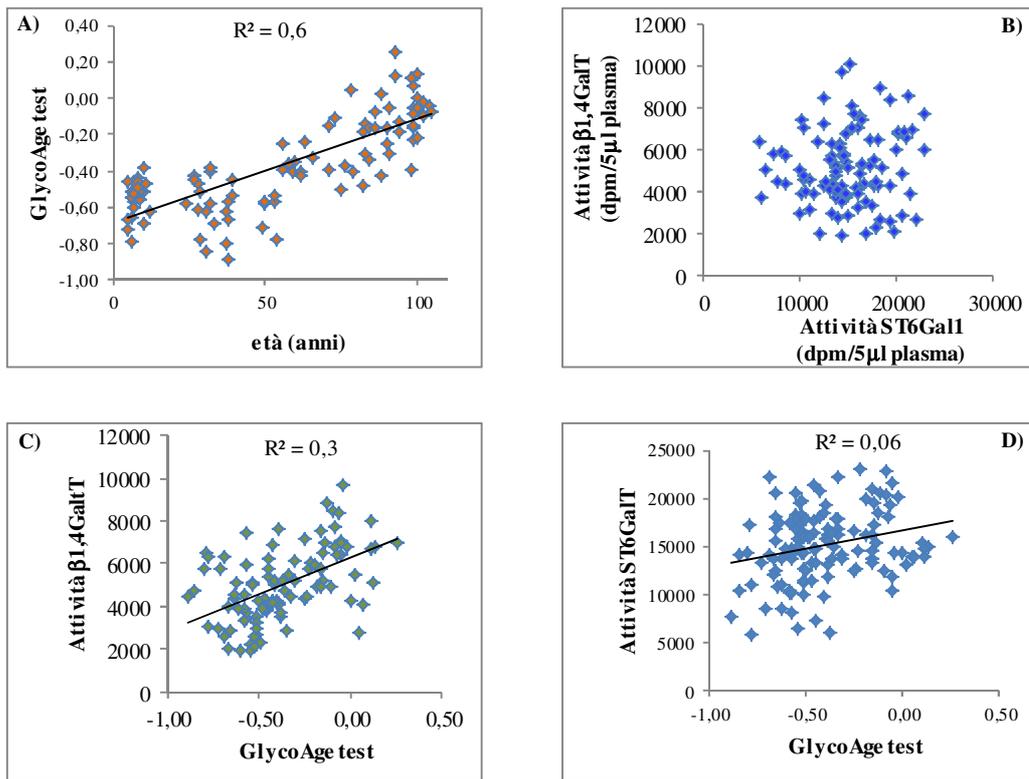


Fig.11 : Relazione tra glicosiltransferasi e tra attività $\beta 1,4\text{GalT}$ e ST6GalI con il GlycoAge test. Il GlycoAge test è in relazione lineare e molto significativa con l'età (A). L'attività delle due glicosiltransferasi misurate nel plasma di soggetti di diversa età non mostrano alcun tipo di correlazione (B). Studi di correlazione indicano che il GlycoAge non è in relazione con l'attività ST6GalI (C), ma solo e debolmente, con l'attività $\beta 1,4\text{GalT}$ ($R^2 = 0.3$).

Tale risultato indica chiaramente che il meccanismo alla base dell'attività dei due enzimi plasmatici sia differente.

I nostri dati dimostrano che, pur basandosi su meccanismi diversi, tutti e tre questi marcatori misurano indipendentemente diverse condizioni fisio-patologiche legate all'età.

4.5 ANALISI DELLO STATO DI GLICOSILAZIONE DI IgG MEDIANTE L'UTILIZZO DI LECTINE

Le lectine sono proteine di origine vegetale in grado di riconoscere particolari strutture glucidiche. In particolare la lectina estratta dal *Sambucus nigra* (SNA) riconosce in modo specifico l'acido sialico legato in posizione α 2,6 e può fornire una misura indiretta dell'attività dell'enzima ST6Gal1, in quanto ne misura il prodotto. Le proteine plasmatiche sono state separate mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide e successivamente analizzate mediante lectin-blot con SNA. L'analisi ha rilevato una serie di discreta di bande reattive all'SNA (Fig. 12A) che sono state poi isolate dal gel e successivamente identificate e caratterizzate mediante MALDI-TOF. Dall'analisi mediante spettrometria di massa è emerso che le principali bande SNA-reattive sono le seguenti: trombospondina, catena pesante delle IgM, catene β e γ del fibrinogeno e catena pesante delle IgG (Fig. 12A).

Plasmi di individui di età e sesso diversi sono stati analizzati mediante lectin-blot con l' SNA per valutare se il grado di sialilazione delle proteine identificate mediante MALDI-TOF venisse modificato con l'età. Dall'analisi è emerso che il grado di sialilazione risulta modulato solo per quanto riguarda le catene pesanti delle IgG. In particolare, come mostrato in Fig. 12B mentre per tutte le glicoproteine plasmatiche il grado di sialilazione è indipendente dall'età, per le catene pesanti delle IgG, si ha, nei giovani, un aumento della reattività all'SNA rispetto a quanto osservato nella popolazione anziana.

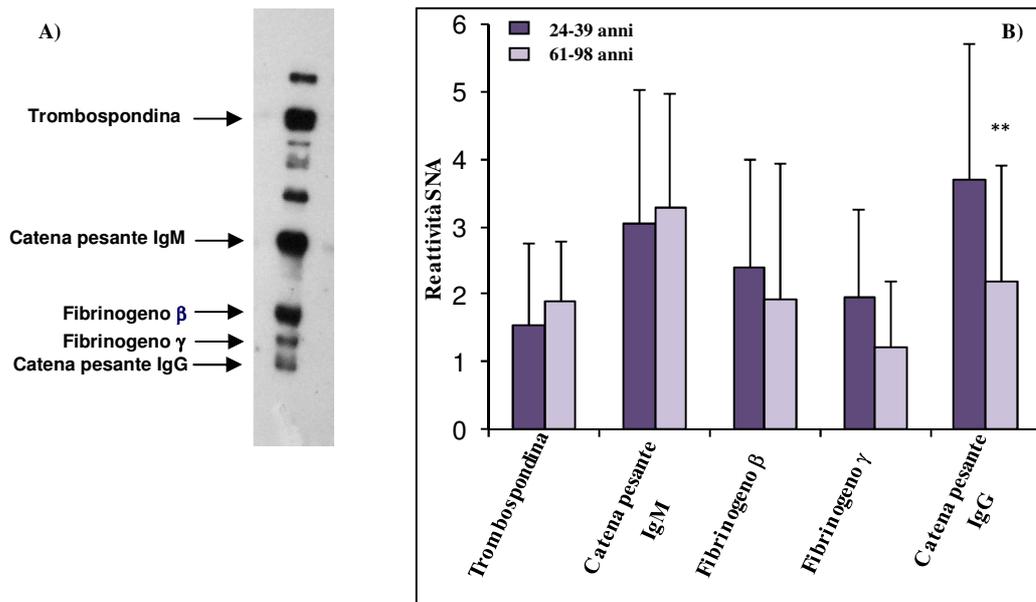


Fig.12 : Studio dell' α 2,6sialilazione di glicoproteine plasmatiche. In figura A viene riportato un lectin-blot mediante SNA di plasma umano diluito 100X. Le principali bande SNA reattive sono state isolate dal gel e caratterizzate mediante spettrometria di massa. Dall'alto verso il basso le principali glicoproteine α 2,6 sialilate sono risultate essere : trombospondina, catena pesante delle IgM, catene β e γ del fibrinogeno e catena pesante delle IgG. Lo stato di sialilazione delle glicoproteine plasmatiche è stato studiato su plasmi di individui di età e sesso diversi (B). L'istogramma riporta i valori misurati nella popolazione giovane (■, 24-39 anni) e negli anziani (□, 61-98anni). Solo per quanto riguarda le catene pesanti delle IgG si assiste ad una modulazione del livello di sialilazione statisticamente significativa (** Significatività statistica misurata con il Test T di Student per campioni indipendenti; $p < 0.01$).

Sulla base dei dati ottenuti mediante l'impiego dell'SNA per valutare lo stato di sialilazione di glicoproteine plasmatiche, lo studio è stato esteso ad altre strutture glucidiche che possono caratterizzare le catene N-linked delle IgG e che hanno una valenza funzionale nel conferire attività pro- o anti-infiammatoria alle IgG stesse. In particolare il grado di galattosilazione è stato studiato mediante la lectina *Erythrina cristagalli* (ECL) che riconosce il galattoso in posizione terminale; la *Griffonia simplicifolia II* (GSII) è stata utilizzata come misura diretta delle IgG-G0 in quanto riconosce un residuo di GlcNAc terminale, la *Ulex europaeus* I (UEA) riconosce un residuo di α -fucosio ed è stata pertanto utilizzata come misura del grado di fucosilazione delle IgG ed infine la *Phaseolus vulgaris* *Erythroagglutinin* (PHA-E) come rilevatore della bisecting GlcNAc.

La popolazione analizzata, di ambo i sessi, è stata suddivisa in quattro classi di età: **a)** giovani tra i 24-39 anni; **b)** adulti tra i 40 e 60 anni; **c)** anziani di età compresa fra i 61 e 93 anni e **d)** centenari (età > 98 anni).

Come mostrato in Fig. 13 A su un campione di 82 individui, la massima concentrazione di IgG sialilate la si osserva solo nella popolazione giovane, mentre in tutte le restanti classi di età il grado di sialilazione delle IgG risulta più basso di circa il 50% (Fig. 13 A). La reattività all'ECL risulta anch'essa massima tra i giovani decrescendo gradualmente nelle restanti classi di età e raggiungendo i valori minimi tra i centenari (Fig. 13B). Al contrario la reattività delle IgG alla GSII mostra un andamento opposto rispetto a quanto osservato per la ECL, infatti si ha una minima reattività tra i giovani che aumenta gradualmente nelle altre classi di età per raggiungere i massimi valori nei centenari (Fig. 13C). Lo stato di fucosilazione e la presenza della *bisecting* GlcNAc sono state valutate su un campione più ristretto, di 55 individui di diversa età e sesso e i dati ottenuti, mostrati nelle Fig. 13 D ed E. La presenza di IgG fucosilate è massima nei giovani e minima in tutte le altre classi di età (Fig. 13D), mentre la reattività alla PHA-E non sembra essere influenzata dall'età, sebbene si osservi una tendenza, non statisticamente significativa, a decrescere con l'aumentare dell'età (Fig. 13E).

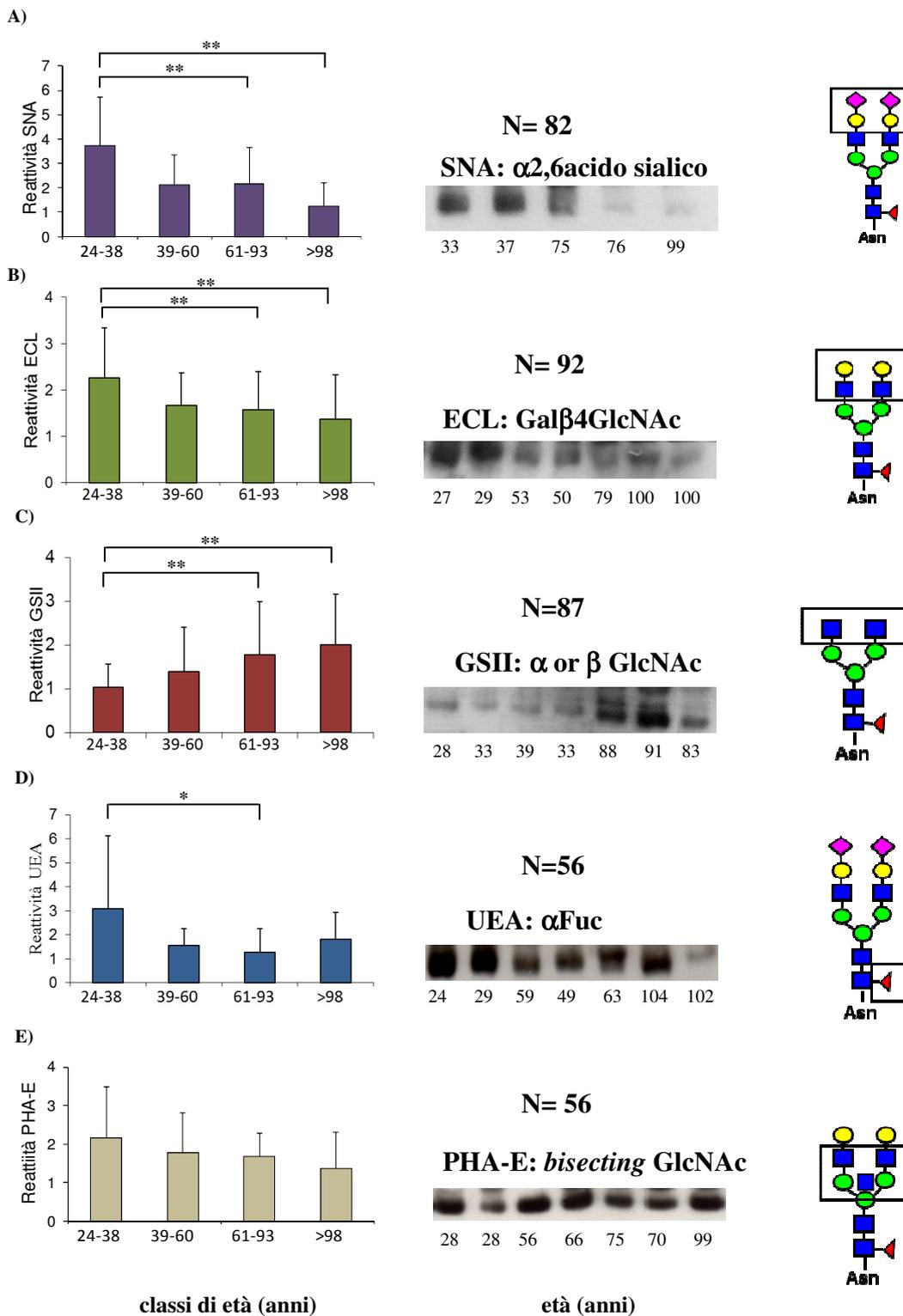


Fig.13 : Studio del grado di glicosilazione della catena pesante delle IgG mediante l'uso di lectine. Da sn., per ogni lectina vengono riportati: l'istogramma rappresentante la reattività della catena pesante delle IgG alla lectina in ciascuna classe di età, un lectin blot rappresentativo dove viene indicato con N il numero dei plasmi analizzati e, infine lo schema della struttura glicanica riconosciuta dalla lectina utilizzata. Vengono riportati i valori relativi al grado di sialilazione con SNA (A), galattosilazione con ECL (B), agalattosilazione con GSII (C), fucosilazione con UEA (D) e presenza della *bisecting* GlcNAc nella porzione Fc delle IgG con PHA-E (E).(*p<0.05;**p<0.01)
(Legenda: ■N-acetilglucosammina; ●Mannosio; ●Galattosio; ◄Fucosio; ◆Acido sialico).

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le glicoproteine sono proteine a cui sono state aggiunte una o più catene glucidiche mediante il processo di glicosilazione. Il ruolo degli zuccheri è fondamentale nella fine regolazione delle diverse funzioni biologiche delle glicoproteine. Un esempio molto chiaro di quanto detto è fornito dalle IgG, in cui la presenza di catene di zuccheri assume un significato funzionale rilevante nella regolazione delle funzioni effettrici della molecola anticorpale. In particolare, il principale sito di N-glicosilazione delle IgG è nella porzione Fc sul residuo altamente conservato Asn297 e presenta una grande microeterogeneità. La catena N-linked, situata in corrispondenza dell' interfaccia CH2-CH3, è di tipo bi-antennario e può terminare con 1 o 2 residui di: a) acido sialico; b) galattosio o c) GlcNAc. La struttura può contenere inoltre il *core fucose*, ovvero un residuo di fucosio legato alla GlcNAc direttamente legata al residuo di Asn oppure può contenere la *bisecting GlcNAc*, ossia un residuo di GlcNAc legato al Man centrale con legame β 1,4. Le diverse strutture glucidiche che possiamo ritrovare associate alla porzione Fc delle IgG hanno un significato funzionale molto importante che si ripercuote sulla capacità di indurre una risposta di tipo pro- o anti- infiammatoria. La glicosilazione dell'Asn297 regola in particolare la capacità delle IgG di: 1) attivare il complemento; 2) legare i recettori Fc γ e 3) interagire con cellule APC. In particolare, la galattosilazione delle IgG, gioca un ruolo fondamentale sia nell'attivazione del complemento sia nel legame alle cellule APC. Infatti la perdita del Gal in posizione terminale su una o entrambe le antenne garantisce l'interazione con la MBL (proteina legante il mannosio) con una forza almeno 5 volte superiore rispetto alle IgG normo-glicosilate e induce la cascata del

complemento attraverso la via lectinica (Malhotra et al. 1995). L'esposizione della GlcNAc terminale, in seguito a perdita del Gal, conferisce alle IgG un'attività pro-infiammatoria sia mediata dai recettori leganti il Man (analoghi della MBL) posti su macrofagi e cellule dendritiche (Dong et al. 1999), sia mediante il legame a cellule dendritiche attraverso DC-SIGN (Yabe et al. 2010). Infine il grado di galattosilazione influisce anche sulla capacità delle IgG di formare aggregati, infatti le IgG-G0 tendono molto più agevolmente ad aggregarsi tra loro. Sebbene molto dibattuta, la sialilazione della porzione Fc sembra conferire alle IgG un'attività di tipo anti-infiammatorio, che vede coinvolti il recettore DC-SIGN sulle cellule dendritiche, i basofili ed i recettori Fc γ RIIa dei macrofagi (Kaneko et al. 2006). Anche il legame diretto IgG-recettori Fc γ è influenzato dalla glicosilazione ed in particolare dal grado di galattosilazione e di fucosilazione: la perdita del Gal, induce cambi conformazionali della struttura della molecola facilitandone il legame a forme attivatorie di Fc γ Rs (Krapp et al. 2003), mentre la perdita di fucosio promuove la ADCC (citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente), favorendo l'interazione con Fc γ RIIIa (Shields et al. 2002) e, in entrambi i casi, il risultato finale è la promozione del processo infiammatorio.

Il ruolo biologico delle glicosiltransferasi plasmatiche è stato lungamente dibattuto, in particolare non sembrava possibile un loro coinvolgimento nel processo di glicosilazione in quanto si riteneva che solo all'interno della cellula e nello specifico nel RER o nel Golgi la concentrazione di nucleotidi zuccheri fosse sufficiente per far avvenire le reazioni di biosintesi. Tuttavia, studi recenti, condotti indipendentemente da due gruppi di ricerca, indicano chiaramente le piastrine come ottimi donatori di nucleotidi zuccheri unitamente alla possibilità di un meccanismo di glicosilazione ecto-cellulare in presenza di piastrine attivate che riversino in circolo il contenuto dei loro granuli (Wandall et al. 2014; Lee et

al. 2014). In particolare gli studi condotti da Lee et al. hanno preso in considerazione la sialilazione di proteine circolanti mediata dalla ST6Gal1 plasmatica.

Topi knock out per il promotore epatico della ST6Gal1, mostrano una normale espressione della ST6Gal1 in tutti i tessuti, inclusi i linfociti, ma non nel fegato e nel sangue dove invece è fortemente ridotta. In questi topi, non si osserva l'aumento della sialilazione delle IgG associato all'infiammazione cronica e ciò suggerisce che la ST6Gal1 plasmatica, che è principalmente di origine epatica, giochi un ruolo principale nella α 2,6-sialilazione extracellulare delle IgGs (Appenheimer et al. 2003). Alla luce degli ultimi dati riportati in letteratura sulla possibilità di una forma di glicosilazione ecto-cellulare delle proteine plasmatiche, in questo lavoro è stato valutato se vi fosse una relazione tra i livelli di attività di glicosiltransferasi plasmatiche e le strutture da esse potenzialmente sintetizzate sulle IgG. Sono state, pertanto valutate le attività degli enzimi plasmatici ST6Gal1 e β 4GalT per valutare un loro coinvolgimento nell'alterata glicosilazione delle IgG nell'invecchiamento. Dal nostro studio emerge che l'attività di entrambi gli enzimi correla, sebbene in modo differente, con l'età anagrafica. Infatti mentre l'attività β 4GalT correla in modo lineare con l'età, dai bambini fino agli ultracentenari, la ST6GalT resta costante in tutte le fasce d'età ad eccezione dei bambini e di soggetti con più di 80 anni in cui l'attività sialiltransferasica è massima. Entrambi gli enzimi non hanno mostrato una relazione positiva con le strutture glucidiche potenzialmente frutto della loro attività transferasica, infatti con l'età, il grado di galattosilazione e di sialilazione delle IgG diminuisce drasticamente al contrario di quanto osservato per le attività delle glicosiltransferasi ST6GalT e β 4GalT . ciò non depone a favore di un ruolo rilevante della ecto-glicosilazione nel determinare lo stato di glicosilazione delle

IgG umane. Inoltre, tra le attività dei due enzimi non è stata trovata alcun tipo di correlazione, indicando quindi che il meccanismo alla base del loro rilascio nel plasma sia diverso così come il loro significato biologico. Un dato interessante è quello relativo alla presenza dei due enzimi nel plasma la cui presenza risulta correlata a processi infiammatori. Condizioni infiammatorie sono associate sia a diminuzione dei livelli plasmatici della β 4GalT (Alavi et al. 2004) che all'aumento dei livelli di ST6Gal1 (Kaplan et al. 1983). In particolare la ST6GalT è una proteina di fase acuta la cui espressione è sotto il controllo del promotore epatico P1, regolato a sua volta dai glucocorticoidi (Wang et al. 1990) e dall'IL-6 (Dalziel et al. 1999). Studi su topi knock-out per il gene della ST6Gal1 hanno messo in evidenza un'aumentata presenza di neutrofili in risposta a stimoli infiammatori (Appenheimer et al. 2003). La forma epatica di ST6Gal1 gioca, infatti, un ruolo fondamentale nella sialilazione delle cellule staminali emopoietiche, riducendo di fatto la presenza di neutrofili in circolo in seguito a stimoli infiammatori, abbassando di conseguenza il grado di infiammazione (Jones et al. 2010; Nasirikenari et al. 2006; Nasirikenari et al. 2014). In accordo con quanto detto, la ST6Gal1 epatica/plasmatica sarebbe associata ad un ruolo anti-infiammatorio in quanto capace di contenere il processo infiammatorio. Traslando sull'uomo i risultati ottenuti sul topo knock-out possiamo dunque ipotizzare che la presenza della ST6Gal1 nell'anziano potrebbe contenere e contrastare gli effetti negativi dell'*Inflammaging*. Tale visione è in accordo con quanto osservato nei figli di centenari dove osserviamo un incremento dei valori di ST6Gal1 rispetto ai controlli.

L'analisi lectinica del grado di glicosilazione delle IgG indica che nell'invecchiamento si assiste ad una maggiore presenza di isoforme iposialilate, agalattosilate, prive del *core fucose* e terminanti con la GlcNAc e tali dati

risultano in accordo con la letteratura (Parekh et al. 1988; Vanhooren et al. 2007; Vanhooren et al. 2008; Vanhooren et al. 2010; Ruhaak et al. 2011). Lo studio del grado di glicosilazione effettuato mediante l'uso di lectine mostra, rispetto ad altre tecnologie, diversi vantaggi: a) ci permette di valutare in maniera univoca cambi nella glicosilazione associati solo alla catena pesante delle IgG, riducendo pertanto la variabilità associata alle catene N-linked di altre glicoproteine plasmatiche più abbondanti che non mostrano variazioni significative dipendenti dall'età. In questo lavoro, mediante l'analisi in lectin blot con SNA, su plasma intero, è stato infatti dimostrato come il grado di sialilazione della sola catena pesante delle IgG sia dipendente dall'età; b) lo studio con le lectine fornisce una risposta univoca riguardo la presenza/assenza di una determinata struttura glucidica, facilitando pertanto l'identificazione di modelli associati all'invecchiamento. È grazie a questo tipo di approccio che abbiamo trovato strutture glicaniche associate all'età come la riduzione del *core fucose* in soggetti di età superiore ai 40 anni.

Il meccanismo alla base della presenza di IgG-G0 nell'anziano non è stata chiarita e probabilmente è multifattoriale. Studi sui linfociti B di pazienti affetti da Artrite reumatoide giungono a conclusioni contrastanti. Alcuni lavori indicano una diminuzione dell'attività $\beta 1,4\text{GalT}$ (Axford et al. 1987; Axford et al. 1992) che non viene però confermata da altri (Furukawa et al. 1990; Keusch et al. 1998).

In conclusione, i dati da noi ottenuti hanno permesso di identificare con chiarezza un nuovo marcatore di invecchiamento: la forma plasmatica dell'enzima $\beta 1,4\text{GalT}$. Tuttavia non esistendo una correlazione con un noto marcatore di invecchiamento, il GlycoAge test, possiamo concludere che i due marcatori siano espressione di diverse condizioni fisio-patologiche che caratterizzano l'invecchiamento.

La relazione tra l'enzima ST6Gal1 e l'età risulta essere più complessa e articolata, suggerendo un possibile ruolo protettivo nel limitare gli effetti dell'*Inflammaging*.

Nell'anziano si assiste, come detto in precedenza, alla predominanza di IgG iposialilate, agalattosilate e prive del *core fucose* che potrebbero essere causa e/o effetto della persistenza di un processo infiammatorio cronico di basso grado tipico dell'invecchiamento.

Nel nostro studio le glicosiltransferasi plasmatiche non sono responsabili nel determinare la glicosilazione delle IgG, pertanto sono necessari ulteriori studi al fine di indagare la biogenesi di glicofornie di IgG correlate all'età.

6. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Aalberse, R.C. et al., 2009. Immunoglobulin G4: an odd antibody. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 39(4), pp.469–77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19222496> [Accessed December 30, 2014].
- Adler, Y. et al., Impaired binding capacity of asialyl and agalactosyl IgG to Fc gamma receptors. *Clinical and experimental rheumatology*, 13(3), pp.315–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7554557> [Accessed January 9, 2015].
- Aebi, M., 2013. N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833(11), pp.2430–2437. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.04.001>.
- Alavi, A., Axford, J.S. & Pool, A.J., 2004. Serum galactosyltransferase isoform changes in rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*, 31(8), pp.1513–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15290729> [Accessed January 31, 2015].
- Almeida, R. et al., 1997. A family of human beta4-galactosyltransferases. Cloning and expression of two novel UDP-galactose:beta-n-acetylglucosamine beta1, 4-galactosyltransferases, beta4Gal-T2 and beta4Gal-T3. *The Journal of biological chemistry*, 272(51), pp.31979–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9405390> [Accessed January 30, 2015].
- Almeida, R. et al., 1999. Cloning and Expression of a Proteoglycan UDP-Galactose: -Xylose 1,4-Galactosyltransferase I: A SEVENTH MEMBER OF THE HUMAN 4-GALACTOSYLTRANSFERASE GENE FAMILY. *Journal of Biological Chemistry*, 274(37), pp.26165–26171. Available at: <http://www.jbc.org/content/274/37/26165.short> [Accessed January 30, 2015].
- Amado, M., 1999. Identification and characterization of large galactosyltransferase gene families: galactosyltransferases for all functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1473(1), pp.35–53. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416599001683> [Accessed January 30, 2015].
- Anthony, R.M. et al., 2008. Recapitulation of IVIG anti-inflammatory activity with a recombinant IgG Fc. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5874), pp.373–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2409116&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 21, 2014].
- Appenheimer, M.M. et al., 2003. Biologic contribution of P1 promoter-mediated expression of ST6Gal I sialyltransferase. *Glycobiology*, 13(8), pp.591–600. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12672700> [Accessed January 30, 2015].
- Asano, M. et al., 1997. Growth retardation and early death of beta-1,4-galactosyltransferase knockout mice with augmented proliferation and abnormal

differentiation of epithelial cells. *The EMBO journal*, 16(8), pp.1850–7. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1169788&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].

Axford, J.S. et al., 1992. Changes in normal glycosylation mechanisms in autoimmune rheumatic disease. *Journal of Clinical Investigation*, 89(March), pp.1021–1031.

Axford, J.S. et al., 1987. Reduced B-cell galactosyltransferase activity in rheumatoid arthritis. *Lancet*, 2(8574), pp.1486–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2892049> [Accessed January 31, 2015].

Barrow, A.D. & Trowsdale, J., 2006. You say ITAM and I say ITIM, let's call the whole thing off: The ambiguity of immunoreceptor signalling. *European Journal of Immunology*, 36, pp.1646–1653.

Bennett, B.D. et al., 2000. A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's beta -secretase. *The Journal of biological chemistry*, 275(48), pp.37712–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10956649> [Accessed January 30, 2015].

Bennett, E.P. et al., 2012. Control of mucin-type O-glycosylation: a classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Glycobiology*, 22(6), pp.736–56. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3409716&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 16, 2015].

Berger, E.G., Thurnher, M. & Müller, U., 1987. Galactosyltransferase and sialyltransferase are located in different subcellular compartments in HeLa cells. *Experimental cell research*, 173(1), pp.267–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3119357> [Accessed January 30, 2015].

Böhm, S. et al., 2012. The role of sialic acid as a modulator of the anti-inflammatory activity of IgG. *Seminars in Immunopathology*, 34, pp.443–453.

Bondt, A. et al., 2013. Association between galactosylation of immunoglobulin G and improvement of rheumatoid arthritis during pregnancy is independent of sialylation. *Journal of proteome research*, 12(10), pp.4522–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24016253> [Accessed January 30, 2015].

Breitling, J. & Aebi, M., 2013. N-linked protein glycosylation in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(8), p.a013359. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23751184> [Accessed December 30, 2014].

Brouwers, H.A. et al., 1988. Maternal antibodies against fetal blood group antigens A or B: lytic activity of IgG subclasses in monocyte-driven cytotoxicity and correlation with ABO haemolytic disease of the newborn. *British journal of haematology*, 70(4), pp.465–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3219297> [Accessed January 30, 2015].

- Callewaert, N. et al., 2001. Ultrasensitive profiling and sequencing of N-linked oligosaccharides using standard DNA-sequencing equipment. *Glycobiology*, 11(4), pp.275–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11358876> [Accessed January 31, 2015].
- Campbell, I.K. et al., 2014. Therapeutic effect of IVIG on inflammatory arthritis in mice is dependent on the Fc portion and independent of sialylation or basophils. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 192(11), pp.5031–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4025610&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 31, 2015].
- Cantagrel, V. & Lefeber, D.J., 2011. From glycosylation disorders to dolichol biosynthesis defects: a new class of metabolic diseases. *Journal of inherited metabolic disease*, 34(4), pp.859–67. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3137772&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].
- Chen, G. et al., 2012. Human IgG Fc-glycosylation profiling reveals associations with age, sex, female sex hormones and thyroid cancer. *Journal of proteomics*, 75(10), pp.2824–34. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391912000802> [Accessed January 9, 2015].
- Chiricolo, M. et al., 2006. Phenotypic changes induced by expression of beta-galactoside alpha2,6 sialyltransferase I in the human colon cancer cell line SW948. *Glycobiology*, 16(2), pp.146–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16192407> [Accessed January 30, 2015].
- Colley, K.J. et al., 1989. Conversion of a Golgi apparatus sialyltransferase to a secretory protein by replacement of the NH₂-terminal signal anchor with a signal peptide. *The Journal of biological chemistry*, 264(30), pp.17619–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2808334> [Accessed January 30, 2015].
- Dall’Olio, F. et al., 1989. Increased CMP-NeuAc:Gal beta 1,4GlcNAc-R alpha 2,6 sialyltransferase activity in human colorectal cancer tissues. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 44(3), pp.434–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2476402> [Accessed January 30, 2015].
- Dall’Olio, F. et al., 2013. N-glycomic biomarkers of biological aging and longevity: A link with inflammaging. *Ageing Research Reviews*, 12(2), pp.685–698. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2012.02.002>.
- Dall’Olio, F. et al., 2014. Sialosignaling: sialyltransferases as engines of self-fueling loops in cancer progression. *Biochimica et biophysica acta*, 1840(9), pp.2752–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24949982> [Accessed January 30, 2015].
- Dall’Olio, F., 2000. The sialyl-alpha2,6-lactosaminyl-structure: biosynthesis and functional role. *Glycoconjugate journal*, 17(10), pp.669–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11425186> [Accessed January 30, 2015].

- Dall'Olio, F. & Chiricolo, M., Sialyltransferases in cancer. *Glycoconjugate journal*, 18(11-12), pp.841–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12820717> [Accessed January 30, 2015].
- Dalziel, M. et al., 1999. Hepatic acute phase induction of murine beta-galactoside alpha 2,6 sialyltransferase (ST6Gal I) is IL-6 dependent and mediated by elevation of exon H-containing class of transcripts. *Glycobiology*, 9(10), pp.1003–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10521536> [Accessed January 31, 2015].
- Dalziel, M. et al., 2004. Ras oncogene induces beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase (ST6Gal I) via a RalGEF-mediated signal to its housekeeping promoter. *European journal of biochemistry / FEBS*, 271(18), pp.3623–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15355339> [Accessed January 30, 2015].
- Datta, A.K., Sinha, A. & Paulson, J.C., 1998. Mutation of the sialyltransferase S-sialylmotif alters the kinetics of the donor and acceptor substrates. *The Journal of biological chemistry*, 273(16), pp.9608–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9545292> [Accessed January 30, 2015].
- Delves, P.J. et al., 1990. Polymorphism and expression of the galactosyltransferase-associated protein kinase gene in normal individuals and galactosylation-defective rheumatoid arthritis patients. *Arthritis and rheumatism*, 33(11), pp.1655–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2122902> [Accessed January 30, 2015].
- Dong, X., Storkus, W.J. & Salter, R.D., 1999. Binding and uptake of agalactosyl IgG by mannose receptor on macrophages and dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163, pp.5427–5434.
- Dwyer, J.M., 1992. Manipulating the immune system with immune globulin. *The New England journal of medicine*, 326(2), pp.107–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1727218> [Accessed January 30, 2015].
- Ferrante, A., Beard, L.J. & Feldman, R.G., 1990. IgG subclass distribution of antibodies to bacterial and viral antigens. *The Pediatric infectious disease journal*, 9(8 Suppl), pp.S16–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2216603> [Accessed January 30, 2015].
- Furukawa, K. et al., 1990. Kinetic study of a galactosyltransferase in the B cells of patients with rheumatoid arthritis. *International Immunology*, 2(1), pp.105–112. Available at: <http://intimm.oxfordjournals.org/content/2/1/105.short> [Accessed January 30, 2015].
- Garred, P., 2003. Mannose-binding lectin deficiency—revisited. *Molecular Immunology*, 40(2-4), pp.73–84. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589003001044> [Accessed January 6, 2015].
- Gelfand, E.W., 2006. Differences between IGIV products: impact on clinical outcome. *International immunopharmacology*, 6(4), pp.592–9. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576905003140> [Accessed January 30, 2015].

- Grundmann, U. et al., 1990. Complete cDNA sequence encoding human beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase. *Nucleic acids research*, 18(3), p.667. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=333489&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].
- Guo, S. et al., 2001. Galactosylation of N-linked oligosaccharides by human beta-1,4-galactosyltransferases I, II, III, IV, V, and VI expressed in Sf-9 cells. *Glycobiology*, 11(10), pp.813–820.
- Hammarström, L. & Smith, C.I., 1983. IgG2 deficiency in a healthy blood donor. Concomitant lack of IgG2, IgA and IgE immunoglobulins and specific anti-carbohydrate antibodies. *Clinical and experimental immunology*, 51(3), pp.600–4. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1536779&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].
- Hansen, L. et al., 2015. A glycogene mutation map for discovery of diseases of glycosylation. *Glycobiology*, 25(2), pp.211–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25267602> [Accessed January 22, 2015].
- Harduin-Lepers, a. et al., 2001. The human sialyltransferase family. *Biochimie*, 83, pp.727–737.
- Huhn, C. et al., 2009. IgG glycosylation analysis. *Proteomics*, 9, pp.882–913.
- Hussain, I. et al., 1999. Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Molecular and cellular neurosciences*, 14(6), pp.419–27. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10656250> [Accessed January 30, 2015].
- Iida, S. et al., 2006. Nonfucosylated therapeutic IgG1 antibody can evade the inhibitory effect of serum immunoglobulin G on antibody-dependent cellular cytotoxicity through its high binding to FcγRIIIa. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12(9), pp.2879–87. Available at: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/12/9/2879.short> [Accessed January 30, 2015].
- Jefferis, R., 2009. Recombinant antibody therapeutics: the impact of glycosylation on mechanisms of action. *Trends in pharmacological sciences*, 30(7), pp.356–62. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165614709000911> [Accessed December 7, 2014].
- Jefferis, R. & Kumararatne, D.S., 1990. Selective IgG subclass deficiency: quantification and clinical relevance. *Clinical and experimental immunology*, 81(3), pp.357–67. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1534990&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].
- Jones, M.B. et al., 2010. Role for hepatic and circulatory ST6Gal-1 sialyltransferase in regulating myelopoiesis. *The Journal of biological chemistry*, 285(32), pp.25009–17. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2915736&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 31, 2015].

- Kaneko, Y., Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V, 2006. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science (New York, N.Y.)*, 313(2006), pp.670–673.
- Kaplan, H.A. et al., 1983. Studies on the effect of inflammation on rat liver and serum sialyltransferase. Evidence that inflammation causes release of Gal beta 1 leads to 4GlcNAc alpha 2 leads to 6 sialyltransferase from liver. *The Journal of biological chemistry*, 258(19), pp.11505–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6413502> [Accessed January 30, 2015].
- Keusch, J. et al., 1998. B lymphocyte galactosyltransferase protein levels in normal individuals and in patients with rheumatoid arthritis. *Glycoconjugate journal*, 15(11), pp.1093–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10386894> [Accessed January 31, 2015].
- Kitazume, S. et al., 2001. Alzheimer's beta-secretase, beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme, is responsible for cleavage secretion of a Golgi-resident sialyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(24), pp.13554–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=61079&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].
- Kitazume, S. et al., 2003. Characterization of alpha 2,6-sialyltransferase cleavage by Alzheimer's beta -secretase (BACE1). *The Journal of biological chemistry*, 278(17), pp.14865–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12473667> [Accessed January 30, 2015].
- Kitazume, S. et al., 2005. In vivo cleavage of alpha2,6-sialyltransferase by Alzheimer beta-secretase. *The Journal of biological chemistry*, 280(9), pp.8589–95. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15364953> [Accessed January 30, 2015].
- Kitazume, S. et al., 2009. Molecular insights into beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase secretion in vivo. *Glycobiology*, 19(5), pp.479–487.
- Kornfeld, R. & Kornfeld, S., 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annual review of biochemistry*, 54, pp.631–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3896128> [Accessed December 12, 2014].
- Krapp, S. et al., 2003. Structural Analysis of Human IgG-Fc Glycoforms Reveals a Correlation Between Glycosylation and Structural Integrity. *Journal of Molecular Biology*, 325(5), pp.979–989. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283602012500> [Accessed November 21, 2014].
- Kuijpers, T.W., Weening, R.S. & Out, T.A., 1992. IgG subclass deficiencies and recurrent pyogenic infections, unresponsiveness against bacterial polysaccharide antigens. *Allergologia et immunopathologia*, 20(1), pp.28–34. Available at: <http://europepmc.org/abstract/med/1509985> [Accessed January 30, 2015].
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp.680–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063> [Accessed July 9, 2014].

- Leader, K.A. et al., 1996. Agalactosyl IgG in aggregates from the rheumatoid joint. *British journal of rheumatology*, 35(4), pp.335–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8624636> [Accessed January 30, 2015].
- Lee, M. et al., 2008. Protein sialylation by sialyltransferase involves radiation resistance. *Molecular cancer research: MCR*, 6(8), pp.1316–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18708363> [Accessed December 30, 2014].
- Lee, M.M. et al., 2014. Platelets support extracellular sialylation by supplying the sugar donor substrate. *Journal of Biological Chemistry*, 289(13), pp.8742–8748.
- Lennartz, M.R. et al., 1987. Isolation and characterization of a mannose-specific endocytosis receptor from human placenta. *The Journal of biological chemistry*, 262(21), pp.9942–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3611070> [Accessed January 30, 2015].
- Leontyev, D. et al., 2012. Sialylation-independent mechanism involved in the amelioration of murine immune thrombocytopenia using intravenous gammaglobulin. *Transfusion*, 52(8), pp.1799–805. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22257295> [Accessed January 27, 2015].
- Liu, J. & Mushegian, A., 2003. Three monophyletic superfamilies account for the majority of the known glycosyltransferases. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 12(7), pp.1418–31. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2323934&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].
- Lodish, H.F., 1991. Recognition of complex oligosaccharides by the multi-subunit asialoglycoprotein receptor. *Trends in biochemical sciences*, 16(10), pp.374–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1785139> [Accessed January 30, 2015].
- Lu, Q., Hasty, P. & Shur, B.D., 1997. Targeted mutation in beta1,4-galactosyltransferase leads to pituitary insufficiency and neonatal lethality. *Developmental biology*, 181(2), pp.257–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9013935> [Accessed January 30, 2015].
- Malhotra, R. et al., 1995. Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. *Nature Medicine*, 1(3), pp.237–243. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nm0395-237> [Accessed January 30, 2015].
- Mawas, F. et al., 1997. Immunoglobulin G subclasses of anti-human platelet antigen 1a in maternal sera: relation to the severity of neonatal alloimmune thrombocytopenia. *European journal of haematology*, 59(5), pp.287–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9414639> [Accessed January 30, 2015].
- McGuire, E.J. et al., 1989. A human milk galactosyltransferase is specific for secreted, but not plasma, IgA. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 143(9), pp.2933–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2509560> [Accessed January 22, 2015].

- Menni, C. et al., 2013. Glycosylation of immunoglobulin g: role of genetic and epigenetic influences. *PloS one*, 8(12), p.e82558. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3855797&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].
- Mimura, Y. et al., 2000. The influence of glycosylation on the thermal stability and effector function expression of human IgG1-Fc: properties of a series of truncated glycoforms. *Molecular Immunology*, 37(12-13), pp.697–706. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016158900000105X> [Accessed January 30, 2015].
- Mitchell, D.A., Fadden, A.J. & Drickamer, K., 2001. A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands. *The Journal of biological chemistry*, 276(31), pp.28939–45. Available at: <http://www.jbc.org/content/276/31/28939.short> [Accessed January 30, 2015].
- Miyoshi, E. et al., 1999. The alpha1-6-fucosyltransferase gene and its biological significance. *Biochimica et biophysica acta*, 1473(1), pp.9–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10580126> [Accessed January 30, 2015].
- Morgan, A. et al., 1995. The N-terminal end of the CH2 domain of chimeric human IgG1 anti-HLA-DR is necessary for C1q, Fc gamma RI and Fc gamma RIII binding. *Immunology*, 86(2), pp.319–24. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1384012&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].
- Mori, M. et al., 1994. The LEC rat: a model for human hepatitis, liver cancer, and much more. *The American journal of pathology*, 144(1), pp.200–4. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1887108&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].
- Nagelkerke, S.Q. et al., 2014. Inhibition of FcγR-mediated phagocytosis by IVIg is independent of IgG-Fc sialylation and FcγRIIb in human macrophages. *Blood*, 124(25), pp.3709–18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25352126> [Accessed January 30, 2015].
- Nasirikenari, M. et al., 2006. Altered granulopoietic profile and exaggerated acute neutrophilic inflammation in mice with targeted deficiency in the sialyltransferase ST6Gal I. *Blood*, 108(10), pp.3397–405. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1895428&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 31, 2015].
- Nasirikenari, M. et al., 2014. Remodeling of marrow hematopoietic stem and progenitor cells by non-self ST6Gal-1 sialyltransferase. *The Journal of biological chemistry*, 289(10), pp.7178–89. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24425878> [Accessed January 31, 2015].
- Nimmerjahn, F., Anthony, R.M. & Ravetch, J. V., 2007. Agalactosylated IgG antibodies depend on cellular Fc receptors for in vivo activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(20), pp.8433–8437.

- Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V, 2008. Anti-inflammatory actions of intravenous immunoglobulin. *Annual review of immunology*, 26, pp.513–33. Available at: http://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090232?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed [Accessed January 19, 2015].
- Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V, 2006. Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity*, 24(1), pp.19–28. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16413920> [Accessed January 30, 2015].
- Nomura, K.H. et al., 1998. Involvement of blood-group-B-active trisaccharides in Ca²⁺-dependent cell-cell adhesion in the *Xenopus* blastula. *Development genes and evolution*, 208(1), pp.9–18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9518520> [Accessed January 30, 2015].
- Nomura, T. et al., 1998. Purification, cDNA cloning, and expression of UDP-Gal: glucosylceramide beta-1,4-galactosyltransferase from rat brain. *The Journal of biological chemistry*, 273(22), pp.13570–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9593693> [Accessed January 30, 2015].
- Parekh, R. et al., 1988. Age-related galactosylation of the N-linked oligosaccharides of human serum IgG. *The Journal of experimental medicine*, 167(5), pp.1731–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2188930&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 9, 2015].
- Parekh, R.B. et al., Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature*, 316(6027), pp.452–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3927174> [Accessed January 9, 2015].
- Pekelharing, J.M. et al., 1988. Alterations in carbohydrate composition of serum IgG from patients with rheumatoid arthritis and from pregnant women. *Annals of the rheumatic diseases*, 47(2), pp.91–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1003459&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].
- Perillo, N.L. et al., 1995. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature*, 378(6558), pp.736–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7501023> [Accessed January 30, 2015].
- Pollock, J.M. & Bowman, J.M., 1990. Anti-Rh(D) IgG subclasses and severity of Rh hemolytic disease of the newborn. *Vox sanguinis*, 59(3), pp.176–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2124753> [Accessed January 30, 2015].
- Potter, M., 1983. Structural correlates of immunoglobulin diversity. *Survey of immunologic research*, 2(1), pp.27–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6417753> [Accessed January 30, 2015].
- Pricop, L. et al., 2001. Differential modulation of stimulatory and inhibitory Fc gamma receptors on human monocytes by Th1 and Th2 cytokines. *Journal of immunology*

- (Baltimore, Md. : 1950), 166(1), pp.531–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11123333> [Accessed January 30, 2015].
- Ravetch, J. V., 2000. Immune Inhibitory Receptors. *Science*, 290(5489), pp.84–89. Available at: <http://www.sciencemag.org/content/290/5489/84.short> [Accessed December 3, 2014].
- Rook, G.A. et al., 1991. Changes in IgG glycoform levels are associated with remission of arthritis during pregnancy. *Journal of autoimmunity*, 4(5), pp.779–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1797027> [Accessed January 30, 2015].
- Ruhaak, L.R. et al., 2011. Plasma protein N-glycan profiles are associated with calendar age, familial longevity and health. *Journal of proteome research*, 10(4), pp.1667–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21184610> [Accessed January 31, 2015].
- Russo, R.N., Shaper, N.L. & Shaper, J.H., 1990. Bovine beta 1----4-galactosyltransferase: two sets of mRNA transcripts encode two forms of the protein with different amino-terminal domains. In vitro translation experiments demonstrate that both the short and the long forms of the enzyme are type II mem. *J. Biol. Chem.*, 265(6), pp.3324–3331. Available at: <http://www.jbc.org/content/265/6/3324.short> [Accessed January 30, 2015].
- Sarma, J.V. & Ward, P. a, 2012. The Compliment System. *NIH Public Access author manuscript*, 343(1), pp.227–235.
- Schenk, B., Fernandez, F. & Waechter, C.J., 2001. The ins(ide) and out(side) of dolichyl phosphate biosynthesis and recycling in the endoplasmic reticulum. *Glycobiology*, 11(5), p.61R–70R. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11425794> [Accessed January 30, 2015].
- Schur, P.H., 1988. IgG subclasses. A historical perspective. *Monographs in allergy*, 23, pp.1–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3290655> [Accessed January 30, 2015].
- Schwab, I. & Nimmerjahn, F., 2013. Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system? *Nature Reviews Immunology*, 13(3), pp.176–189. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3401> [Accessed January 30, 2015].
- Schwientek, T. et al., 1998. Cloning of a novel member of the UDP-galactose:beta-N-acetylglucosamine beta1,4-galactosyltransferase family, beta4Gal-T4, involved in glycosphingolipid biosynthesis. *The Journal of biological chemistry*, 273(45), pp.29331–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9792633> [Accessed January 30, 2015].
- Selman, M.H.J. et al., 2012. Changes in Antigen-specific IgG1 Fc N-glycosylation Upon Influenza and Tetanus Vaccination. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11, pp.M111.014563–M111.014563.
- Semel, A.C. et al., 2002. Hyposialylation of integrins stimulates the activity of myeloid fibronectin receptors. *The Journal of biological chemistry*, 277(36), pp.32830–6.

Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12091385> [Accessed January 30, 2015].

- Shaper, N.L. et al., 1986. The human galactosyltransferase gene is on chromosome 9 at band p13. *Somatic cell and molecular genetics*, 12(6), pp.633–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3097837> [Accessed January 30, 2015].
- Shields, R.L. et al., 2002. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fcγ₃ RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *The Journal of biological chemistry*, 277(30), pp.26733–40. Available at: <http://www.jbc.org/content/277/30/26733.short> [Accessed January 9, 2015].
- Söderström, T. et al., 1985. Immunoglobulin subclass (IgG3) restriction of anti-P and anti-Pk antibodies in patients of the rare p blood group. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 134(1), pp.1–3. Available at: <http://www.jimmunol.org/content/134/1/1.abstract> [Accessed January 30, 2015].
- Soilleux, E.J. et al., 2002. Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro. *Journal of leukocyte biology*, 71(3), pp.445–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11867682> [Accessed January 30, 2015].
- Stanworth, S.J. et al., 1998. Absence of an association between mannose-binding lectin polymorphism and rheumatoid arthritis. *British journal of rheumatology*, 37, pp.186–188.
- Sun, P.D., 2003. Structure and function of natural-killer-cell receptors. *Immunologic research*, 27(2-3), pp.539–48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12857997> [Accessed January 17, 2015].
- Suzuki, K. et al., 1993. High copper and iron levels and expression of Mn-superoxide dismutase in mutant rats displaying hereditary hepatitis and hepatoma (LEC rats). *Carcinogenesis*, 14(9), pp.1881–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8403214> [Accessed January 30, 2015].
- Swindall, A.F. & Bellis, S.L., 2011. Sialylation of the Fas death receptor by ST6Gal-I provides protection against Fas-mediated apoptosis in colon carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry*, 286(26), pp.22982–90. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3123066&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].
- Tei, K. et al., 2002. Roles of cell adhesion molecules in tumor angiogenesis induced by cotransplantation of cancer and endothelial cells to nude rats. *Cancer research*, 62(21), pp.6289–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12414659> [Accessed January 30, 2015].
- Troelsen, L.N. et al., 2007. Genetically determined high serum levels of mannose-binding lectin and agalactosyl IgG are associated with ischemic heart disease in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 56(1), pp.21–29.
- Ujita, M. et al., 1998. Synthesis of poly-N-acetyllactosamine in core 2 branched O-glycans. The requirement of novel beta-1,4-galactosyltransferase IV and beta-1,3-

- n-acetylglucosaminyltransferase. *The Journal of biological chemistry*, 273(52), pp.34843–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9857011> [Accessed January 30, 2015].
- Vanhooren, V. et al., 2008. N-glycan profiling in the study of human aging. *Biogerontology*, 9(5), pp.351–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18431686> [Accessed January 13, 2015].
- Vanhooren, V. et al., 2007. N-glycomic changes in serum proteins during human aging. *Rejuvenation research*, 10(4), pp.521–531a. Available at: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/rej.2007.0556> [Accessed January 31, 2015].
- Vanhooren, V. et al., 2010. Serum N-glycan profile shift during human ageing. *Experimental gerontology*, 45(10), pp.738–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20801208> [Accessed January 31, 2015].
- Varki, A., 1993. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, 3(2), pp.97–130. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8490246> [Accessed January 8, 2015].
- Vidarsson, G. et al., 2006. FcRn: an IgG receptor on phagocytes with a novel role in phagocytosis. *Blood*, 108(10), pp.3573–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16849638> [Accessed January 30, 2015].
- Vidarsson, G., Dekkers, G. & Rispen, T., 2014. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. , 5(October), pp.1–17.
- Wandall, H.H. et al., 2014. The origin and function of platelet glycosyltransferases The origin and function of platelet glycosyltransferases. , 120(3), pp.626–635.
- Wang, X.C., Smith, T.J. & Lau, J.T., 1990. Transcriptional regulation of the liver beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase by glucocorticoids. *The Journal of biological chemistry*, 265(29), pp.17849–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2211665> [Accessed January 31, 2015].
- Weinstein, J. et al., 1987. Primary structure of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase. Conversion of membrane-bound enzyme to soluble forms by cleavage of the NH₂-terminal signal anchor. *The Journal of biological chemistry*, 262(36), pp.17735–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3121604> [Accessed January 30, 2015].
- Wieser, R.J. & Oesch, F., 1992. Contact-Inhibition of Growth by Complex Carbohydrates. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 4(16), pp.160–167. Available at: <http://ci.nii.ac.jp/naid/130003454730/en/> [Accessed January 30, 2015].
- Wright, A. et al., 1991. Antibody variable region glycosylation: position effects on antigen binding and carbohydrate structure. *The EMBO journal*, 10(10), pp.2717–23. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=452979&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].

- Wuhrer, M. et al., 2009. Regulated glycosylation patterns of IgG during alloimmune responses against human platelet antigens. *Journal of proteome research*, 8(2), pp.450–6. Available at: <http://dx.doi.org/10.1021/pr800651j> [Accessed January 30, 2015].
- Xue, J., Zhu, L.P. & Wei, Q., 2013. IgG-Fc N-glycosylation at Asn297 and IgA O-glycosylation in the hinge region in health and disease. *Glycoconjugate Journal*, 30, pp.735–745.
- Yabe, R., Tateno, H. & Hirabayashi, J., 2010. Frontal affinity chromatography analysis of constructs of DC-SIGN, DC-SIGNR and LSECtin extend evidence for affinity to agalactosylated N-glycans. *The FEBS journal*, 277(19), pp.4010–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20840590> [Accessed January 30, 2015].
- Yamada, E. et al., 1997. Structural changes of immunoglobulin G oligosaccharides with age in healthy human serum. *Glycoconjugate journal*, 14(3), pp.401–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9147063> [Accessed January 30, 2015].
- Yamamoto, M. et al., 2012. Value of serum IgG4 in the diagnosis of IgG4-related disease and in differentiation from rheumatic diseases and other diseases. *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association*, 22(3), pp.419–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21953287> [Accessed January 30, 2015].
- Yan, R. et al., 1999. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature*, 402(6761), pp.533–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10591213> [Accessed January 30, 2015].
- Yu, X. et al., 2013. Dissecting the molecular mechanism of IVIg therapy: the interaction between serum IgG and DC-SIGN is independent of antibody glycoform or Fc domain. *Journal of molecular biology*, 425(8), pp.1253–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23416198> [Accessed January 30, 2015].

1. INTRODUZIONE

1.1 N-GLICOSILAZIONE

La glicosilazione enzimatica rappresenta uno dei principali meccanismi di modificazione co/post-traduzionale delle proteine e riveste un ruolo fondamentale per la struttura e/o funzione della proteina nascente (Aebi 2013; Dall'Olio et al. 2013). Basti ricordare che almeno l'1% del genoma umano codifica per proteine coinvolte nella biosintesi (glicosiltrasferasi), degradazione (glicosidasi) o riconoscimento di catene di zuccheri (Varki 1993) e che mutazioni di enzimi implicati nella biosintesi di catene glucidiche (glicosiltrasferasi) sono responsabili di gravi sindromi, spesso incompatibili con la vita e note, complessivamente, come "*Congenital Disorders of Glycosylation (CDGs)*" (Hansen et al. 2015). Le catene di zuccheri legate alle proteine svolgono un ruolo fondamentale nella vita della cellula e dell'intero organismo in quanto ne regolano importanti processi biologici quali ad esempio l'apoptosi e la sopravvivenza cellulare (Lee et al. 2008; Swindall & Bellis 2011), l'angiogenesi (Tei et al. 2002) e le funzioni effettrici degli anticorpi (Nimmerjahn & Ravetch 2008; Xue et al. 2013; Vidarsson et al. 2014). Ricordiamo infine che molte delle glicoproteine sono destinate ad essere proteine di membrana e la componente oligosaccaridica forma il glicocalice, ovvero la struttura più esterna della cellula, coinvolta quindi nei meccanismi di comunicazione cellula-cellula e cellula-ambiente.

La glicosilazione delle proteine consiste, dunque, nell'aggiunta di catene glucidiche a particolari amminoacidi di una catena peptidica, dando origine ad una

glicoproteina. Le catene di zuccheri legate alle proteine possono essere di diverso tipo, anche se le più comuni sono di tipo O-linked ed N-linked.

La biosintesi di catene O-linked avviene esclusivamente nell'apparato di Golgi e consiste nell'aggiunta di uno o pochi residui di zuccheri all'atomo di ossigeno di un residuo di treonina, serina o idrossilisina (Bennett et al. 2012).

Le catene N-linked sono invece sintetizzate nel reticolo endoplasmico rugoso (RER), successivamente modificate e completate nell'apparato di Golgi (Aebi 2013). La loro biosintesi, molto più complessa rispetto a quella delle catene O-linked, può essere suddivisa in due fasi: l'assemblaggio di una catena oligosaccaridica su un lipide (*lipid-linked oligosaccharide, LLO*) e il trasferimento dell'oligosaccaride ad un residuo di Asn di una catena peptidica nascente (Breitling & Aebi 2013) (Fig. 1). La biosintesi del LLO avviene nel RER, versante citoplasmatico, ad opera di specifici enzimi, appartenenti alla famiglia ALG (*Asparagine linked glycosylation*) che catalizzano il trasferimento di monosaccaridi, utilizzando nucleotidi-zuccheri come donatori, ad un lipide, il dolicolo fosfato. Questo lipide riveste un ruolo fondamentale nella biosintesi di catene N-linked in quanto assolve alla funzione di traslocatore di monosaccaridi o oligosaccaridi dal citoplasma al lume del RER. La sua biosintesi risulta essere un passaggio cruciale della N-glicosilazione, ed avviene sulla membrana del RER ad opera della cis-preniltrasferasi (Aebi 2013). Alterazioni del processo di biosintesi del dolicolo compromettono gravemente il processo di N-glicosilazione (Schenk et al. 2001) e tali alterazioni sono causa di alcune CDGs (Cantagrel & Lefeber 2011). La fase citoplasmatica della biosintesi del LLO termina con il dolicolo fosfato, ancorato alla membrana del RER, associato ad una catena oligosaccaridica formata da 2 residui di N-acetilglucosammina (GlcNAc) e 5 di mannosio (Man). A questo punto, l'enzima RFT1, trasferisce la catena

oligosaccaridica dall'esterno verso il lume del RER dove verrà modificata ad opera di altri enzimi appartenenti alla famiglia delle ALG che alla fine generano una struttura così composta: 2 residui di GlcNAc, 9 di Man e 3 di glucosio (Glc) legati al dolicholo fosfato (Aebi 2013). Questa struttura glucidica è poi trasferita dall'oligosaccariltrasferasi (OST) alla sequenza polipeptidica nascente, che riconosce una specifica sequenza consenso, Asn-X-Ser/Thr (dove X è un qualunque amminoacido ad eccezione della prolina) e crea un sito di N-glicosilazione tra il residuo amminico dell'Asn e la catena oligosaccaridica (Breitling & Aebi 2013).

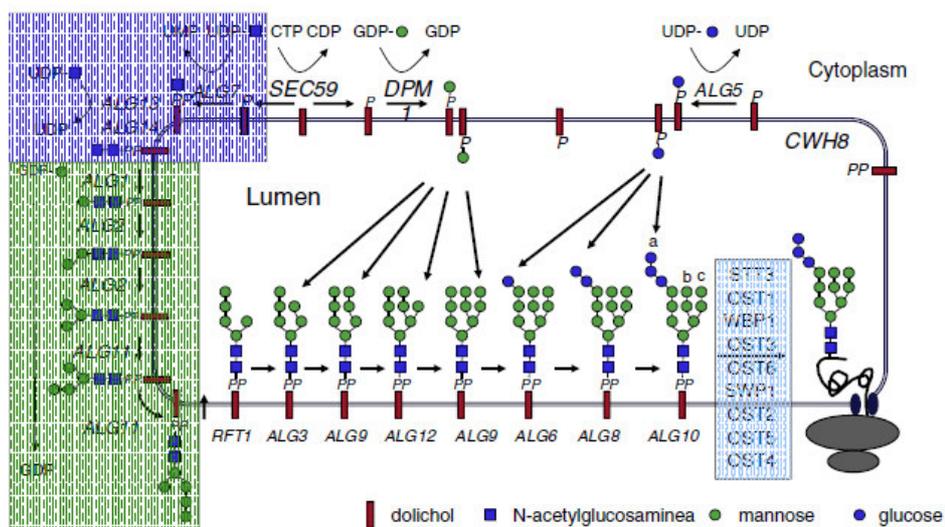


Fig.1: Rappresentazione schematica delle prime fasi della biosintesi di una catena N-linked. Durante la fase *lipid-linked oligosaccharide*, LLO (riquadro verde) la catena glucidica, legata al dolicholo fosfato, è formata ad opera delle ALG (*Asparagine linked glycosylation*). La struttura glucidica formata da 2 residui di GlcNAc e 5 di Man è poi trasportata sul versante luminale del RER, ad opera di una flippasi, la RFT1, dove subisce ulteriori modifiche operate da altri enzimi ALG. Infine la struttura composta di 2 residui di GlcNAc, 9 di mannosio e 3 di Glc è trasferita dal dolicholo fosfato al residuo di Asn della proteina dall'OST (oligosaccariltrasferasi) e successivamente al Golgi dove viene modificata nella sua struttura finale (Da: Aebi, 2013).

La struttura sopradescritta subisce ulteriori modifiche ad opera di glicosidasi, enzimi che catalizzano la rimozione di residui di zuccheri. Il primo step prevede la rimozione di 3 residui di Glc ad opera, rispettivamente delle α -glicosidasi I, e II,

seguito dalla rimozione di 4 residui di Man ad opera dell' α -mannosidasi I. A questo punto la glicosiltrasferasi GlcNAc trasferasi 1 (GlcNAcT1), implementa la catena glucidica con un residuo di GlcNAc, mentre altri due residui di mannosio sono poi rimossi dalla α -mannosidasi II; infine un secondo residuo di GlcNAc è aggiunto ad opera della GlcNAcT2 (Kornfeld & Kornfeld 1985). Questa struttura glicidica, composta da 2 residui di GlcNAc, 3 di mannosio e 2 di GlcNAc è la struttura base di tutte le catene N-linked e può essere successivamente completata nell'apparato di Golgi dove la catena N-linked è modificata in modo specifico (Fig. 2).

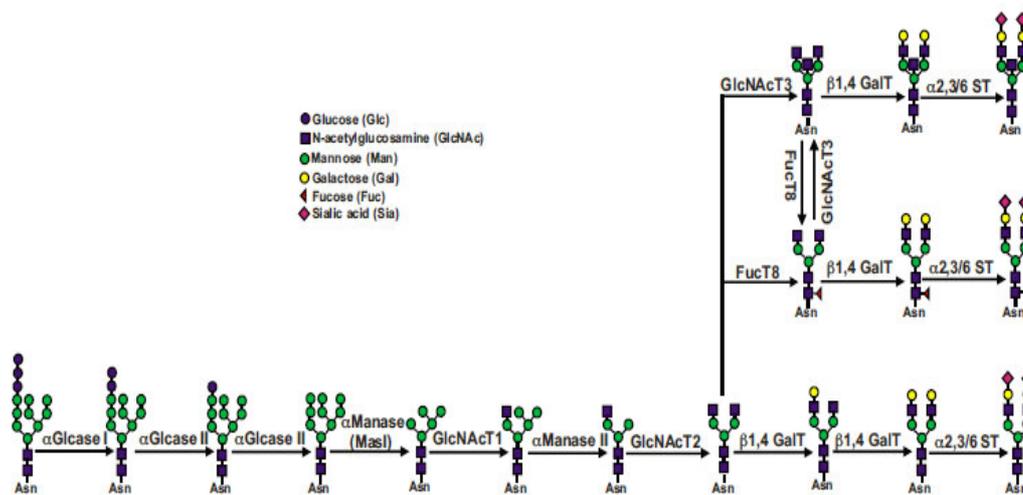


Fig.2: Rappresentazione schematica delle fasi finali di biosintesi di una catena N-linked. La struttura base di tutte le catene N-linked, data da 2 residui di N-acetilglucosammina (GlcNAc), 3 di mannosio (Man) e 2 di GlcNAc è il risultato di enzimi biosintetici (glicosiltrasferasi) e catabolici (glicosidasi). La struttura base, nel Golgi, può essere poi completata con l'aggiunta di altri zuccheri, quali galattosio (Gal), GlcNAc, fucosio (Fuc) o acido sialico (Sia). (Da: Dall'Olio et al. 2013)

In tal modo si ottiene una grande varietà di specie N-glicaniche, in grado di conferire una specifica funzione alla struttura proteica a cui sono associate (Aebi 2013). Nel Golgi, la struttura base può essere completata dall'enzima β 1,4 galattosiltrasferasi con l'aggiunta di galattosio ad un residuo di GlcNAc terminale

e/o dalla fucosiltrasferasi8 (FucT8) che catalizza il trasferimento con legame α 1,6 di un residuo di fucosio al residuo di GlcNAc legato all'Asn (*core fucose*). L'enzima GlcNAcT3 può trasferire un residuo di GlcNAc al residuo di Man in posizione centrale mediante un legame β 1-4, dando origine alla struttura nota come *bisecting GlcNAc* ed in questo caso la struttura non viene più modificata. Infine, le catene N-linked, dopo l'aggiunta del galattosio, possono terminare con uno o due residui di acido sialico legati con legame α 2,3 o 2,6 e i due tipi di legame sono il prodotto di due diverse classi di sialiltrasferasi.

Ricordiamo infine che il processo di N-glicosilazione, non è di tipo deterministico, come per la biosintesi delle proteine o degli acidi nucleici, bensì stocastico, in quanto dipende dalla concentrazione di enzimi (glicosiltrasferasi e glicosidasi) e donatori-zuccheri. Ne consegue che per una data proteina, la composizione della catena N-linked legata ad uno specifico sito di glicosilazione possa presentare un certo grado di variabilità (microeterogeneità) (Dall'Olio et al. 2013).

Dalla trattazione appena fatta si evince come il processo di N-glicosilazione sia localizzato all'interno della cellula ed in particolare nel reticolo endoplasmico rugoso e nel Golgi. Tuttavia recenti studi hanno evidenziato la possibilità di un meccanismo di glicosilazione extracellulare mediato dalle piastrine (Wandall et al. 2014; Lee et al. 2014). Le piastrine sono elementi corpuscolati del sangue che derivano dalla frammentazione del citoplasma di megacariociti e all'interno del loro citoplasma contengono dei granuli in cui sono presenti, tra l'altro, delle glicosiltrasferasi. Le piastrine attivate riversano il contenuto dei loro granuli in circolo e le glicosiltrasferasi rilasciate sono in grado di esplicare la loro attività enzimatica, incorporando residui di zuccheri a proteine plasmatiche (Wandall et al. 2014). Le piastrine, oltre a essere fonte di glicosiltrasferasi, possono assolvere

alla funzione di donatori di nucleotidi zuccheri per glicosiltransferasi plasmatiche. Recenti studi hanno dimostrato che le piastrine attivate dalla trombina, a concentrazioni fisiologiche, sono degli ottimi donatori di CMP-acido sialico, che può essere utilizzato dalla sialiltransferasi ST6Gal1 plasmatica per glicosilare la superficie di cellule target (Lee et al. 2014).

1.2 LE GLICOSILTRANSFERASI

Le glicosiltransferasi (GTs) vengono classificate in 65 famiglie diverse sulla base della loro attività catalica. La reazione catalizzata prevede il trasferimento di un monosaccaride da un donatore di zuccheri attivato, che può essere un nucleotide zucchero mono- o di- fosfato, ad un saccaride, lipide, proteina o DNA o piccole molecole accettrici e formano dunque glico-coniugati (Liu & Mushegian 2003). La loro localizzazione è a livello intracellulare ed in particolare nel RER e nel Golgi, laddove esiste una buona concentrazione di nucleotidi zuccheri, indispensabili per il funzionamento delle glicosiltransferasi. Tuttavia, anche nel plasma si ritrovano delle isoforme di particolari glicosiltrasferasi che assumono in alcuni casi un particolare significato clinico e che, che come detto in precedenza potrebbero svolgere un ruolo anche nella N-glicosilazione ecto-cellulare (Wandall et al. 2014; Lee et al. 2014).

1.2.1 α 2,6 sialiltrasferasi

L'enzima α 2,6sialiltransferasi (ST6Gal1) catalizza l' α 2,6 sialilazione degli N-glicani utilizzando come donatore di nucleotidi zuccheri il CMP-acido sialico e come accettore la struttura Gal β 1,4GlcNAc delle catene N-linked (Dall'Olio 2000). La ST6Gal1 fa parte della superfamiglia delle sialiltransferasi, di cui fanno parte più di 20 enzimi, coinvolti nella produzione di oligosaccaridi sialilati. Da un

punto di vista storico, il cDNA della ST6Gal1 venne isolato per la prima volta nel ratto da Weinstein *et al.* nel 1987 e tre anni più tardi, da Grundmann *et al.* venne isolato il cDNA umano (Weinstein *et al.* 1987; Grundmann *et al.* 1990). Le sialiltrasferasi sono glicoproteine transmembrana di tipo 2 in cui è possibile distinguere tre domini ben definiti: 1) una piccola coda in posizione NH₂ terminale rivolta verso il versante citoplasmatico 2) una porzione transmembrana di dimensioni variabili tra i 20-200 amminoacidi che termina con 3) la porzione C-terminale, rivolta nella parte luminale (del Golgi) e in cui è contenuto il dominio catalitico dell'enzima. Tutte le sialiltrasferasi umane pur essendo molto diverse tra loro da un punto di vista strutturale, condividono 3 sequenze consenso (L, S, VS), altamente conservate, dette sialil-motivi (Harduin-Lepers *et al.* 2001). Il significato funzionale di queste regioni è stato messo in evidenza da studi di mutagenesi sulla ST6Gal1 ed in particolare è emerso che l'alto grado di conservazione di queste sequenze abbia un significato funzionale molto importante. Infatti il dominio L lega il donatore di nucleotidi zuccheri, il CMP-acido sialico, il dominio S lega sia il donatore zucchero che l'accettore e infine il dominio VS, che consiste essenzialmente di due amminoacidi altamente conservati (una Glu ed una His separate da 4 amminoacidi), è coinvolto nel processo catalitico (Datta *et al.* 1998).

La localizzazione della ST6Gal1 è sia intracellulare e, più precisamente, nel trans-Golgi, sia plasmatica. Elevati livelli intracellulari di ST6Gal1 sono spesso presenti in diverse neoplasie come quella del colon (Dall'Olio *et al.* 1989) ed associate a diverse funzioni cellulari (Dall'Olio & Chiricolo; Dall'Olio *et al.* 2014). In particolare è stato dimostrato che l'incremento di attività α 2,6 sialiltransferasica intracellulare sia responsabile dell'aumentata sialilazione delle integrine in conseguenza della quale mostrerebbero una maggiore affinità per la fibronectina

(Semel et al. 2002; Chiricolo et al. 2006). La ST6Gal1 plasmatica invece, è il risultato del clivaggio e secrezione della forma epatica (Weinstein et al. 1987; Colley et al. 1989). Il clivaggio della ST6Gal1 epatica è operato dal *β -site amyloid precursor protein (APP)-cleaving enzyme 1* (BACE1) (Kitazume et al. 2001; Kitazume et al. 2003; Kitazume et al. 2005), lo stesso enzima coinvolto nella malattia di Alzheimer in quanto responsabile della produzione del peptide neurotossico β amiloide ($A\beta$) derivato dal clivaggio di APP (Yan et al. 1999; Hussain et al. 1999; Bennett et al. 2000). L'attività plasmatica dell'ST6Gal1 aumenta in condizioni infiammatorie, infatti studi condotti su topi, indicano che, in seguito a induzione di uno stato infiammatorio mediato da inoculazioni sottocutanee di acqueragia, si verifica un aumento dei livelli sierici di glicoproteine epatiche tra cui la ST6Gal1, che si mostra tra le prime proteine di fase acuta rilevabili in circolo (Kaplan et al. 1983; Dalziel et al. 2004). Altri studi, condotti su topi *Long-Evans Cinnamon* (LEC), caratterizzati da un difetto genetico del trasportatore ATPasico del Cu^{++} (ATP7B) e che incorrono spontaneamente in danno epatico (Mori et al. 1994; Suzuki et al. 1993), mostrano come i segni evidenti di epatite siano preceduti molto precocemente da un innalzamento dei livelli sierici di ST6Gal1 (Kitazume et al. 2005). In questo contesto, la ST6Gal1 sierica risulta essere un ottimo e sensibile marker di infiammazione epatica. Infine, studi condotti su pazienti affetti da epatite C, indicano chiaramente che i livelli sierici di ST6Gal1 correlano positivamente con il grado di infiammazione epatica (Kitazume et al. 2009).

1.2.2 β 1,4Galattosiltransferasi

Le glicosiltransferasi β 1,4galattosiltransferasi (β 1,4GalTs) catalizzano il trasferimento di galattosio dall'UDP-galattoso a residui terminali di GlcNAc durante l'allungamento della catena oligosaccaridica di glicoproteine, tra cui le IgA e le IgG (McGuire et al. 1989). La localizzazione dell'enzima è sia intracellulare che extracellulare; in particolare all'interno della cellula si trova o inserito nella membrana dell'apparato di Golgi (Berger et al. 1987) o sulla superficie della membrana plasmatica, mentre, a livello extracellulare lo ritroviamo in diversi liquidi biologici tra cui latte, liquido amniotico e cerebrospinale, urina, saliva e siero (Axford et al. 1992). Il gene che codifica per la β 1,4GalT è sul cromosoma 9 (Shaper et al. 1986) e viene trascritto in più di una molecola di mRNA (Russo et al. 1990) per dare origine a diverse isoforme, caratterizzate ognuna per la specificità dell'accettore. Studi eseguiti su omogenati di cellule B derivati da pazienti affetti da artrite reumatoide (AR), che presentano una ridotta galattosilazione delle Immunoglobuline G (IgG), dimostrano una riduzione dell'attività enzimatica β 1,4GalT se si utilizzano le IgG come accettore, mentre, fornendo l' α -lattoalbumina come accettore glicoproteico, l'attività resta costante (Furukawa et al. 1990). Altri studi hanno riportato che l'attività galattosiltrasferasica è invariata nei B linfociti dei pazienti con AR (Delves et al. 1990; Furukawa et al. 1990). La famiglia delle β 1,4GalTs comprende, infatti, 7 isoforme (I-VII) (Amado 1999) e, da studi in vitro, eseguiti misurando l'attività enzimatica utilizzando diversi accettori è emerso che : 1) le isoforme II e V operano la galattosilazione di catene N-linked (Almeida et al. 1999); 2) le β 1,4GalT IV e V lavorano su catene O-linked (Ujita et al. 1998); 3) le forme III, IV, V e VI catalizzano il trasferimento di Gal a residui di GlcNAc o Glu di

glicolipidi (Almeida et al. 1997; T. Nomura et al. 1998; Schwientek et al. 1998);

4) l'isoforma VII catalizza la galattosilazione dello xilosio dei proteoglicani (Almeida et al. 1999). La struttura glucidica formata dalla $\beta 1,4\text{GalT}$ è di tipo $\text{Gal}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}$ ed è spesso associata al dominio esterno di glicoproteine di membrana (Guo et al. 2001) in quanto gioca un ruolo molto importante nei contatti cellula-cellula (K. H. Nomura et al. 1998). Il galattosio terminale, infatti, è riconosciuto e legato da diverse proteine come le galectine (Perillo et al. 1995), la contatto-inibina (Wieser & Oesch 1992) e il recettore delle asialoglicoproteine epatico (Lodish 1991) ed è pertanto coinvolto nella regolazione di numerosi processi biologici quali apoptosi, crescita cellulare o clearance di glicoproteine sieriche (Guo et al. 2001). Topi knock-out per il gene $\beta 1,4\text{GalT}$ mostrano una crescita embrionale ritardata e mortalità precoce, evidenziando l'importanza della galattosilazione delle glicoproteine nel processo di crescita e sviluppo dell'animale (Asano et al. 1997; Lu et al. 1997). Tuttavia difetti del processo di galattosilazione di proteine si riscontrano anche in alcuni quadri patologici quali malattie infiammatorie croniche come la già citata AR, dove, l'alterata galattosilazione riguarda in modo specifico le IgG. Studi di cinetica enzimatica su linfociti B di pazienti con AR, hanno dimostrato che causa della ridotta galattosilazione delle IgG è la scarsa affinità dell'enzima per l'UDP-Gal, ma non per l'asialo-agalatto-IgG, mentre l'affinità per il donatore e accettore nel caso dell' α -lattoalbumina è paragonabile tra cellule B di pazienti AR e individui sani (Furukawa et al. 1990), dimostrando ancora una volta la specificità dell'enzima per all'accettore.

1.3 IMMUNOGLOBULINE DI CLASSE G

Le immunoglobuline (Ig) sono tra le proteine plasmatiche più abbondanti e sono divise in 5 classi : IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Tra le Ig plasmatiche, le più rappresentate sono le IgG che da sole, costituiscono circa l'85% delle Ig totali e il 10-20% delle proteine sieriche (Vidarsson et al. 2014). Le immunoglobuline sono glicoproteine costituite per l' 82-96% dalla componente proteica e per il 4-18% da quella glicidica (Vidarsson et al. 2014). Studi iniziati nel 1960 utilizzando uno specifico anti-siero di coniglio contro proteine prodotte da cellule di mieloma umano, hanno messo in evidenza 4 classi di IgG classificate come: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (Schur 1988). Tutte e 4 le sottoclassi, pur condividendo il 90% della sequenza amminoacidica, si differenziavano tra loro per le seguenti proprietà: vita media, capacità di formare immunocomplessi e attivare il complemento, abilità ad attraversare la placenta e legame all'antigene (Schur 1988). Un calo selettivo di alcune sottoclassi di IgG, che si manifesta più di consueto in una riduzione delle IgG2 e/o IgG4 in individui sani, non è critico per la salute dell'individuo, ma può essere responsabile di una maggiore suscettibilità verso alcuni patogeni (Vidarsson et al. 2014). Esaminiamo brevemente le diverse classi di IgG: **1)** Le IgG1 sono le più abbondanti e risultano essere anche le prime, tra le IgG, ad essere prodotte in risposta alla presenza di un antigene e spesso, la loro presenza è associata a bassi livelli di IgG3 e IgG4 (Ferrante et al. 1990). La riduzione di IgG1 spesso si traduce in un calo della concentrazione totale di IgG sieriche (ipogammaglobulinemia) e, se accompagnata da riduzione di IgG appartenenti ad altre sottoclassi, si associa facilmente ad infezioni ricorrenti (Jefferis & Kumararatne 1990); **2)** Le IgG2 riconoscono in modo selettivo e specifico molecole glucidiche e sono, pertanto, associate principalmente alla difesa

dell'organismo contro batteri capsulati, in quanto ne riconoscono in modo specifico, la componente polisaccaridica (Hammarström & Smith 1983). La riduzione di IgG2, sebbene spesso compensata con un aumento di altre sottoclassi, si manifesta con una maggiore suscettibilità alle infezioni sostenute da particolari batteri (Kuijpers et al. 1992) **3** le IgG3, sono l'unica classe ad essere diretta contro rari antigeni eritrocitari come il caso degli antigeni P e P^k (Söderström et al. 1985). Inoltre, in associazione con le IgG1, guidano le risposte immunitarie contro alcuni antigeni eritrocitari (fattore RhD) (Pollock & Bowman 1990) e piastrinici (*human platelet antigen 1a*) in caso di incompatibilità trasfusionale o madre/figlio durante la gravidanza. (Brouwers et al. 1988; Mawas et al. 1997); **4** le IgG4, come le IgE, sono indotte spesso da allergeni. In caso di patologie allergiche, la desensibilizzazione può essere effettuata, talvolta, eseguendo una terapia immunologica, ovvero somministrando al paziente dosi minime e crescenti dell'allergene purificato al fine di indurre tolleranza. Le IgG4 rivestono un ruolo cruciale in questa pratica clinica, in quanto è stato osservato che, il miglioramento dei sintomi coincide con l'induzione della sottoclasse 4 di IgG che può essere modulata dall'IL-10 (Aalberse et al. 2009). Le IgG4 sono anche alla base di una rara patologia nota come *IgG4 related disease* (IgG4-RD) caratterizzata da un'elevata concentrazione plasmatica di IgG4 seguita da infiltrazione tissutale da parte di plasmacellule IgG4-positive e può riguardare numerosi organi e tessuti (Yamamoto et al. 2012).

1.3.1 IgG : struttura e funzioni

Le IgG sono prodotte da cellule del sistema immunitario adattativo, le plasmacellule e sono formate da 4 catene polipetidiche a due a due uguali (Fig.3). Ogni IgG è costituita da 2 catene leggere (L) di tipo κ o λ , ciascuna di 25kD e da due catene pesanti (H) di tipo γ , da 50 kDa e legate tra loro mediante ponti disolfuro. Le catene H sono caratterizzate dalla presenza di una regione N-terminale variabile (VH) e tre costanti (CH1, CH2 e CH3). Allo stesso modo le catene L hanno una regione N-terminale variabile (VL) ed una costante (CL). La porzione costante della catena leggera è associata alla catena pesante mediante VH e CH1 e forma il Fab (*Fragment antigen binding*), una struttura molto importante sia da un punto di vista strutturale che funzionale. Il Fab, ed in particolare la regione V delle due catene, è deputato al riconoscimento dell'antigene. La porzione compresa fra CH1 e CH2 prende il nome di regione cerniera ed è caratterizzata dall'essere molto flessibile in modo da permettere il legame simultaneo di più antigeni. Infine, le regioni CH2 e CH3 si uniscono a formare la porzione Fc (*fragment crystalline*).

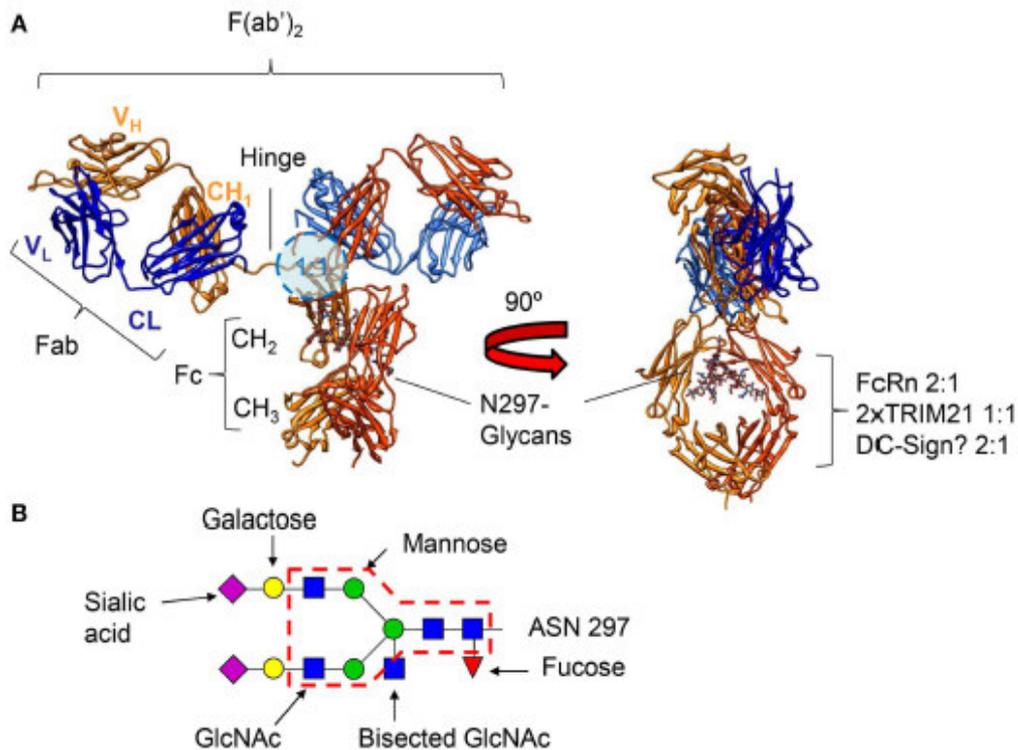


Fig.3: Rappresentazione schematica della struttura di IgG e della catena N-linked associata all'Asn297. Le IgG sono formate da due catene leggere (L) e due pesanti (H). Le catene leggere hanno due domini, uno variabile (VL) e uno costante (CL), invece le catene pesanti hanno un dominio variabile (VH) e tre costanti (CH1, CH2 e CH3). La porzione Fab (*Fragment antigen binding*) riconosce e lega l'antigene ed è costituita dai domini VL, CL, VH e CH1. La zona compresa tra CH1 e CH2 forma la cerniera, mentre l'associazione tra CH2 e CH3 genera il frammento cristallizzabile (Fc). Viene inoltre evidenziato il residuo amminoacidico Asn 297 nell'interfaccia tra CH2 e CH3, importante per essere il principale sito di N-glicosilazione delle IgG (A). Le catene N-linked associate alle IgG (B) possono essere completate con l'aggiunta di galattosio, acido sialico, *core fucose* o *bisecting GlcNAc*. (Da: Vidarsson et al, 2006)

Come detto in precedenza, gli anticorpi sono in grado di riconoscere una grande varietà di antigeni, anche molto diversi tra loro e questa capacità è delegata alla porzione Fab. In particolare ciò è reso possibile grazie al riassortimento genico di tre segmenti genici posti sui locus delle catene pesanti e leggere: V (*Variable*), D (*Diversity*) e J (*Joining*). In particolare, i loci per le Ig nell'uomo sono 3 di cui uno per la catena pesante sul cromosoma 14, uno sul cromosoma 2 per la catena leggera di tipo κ e uno per quella di tipo λ sul cromosoma 22. Ogni locus, partendo dall'estremità 3' possiede una regione costante C e due variabili (V e J), e per le catene pesanti, ma non per le leggere, la porzione V è separata da quella J

da una regione D. Ciascuna regione è formata da un numero diverso di segmenti V, (D), J che vanno incontro a ricombinazione durante la maturazione delle plasmacellule. In particolare il locus della catena λ possiede 30 segmenti V, 4 J tutti in posizione 5' rispetto ai 4 segmenti C. Il locus κ è composto da 40 segmenti V, 5J e un solo C ed è molto simile a quello della catena pesante che presenta 40 segmenti V, 27D, 6J ed uno C. La struttura finale della porzione variabile sarà costituita da un frammento V e uno J per le catene leggere e da un segmento VDJ per le catene pesanti. Il DNA codificante per i diversi loci, così riarrangiato, sarà trascritto in un trascritto primario che subirà uno splicing alternativo e darà origine all'RNA maturo che verrà tradotto. La proteina matura sarà dunque il risultato di un meccanismo di ricombinazione genico e/o mutazioni somatiche che generano una grande variabilità della porzione variabile delle Ig (Potter 1983).

Due regioni della molecola particolarmente importanti sono: la parte più prossimale della cerniera al dominio CH2, in quanto sito di legame del fattore C1q del complemento ed i recettori della porzione Fc delle IgG (Fc γ Rs) ed il residuo Asn 297 situato all'interfaccia tra CH2 e CH3 in quanto principale sito di N-glicosilazione delle IgG (Fig.3). La glicosilazione riveste un ruolo fondamentale nelle attività effettrici delle IgG in quanto ne modula in modo significativo la propria attività in senso pro-/anti-infiammatorio. Anche la regione V ha dei siti di glicosilazione, in particolare circa il 10-15% del totale degli anticorpi risultano glicosilati nella porzione variabile e la presenza di catene di zuccheri insieme al meccanismo di ricombinazione V(D)J è alla base della capacità degli anticorpi di riconoscere una moltitudine di antigeni anche molto diversi tra loro (Wright et al. 1991). Gli anticorpi rappresentano il link tra l'immunità innata e quella di tipo adattativa e sono in grado di riconoscere e neutralizzare agenti patogeni quali virus, batteri, tossine. In alcuni casi, possono reagire nei confronti di antigeni self

e dare origine a quadri patologici noti come malattie autoimmuni: un esempio è dato dall'artrite reumatoide, una patologia autoimmune caratterizzata, in una grossa percentuale di casi, dalla presenza, nel siero, del fattore reumatoide, ossia auto-anticorpi diretti contro la porzione Fc delle IgG. Inoltre gli anticorpi possono riconoscere anche degli antigeni non patogeni, come ad esempio il polline e dare origine a manifestazioni allergiche. In condizioni fisiologiche, gli anticorpi rivestono un ruolo fondamentale per la difesa dell'organismo, esplicito fondamentalmente mediante l'attivazione del complemento ed il legame con i recettori Fc γ su linfociti B, cellule dendritiche, macrofagi, neutrofilo, basofili, eosinofili e cellule natural killer.

1.3.1.1 Attivazione del complemento

Il sistema del complemento consta di oltre 30 proteine e al momento della sua attivazione alcune proteine risultano solubili e altre legate alla membrana del patogeno. L'attivazione del complemento comporta una serie di reazioni a cascata e può avvenire mediante tre vie: classica, alternativa e lectinica, attraverso una serie di reazioni a cascata, come nel caso della coagulazione e che convergono tutte nell'attivazione del fattore C3 che genera i prodotti attivati C3a, C3b e C5a ed infine il MAC (*Membrane Attack Complex*) (Fig.4) (Sarma & Ward 2012). Le IgG, insieme alle IgM, attivano il complemento attraverso la via classica: in seguito al riconoscimento dell'antigene, mediato dalla porzione Fc, legano C1, un complesso multimerico composto di 3 subunità: C1q, C1r e C1s. La componente C1q riconosce la porzione Fc dell'anticorpo legato all'antigene e dal legame simultaneo di C1q con 2 o più porzioni Fc dell'anticorpo attiva C1r che svolge un'azione proteasica scindendo C1s. C1s, anch'essa una proteasi, cliva il fattore C4 in C4a che è rilasciato in circolo e C4b che si lega alla membrana del patogeno

garantendo il proseguimento del processo di attivazione del complemento. C4b recluta il fattore C2 che viene scisso anch'esso in C2a, rilasciato in circolo e C2b che resta legato alla membrana dove forma con C4b la C3 convertasi (C4bC2b), ossia un enzima che lega e scinde il fattore C3 in C3a e C3b. Quest'ultimo svolge due funzioni: **a)** coadiuva il processo di fagocitosi del patogeno, fungendo da opsonina e **b)** lega il complesso C3 convertasi formando il complesso C5 convertasi che cliva il fattore C5 in C5a che è riversato nel torrente circolatorio, e C5b che si lega alle altre proteine già presenti sulla membrana e recluta i fattori C6, 7, 8 e 9 conducendo alla formazione del MAC (Fig.4) (C5b-9). Il MAC si inserisce nella membrana del patogeno e ne causa la lisi (Sarma & Ward 2012).

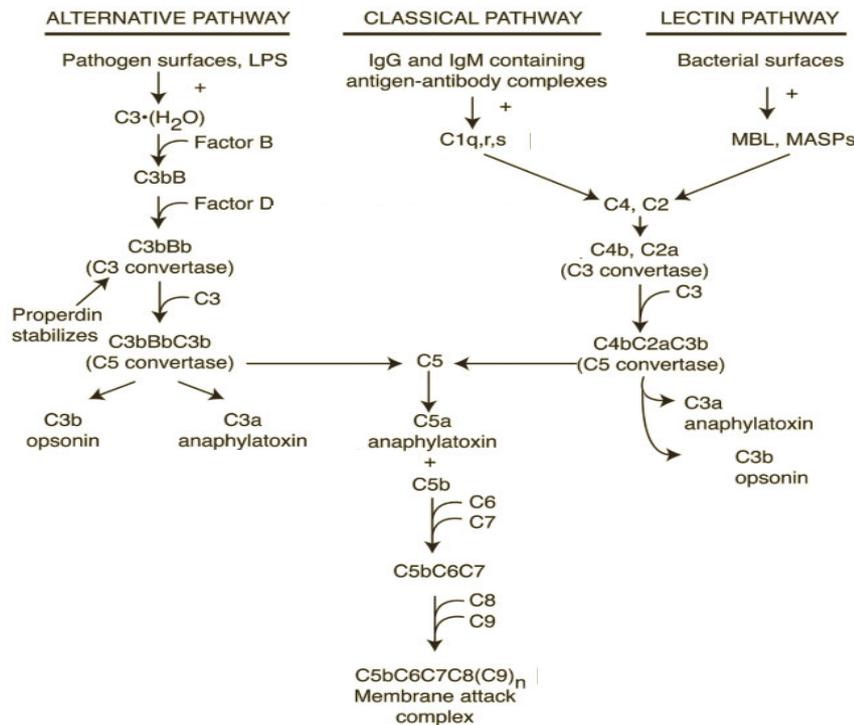


Fig.4: Rappresentazione schematica del sistema del complemento. L'attivazione può avvenire mediante tre vie: classica, alternativa e lectinica che convergono tutte nell'attivazione della componente C3 ed infine nella formazione del Membrane attack complex (MAC) (Da: Sarma and Ward, 2011).

Per quanto riguarda le IgG abbiamo visto essere in grado di legare e attivare il fattore C1q, sebbene non tutte le sottoclassi siano in grado di farlo allo stesso modo. In particolare le IgG1 e IgG3 legano con alta efficienza il C1q mentre le IgG2 e IgG4 con meno efficienza e solo in alcuni casi. La capacità di legare C1q sembra essere legata ad una particolare struttura e composizione della catena peptidica a livello della regione CH2. Ad esempio è stato dimostrato che la sostituzione di una leucina con una alanina in posizione 235 è causa di una ridotta affinità delle IgG2 verso il C1q (Morgan et al. 1995).

1.3.1.2 Interazione con FcγRs

I recettori Fcγ (FcγRs) sono localizzati su diverse cellule del sistema immunitario dove svolgono funzioni diverse. In particolare FcγRs si trovano su monociti e macrofagi, neutrofilo ed eosinofili, cellule Natural Killer (NK) e linfociti B e, da un punto di vista funzionale, sono divisi in due grandi gruppi: **a)** gli attivatori, che comprendono i FcγRI, FcγRIIa e FcγRIIIa e **b)** gli inibitori di cui ne fa parte FcγRIIb (Nimmerjahn & Ravetch 2006; Schwab & Nimmerjahn 2013) (Fig.5).

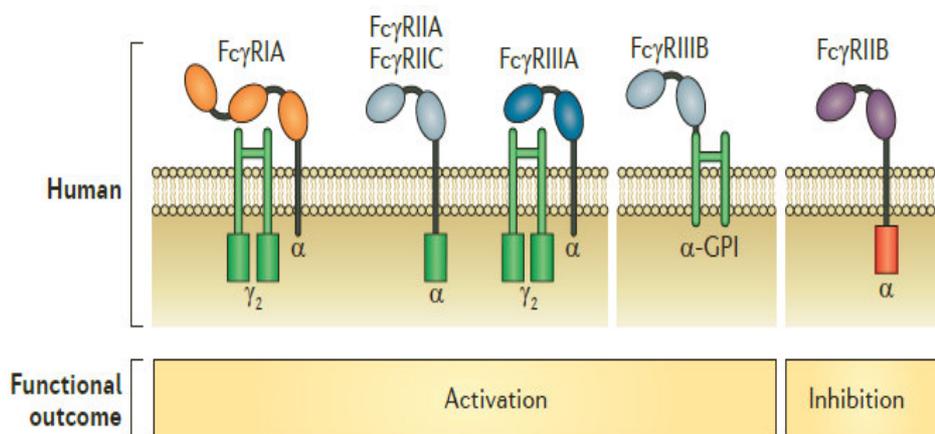


Fig.5: Visione schematica delle due grandi classi di FcγRs nell'uomo. [Da: (Schwab & Nimmerjahn 2013)]

Le classi attivatorie sono caratterizzate dalla presenza di motivi ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*), ovvero contengono due sequenze formate da una tirosina separata da due amminoacidi da una leucina e le due sequenze sono separate di solito da 6-8 amminoacidi (Barrow & Trowsdale 2006). Tali sequenze sono importantissime per la trasduzione del segnale in quanto, in seguito al legame con il recettore, la tirosina è fosforilata e dà l'avvio alla funzione effettrice. I recettori inibitori hanno invece, all'estremità citoplasmatica, delle sequenze ITIM (S/I/V/LxYxxI/V/L) (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif*) ed in seguito al legame col ligando i motivi ITIM vengono fosforilati e reclutano fosfatasi che inibiscono la trasduzione del segnale (Ravetch 2000). Il sito di legame delle IgG a Fc γ Rs è lo stesso che lega il fattore C1q e comprende i seguenti residui : 234-239,265-269,297-299,327-330 (Vidarsson et al. 2014). Ciascuna sottoclasse di IgG ha un profilo di legame unico alle varie classi di Fc γ R, ad esempio le IgG1 e IgG3 interagiscono molto bene con diverse classi Fc γ R, al contrario delle IgG2 e IgG4 che ne legano solo alcune. L'effetto del legame delle IgG alle diverse classi di Fc γ Rs ha degli effetti diversi a seconda sia del tipo di recettore coinvolto sia del tipo cellulare a cui è legato. Ad esempio l'attivazione del recettore Fc γ RIII posto su cellule NK induce la citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC). In particolare il legame di IgG, legate alla struttura target, con Fc γ RIII, induce sia il rilascio di citochine infiammatorie come l'IFN γ che stimolano altre cellule del sistema immunitario, sia la produzione di granzimi e perforine responsabili della morte della cellula target (Sun 2003). Al contrario, il legame dell'anticorpo al recettore Fc γ RIIB sui linfociti B è responsabile della soppressione dell'attività immunitaria.

1.4 LA GLICOSILAZIONE DELLE IgG

Le Immunoglobuline G hanno diversi siti di N-glicosilazione sia nel Fab (10-20% del totale delle IgG circolanti) sia nella porzione Fc dove è presente, peraltro, il principale sito N-linked delle IgG: il residuo Asn 297 (Fig. 3A) (Vidarsson et al. 2014). L’N-glicosilazione del Fab e del Fc presenta delle importanti differenze in termini di composizione, dovuta, in parte, alla diversa capacità da parte di glicosidasi e glicosiltransferasi, di accedere ai potenziali siti di N-glicosilazione; infatti, la porzione Fab, rispetto al sito Asn297 della porzione Fc risulta più facilmente accessibile. Inoltre, come visto in precedenza, la glicosilazione è un processo stocastico e quindi dipendente dalla disponibilità di donatori zuccheri e di glicosiltransferasi e/o glicosidasi, pertanto, la presenza di particolari glicoforme dipende dall’espressione di glicosiltransferasi nei linfociti B che, a sua volta, può essere influenzata da meccanismi epigenetici (Menni et al. 2013) dipendenti da diversi fattori quali età, ormoni o citochine (Chen et al. 2012). Le catene N-linked associate al Fab sono frequentemente galattosilate e sialilate (spesso presentano una di-sialilazione) e presentano strutture tipo la *bisecting GlcNAc*. Diversamente, la fucosilazione caratterizza maggiormente le catene N-linked Fc-associate (90% delle IgG totali) rispetto a quelle associate al Fab (70% delle IgG totali) (Vidarsson et al. 2014). Le catene N-linked legate alla Asn297 sono di tipo bi-antennario la cui struttura di base (2GlcNAc,5Man, 2GlcNAc) può essere completata con l’aggiunta di galattosio e acido sialico su una o entrambe le antenne, *bisecting GlcNAc* e *core fucose* (Huhn et al. 2009). Nel siero di individui sani, tuttavia, le catene N-linked IgG-associate maggiormente presenti sono fucosilate con antenne: a) prive di galattosio; 2) con uno/due residui di galattosio o 3) con due residui di galattosio e uno di acido sialico (Vidarsson et al. 2014). La

maggior variabilità riguarda, comunque, la presenza/assenza del galattosio e, di conseguenza dell'acido sialico, su una o entrambe le antenne ed in particolare, a seconda della presenza di catene N-linked completate con una, due o nessuna molecola di galattosio le IgG sono classificate come G2, G1 o G0 rispettivamente (Huhn et al. 2009).

1.5 EFFETTI DELLA GLICOSILAZIONE SULL'ATTIVITA' DELLE IgG

1.5.1 Galattosilazione

La presenza del galattosio terminale sulla catena N-linked Fc-associata conferisce alle IgG un'attività di tipo anti-infiammatorio. Ad esempio, in seguito a somministrazione di vaccini contro il virus influenzale o la tossina tetanica, è stato dimostrato che le IgG prodotte contro l'antigene, ma non le totali, risultano più galattosilate inducendo quindi una risposta immunitaria, ma non infiammatoria (Selman et al. 2012). Al contrario, nell'artrite reumatoide (RA), si osserva una diminuzione di IgG galattosilate nella porzione Fc (IgG-G0) (Parekh et al.) e la reversione del fenotipo IgG-G0 la si osserva invece in donne affette da AR in corso di gravidanza, soprattutto durante il terzo trimestre (Rook et al. 1991), condizione a cui è spesso associata la remissione della sintomatologia (Pekelharing et al. 1988; Bondt et al. 2013).

Alterazioni della glicosilazione delle IgG sono state osservate anche in un processo fisiologico quale l'invecchiamento. In particolare i primi studi in tal senso furono condotti alla fine degli anni '80 da Parekh et al. che analizzarono il siero di 151 individui sani, di entrambi i sessi e di età compresa tra 1 e 70 anni.

L'analisi riguardava in modo selettivo il grado di galattosilazione delle IgG al netto del contributo conferito dall'aggiunta di acido sialico, fucosio o N-acetilglucosammina (Parekh et al.). Lo studio, pubblicato nel 1988 mise in evidenza che: 1) circa il 30% dei bambini analizzati presentava IgG con catene N-linked prive del galattosio terminale, 2) nei giovani (età media 25 anni) solo nel 20% dei casi entrambe le antenne delle catene N-linked delle IgG terminavano con la GlcNAc, 3) mentre in soggetti anziani, la percentuale di IgG-G0 sale al 40% (Parekh et al.). Più tardi, un gruppo di ricerca giapponese analizzò un campione più cospicuo (176 donne e 227 uomini) di età compresa fra 0 e 84 anni e confermò la correlazione negativa tra l'età anagrafica e il grado di galattosilazione delle IgG (Yamada et al. 1997).

1.5.1.1 Effetti patologici dovuti alla ridotta galattosilazione di IgG

Come descritto già in precedenza, le IgG-G0, sono delle particolari glicoforme di IgG le cui antenne della catena N-linked legata all'Asn 297 (porzione Fc), sono prive del Gal in posizione terminale e terminano pertanto con un residuo di GlcNAc. La perdita di galattosio, oltre a modificarne la struttura, conferisce alle IgG un'attività di tipo pro-infiammatorio attraverso almeno quattro meccanismi (Fig.6): **1)** interazione con il recettore MBL (*Mannose Binding Lectin*) e successiva attivazione della cascata del complemento mediante la via lectinica; **2)** attivazione delle cellule APC (*Antigen Presenting Antigen*) mediata da recettori lectinici; **3)** interazione con Fc γ Rs su cellule NK e macrofagi; **4)** formazione di aggregati di anticorpi (Dall'Olio et al. 2013).

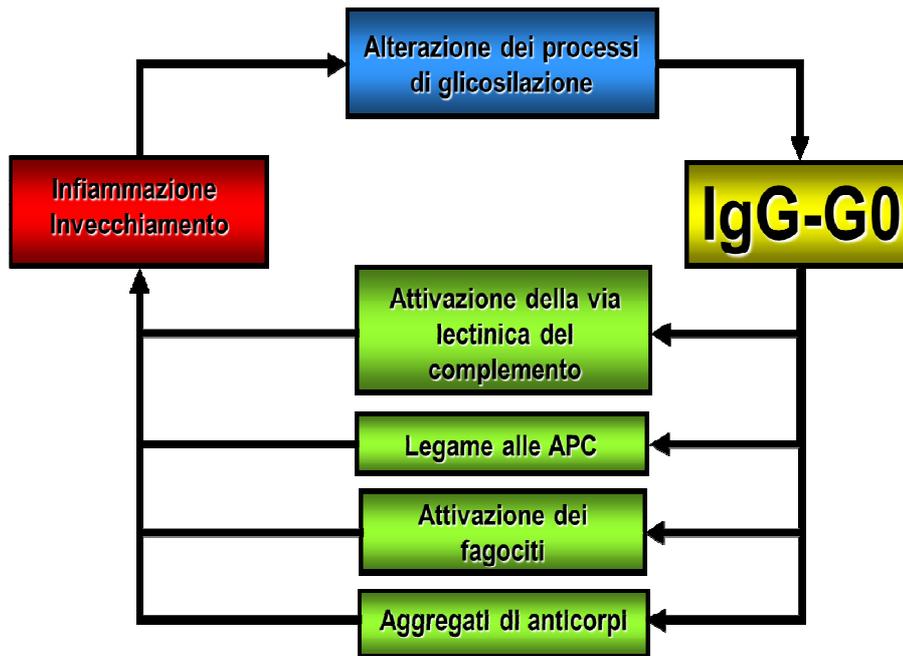


Fig.6: Le IgG-G0 come causa ed effetto dell'infiammazione. Il diagramma mostra come le IgG-G0 siano il risultato di una alterata glicosilazione e causa di infiammazione attraverso quattro meccanismi distinti: 1) attivazione del complemento, mediata dal legame a MBL; 2) attivazione delle cellule presentanti l'antigene (APC) mediata dal legame a recettori DC-SIGN o recettori per il mannosio (MBP); 3) attivazione di fagociti mediata dall'interazione con recettori Fc γ ; 4) formazione di aggregati di anticorpi. L'attivazione del processo infiammatorio agisce poi sull'apparato glicosintetico, causandone delle aberrazioni funzionali che generano le IgG-G0 [Da: (Dall'Olio et al. 2013)].

È stato proposto che le alterazioni della glicosilazione di IgG nell'invecchiamento siano causa ed effetto dell'infiammazione (Fig.6). In particolare le IgG-G0 attraverso i meccanismi sopraelencati attiverrebbero il processo infiammatorio il quale influenzerebbe e modificherebbe l'apparato glicosintetico e tali modificazioni si tradurrebbero in un'ulteriore produzione di IgG con alterata glicosilazione (Dall'Olio et al. 2013).

Legame a MBL e attivazione del complemento

Il recettore MBL è una proteina di origine epatica, analoga al fattore C1q del complemento (Malhotra et al. 1995) e capace di riconoscere residui di mannosio e GlcNAc sulla superficie di microrganismi patogeni (Troelsen et al. 2007). Il recettore MBL svolge una duplice funzione in quanto funge da proteina opsonizzatrice, incentivando l'attività di cellule ad azione fagocitaria ed è in grado di attivare la cascata del complemento (Troelsen et al. 2007). I livelli sierici di MBL sono determinati geneticamente e variano molto all'interno della popolazione in quanto determinati da almeno tre configurazioni alleliche sull'esone 1 del gene MBL2 posto sul cromosoma 10 (Garred 2003). L'effetto patogeno che, in pazienti AR, le IgG-G0 esplicano mediante il legame con MBL è legato alla loro forza di interazione, almeno cinque volte superiore rispetto alle IgG normo-glicosilate (Malhotra et al. 1995) e la conseguente capacità di attivare il complemento mediante la via lectinica contribuisce ad incrementare il processo infiammatorio nelle giunzioni sinoviali (Malhotra et al. 1995). Infine studi condotti su pazienti RA hanno dimostrato che la simultanea presenza di MBL e IgG-G0 in concentrazioni elevate è associata ad una aumentata mortalità in seguito ad eventi ischemici e/o infarti del miocardio. Tale associazione è correlata alla persistenza del processo infiammatorio cronico che aggrava i danni dovuti alla ri-perfusione dei tessuti colpiti da ischemia (Troelsen et al. 2007).

Di contro, studi condotti su pazienti RA portatori di una particolare variante allelica di MBL, descritta come incapace di attivare il complemento, non mostrano alcun tipo di protezione o miglioramento di sintomi legati al processo infiammatorio a livello delle giunzioni sinoviali (Stanworth et al. 1998). Pertanto, secondo questi dati, l'attivazione del complemento, mediata dal legame MBL-IgG-G0, non avrebbe un ruolo da protagonista nella fisiopatologia dell'artrite

reumatoide (Stanworth et al. 1998). Inoltre, studi più recenti, dimostrano che, in topi a cui è stato deletato il gene per la MBL, l'attività infiammatoria delle IgG-G0 non ne risulta compromessa (Nimmerjahn et al. 2007).

Interazione con cellule presentanti l'antigene (APC) e recettori $Fc\gamma$

Le IgG-G0, in seguito all'esposizione della GlcNAc terminale, sono in grado di attivare cellule dendritiche e macrofagi mediante il loro legame ai recettori per il mannosio, una lectina di tipo C e analoga, dal punto di vista funzionale, a MBL (Dong et al. 1999). I recettori per il mannosio sono in grado di riconoscere e legare diverse strutture di carboidrati tra cui i residui di GlcNAc (Lennartz et al. 1987) e di conseguenza le IgG-G0. In seguito al legame, le IgG-G0 vengono internalizzate nel citoplasma dove subiscono una particolare processazione che si conclude con la produzione di piccoli peptidi con caratteristiche antigeniche che, in seguito all'associazione con molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di tipo II (MCH II), vengono esposti sulla superficie cellulare al fine di stimolare una risposta immunitaria mediata dai linfociti T (Dong et al. 1999).

Le IgG-G0 stimolano il processo infiammatorio anche mediante il legame ed attivazione delle cellule dendritiche attraverso il recettore DC-SIGN (anche conosciuto come recettore CD209) (Yabe et al. 2010), un recettore appartenente alla superfamiglia delle lectine di tipo C (Soilleux et al. 2002). Il DC-SIGN è un recettore che presenta 3 domini: uno citoplasmatico, uno transmembrana ed uno extracellulare che contiene dei motivi CRD (*carbohydrate-recognition domain*) in grado di riconoscere residui terminali di Man, Fuc e GlcNAc attraverso un meccanismo Ca^{2+} -dipendente (Mitchell et al. 2001).

I recettori Fc γ , descritti in precedenza, subiscono anch'essi gli esiti dell'alterata glicosilazione delle IgG. In particolare, la perdita del galattosio terminale sembra essere cruciale nell'indurre, nella porzione Fc delle IgG, un cambio conformazionale tale da rendere più agevole il legame, e, successiva attivazione dei recettori Fc γ (Krapp et al. 2003).

Formazione di aggregati di IgG-G0

La presenza di aggregati di IgG è stata messa in evidenza nel liquido sinoviale di pazienti AR, dove le IgG-G0 (Leader et al. 1996) tendono ad aggregarsi e a peggiorare il processo infiammatorio a livello delle giunzioni sinoviali. In particolare è emerso che il grado di galattosilazione sembra ridursi sensibilmente nelle IgG che formano aggregati rispetto a quanto osservato per IgG in forma libera (Leader et al. 1996) confermando che la perdita di galattosio in posizione terminale facilita l'aggregazione di molecole anticorpali.

1.5.2 Fucosilazione

Le IgG prodotte in seguito a vaccinazione o normali risposte immunitarie risultano in gran parte fucosilate nella porzione Fc e ciò spiega perché circa il 94% delle IgG circolanti risulta fucosilato (Vidarsson et al. 2006). Nella catena N-linked legata all'Asn 297, il fucosio può essere trasferito al residuo di GlcNAc legato al peptide, dalla α 1,6fucosiltrasferasi-8 (FUT8) a formare il *core fucose* (Miyoshi et al. 1999). La presenza di un residuo di fucosio sulla catena CH2 dell'anticorpo si ripercuote sulla capacità di indurre ADCC, capacità che per altro non sembra essere influenzata dalla presenza di acido sialico, galattosio o *bisecting GlcNAc* (Mimura et al. 2000; Iida et al. 2006). Osservazioni sperimentali

dimostrano infatti che in malattie immunitarie come la trombocitopenia alloimmune fetale, si ha un incremento di anticorpi non fucosilati di origine materna diretti verso antigeni piastrinici (Wuhrer et al. 2009). L'effetto anti-infiammatorio che conferisce la presenza del fucosio alle IgG dipende dall'interazione con il recettore Fc γ RIIIa sui fagociti. La perdita del *core fucose*, infatti produce dei cambiamenti conformazionali che si traducono in una maggiore capacità di legare Fc γ RIIIa e quindi di indurre l'ADCC (Shields et al. 2002). Tale capacità viene sfruttata anche in clinica, per potenziare l'effetto terapeutico di alcuni anticorpi monoclonali (Jefferis 2009).

1.5.3 Sialilazione

La sialilazione conferisce alle IgG un'attività anti-infiammatoria che è alla base di una comune pratica clinica, la IVIG (*Intravenous Immunoglobulin*), utilizzata per attenuare i sintomi correlati a quadri clinici caratterizzati da autoimmunità associata ad infiammazione cronica (Schwab & Nimmerjahn 2013). La IVIG consiste nella somministrazione intravenosa di alte dosi di IgG purificate (1-3g/kg) (Gelfand 2006) dal siero di 5-10000 donatori (Dwyer 1992). Le IgG contenute nella soluzione inoculata comprendono tutte le sottoclassi (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) e più di 30 glicovarianti (Anthony et al. 2008). La somministrazione di IgG in pazienti affetti da malattie autoimmuni è controintuitiva e potrebbe sembrare paradossale in quanto sono le IgG stesse responsabili del quadro sintomatologico di patologie autoimmunitarie come il lupus eritematoso sistemico o l'artrite reumatoide (Schwab & Nimmerjahn 2013). In realtà l'attività terapeutica è relegata ad una piccola percentuale di IgG, ovvero a glicoforme che presentano la catena N-linked, legata all'Asn297, con una o entrambe le antenne terminanti con residui di acido sialico (Kaneko et al. 2006). Studi in vitro hanno

dimostrato che, in seguito al trattamento di IgG con Neuraminidasi, enzima che rimuove selettivamente l'acido sialico in posizione terminale, si ha la perdita dell'attività anti-infiammatoria IVIG-specifica (Böhm et al. 2012), mentre l'arricchimento di dosi di IVIG con IgG precipitate con SNA, (una lectina estratta da *Sambucus nigra*, che riconosce l'acido sialico in posizione $\alpha 2,6$), ne incrementa l'attività anti-infiammatoria (Kaneko et al. 2006). Da un punto di vista molecolare, l'attività anti-infiammatoria di IgG sialilate è legata all'interazione con il recettore dei macrofagi Fc γ RIIB (Fig.7) che è associato ad un'attività di tipo inibitorio (Böhm et al. 2012).

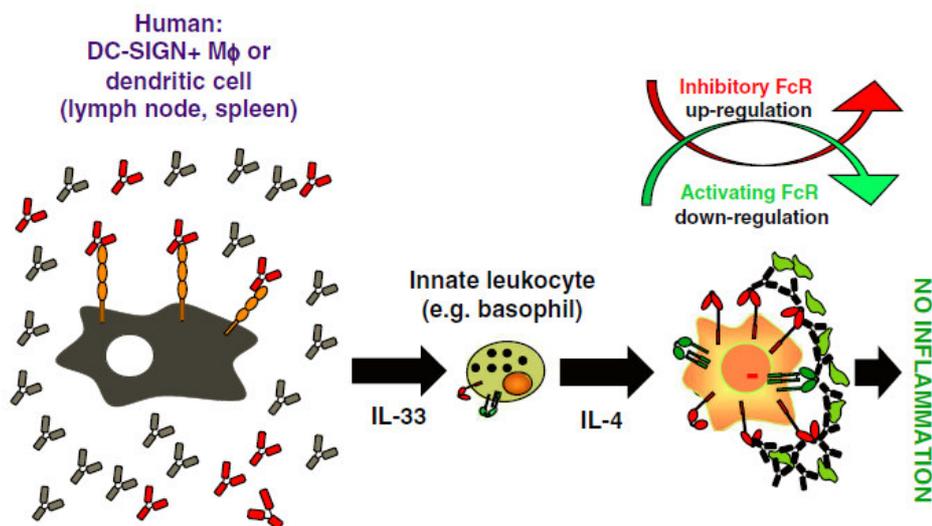


Fig.7: Effetto anti-infiammatorio di IgG sialilate. Le IgG sialilate riducono l'infiammazione attraverso un meccanismo che vede coinvolti i recettori DC-SIGN. Il legame di IgG sialilate ai recettori DC-SIGN sulle cellule dendritiche induce la produzione di IL-33, che a livello dei basofili, stimola la produzione di IL-4 e quindi un pathway Th2. L'IL-4 infine, stimola sui macrofagi l'esposizione di Fc γ RIIB (inibitori) e riduce quella di Fc γ R di tipo attivatorio. In seguito al legame del complesso autoantigene- anticorpo, tipico di malattie autoimmuni, l'abbondanza di Fc γ R inibitori blocca il processo infiammatorio. [Da: (Böhm et al. 2012)]

In particolare studi eseguiti su modelli murini indicano che la presenza di Fc γ RIIB su macrofagi o cellule della linea mieloide, presenti nel sito di infiammazione,

aumenta significativamente dopo trattamento con IVIG, mentre altre isoforme di Fc γ R di tipo attivatorio tendono a diminuire (Kaneko et al. 2006). Più nel dettaglio, il pathway indotto dalle IgG sialilate coinvolge, su cellule dendritiche, il recettore murino SIGNR1, ortologo del recettore umano DC-SIGN. Le IgG sialilate, ma non le de-sialilate, legano con grande affinità il recettore SIGNR1 e inducono il rilascio di Interleuchina 33 (IL-33) la quale stimola i basofili a produrre Interleuchina 4 (IL-4). L'effetto dell'IL-4 sui macrofagi è quello di stimolare l'esposizione di Fc γ RIIB (inibitorio) e inibire quella di Fc γ Rs di tipo attivatorio (Pricop et al. 2001; Nimmerjahn & Ravetch 2006). In tal modo, in seguito al legame del complesso autoantigene-anticorpo con i recettori Fc γ RIIB, a questo punto più abbondanti sui macrofagi attivati, riduce sensibilmente il processo infiammatorio (Fig.7).

Da quanto discusso finora, la sialilazione della porzione Fc conferirebbe alle IgG un'attività di tipo anti-infiammatoria che vede coinvolti il recettore DC-SIGN, i basofili e i recettori Fc γ di tipo inibitorio. Tuttavia tale visione viene messa in discussione da altri studi, sia su modelli murini che umani. Studi funzionali dimostrano che il grado di sialilazione non interferisce sulla capacità delle IgG di legare Fc γ Rs o DC-SIGN. In particolare è stato evidenziato che il legame di glicoformenti di IgG (di classe 1 e 3) de-sialate o agalattosilate ai polimorfonucleati (PMN), mediato dal recettore Fc γ RIIB (di tipo attivatorio), non risulta più basso rispetto alle isoforme native (Adler et al.) e che l'affinità tra la porzione Fc delle IgG e il recettore DC-SIGN sia indipendente dal grado di sialilazione, e più in generale di glicosilazione, della porzione Fc delle IgG (Yu et al. 2013). Studi più recenti, eseguiti su pazienti affetti da trombocitopenia autoimmune, patologia caratterizzata dalla opsonizzazione (IgG-dipendente) e successiva fagocitosi di

cellule del sangue da parte dei macrofagi, mostrano che, in seguito a IVIG, si ha riduzione della fagocitosi, non dipendente dal grado di sialilazione della porzione Fc delle IgG né da un incremento dell' espressione di Fc γ RIIb (Nagelkerke et al. 2014). Tali studi risultano in accordo con i dati ottenuti su un modello murino di trombocitopenia autoimmune: anche in questo caso dal confronto tra somministrazioni di IVIG arricchite di glicoforme de-sialilate o iper-sialilate non emerge alcun tipo di differenza sull'effetto clinico manifestato e, da un punto di vista molecolare, la somministrazione di alte dosi di IgG non provoca un incremento dell'mRNA di Fc γ RIIb a livello splenico, ma solo a livello del midollo osseo (Leontyev et al. 2012). Infine Campbell et al. hanno dimostrato, su un modello murino di artrite, che l'attività anti-infiammatoria delle IVIG non dipende dai basofili (Campbell et al. 2014).

2. SCOPO DELLA RICERCA

Scopo della ricerca è studiare lo stato di glicosilazione delle proteine plasmatiche con particolare riferimento alle IgG e indagare i possibili meccanismi alla base della loro alterata glicosilazione nell'invecchiamento. Abbiamo studiato l'attività di glicosiltransferasi plasmatiche, con particolare riferimento alla β 1,4GalT e ST6Gal1, in modo da valutare, sulla base della più recente letteratura (Wandall et al. 2014; Lee et al. 2014), un eventuale ruolo di queste isoforme plasmatiche nella glicosilazione delle IgG. Lo studio è stato eseguito su plasmi derivati da individui sani di ambo i sessi e di diversa età e, come modello di invecchiamento precoce, saranno utilizzati plasmi di soggetti ambo sessi, di diversa età e affetti da Sindrome di Down.

3. MATERIALI E METODI

3.1 MISURA DELL'ATTIVITA' DI GLICOSILTRANSFERASI PLASMATICHE

Misura dell'attività α 2,6sialiltrasferasica

L'attività α 2,6sialiltrasferasica (ST6GalT) veniva misurata utilizzando come accettore l'asialotransferrina. La de-sialilazione della transferrina veniva eseguita mediante una blanda idrolisi acida con acido solforico (H_2SO_4) 50mM per 1 h a 80°C. Il campione veniva poi dializzato e liofilizzato e successivamente risospeso in H_2O alla concentrazione di 20mg/ml. Per misurare l'attività ST6Gal-T1 veniva preparata una miscela di reazione che conteneva, in un volume finale di 50 μ l: 80 μ M tampone Na-cacodilato a pH 6.5, 5 μ M di CMP-acido sialico e 1 μ l di CMP-[3H]-acido sialico (0.001mCi/ml), 500 μ g di asialotransferrina come accettore glicoproteico e 5 μ l di plasma umano. Dopo 3h di incubazione a 37°C, la componente glicoproteica veniva precipitata aggiungendo 1ml di acido fosfotungstico (FTA) 1%. Il precipitato ottenuto veniva lavato due volte con FTA 1% e una con metanolo, risospeso in HCl 1M e infine bollito per 15 min. La radioattività presente nelle glicoproteine, misura diretta dell'attività della ST6Gal-T1, veniva rilevata mediante l'utilizzo dello scintillatore *Guardian 1414 Liquid Scintillation Counter (PerkinElmer)*.

Misura dell'attività β 1,4galattosiltrasferasica

L'attività β 1,4galattosiltrasferasica (β 1,4Gal-T) veniva misurata su 5 μ l di plasma umano utilizzando, come accettore ovalbumina estratta da uovo di pollo. La reazione veniva eseguita in un volume finale di 20.5 μ l e contenente: 97.5mM Tris/HCl pH 8, 9.75mM Mn₂Cl, 4.9mM CDP-Colina, 1 μ l di UDP-[³H]-galattosio (0.025mCi/ml), 0.4mM ATP e 550 μ g di ovalbumina. Dopo 3h di incubazione a 37°C la rilevazione della radioattività associata all'accettore glicoproteico veniva eseguita come descritto in precedenza per l'attività ST6Gal1.

3.2 STUDIO DELLO STATO DI GLICOSILAZIONE DELLE IgG

Isolamento di proteine plasmatiche sialilate mediante precipitazione con SNA-agarose

A 400 μ l di plasma umano venivano aggiunti 100 μ l di PBS contenente 1% NONIDET-P40, 1% acido deossicolico e inibitori di proteasi. In seguito, venivano aggiunti 20 μ l di una soluzione SNA-biotina (2mg/ml) (Vector Laboratories) e il campione veniva incubato per 5h a 4°C in agitazione. Venivano poi aggiunti 50 μ l di Streptavidina-Agarose (1mg/ml) (Vector Laboratories) e il campione veniva incubato *overnight* a 4°C in agitazione. Dopo centrifugazione il pellet ottenuto veniva lavato 3 volte con PBS contenente 1% NONIDET-P40, 1% acido deossicolico e inibitori delle proteasi e una con Tris-HCl 50mM/NaCl 15mM. In seguito a centrifugazione il campione veniva risospeso con 70 μ l di H₂O e 50 μ l di

sample buffer riducente e incubato a 60°C per 15min, prima di sottoporlo ad elettroforesi secondo il metodo di Laemmli (Laemmli 1970).

Identificazione di proteine SNA-positive mediante MALDI-TOF/TOF

Le bande di interesse venivano isolate dal gel e processate per l'analisi MALDI MS, eseguita presso l'Unità di Proteomica dell'IPATIMUP (Università di Porto), al fine di identificare le proteine in esse contenute. Le bande escisse dal gel venivano lavate, decolorate (nel caso in cui fossero state precedentemente colorate con Blue Comassico), digerite con Tripsina e i peptidi venivano estratti secondo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice della Tripsina (Promega, USA). Le proteine digerite venivano desalinizzate, concentrate e caricate sulla piastra del MALDI usando ZipTips (Millipore, USA) seguendo le indicazioni del produttore. Per la preparazione della matrice veniva utilizzata una soluzione di 6-8mg/ml di acido α -ciano-4-idrossicinnamico in 50%ACN/0.1%TFA. I campioni venivano analizzati utilizzando un 4700 Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF (AB SCIEX, USA). I dati relativi alla *peptide mass fingerprint* (PMF) venivano acquisiti in un riflettore positivo MS in un range di 700-4000 (m/z) e la calibrazione interna dello strumento veniva eseguita utilizzando picchi derivati dall'autolisi della tripsina. Se necessario, per l'analisi MS/MS, venivano selezionati degli altri picchi, di più alta intensità, non derivati dalla digestione con tripsina. Gli spettri MS e MS/MS venivano analizzati utilizzando il software GPS Explorer (Version 3.6, AB SCIEX, USA) e, utilizzando il *Mascot search engine* (Version 2.1.04, Matrix Science, UK), le sequenze venivano ricercate nei seguenti database: UniProtKB/Swiss-Prot, UniProtKB/TrEMBL e NCBI *Inr*. L'inclusione del picco avveniva solo se il rapporto tra il segnale/rumore di fondo era maggiore di 10. L'associazione tra il picco ottenuto e la proteina identificata avveniva con

un intervallo di confidenza (CI), calcolato con il software AB SCIEX GPS, di almeno il 99%.

Lectin-blot

Le proteine contenute in 10µl di plasma umano, diluito 100X, venivano separate mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti e riducenti secondo il protocollo di Laemmli (1970). In ogni gel venivano caricate due quantità note (2,5 e 5 µg) di IgG standard (Sigma), necessarie per normalizzare l'intensità del segnale. Le proteine così separate venivano trasferite su membrana di nitrocellulosa. Il blocco dei siti aspecifici era eseguito a temperatura ambiente incubando il filtro per 1h con una soluzione di BSA 3% in PBS contenente Tween-20 0,1% (PBS-T). I lavaggi del filtro, dopo ogni incubazione, venivano effettuati con PBS-T e le soluzioni di lectine e/o di anticorpo secondario venivano diluite in PBS-T contenente BSA 10mg/ml. Si eseguivano due lavaggi da 10min ciascuno seguiti dall'incubazione con la lectina digossigenilata. Per identificare le diverse strutture glicidiche sono state utilizzate le seguenti lectine: A seconda del tipo di indagine, le lectine utilizzate sono state le seguenti: *Sambucus nigra* (SNA), *Griffonia simplicifolia II* (GSII), *Erythrina cristagalli* (ECL), *Ulex Europeans I* (UEA), *Phaseolus vulgaris erythroagglutinin* (PHA-E) [Vector Laboratories]. Le incubazioni con le lectine venivano eseguite in tutti i casi per 1h a temperatura ambiente, con soluzioni d'uso 0.5µg/ml. Si proseguiva con 2 lavaggi da 10 minuti ciascuno e infine si eseguiva, per 1h a temperatura ambiente, l'incubazione con anti-digossigenina coniugata con la perossidasi. Dopo 2 lavaggi si procedeva con la rilevazione del segnale con SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific). L'intensità del segnale corrispondente alla catena pesante delle IgG veniva

quantificato spettrofotometricamente e normalizzato con quello delle quantità note di IgG standard, ottenendo un valore assoluto che consentiva la comparazione di gel diversi.

Digossigenilazione di lectine

Le lectine da noi utilizzate per l'analisi lectin blot, venivano preventivamente coniugate con Digossigenina. Le lectine venivano risospese in H₂O alla concentrazione 1mg/ml e ad ogni ml di soluzione venivano aggiunti 9µl di una soluzione di Digossigenina (41mg/ml in etanolo). Dopo 2h di incubazione a temperatura ambiente, si dializzava esaustivamente.

3.3 GLYCOAGE TEST

Il GlycoAge test viene calcolato in seguito allo studio del profilo degli N-glicani legati a glicoproteine plasmatiche effettuato mediante DSA-FACE (*DNA Sequencer-assisted fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis*) come descritto da Callewaert *et al.* (Callewaert et al. 2001). La procedura è suddivisa in 5 steps: deglicosilazione delle glicoproteine plasmatiche mediante l'enzima N-glicosidasi F (PNGasi F), derivatizzazione con acido 8-ammino-1,3,6-PireneTriSolfonico (APTS), desialilazione delle catene N-linked mediante Neuraminidasi, separazione delle specie glicaniche mediante un sequenziatore di DNA e analisi dei dati. La procedura sopra descritta veniva eseguita secondo il metodo messo a punto da Vanhooren *et al.* (Vanhooren et al. 2008). Il GlycoAge test veniva inteso come il rapporto tra la concentrazione di catene N-linked agalattosilate (NGA2F) e di-galattosilate (NA2F), in entrambi i casi *core fucosilated* (Vanhooren et al. 2010).

4. RISULTATI

4.1 ATTIVITA' ST6Gal1 e β 1,4GalT IN PLASMA UMANO DI SOGGETTI SANI

Su un campione di 123 plasmi, derivati da individui sani di entrambi i sessi e di diversa età, è stata misurata l'attività di due glicosiltrasferasi che intervengono nelle fasi finali di biosintesi di catene N-linked: la α 2,6sialiltrasferasi (ST6Gal1) e la β 1,4galattosiltrasferasi (β 1,4GalT).

La ST6Gal1 catalizza il trasferimento di un residuo di acido sialico a livello di un residuo di galattosio terminale, mentre la β 1,4GalT trasferisce ad un residuo di GlcNAc terminale, un residuo di galattoso.

La popolazione analizzata è stata suddivisa in cinque classi di età: **a)** bambini di età compresa fra i 5 e i 12 anni; **b)** giovani tra i 24 e i 39 anni; **c)** adulti tra i 40 e i 60 anni ; **d)** anziani di età compresa fra i 61 e 80 anni ed **e)** over 80, comprensivi dei centenari (età > 98anni).

Dai dati ottenuti si evince che le attività di entrambe le glicosiltransferasi sono in relazione con l'età, sebbene con modalità differenti (Fig. 8A e C).

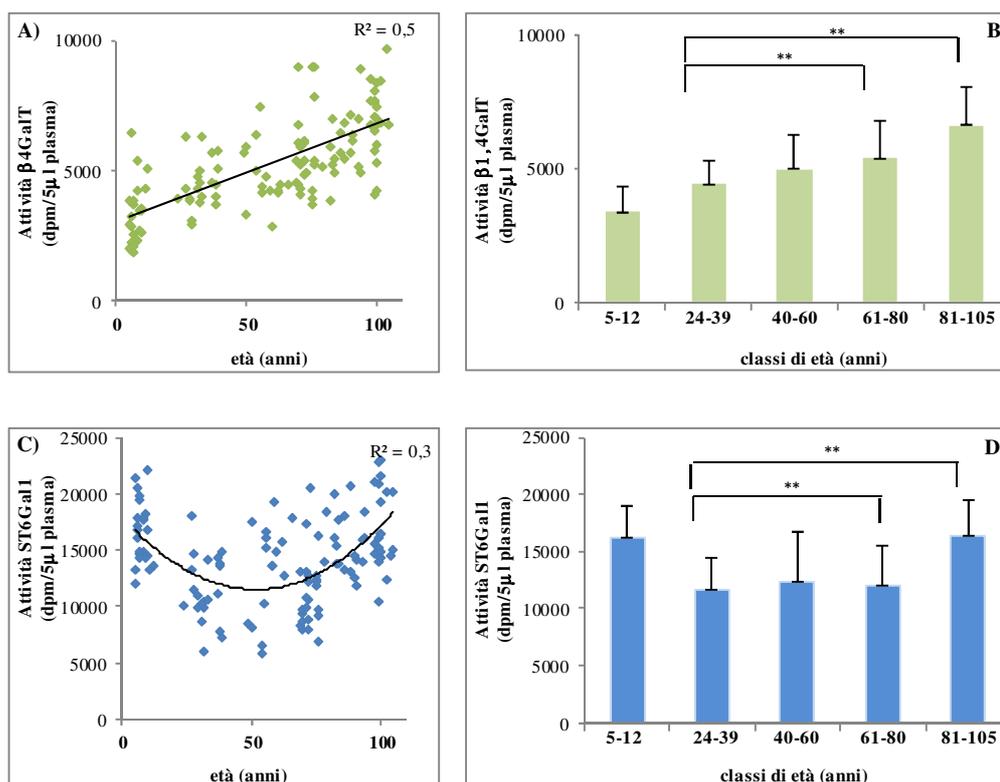


Fig. 8: Attività di glicosiltransferasi plasmatiche misurate in soggetti sani di diversa età. L'attività β 1,4GalT e ST6GalI sono state misurate in 5 μ l di plasma derivato da soggetti sani di età compresa tra 5 e 105 anni. L'attività β 1,4GalT mostra una relazione di tipo lineare con l'età (A) al contrario di quanto osservato per l'attività ST6GalI (C). I valori massimi e minimi di attività β 1,4GalT si riscontrano negli over-80 e nei bambini rispettivamente (B), mentre l'attività ST6GalI resta costante in tutte le classi di età ad eccezione dei bambini e degli over-80 in cui si registrano i valori massimi (D) (** Differenze statistiche misurate con il test T di Student; $p < 0.01$).

In particolare l'attività galattosiltransferasica cresce linearmente con l'età (Fig. 8 A) mostrando valori minimi nei bambini e massimi negli over 80 (Fig. 8B). Al contrario l'attività sialiltransferasica, non correla linearmente con l'età (Fig. 8C), i valori massimi sono associati alle classi a) ed e) mentre per tutte le altre fasce d'età l'attività tende a restare pressoché costante e risulta essere più bassa di circa il 30% rispetto a quanto osservato nei bambini e negli over 80 (fig. 8D).

4.2 ATTIVITA' ST6Gal1 E β 1,4GalT IN PLASMA UMANO DI SOGGETTI AFFETTI DA SINDROME DI DOWN

L'attività enzimatica della ST6Gal1 e β 1,4GalT sono state misurate su plasmi derivati da soggetti affetti da sindrome di Down (SD), in quanto tale condizione patologica è considerata un buon modello di invecchiamento precoce. La popolazione analizzata è stata suddivisa in due classi di età : < 30anni e > 30anni. I giovani affetti da SD (< 30anni) mostrano un'attività β 1,4GalT inferiore di circa il 20% rispetto a quanto osservato per il gruppo > 30 anni (Fig. 9A), mentre l'attività ST6Gal1 tende ad aumentare in modo statisticamente significativo di circa il 20% nei gruppo di età > 30 anni (Fig.9B).

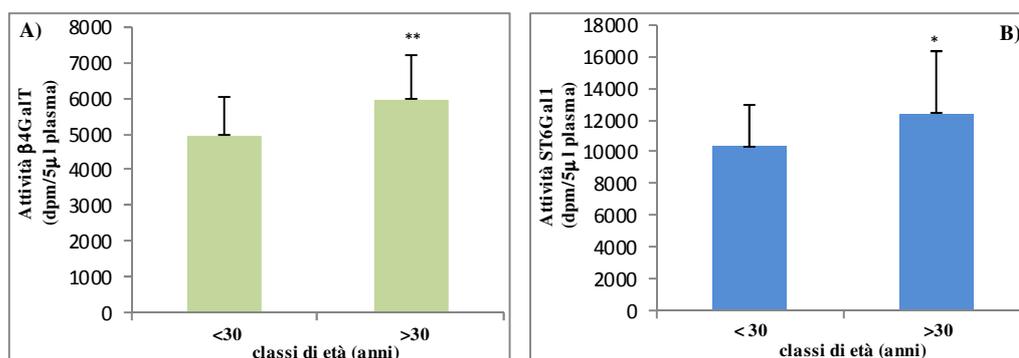


Fig. 9: Attività di glicosiltransferasi plasmatiche in soggetti di diversa età affetti da Sindrome di Down. L'attività β 1,4GalT e ST6Gal1 sono state misurate in 5 μ l di plasma. Entrambe le attività enzimatiche aumentano del 20% in soggetti di età superiore ai 30 anni e affetti da Sindrome di Down. * Differenze statistiche misurate mediante il test T di Student per campioni indipendenti tra soggetti con Sindrome di Down di età < 30 anni o > 30 anni (*p<0.05; **p<0.01)

Dal confronto con la popolazione sana, emerge che il gruppo SD < 30 anni mostra valori di attività galattosiltransferasica simili a quanto osservato in soggetti sani di età compresa tra i 40 e i 60 anni (Fig. 8B), mentre l'attività β 1,4GalT misurata in soggetti SD e con più di 30 anni è paragonabile a quanto riscontrato nella popolazione anziana (< 80 anni) ma non negli over-80 (Fig.8B). Per quanto

riguarda l'attività ST6Gal1, i valori ottenuti per soggetti SD con età > 30anni sono paragonabili a quanto misurato in soggetti sani nelle fasce d'età che vanno dai 24 agli 80 anni (Fig. 8D).

4.3 ATTIVITA' ST6Gal1 E β 1,4GalT IN PLASMA UMANO IN FIGLI DI CENTENARI

Al fine di valutare se eventuali modifiche dell'attività enzimatica potessero essere associate ad un particolare background genetico associato alla longevità, le attività plasmatiche dei due enzimi (ST6Gal1 e β 1,4GalT) sono state misurate in individui di età media pari a 70 anni caratterizzati dall'aver almeno un genitore sopravvissuto oltre l'aspettativa di vita relativa al periodo in cui viveva (longevo). Tale gruppo è stato classificato come "figli di centenari". I dati ottenuti sono stati poi confrontati con i relativi controlli, ossia individui di età paragonabile ai figli di centenari, che condividevano lo stesso ambiente di vita, ma differivano solamente per non avere genitori longevi.

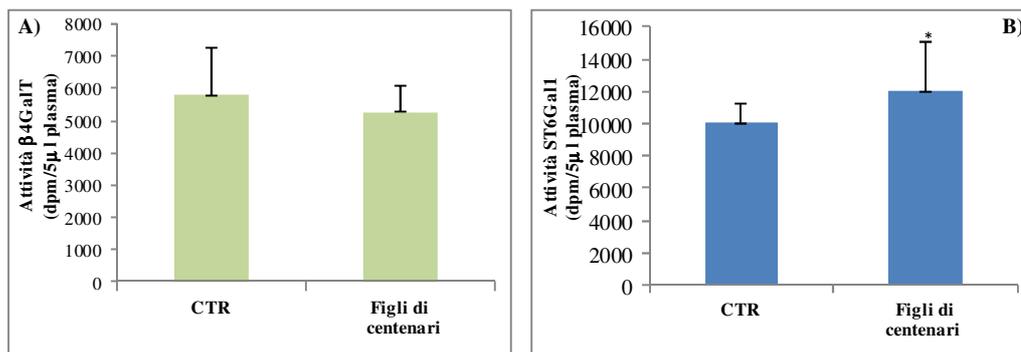


Fig. 10: Attività di glicosiltransferasi plasmatiche misurate in figli di centenari e controlli. L'attività β 1,4GalT e ST6Gal1 sono state misurate in 5µl di plasma. L'attività β 1,4GalT non mostra variazioni significative tra i due gruppi analizzati (A), mentre l'attività ST6Gal1 risulta più elevata nei figli di centenari di circa il 20% rispetto ai controlli (B). * Differenze statistiche misurate mediante il test T di Student per campioni indipendenti tra figli di centenari e relativi controlli (p < 0.05).

Come mostrato in Fig. 10A, l'attività galattosiltrasferasica risulta essere paragonabile tra i due gruppi analizzati, mentre l'attività sialiltrasferasica è più alta di circa il 20 % nei figli di centenari rispetto ai controlli (Fig. 10B).

4.4 CORRELAZIONE TRA GlycoAge test E GLICOSILTRANSFERASI PLASMATICHE

Il GlycoAge test è una misura del rapporto tra catene N-linked agalattosilate e digalattosilate associate a glicoproteine plasmatiche ed è riconosciuto come un ottimo marcatore di invecchiamento. In Fig 11A viene infatti mostrata la relazione tra il GlycoAge test, misurato su un campione di 125 individui di età compresa tra i 5 e i 105 anni, e l'età anagrafica. La correlazione risulta essere lineare e molto significativa ($R^2 = 0,6$).

Tale relazione con l'età è diversa rispetto a quanto osservato per le due glicosiltrasferasi analizzate in precedenza (Fig.11 A) e non si ha una relazione significativa tra il GlycoAge test e l'attività ST6Gal1 (Fig. 11D), mentre si osserva una debole e poco significativa relazione di tipo lineare con l'attività galattosiltrasferasica (Fig.11C). Inoltre, sebbene entrambe le glicosiltrasferasi siano in relazione, anche se con modalità differenti, con l'età, il dot-plot in Fig. 11B in cui si correlano le attività ST6Gal1 e β 1,4GalT, mostra una completa indipendenza tra i due enzimi.

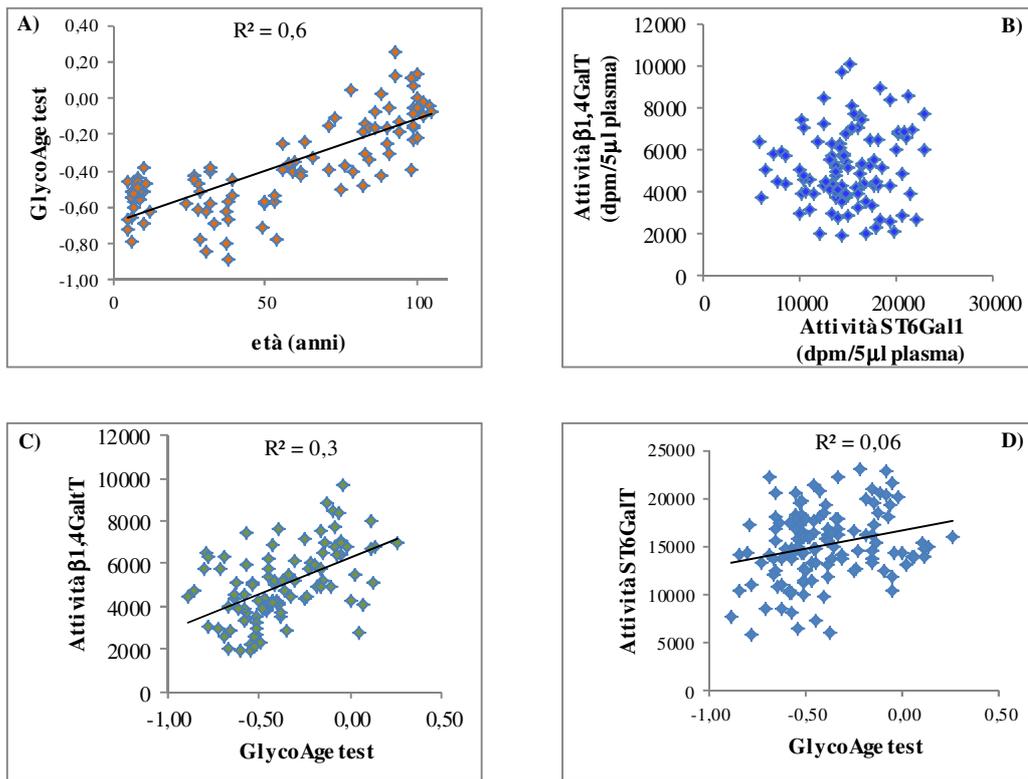


Fig.11 : Relazione tra glicosiltransferasi e tra attività $\beta 1,4\text{GalT}$ e ST6GalT con il GlycoAge test. Il GlycoAge test è in relazione lineare e molto significativa con l'età (A). L'attività delle due glicosiltransferasi misurate nel plasma di soggetti di diversa età non mostrano alcun tipo di correlazione (B). Studi di correlazione indicano che il GlycoAge non è in relazione con l'attività ST6GalI (C), ma solo e debolmente, con l'attività $\beta 1,4\text{GalT}$ ($R^2 = 0.3$).

Tale risultato indica chiaramente che il meccanismo alla base dell'attività dei due enzimi plasmatici sia differente.

I nostri dati dimostrano che, pur basandosi su meccanismi diversi, tutti e tre questi marcatori misurano indipendentemente diverse condizioni fisio-patologiche legate all'età.

4.5 ANALISI DELLO STATO DI GLICOSILAZIONE DI IgG MEDIANTE L'UTILIZZO DI LECTINE

Le lectine sono proteine di origine vegetale in grado di riconoscere particolari strutture glucidiche. In particolare la lectina estratta dal *Sambucus nigra* (SNA) riconosce in modo specifico l'acido sialico legato in posizione α 2,6 e può fornire una misura indiretta dell'attività dell'enzima ST6Gal1, in quanto ne misura il prodotto. Le proteine plasmatiche sono state separate mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide e successivamente analizzate mediante lectin-blot con SNA. L'analisi ha rilevato una serie di discreta di bande reattive all'SNA (Fig. 12A) che sono state poi isolate dal gel e successivamente identificate e caratterizzate mediante MALDI-TOF. Dall'analisi mediante spettrometria di massa è emerso che le principali bande SNA-reattive sono le seguenti: trombospondina, catena pesante delle IgM, catene β e γ del fibrinogeno e catena pesante delle IgG (Fig. 12A).

Plasmi di individui di età e sesso diversi sono stati analizzati mediante lectin-blot con l' SNA per valutare se il grado di sialilazione delle proteine identificate mediante MALDI-TOF venisse modificato con l'età. Dall'analisi è emerso che il grado di sialilazione risulta modulato solo per quanto riguarda le catene pesanti delle IgG. In particolare, come mostrato in Fig. 12B mentre per tutte le glicoproteine plasmatiche il grado di sialilazione è indipendente dall'età, per le catene pesanti delle IgG, si ha, nei giovani, un aumento della reattività all'SNA rispetto a quanto osservato nella popolazione anziana.

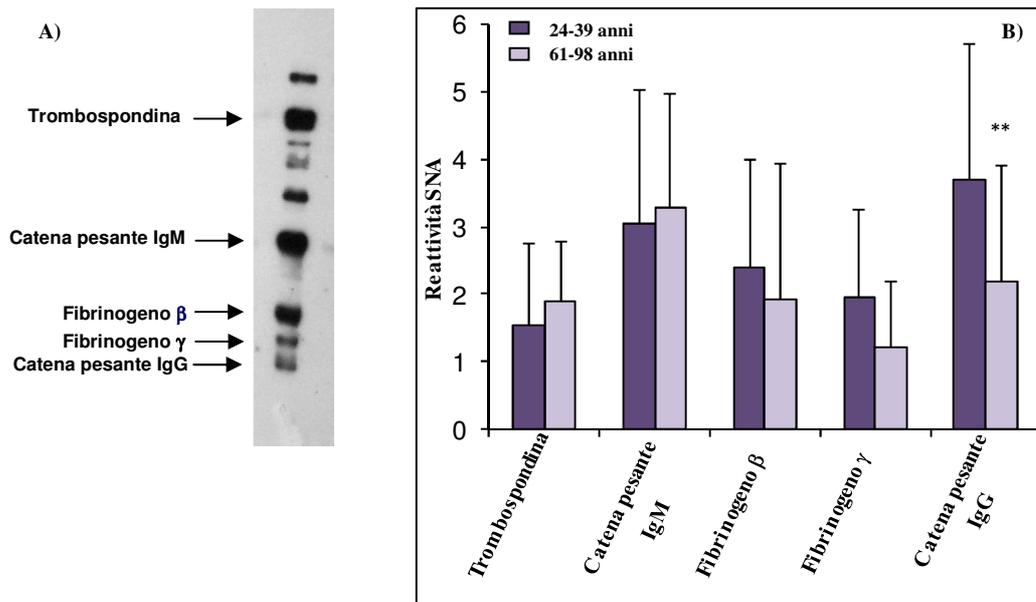


Fig.12 : Studio dell' α 2,6sialilazione di glicoproteine plasmatiche. In figura A viene riportato un lectin-blot mediante SNA di plasma umano diluito 100X. Le principali bande SNA reattive sono state isolate dal gel e caratterizzate mediante spettrometria di massa. Dall'alto verso il basso le principali glicoproteine α 2,6 sialilate sono risultate essere : trombospondina, catena pesante delle IgM, catene β e γ del fibrinogeno e catena pesante delle IgG. Lo stato di sialilazione delle glicoproteine plasmatiche è stato studiato su plasmi di individui di età e sesso diversi (B). L'istogramma riporta i valori misurati nella popolazione giovane (■, 24-39 anni) e negli anziani (□, 61-98anni). Solo per quanto riguarda le catene pesanti delle IgG si assiste ad una modulazione del livello di sialilazione statisticamente significativa (** Significatività statistica misurata con il Test T di Student per campioni indipendenti; $p < 0.01$).

Sulla base dei dati ottenuti mediante l'impiego dell'SNA per valutare lo stato di sialilazione di glicoproteine plasmatiche, lo studio è stato esteso ad altre strutture glucidiche che possono caratterizzare le catene N-linked delle IgG e che hanno una valenza funzionale nel conferire attività pro- o anti-infiammatoria alle IgG stesse. In particolare il grado di galattosilazione è stato studiato mediante la lectina *Erythrina cristagalli* (ECL) che riconosce il galattoso in posizione terminale; la *Griffonia simplicifolia II* (GSII) è stata utilizzata come misura diretta delle IgG-G0 in quanto riconosce un residuo di GlcNAc terminale, la *Ulex europaeus* I (UEA) riconosce un residuo di α -fucosio ed è stata pertanto utilizzata come misura del grado di fucosilazione delle IgG ed infine la *Phaseolus vulgaris* *Erythroagglutinin* (PHA-E) come rilevatore della bisecting GlcNAc.

La popolazione analizzata, di ambo i sessi, è stata suddivisa in quattro classi di età: **a)** giovani tra i 24-39 anni; **b)** adulti tra i 40 e 60 anni; **c)** anziani di età compresa fra i 61 e 93 anni e **d)** centenari (età > 98 anni).

Come mostrato in Fig. 13 A su un campione di 82 individui, la massima concentrazione di IgG sialilate la si osserva solo nella popolazione giovane, mentre in tutte le restanti classi di età il grado di sialilazione delle IgG risulta più basso di circa il 50% (Fig. 13 A). La reattività all'ECL risulta anch'essa massima tra i giovani decrescendo gradualmente nelle restanti classi di età e raggiungendo i valori minimi tra i centenari (Fig. 13B). Al contrario la reattività delle IgG alla GSII mostra un andamento opposto rispetto a quanto osservato per la ECL, infatti si ha una minima reattività tra i giovani che aumenta gradualmente nelle altre classi di età per raggiungere i massimi valori nei centenari (Fig. 13C). Lo stato di fucosilazione e la presenza della *bisecting* GlcNAc sono state valutate su un campione più ristretto, di 55 individui di diversa età e sesso e i dati ottenuti, mostrati nelle Fig. 13 D ed E. La presenza di IgG fucosilate è massima nei giovani e minima in tutte le altre classi di età (Fig. 13D), mentre la reattività alla PHA-E non sembra essere influenzata dall'età, sebbene si osservi una tendenza, non statisticamente significativa, a decrescere con l'aumentare dell'età (Fig. 13E).

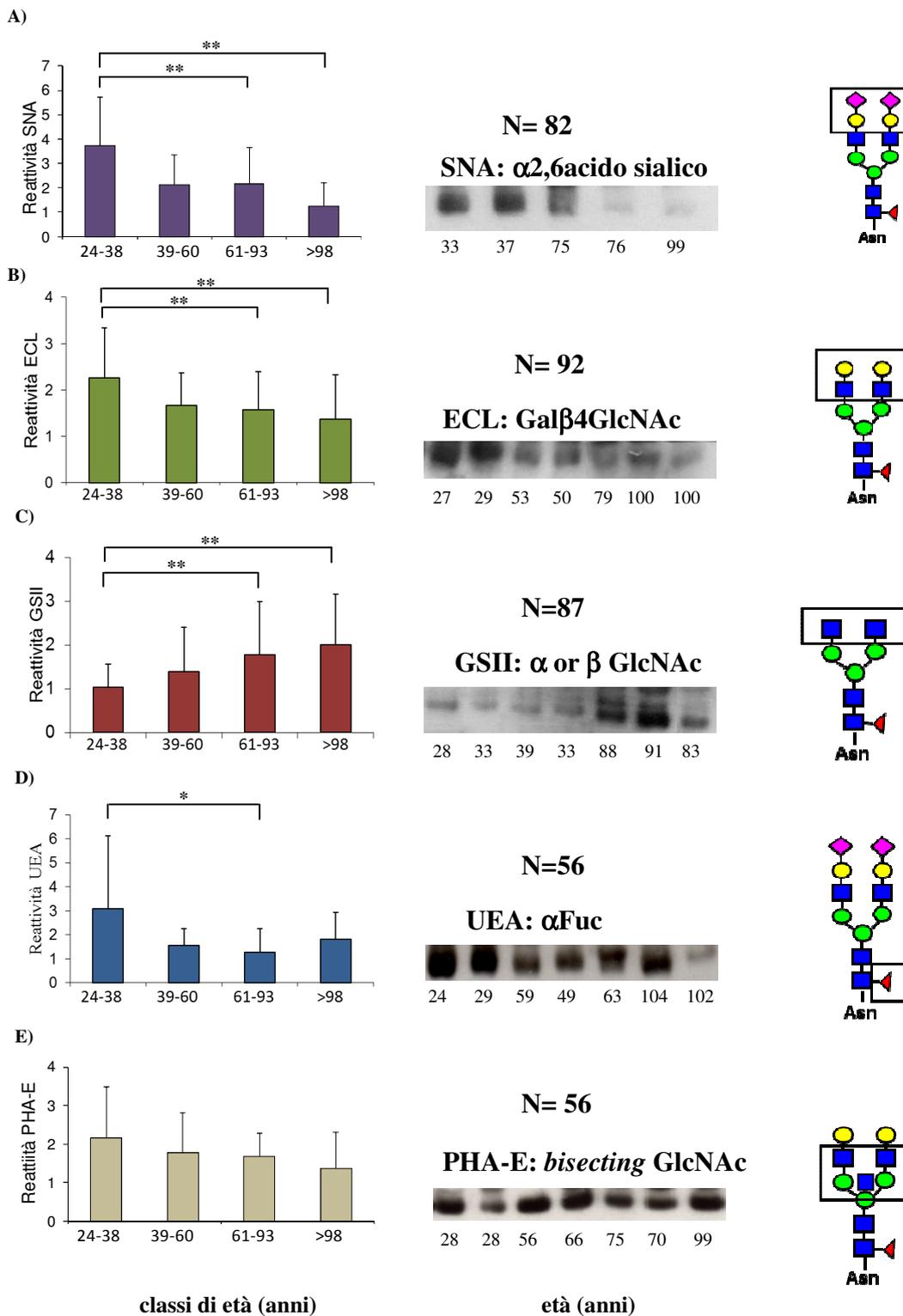


Fig.13 : Studio del grado di glicosilazione della catena pesante delle IgG mediante l'uso di lectine. Da sn., per ogni lectina vengono riportati: l'istogramma rappresentante la reattività della catena pesante delle IgG alla lectina in ciascuna classe di età, un lectin blot rappresentativo dove viene indicato con N il numero dei plasmi analizzati e, infine lo schema della struttura glicanica riconosciuta dalla lectina utilizzata. Vengono riportati i valori relativi al grado di sialilazione con SNA (A), galattosilazione con ECL (B), agalattosilazione con GSII (C), fucosilazione con UEA (D) e presenza della *bisecting* GlcNAc nella porzione Fc delle IgG con PHA-E (E).(*p<0.05;**p<0.01)
(Legenda: ■N-acetilglucosammina; ●Mannosio; ●Galattosio; ▲Fucosio; ◆Acido sialico).

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le glicoproteine sono proteine a cui sono state aggiunte una o più catene glucidiche mediante il processo di glicosilazione. Il ruolo degli zuccheri è fondamentale nella fine regolazione delle diverse funzioni biologiche delle glicoproteine. Un esempio molto chiaro di quanto detto è fornito dalle IgG, in cui la presenza di catene di zuccheri assume un significato funzionale rilevante nella regolazione delle funzioni effettrici della molecola anticorpale. In particolare, il principale sito di N-glicosilazione delle IgG è nella porzione Fc sul residuo altamente conservato Asn297 e presenta una grande microeterogeneità. La catena N-linked, situata in corrispondenza dell' interfaccia CH2-CH3, è di tipo bi-antennario e può terminare con 1 o 2 residui di: a) acido sialico; b) galattosio o c) GlcNAc. La struttura può contenere inoltre il *core fucose*, ovvero un residuo di fucosio legato alla GlcNAc direttamente legata al residuo di Asn oppure può contenere la *bisecting GlcNAc*, ossia un residuo di GlcNAc legato al Man centrale con legame β 1,4. Le diverse strutture glucidiche che possiamo ritrovare associate alla porzione Fc delle IgG hanno un significato funzionale molto importante che si ripercuote sulla capacità di indurre una risposta di tipo pro- o anti- infiammatoria. La glicosilazione dell'Asn297 regola in particolare la capacità delle IgG di: 1) attivare il complemento; 2) legare i recettori Fc γ e 3) interagire con cellule APC. In particolare, la galattosilazione delle IgG, gioca un ruolo fondamentale sia nell'attivazione del complemento sia nel legame alle cellule APC. Infatti la perdita del Gal in posizione terminale su una o entrambe le antenne garantisce l'interazione con la MBL (proteina legante il mannosio) con una forza almeno 5 volte superiore rispetto alle IgG normo-glicosilate e induce la cascata del

complemento attraverso la via lectinica (Malhotra et al. 1995). L'esposizione della GlcNAc terminale, in seguito a perdita del Gal, conferisce alle IgG un'attività pro-infiammatoria sia mediata dai recettori leganti il Man (analoghi della MBL) posti su macrofagi e cellule dendritiche (Dong et al. 1999), sia mediante il legame a cellule dendritiche attraverso DC-SIGN (Yabe et al. 2010). Infine il grado di galattosilazione influisce anche sulla capacità delle IgG di formare aggregati, infatti le IgG-G0 tendono molto più agevolmente ad aggregarsi tra loro. Sebbene molto dibattuta, la sialilazione della porzione Fc sembra conferire alle IgG un'attività di tipo anti-infiammatorio, che vede coinvolti il recettore DC-SIGN sulle cellule dendritiche, i basofili ed i recettori Fc γ RIIa dei macrofagi (Kaneko et al. 2006). Anche il legame diretto IgG-recettori Fc γ è influenzato dalla glicosilazione ed in particolare dal grado di galattosilazione e di fucosilazione: la perdita del Gal, induce cambi conformazionali della struttura della molecola facilitandone il legame a forme attivatorie di Fc γ Rs (Krapp et al. 2003), mentre la perdita di fucosio promuove la ADCC (citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente), favorendo l'interazione con Fc γ RIIIa (Shields et al. 2002) e, in entrambi i casi, il risultato finale è la promozione del processo infiammatorio.

Il ruolo biologico delle glicosiltransferasi plasmatiche è stato lungamente dibattuto, in particolare non sembrava possibile un loro coinvolgimento nel processo di glicosilazione in quanto si riteneva che solo all'interno della cellula e nello specifico nel RER o nel Golgi la concentrazione di nucleotidi zuccheri fosse sufficiente per far avvenire le reazioni di biosintesi. Tuttavia, studi recenti, condotti indipendentemente da due gruppi di ricerca, indicano chiaramente le piastrine come ottimi donatori di nucleotidi zuccheri unitamente alla possibilità di un meccanismo di glicosilazione ecto-cellulare in presenza di piastrine attivate che riversino in circolo il contenuto dei loro granuli (Wandall et al. 2014; Lee et

al. 2014). In particolare gli studi condotti da Lee et al. hanno preso in considerazione la sialilazione di proteine circolanti mediata dalla ST6Gal1 plasmatica.

Topi knock out per il promotore epatico della ST6Gal1, mostrano una normale espressione della ST6Gal1 in tutti i tessuti, inclusi i linfociti, ma non nel fegato e nel sangue dove invece è fortemente ridotta. In questi topi, non si osserva l'aumento della sialilazione delle IgG associato all'infiammazione cronica e ciò suggerisce che la ST6Gal1 plasmatica, che è principalmente di origine epatica, giochi un ruolo principale nella α 2,6-sialilazione extracellulare delle IgGs (Appenheimer et al. 2003). Alla luce degli ultimi dati riportati in letteratura sulla possibilità di una forma di glicosilazione ecto-cellulare delle proteine plasmatiche, in questo lavoro è stato valutato se vi fosse una relazione tra i livelli di attività di glicosiltransferasi plasmatiche e le strutture da esse potenzialmente sintetizzate sulle IgG. Sono state, pertanto valutate le attività degli enzimi plasmatici ST6Gal1 e β 4GalT per valutare un loro coinvolgimento nell'alterata glicosilazione delle IgG nell'invecchiamento. Dal nostro studio emerge che l'attività di entrambi gli enzimi correla, sebbene in modo differente, con l'età anagrafica. Infatti mentre l'attività β 4GalT correla in modo lineare con l'età, dai bambini fino agli ultracentenari, la ST6GalT resta costante in tutte le fasce d'età ad eccezione dei bambini e di soggetti con più di 80 anni in cui l'attività sialiltransferasica è massima. Entrambi gli enzimi non hanno mostrato una relazione positiva con le strutture glucidiche potenzialmente frutto della loro attività transferasica, infatti con l'età, il grado di galattosilazione e di sialilazione delle IgG diminuisce drasticamente al contrario di quanto osservato per le attività delle glicosiltransferasi ST6GalT e β 4GalT . ciò non depone a favore di un ruolo rilevante della ecto-glicosilazione nel determinare lo stato di glicosilazione delle

IgG umane. Inoltre, tra le attività dei due enzimi non è stata trovata alcun tipo di correlazione, indicando quindi che il meccanismo alla base del loro rilascio nel plasma sia diverso così come il loro significato biologico. Un dato interessante è quello relativo alla presenza dei due enzimi nel plasma la cui presenza risulta correlata a processi infiammatori. Condizioni infiammatorie sono associate sia a diminuzione dei livelli plasmatici della β 4GalT (Alavi et al. 2004) che all'aumento dei livelli di ST6Gal1 (Kaplan et al. 1983). In particolare la ST6GalT è una proteina di fase acuta la cui espressione è sotto il controllo del promotore epatico P1, regolato a sua volta dai glucocorticoidi (Wang et al. 1990) e dall'IL-6 (Dalziel et al. 1999). Studi su topi knock-out per il gene della ST6Gal1 hanno messo in evidenza un'aumentata presenza di neutrofili in risposta a stimoli infiammatori (Appenheimer et al. 2003). La forma epatica di ST6Gal1 gioca, infatti, un ruolo fondamentale nella sialilazione delle cellule staminali emopoietiche, riducendo di fatto la presenza di neutrofili in circolo in seguito a stimoli infiammatori, abbassando di conseguenza il grado di infiammazione (Jones et al. 2010; Nasirikenari et al. 2006; Nasirikenari et al. 2014). In accordo con quanto detto, la ST6Gal1 epatica/plasmatica sarebbe associata ad un ruolo anti-infiammatorio in quanto capace di contenere il processo infiammatorio. Traslando sull'uomo i risultati ottenuti sul topo knock-out possiamo dunque ipotizzare che la presenza della ST6Gal1 nell'anziano potrebbe contenere e contrastare gli effetti negativi dell'*Inflammaging*. Tale visione è in accordo con quanto osservato nei figli di centenari dove osserviamo un incremento dei valori di ST6Gal1 rispetto ai controlli.

L'analisi lectinica del grado di glicosilazione delle IgG indica che nell'invecchiamento si assiste ad una maggiore presenza di isoforme iposialilate, agalattosilate, prive del *core fucose* e terminanti con la GlcNAc e tali dati

risultano in accordo con la letteratura (Parekh et al. 1988; Vanhooren et al. 2007; Vanhooren et al. 2008; Vanhooren et al. 2010; Ruhaak et al. 2011). Lo studio del grado di glicosilazione effettuato mediante l'uso di lectine mostra, rispetto ad altre tecnologie, diversi vantaggi: a) ci permette di valutare in maniera univoca cambi nella glicosilazione associati solo alla catena pesante delle IgG, riducendo pertanto la variabilità associata alle catene N-linked di altre glicoproteine plasmatiche più abbondanti che non mostrano variazioni significative dipendenti dall'età. In questo lavoro, mediante l'analisi in lectin blot con SNA, su plasma intero, è stato infatti dimostrato come il grado di sialilazione della sola catena pesante delle IgG sia dipendente dall'età; b) lo studio con le lectine fornisce una risposta univoca riguardo la presenza/assenza di una determinata struttura glucidica, facilitando pertanto l'identificazione di modelli associati all'invecchiamento. È grazie a questo tipo di approccio che abbiamo trovato strutture glicaniche associate all'età come la riduzione del *core fucose* in soggetti di età superiore ai 40 anni.

Il meccanismo alla base della presenza di IgG-G0 nell'anziano non è stata chiarita e probabilmente è multifattoriale. Studi sui linfociti B di pazienti affetti da Artrite reumatoide giungono a conclusioni contrastanti. Alcuni lavori indicano una diminuzione dell'attività β 1,4GalT (Axford et al. 1987; Axford et al. 1992) che non viene però confermata da altri (Furukawa et al. 1990; Keusch et al. 1998).

In conclusione, i dati da noi ottenuti hanno permesso di identificare con chiarezza un nuovo marcatore di invecchiamento: la forma plasmatica dell'enzima β 1,4GalT. Tuttavia non esistendo una correlazione con un noto marcatore di invecchiamento, il GlycoAge test, possiamo concludere che i due marcatori siano espressione di diverse condizioni fisio-patologiche che caratterizzano l'invecchiamento.

La relazione tra l'enzima ST6Gal1 e l'età risulta essere più complessa e articolata, suggerendo un possibile ruolo protettivo nel limitare gli effetti dell'*Inflammaging*.

Nell'anziano si assiste, come detto in precedenza, alla predominanza di IgG iposialilate, agalattosilate e prive del *core fucose* che potrebbero essere causa e/o effetto della persistenza di un processo infiammatorio cronico di basso grado tipico dell'invecchiamento.

Nel nostro studio le glicosiltransferasi plasmatiche non sono responsabili nel determinare la glicosilazione delle IgG, pertanto sono necessari ulteriori studi al fine di indagare la biogenesi di glicofornie di IgG correlate all'età.

6. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Aalberse, R.C. et al., 2009. Immunoglobulin G4: an odd antibody. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 39(4), pp.469–77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19222496> [Accessed December 30, 2014].
- Adler, Y. et al., Impaired binding capacity of asialyl and agalactosyl IgG to Fc gamma receptors. *Clinical and experimental rheumatology*, 13(3), pp.315–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7554557> [Accessed January 9, 2015].
- Aebi, M., 2013. N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833(11), pp.2430–2437. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.04.001>.
- Alavi, A., Axford, J.S. & Pool, A.J., 2004. Serum galactosyltransferase isoform changes in rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*, 31(8), pp.1513–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15290729> [Accessed January 31, 2015].
- Almeida, R. et al., 1997. A family of human beta4-galactosyltransferases. Cloning and expression of two novel UDP-galactose:beta-n-acetylglucosamine beta1, 4-galactosyltransferases, beta4Gal-T2 and beta4Gal-T3. *The Journal of biological chemistry*, 272(51), pp.31979–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9405390> [Accessed January 30, 2015].
- Almeida, R. et al., 1999. Cloning and Expression of a Proteoglycan UDP-Galactose: -Xylose 1,4-Galactosyltransferase I: A SEVENTH MEMBER OF THE HUMAN 4-GALACTOSYLTRANSFERASE GENE FAMILY. *Journal of Biological Chemistry*, 274(37), pp.26165–26171. Available at: <http://www.jbc.org/content/274/37/26165.short> [Accessed January 30, 2015].
- Amado, M., 1999. Identification and characterization of large galactosyltransferase gene families: galactosyltransferases for all functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1473(1), pp.35–53. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416599001683> [Accessed January 30, 2015].
- Anthony, R.M. et al., 2008. Recapitulation of IVIG anti-inflammatory activity with a recombinant IgG Fc. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5874), pp.373–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2409116&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 21, 2014].
- Appenheimer, M.M. et al., 2003. Biologic contribution of P1 promoter-mediated expression of ST6Gal I sialyltransferase. *Glycobiology*, 13(8), pp.591–600. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12672700> [Accessed January 30, 2015].
- Asano, M. et al., 1997. Growth retardation and early death of beta-1,4-galactosyltransferase knockout mice with augmented proliferation and abnormal

differentiation of epithelial cells. *The EMBO journal*, 16(8), pp.1850–7. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1169788&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].

Axford, J.S. et al., 1992. Changes in normal glycosylation mechanisms in autoimmune rheumatic disease. *Journal of Clinical Investigation*, 89(March), pp.1021–1031.

Axford, J.S. et al., 1987. Reduced B-cell galactosyltransferase activity in rheumatoid arthritis. *Lancet*, 2(8574), pp.1486–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2892049> [Accessed January 31, 2015].

Barrow, A.D. & Trowsdale, J., 2006. You say ITAM and I say ITIM, let's call the whole thing off: The ambiguity of immunoreceptor signalling. *European Journal of Immunology*, 36, pp.1646–1653.

Bennett, B.D. et al., 2000. A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's beta -secretase. *The Journal of biological chemistry*, 275(48), pp.37712–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10956649> [Accessed January 30, 2015].

Bennett, E.P. et al., 2012. Control of mucin-type O-glycosylation: a classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Glycobiology*, 22(6), pp.736–56. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3409716&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 16, 2015].

Berger, E.G., Thurnher, M. & Müller, U., 1987. Galactosyltransferase and sialyltransferase are located in different subcellular compartments in HeLa cells. *Experimental cell research*, 173(1), pp.267–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3119357> [Accessed January 30, 2015].

Böhm, S. et al., 2012. The role of sialic acid as a modulator of the anti-inflammatory activity of IgG. *Seminars in Immunopathology*, 34, pp.443–453.

Bondt, A. et al., 2013. Association between galactosylation of immunoglobulin G and improvement of rheumatoid arthritis during pregnancy is independent of sialylation. *Journal of proteome research*, 12(10), pp.4522–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24016253> [Accessed January 30, 2015].

Breitling, J. & Aebi, M., 2013. N-linked protein glycosylation in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(8), p.a013359. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23751184> [Accessed December 30, 2014].

Brouwers, H.A. et al., 1988. Maternal antibodies against fetal blood group antigens A or B: lytic activity of IgG subclasses in monocyte-driven cytotoxicity and correlation with ABO haemolytic disease of the newborn. *British journal of haematology*, 70(4), pp.465–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3219297> [Accessed January 30, 2015].

- Callewaert, N. et al., 2001. Ultrasensitive profiling and sequencing of N-linked oligosaccharides using standard DNA-sequencing equipment. *Glycobiology*, 11(4), pp.275–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11358876> [Accessed January 31, 2015].
- Campbell, I.K. et al., 2014. Therapeutic effect of IVIG on inflammatory arthritis in mice is dependent on the Fc portion and independent of sialylation or basophils. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 192(11), pp.5031–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4025610&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 31, 2015].
- Cantagrel, V. & Lefeber, D.J., 2011. From glycosylation disorders to dolichol biosynthesis defects: a new class of metabolic diseases. *Journal of inherited metabolic disease*, 34(4), pp.859–67. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3137772&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].
- Chen, G. et al., 2012. Human IgG Fc-glycosylation profiling reveals associations with age, sex, female sex hormones and thyroid cancer. *Journal of proteomics*, 75(10), pp.2824–34. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391912000802> [Accessed January 9, 2015].
- Chiricolo, M. et al., 2006. Phenotypic changes induced by expression of beta-galactoside alpha2,6 sialyltransferase I in the human colon cancer cell line SW948. *Glycobiology*, 16(2), pp.146–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16192407> [Accessed January 30, 2015].
- Colley, K.J. et al., 1989. Conversion of a Golgi apparatus sialyltransferase to a secretory protein by replacement of the NH2-terminal signal anchor with a signal peptide. *The Journal of biological chemistry*, 264(30), pp.17619–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2808334> [Accessed January 30, 2015].
- Dall'Olio, F. et al., 1989. Increased CMP-NeuAc:Gal beta 1,4GlcNAc-R alpha 2,6 sialyltransferase activity in human colorectal cancer tissues. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 44(3), pp.434–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2476402> [Accessed January 30, 2015].
- Dall'Olio, F. et al., 2013. N-glycomic biomarkers of biological aging and longevity: A link with inflammaging. *Ageing Research Reviews*, 12(2), pp.685–698. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2012.02.002>.
- Dall'Olio, F. et al., 2014. Sialosignaling: sialyltransferases as engines of self-fueling loops in cancer progression. *Biochimica et biophysica acta*, 1840(9), pp.2752–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24949982> [Accessed January 30, 2015].
- Dall'Olio, F., 2000. The sialyl-alpha2,6-lactosaminyl-structure: biosynthesis and functional role. *Glycoconjugate journal*, 17(10), pp.669–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11425186> [Accessed January 30, 2015].

- Dall'Olio, F. & Chiricolo, M., Sialyltransferases in cancer. *Glycoconjugate journal*, 18(11-12), pp.841–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12820717> [Accessed January 30, 2015].
- Dalziel, M. et al., 1999. Hepatic acute phase induction of murine beta-galactoside alpha 2,6 sialyltransferase (ST6Gal I) is IL-6 dependent and mediated by elevation of exon H-containing class of transcripts. *Glycobiology*, 9(10), pp.1003–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10521536> [Accessed January 31, 2015].
- Dalziel, M. et al., 2004. Ras oncogene induces beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase (ST6Gal I) via a RalGEF-mediated signal to its housekeeping promoter. *European journal of biochemistry / FEBS*, 271(18), pp.3623–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15355339> [Accessed January 30, 2015].
- Datta, A.K., Sinha, A. & Paulson, J.C., 1998. Mutation of the sialyltransferase S-sialylmotif alters the kinetics of the donor and acceptor substrates. *The Journal of biological chemistry*, 273(16), pp.9608–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9545292> [Accessed January 30, 2015].
- Delves, P.J. et al., 1990. Polymorphism and expression of the galactosyltransferase-associated protein kinase gene in normal individuals and galactosylation-defective rheumatoid arthritis patients. *Arthritis and rheumatism*, 33(11), pp.1655–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2122902> [Accessed January 30, 2015].
- Dong, X., Storkus, W.J. & Salter, R.D., 1999. Binding and uptake of agalactosyl IgG by mannose receptor on macrophages and dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163, pp.5427–5434.
- Dwyer, J.M., 1992. Manipulating the immune system with immune globulin. *The New England journal of medicine*, 326(2), pp.107–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1727218> [Accessed January 30, 2015].
- Ferrante, A., Beard, L.J. & Feldman, R.G., 1990. IgG subclass distribution of antibodies to bacterial and viral antigens. *The Pediatric infectious disease journal*, 9(8 Suppl), pp.S16–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2216603> [Accessed January 30, 2015].
- Furukawa, K. et al., 1990. Kinetic study of a galactosyltransferase in the B cells of patients with rheumatoid arthritis. *International Immunology*, 2(1), pp.105–112. Available at: <http://intimm.oxfordjournals.org/content/2/1/105.short> [Accessed January 30, 2015].
- Garred, P., 2003. Mannose-binding lectin deficiency—revisited. *Molecular Immunology*, 40(2-4), pp.73–84. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589003001044> [Accessed January 6, 2015].
- Gelfand, E.W., 2006. Differences between IGIV products: impact on clinical outcome. *International immunopharmacology*, 6(4), pp.592–9. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576905003140> [Accessed January 30, 2015].

- Grundmann, U. et al., 1990. Complete cDNA sequence encoding human beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase. *Nucleic acids research*, 18(3), p.667. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=333489&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].
- Guo, S. et al., 2001. Galactosylation of N-linked oligosaccharides by human beta-1,4-galactosyltransferases I, II, III, IV, V, and VI expressed in Sf-9 cells. *Glycobiology*, 11(10), pp.813–820.
- Hammarström, L. & Smith, C.I., 1983. IgG2 deficiency in a healthy blood donor. Concomitant lack of IgG2, IgA and IgE immunoglobulins and specific anti-carbohydrate antibodies. *Clinical and experimental immunology*, 51(3), pp.600–4. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1536779&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].
- Hansen, L. et al., 2015. A glycogene mutation map for discovery of diseases of glycosylation. *Glycobiology*, 25(2), pp.211–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25267602> [Accessed January 22, 2015].
- Harduin-Lepers, a. et al., 2001. The human sialyltransferase family. *Biochimie*, 83, pp.727–737.
- Huhn, C. et al., 2009. IgG glycosylation analysis. *Proteomics*, 9, pp.882–913.
- Hussain, I. et al., 1999. Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Molecular and cellular neurosciences*, 14(6), pp.419–27. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10656250> [Accessed January 30, 2015].
- Iida, S. et al., 2006. Nonfucosylated therapeutic IgG1 antibody can evade the inhibitory effect of serum immunoglobulin G on antibody-dependent cellular cytotoxicity through its high binding to FcγRIIIa. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12(9), pp.2879–87. Available at: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/12/9/2879.short> [Accessed January 30, 2015].
- Jefferis, R., 2009. Recombinant antibody therapeutics: the impact of glycosylation on mechanisms of action. *Trends in pharmacological sciences*, 30(7), pp.356–62. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165614709000911> [Accessed December 7, 2014].
- Jefferis, R. & Kumararatne, D.S., 1990. Selective IgG subclass deficiency: quantification and clinical relevance. *Clinical and experimental immunology*, 81(3), pp.357–67. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1534990&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].
- Jones, M.B. et al., 2010. Role for hepatic and circulatory ST6Gal-1 sialyltransferase in regulating myelopoiesis. *The Journal of biological chemistry*, 285(32), pp.25009–17. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2915736&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 31, 2015].

- Kaneko, Y., Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V, 2006. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science (New York, N.Y.)*, 313(2006), pp.670–673.
- Kaplan, H.A. et al., 1983. Studies on the effect of inflammation on rat liver and serum sialyltransferase. Evidence that inflammation causes release of Gal beta 1 leads to 4GlcNAc alpha 2 leads to 6 sialyltransferase from liver. *The Journal of biological chemistry*, 258(19), pp.11505–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6413502> [Accessed January 30, 2015].
- Keusch, J. et al., 1998. B lymphocyte galactosyltransferase protein levels in normal individuals and in patients with rheumatoid arthritis. *Glycoconjugate journal*, 15(11), pp.1093–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10386894> [Accessed January 31, 2015].
- Kitazume, S. et al., 2001. Alzheimer's beta-secretase, beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme, is responsible for cleavage secretion of a Golgi-resident sialyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(24), pp.13554–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=61079&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].
- Kitazume, S. et al., 2003. Characterization of alpha 2,6-sialyltransferase cleavage by Alzheimer's beta -secretase (BACE1). *The Journal of biological chemistry*, 278(17), pp.14865–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12473667> [Accessed January 30, 2015].
- Kitazume, S. et al., 2005. In vivo cleavage of alpha2,6-sialyltransferase by Alzheimer beta-secretase. *The Journal of biological chemistry*, 280(9), pp.8589–95. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15364953> [Accessed January 30, 2015].
- Kitazume, S. et al., 2009. Molecular insights into beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase secretion in vivo. *Glycobiology*, 19(5), pp.479–487.
- Kornfeld, R. & Kornfeld, S., 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annual review of biochemistry*, 54, pp.631–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3896128> [Accessed December 12, 2014].
- Krapp, S. et al., 2003. Structural Analysis of Human IgG-Fc Glycoforms Reveals a Correlation Between Glycosylation and Structural Integrity. *Journal of Molecular Biology*, 325(5), pp.979–989. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283602012500> [Accessed November 21, 2014].
- Kuijpers, T.W., Weening, R.S. & Out, T.A., 1992. IgG subclass deficiencies and recurrent pyogenic infections, unresponsiveness against bacterial polysaccharide antigens. *Allergologia et immunopathologia*, 20(1), pp.28–34. Available at: <http://europepmc.org/abstract/med/1509985> [Accessed January 30, 2015].
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp.680–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063> [Accessed July 9, 2014].

- Leader, K.A. et al., 1996. Agalactosyl IgG in aggregates from the rheumatoid joint. *British journal of rheumatology*, 35(4), pp.335–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8624636> [Accessed January 30, 2015].
- Lee, M. et al., 2008. Protein sialylation by sialyltransferase involves radiation resistance. *Molecular cancer research: MCR*, 6(8), pp.1316–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18708363> [Accessed December 30, 2014].
- Lee, M.M. et al., 2014. Platelets support extracellular sialylation by supplying the sugar donor substrate. *Journal of Biological Chemistry*, 289(13), pp.8742–8748.
- Lennartz, M.R. et al., 1987. Isolation and characterization of a mannose-specific endocytosis receptor from human placenta. *The Journal of biological chemistry*, 262(21), pp.9942–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3611070> [Accessed January 30, 2015].
- Leontyev, D. et al., 2012. Sialylation-independent mechanism involved in the amelioration of murine immune thrombocytopenia using intravenous gammaglobulin. *Transfusion*, 52(8), pp.1799–805. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22257295> [Accessed January 27, 2015].
- Liu, J. & Mushegian, A., 2003. Three monophyletic superfamilies account for the majority of the known glycosyltransferases. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 12(7), pp.1418–31. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2323934&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].
- Lodish, H.F., 1991. Recognition of complex oligosaccharides by the multi-subunit asialoglycoprotein receptor. *Trends in biochemical sciences*, 16(10), pp.374–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1785139> [Accessed January 30, 2015].
- Lu, Q., Hasty, P. & Shur, B.D., 1997. Targeted mutation in beta1,4-galactosyltransferase leads to pituitary insufficiency and neonatal lethality. *Developmental biology*, 181(2), pp.257–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9013935> [Accessed January 30, 2015].
- Malhotra, R. et al., 1995. Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. *Nature Medicine*, 1(3), pp.237–243. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nm0395-237> [Accessed January 30, 2015].
- Mawas, F. et al., 1997. Immunoglobulin G subclasses of anti-human platelet antigen 1a in maternal sera: relation to the severity of neonatal alloimmune thrombocytopenia. *European journal of haematology*, 59(5), pp.287–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9414639> [Accessed January 30, 2015].
- McGuire, E.J. et al., 1989. A human milk galactosyltransferase is specific for secreted, but not plasma, IgA. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 143(9), pp.2933–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2509560> [Accessed January 22, 2015].

- Menni, C. et al., 2013. Glycosylation of immunoglobulin g: role of genetic and epigenetic influences. *PloS one*, 8(12), p.e82558. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3855797&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].
- Mimura, Y. et al., 2000. The influence of glycosylation on the thermal stability and effector function expression of human IgG1-Fc: properties of a series of truncated glycoforms. *Molecular Immunology*, 37(12-13), pp.697–706. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016158900000105X> [Accessed January 30, 2015].
- Mitchell, D.A., Fadden, A.J. & Drickamer, K., 2001. A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands. *The Journal of biological chemistry*, 276(31), pp.28939–45. Available at: <http://www.jbc.org/content/276/31/28939.short> [Accessed January 30, 2015].
- Miyoshi, E. et al., 1999. The alpha1-6-fucosyltransferase gene and its biological significance. *Biochimica et biophysica acta*, 1473(1), pp.9–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10580126> [Accessed January 30, 2015].
- Morgan, A. et al., 1995. The N-terminal end of the CH2 domain of chimeric human IgG1 anti-HLA-DR is necessary for C1q, Fc gamma RI and Fc gamma RIII binding. *Immunology*, 86(2), pp.319–24. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1384012&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].
- Mori, M. et al., 1994. The LEC rat: a model for human hepatitis, liver cancer, and much more. *The American journal of pathology*, 144(1), pp.200–4. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1887108&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].
- Nagelkerke, S.Q. et al., 2014. Inhibition of FcγR-mediated phagocytosis by IVIg is independent of IgG-Fc sialylation and FcγRIIb in human macrophages. *Blood*, 124(25), pp.3709–18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25352126> [Accessed January 30, 2015].
- Nasirikenari, M. et al., 2006. Altered granulopoietic profile and exaggerated acute neutrophilic inflammation in mice with targeted deficiency in the sialyltransferase ST6Gal I. *Blood*, 108(10), pp.3397–405. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1895428&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 31, 2015].
- Nasirikenari, M. et al., 2014. Remodeling of marrow hematopoietic stem and progenitor cells by non-self ST6Gal-1 sialyltransferase. *The Journal of biological chemistry*, 289(10), pp.7178–89. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24425878> [Accessed January 31, 2015].
- Nimmerjahn, F., Anthony, R.M. & Ravetch, J. V., 2007. Agalactosylated IgG antibodies depend on cellular Fc receptors for in vivo activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(20), pp.8433–8437.

- Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V, 2008. Anti-inflammatory actions of intravenous immunoglobulin. *Annual review of immunology*, 26, pp.513–33. Available at: http://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090232?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed [Accessed January 19, 2015].
- Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V, 2006. Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity*, 24(1), pp.19–28. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16413920> [Accessed January 30, 2015].
- Nomura, K.H. et al., 1998. Involvement of blood-group-B-active trisaccharides in Ca²⁺-dependent cell-cell adhesion in the *Xenopus* blastula. *Development genes and evolution*, 208(1), pp.9–18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9518520> [Accessed January 30, 2015].
- Nomura, T. et al., 1998. Purification, cDNA cloning, and expression of UDP-Gal: glucosylceramide beta-1,4-galactosyltransferase from rat brain. *The Journal of biological chemistry*, 273(22), pp.13570–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9593693> [Accessed January 30, 2015].
- Parekh, R. et al., 1988. Age-related galactosylation of the N-linked oligosaccharides of human serum IgG. *The Journal of experimental medicine*, 167(5), pp.1731–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2188930&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 9, 2015].
- Parekh, R.B. et al., Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature*, 316(6027), pp.452–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3927174> [Accessed January 9, 2015].
- Pekelharing, J.M. et al., 1988. Alterations in carbohydrate composition of serum IgG from patients with rheumatoid arthritis and from pregnant women. *Annals of the rheumatic diseases*, 47(2), pp.91–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1003459&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].
- Perillo, N.L. et al., 1995. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature*, 378(6558), pp.736–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7501023> [Accessed January 30, 2015].
- Pollock, J.M. & Bowman, J.M., 1990. Anti-Rh(D) IgG subclasses and severity of Rh hemolytic disease of the newborn. *Vox sanguinis*, 59(3), pp.176–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2124753> [Accessed January 30, 2015].
- Potter, M., 1983. Structural correlates of immunoglobulin diversity. *Survey of immunologic research*, 2(1), pp.27–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6417753> [Accessed January 30, 2015].
- Pricop, L. et al., 2001. Differential modulation of stimulatory and inhibitory Fc gamma receptors on human monocytes by Th1 and Th2 cytokines. *Journal of immunology*

- (Baltimore, Md. : 1950), 166(1), pp.531–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11123333> [Accessed January 30, 2015].
- Ravetch, J. V., 2000. Immune Inhibitory Receptors. *Science*, 290(5489), pp.84–89. Available at: <http://www.sciencemag.org/content/290/5489/84.short> [Accessed December 3, 2014].
- Rook, G.A. et al., 1991. Changes in IgG glycoform levels are associated with remission of arthritis during pregnancy. *Journal of autoimmunity*, 4(5), pp.779–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1797027> [Accessed January 30, 2015].
- Ruhaak, L.R. et al., 2011. Plasma protein N-glycan profiles are associated with calendar age, familial longevity and health. *Journal of proteome research*, 10(4), pp.1667–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21184610> [Accessed January 31, 2015].
- Russo, R.N., Shaper, N.L. & Shaper, J.H., 1990. Bovine beta 1----4-galactosyltransferase: two sets of mRNA transcripts encode two forms of the protein with different amino-terminal domains. In vitro translation experiments demonstrate that both the short and the long forms of the enzyme are type II mem. *J. Biol. Chem.*, 265(6), pp.3324–3331. Available at: <http://www.jbc.org/content/265/6/3324.short> [Accessed January 30, 2015].
- Sarma, J.V. & Ward, P. a, 2012. The Compliment System. *NIH Public Access author manuscript*, 343(1), pp.227–235.
- Schenk, B., Fernandez, F. & Waechter, C.J., 2001. The ins(ide) and out(side) of dolichyl phosphate biosynthesis and recycling in the endoplasmic reticulum. *Glycobiology*, 11(5), p.61R–70R. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11425794> [Accessed January 30, 2015].
- Schur, P.H., 1988. IgG subclasses. A historical perspective. *Monographs in allergy*, 23, pp.1–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3290655> [Accessed January 30, 2015].
- Schwab, I. & Nimmerjahn, F., 2013. Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system? *Nature Reviews Immunology*, 13(3), pp.176–189. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3401> [Accessed January 30, 2015].
- Schwientek, T. et al., 1998. Cloning of a novel member of the UDP-galactose:beta-N-acetylglucosamine beta1,4-galactosyltransferase family, beta4Gal-T4, involved in glycosphingolipid biosynthesis. *The Journal of biological chemistry*, 273(45), pp.29331–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9792633> [Accessed January 30, 2015].
- Selman, M.H.J. et al., 2012. Changes in Antigen-specific IgG1 Fc N-glycosylation Upon Influenza and Tetanus Vaccination. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11, pp.M111.014563–M111.014563.
- Semel, A.C. et al., 2002. Hyposialylation of integrins stimulates the activity of myeloid fibronectin receptors. *The Journal of biological chemistry*, 277(36), pp.32830–6.

Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12091385> [Accessed January 30, 2015].

- Shaper, N.L. et al., 1986. The human galactosyltransferase gene is on chromosome 9 at band p13. *Somatic cell and molecular genetics*, 12(6), pp.633–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3097837> [Accessed January 30, 2015].
- Shields, R.L. et al., 2002. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fcγ₃ RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *The Journal of biological chemistry*, 277(30), pp.26733–40. Available at: <http://www.jbc.org/content/277/30/26733.short> [Accessed January 9, 2015].
- Söderström, T. et al., 1985. Immunoglobulin subclass (IgG3) restriction of anti-P and anti-Pk antibodies in patients of the rare p blood group. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 134(1), pp.1–3. Available at: <http://www.jimmunol.org/content/134/1/1.abstract> [Accessed January 30, 2015].
- Soilleux, E.J. et al., 2002. Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro. *Journal of leukocyte biology*, 71(3), pp.445–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11867682> [Accessed January 30, 2015].
- Stanworth, S.J. et al., 1998. Absence of an association between mannose-binding lectin polymorphism and rheumatoid arthritis. *British journal of rheumatology*, 37, pp.186–188.
- Sun, P.D., 2003. Structure and function of natural-killer-cell receptors. *Immunologic research*, 27(2-3), pp.539–48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12857997> [Accessed January 17, 2015].
- Suzuki, K. et al., 1993. High copper and iron levels and expression of Mn-superoxide dismutase in mutant rats displaying hereditary hepatitis and hepatoma (LEC rats). *Carcinogenesis*, 14(9), pp.1881–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8403214> [Accessed January 30, 2015].
- Swindall, A.F. & Bellis, S.L., 2011. Sialylation of the Fas death receptor by ST6Gal-I provides protection against Fas-mediated apoptosis in colon carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry*, 286(26), pp.22982–90. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3123066&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].
- Tei, K. et al., 2002. Roles of cell adhesion molecules in tumor angiogenesis induced by cotransplantation of cancer and endothelial cells to nude rats. *Cancer research*, 62(21), pp.6289–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12414659> [Accessed January 30, 2015].
- Troelsen, L.N. et al., 2007. Genetically determined high serum levels of mannose-binding lectin and agalactosyl IgG are associated with ischemic heart disease in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 56(1), pp.21–29.
- Ujita, M. et al., 1998. Synthesis of poly-N-acetylglucosamine in core 2 branched O-glycans. The requirement of novel beta-1,4-galactosyltransferase IV and beta-1,3-

- n-acetylglucosaminyltransferase. *The Journal of biological chemistry*, 273(52), pp.34843–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9857011> [Accessed January 30, 2015].
- Vanhooren, V. et al., 2008. N-glycan profiling in the study of human aging. *Biogerontology*, 9(5), pp.351–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18431686> [Accessed January 13, 2015].
- Vanhooren, V. et al., 2007. N-glycomic changes in serum proteins during human aging. *Rejuvenation research*, 10(4), pp.521–531a. Available at: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/rej.2007.0556> [Accessed January 31, 2015].
- Vanhooren, V. et al., 2010. Serum N-glycan profile shift during human ageing. *Experimental gerontology*, 45(10), pp.738–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20801208> [Accessed January 31, 2015].
- Varki, A., 1993. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, 3(2), pp.97–130. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8490246> [Accessed January 8, 2015].
- Vidarsson, G. et al., 2006. FcRn: an IgG receptor on phagocytes with a novel role in phagocytosis. *Blood*, 108(10), pp.3573–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16849638> [Accessed January 30, 2015].
- Vidarsson, G., Dekkers, G. & Rispen, T., 2014. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. , 5(October), pp.1–17.
- Wandall, H.H. et al., 2014. The origin and function of platelet glycosyltransferases The origin and function of platelet glycosyltransferases. , 120(3), pp.626–635.
- Wang, X.C., Smith, T.J. & Lau, J.T., 1990. Transcriptional regulation of the liver beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase by glucocorticoids. *The Journal of biological chemistry*, 265(29), pp.17849–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2211665> [Accessed January 31, 2015].
- Weinstein, J. et al., 1987. Primary structure of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase. Conversion of membrane-bound enzyme to soluble forms by cleavage of the NH₂-terminal signal anchor. *The Journal of biological chemistry*, 262(36), pp.17735–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3121604> [Accessed January 30, 2015].
- Wieser, R.J. & Oesch, F., 1992. Contact-Inhibition of Growth by Complex Carbohydrates. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 4(16), pp.160–167. Available at: <http://ci.nii.ac.jp/naid/130003454730/en/> [Accessed January 30, 2015].
- Wright, A. et al., 1991. Antibody variable region glycosylation: position effects on antigen binding and carbohydrate structure. *The EMBO journal*, 10(10), pp.2717–23. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=452979&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].

- Wuhrer, M. et al., 2009. Regulated glycosylation patterns of IgG during alloimmune responses against human platelet antigens. *Journal of proteome research*, 8(2), pp.450–6. Available at: <http://dx.doi.org/10.1021/pr800651j> [Accessed January 30, 2015].
- Xue, J., Zhu, L.P. & Wei, Q., 2013. IgG-Fc N-glycosylation at Asn297 and IgA O-glycosylation in the hinge region in health and disease. *Glycoconjugate Journal*, 30, pp.735–745.
- Yabe, R., Tateno, H. & Hirabayashi, J., 2010. Frontal affinity chromatography analysis of constructs of DC-SIGN, DC-SIGNR and LSEctin extend evidence for affinity to agalactosylated N-glycans. *The FEBS journal*, 277(19), pp.4010–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20840590> [Accessed January 30, 2015].
- Yamada, E. et al., 1997. Structural changes of immunoglobulin G oligosaccharides with age in healthy human serum. *Glycoconjugate journal*, 14(3), pp.401–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9147063> [Accessed January 30, 2015].
- Yamamoto, M. et al., 2012. Value of serum IgG4 in the diagnosis of IgG4-related disease and in differentiation from rheumatic diseases and other diseases. *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association*, 22(3), pp.419–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21953287> [Accessed January 30, 2015].
- Yan, R. et al., 1999. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature*, 402(6761), pp.533–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10591213> [Accessed January 30, 2015].
- Yu, X. et al., 2013. Dissecting the molecular mechanism of IVIg therapy: the interaction between serum IgG and DC-SIGN is independent of antibody glycoform or Fc domain. *Journal of molecular biology*, 425(8), pp.1253–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23416198> [Accessed January 30, 2015].

1. INTRODUZIONE

1.1 N-GLICOSILAZIONE

La glicosilazione enzimatica rappresenta uno dei principali meccanismi di modificazione co/post-traduzionale delle proteine e riveste un ruolo fondamentale per la struttura e/o funzione della proteina nascente (Aebi 2013; Dall'Olio et al. 2013). Basti ricordare che almeno l'1% del genoma umano codifica per proteine coinvolte nella biosintesi (glicosiltrasferasi), degradazione (glicosidasi) o riconoscimento di catene di zuccheri (Varki 1993) e che mutazioni di enzimi implicati nella biosintesi di catene glucidiche (glicosiltrasferasi) sono responsabili di gravi sindromi, spesso incompatibili con la vita e note, complessivamente, come "*Congenital Disorders of Glycosylation (CDGs)*" (Hansen et al. 2015). Le catene di zuccheri legate alle proteine svolgono un ruolo fondamentale nella vita della cellula e dell'intero organismo in quanto ne regolano importanti processi biologici quali ad esempio l'apoptosi e la sopravvivenza cellulare (Lee et al. 2008; Swindall & Bellis 2011), l'angiogenesi (Tei et al. 2002) e le funzioni effettrici degli anticorpi (Nimmerjahn & Ravetch 2008; Xue et al. 2013; Vidarsson et al. 2014). Ricordiamo infine che molte delle glicoproteine sono destinate ad essere proteine di membrana e la componente oligosaccaridica forma il glicocalice, ovvero la struttura più esterna della cellula, coinvolta quindi nei meccanismi di comunicazione cellula-cellula e cellula-ambiente.

La glicosilazione delle proteine consiste, dunque, nell'aggiunta di catene glucidiche a particolari amminoacidi di una catena peptidica, dando origine ad una

glicoproteina. Le catene di zuccheri legate alle proteine possono essere di diverso tipo, anche se le più comuni sono di tipo O-linked ed N-linked.

La biosintesi di catene O-linked avviene esclusivamente nell'apparato di Golgi e consiste nell'aggiunta di uno o pochi residui di zuccheri all'atomo di ossigeno di un residuo di treonina, serina o idrossilisina (Bennett et al. 2012).

Le catene N-linked sono invece sintetizzate nel reticolo endoplasmico rugoso (RER), successivamente modificate e completate nell'apparato di Golgi (Aebi 2013). La loro biosintesi, molto più complessa rispetto a quella delle catene O-linked, può essere suddivisa in due fasi: l'assemblaggio di una catena oligosaccaridica su un lipide (*lipid-linked oligosaccharide, LLO*) e il trasferimento dell'oligosaccaride ad un residuo di Asn di una catena peptidica nascente (Breitling & Aebi 2013) (Fig. 1). La biosintesi del LLO avviene nel RER, versante citoplasmatico, ad opera di specifici enzimi, appartenenti alla famiglia ALG (*Asparagine linked glycosylation*) che catalizzano il trasferimento di monosaccaridi, utilizzando nucleotidi-zuccheri come donatori, ad un lipide, il dolicolo fosfato. Questo lipide riveste un ruolo fondamentale nella biosintesi di catene N-linked in quanto assolve alla funzione di traslocatore di monosaccaridi o oligosaccaridi dal citoplasma al lume del RER. La sua biosintesi risulta essere un passaggio cruciale della N-glicosilazione, ed avviene sulla membrana del RER ad opera della cis-preniltrasferasi (Aebi 2013). Alterazioni del processo di biosintesi del dolicolo compromettono gravemente il processo di N-glicosilazione (Schenk et al. 2001) e tali alterazioni sono causa di alcune CDGs (Cantagrel & Lefeber 2011). La fase citoplasmatica della biosintesi del LLO termina con il dolicolo fosfato, ancorato alla membrana del RER, associato ad una catena oligosaccaridica formata da 2 residui di N-acetilglucosammina (GlcNAc) e 5 di mannosio (Man). A questo punto, l'enzima RFT1, trasferisce la catena

oligosaccaridica dall'esterno verso il lume del RER dove verrà modificata ad opera di altri enzimi appartenenti alla famiglia delle ALG che alla fine generano una struttura così composta: 2 residui di GlcNAc, 9 di Man e 3 di glucosio (Glc) legati al dolicholo fosfato (Aebi 2013). Questa struttura glucidica è poi trasferita dall'oligosaccariltrasferasi (OST) alla sequenza polipeptidica nascente, che riconosce una specifica sequenza consenso, Asn-X-Ser/Thr (dove X è un qualunque amminoacido ad eccezione della prolina) e crea un sito di N-glicosilazione tra il residuo amminico dell'Asn e la catena oligosaccaridica (Breitling & Aebi 2013).

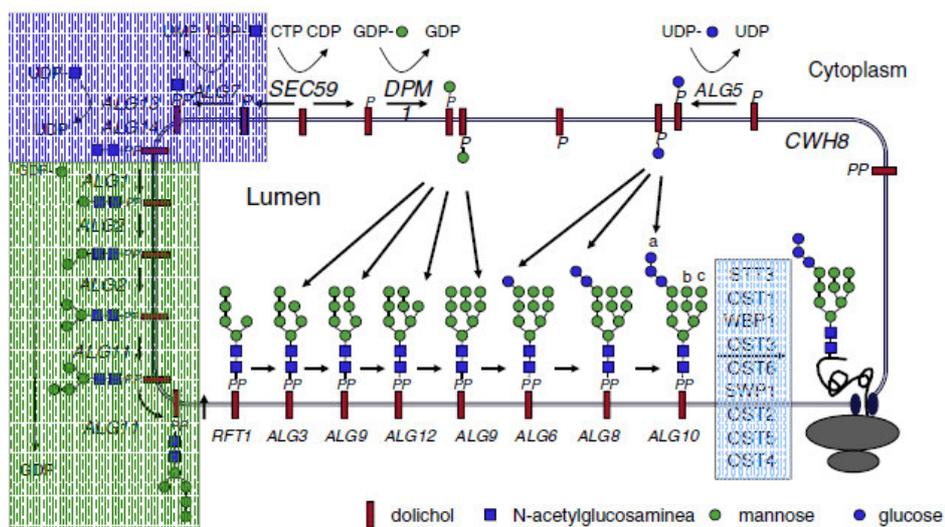


Fig.1: Rappresentazione schematica delle prime fasi della biosintesi di una catena N-linked. Durante la fase *lipid-linked oligosaccharide*, LLO (riquadro verde) la catena glucidica, legata al dolicholo fosfato, è formata ad opera delle ALG (*Asparagine linked glycosylation*). La struttura glucidica formata da 2 residui di GlcNAc e 5 di Man è poi trasportata sul versante luminale del RER, ad opera di una flippasi, la RFT1, dove subisce ulteriori modifiche operate da altri enzimi ALG. Infine la struttura composta di 2 residui di GlcNAc, 9 di mannosio e 3 di Glc è trasferita dal dolicholo fosfato al residuo di Asn della proteina dall'OST (oligosaccariltrasferasi) e successivamente al Golgi dove viene modificata nella sua struttura finale (Da: Aebi, 2013).

La struttura sopradescritta subisce ulteriori modifiche ad opera di glicosidasi, enzimi che catalizzano la rimozione di residui di zuccheri. Il primo step prevede la rimozione di 3 residui di Glc ad opera, rispettivamente delle α -glucosidasi I, e II,

seguito dalla rimozione di 4 residui di Man ad opera dell' α -mannosidasi I. A questo punto la glicosiltrasferasi GlcNAc trasferasi 1 (GlcNAcT1), implementa la catena glucidica con un residuo di GlcNAc, mentre altri due residui di mannosio sono poi rimossi dalla α -mannosidasi II; infine un secondo residuo di GlcNAc è aggiunto ad opera della GlcNAcT2 (Kornfeld & Kornfeld 1985). Questa struttura glicidica, composta da 2 residui di GlcNAc, 3 di mannosio e 2 di GlcNAc è la struttura base di tutte le catene N-linked e può essere successivamente completata nell'apparato di Golgi dove la catena N-linked è modificata in modo specifico (Fig. 2).

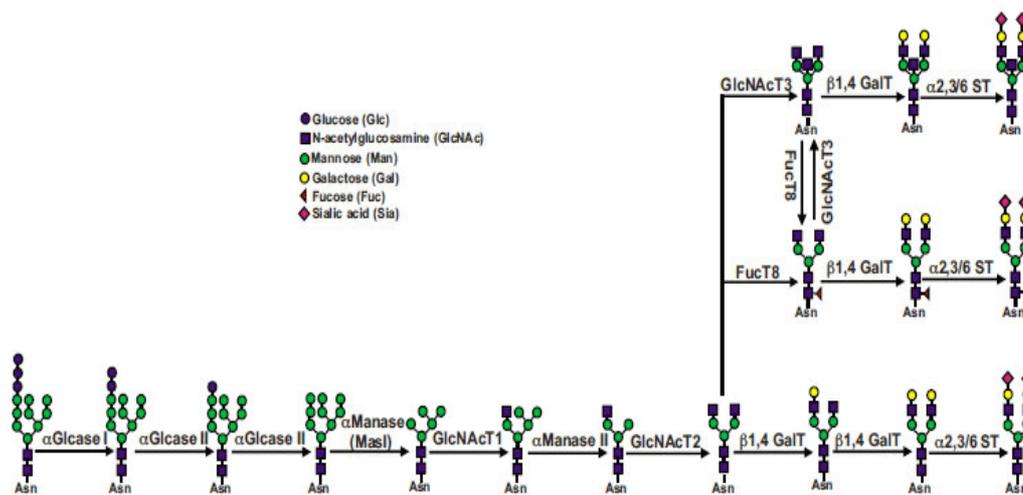


Fig.2: Rappresentazione schematica delle fasi finali di biosintesi di una catena N-linked. La struttura base di tutte le catene N-linked, data da 2 residui di N-acetilglucosammina (GlcNAc), 3 di mannosio (Man) e 2 di GlcNAc è il risultato di enzimi biosintetici (glicosiltrasferasi) e catabolici (glicosidasi). La struttura base, nel Golgi, può essere poi completata con l'aggiunta di altri zuccheri, quali galattosio (Gal), GlcNAc, fucosio (Fuc) o acido sialico (Sia). (Da: Dall'Olio et al. 2013)

In tal modo si ottiene una grande varietà di specie N-glicaniche, in grado di conferire una specifica funzione alla struttura proteica a cui sono associate (Aebi 2013). Nel Golgi, la struttura base può essere completata dall'enzima β 1,4 galattosiltrasferasi con l'aggiunta di galattosio ad un residuo di GlcNAc terminale

e/o dalla fucosiltrasferasi8 (FucT8) che catalizza il trasferimento con legame α 1,6 di un residuo di fucosio al residuo di GlcNAc legato all'Asn (*core fucose*). L'enzima GlcNAcT3 può trasferire un residuo di GlcNAc al residuo di Man in posizione centrale mediante un legame β 1-4, dando origine alla struttura nota come *bisecting GlcNAc* ed in questo caso la struttura non viene più modificata. Infine, le catene N-linked, dopo l'aggiunta del galattosio, possono terminare con uno o due residui di acido sialico legati con legame α 2,3 o 2,6 e i due tipi di legame sono il prodotto di due diverse classi di sialiltrasferasi.

Ricordiamo infine che il processo di N-glicosilazione, non è di tipo deterministico, come per la biosintesi delle proteine o degli acidi nucleici, bensì stocastico, in quanto dipende dalla concentrazione di enzimi (glicosiltrasferasi e glicosidasi) e donatori-zuccheri. Ne consegue che per una data proteina, la composizione della catena N-linked legata ad uno specifico sito di glicosilazione possa presentare un certo grado di variabilità (microeterogeneità) (Dall'Olio et al. 2013).

Dalla trattazione appena fatta si evince come il processo di N-glicosilazione sia localizzato all'interno della cellula ed in particolare nel reticolo endoplasmico rugoso e nel Golgi. Tuttavia recenti studi hanno evidenziato la possibilità di un meccanismo di glicosilazione extracellulare mediato dalle piastrine (Wandall et al. 2014; Lee et al. 2014). Le piastrine sono elementi corpuscolati del sangue che derivano dalla frammentazione del citoplasma di megacariociti e all'interno del loro citoplasma contengono dei granuli in cui sono presenti, tra l'altro, delle glicosiltrasferasi. Le piastrine attivate riversano il contenuto dei loro granuli in circolo e le glicosiltrasferasi rilasciate sono in grado di esplicare la loro attività enzimatica, incorporando residui di zuccheri a proteine plasmatiche (Wandall et al. 2014). Le piastrine, oltre a essere fonte di glicosiltrasferasi, possono assolvere

alla funzione di donatori di nucleotidi zuccheri per glicosiltransferasi plasmatiche. Recenti studi hanno dimostrato che le piastrine attivate dalla trombina, a concentrazioni fisiologiche, sono degli ottimi donatori di CMP-acido sialico, che può essere utilizzato dalla sialiltransferasi ST6Gal1 plasmatica per glicosilare la superficie di cellule target (Lee et al. 2014).

1.2 LE GLICOSILTRANSFERASI

Le glicosiltransferasi (GTs) vengono classificate in 65 famiglie diverse sulla base della loro attività catalica. La reazione catalizzata prevede il trasferimento di un monosaccaride da un donatore di zuccheri attivato, che può essere un nucleotide zucchero mono- o di- fosfato, ad un saccaride, lipide, proteina o DNA o piccole molecole accettrici e formano dunque glico-coniugati (Liu & Mushegian 2003). La loro localizzazione è a livello intracellulare ed in particolare nel RER e nel Golgi, laddove esiste una buona concentrazione di nucleotidi zuccheri, indispensabili per il funzionamento delle glicosiltransferasi. Tuttavia, anche nel plasma si ritrovano delle isoforme di particolari glicosiltrasferasi che assumono in alcuni casi un particolare significato clinico e che, come detto in precedenza potrebbero svolgere un ruolo anche nella N-glicosilazione ecto-cellulare (Wandall et al. 2014; Lee et al. 2014).

1.2.1 α 2,6 sialiltrasferasi

L'enzima α 2,6sialiltransferasi (ST6Gal1) catalizza l' α 2,6 sialilazione degli N-glicani utilizzando come donatore di nucleotidi zuccheri il CMP-acido sialico e come accettore la struttura Gal β 1,4GlcNAc delle catene N-linked (Dall'Olio 2000). La ST6Gal1 fa parte della superfamiglia delle sialiltransferasi, di cui fanno parte più di 20 enzimi, coinvolti nella produzione di oligosaccaridi sialilati. Da un

punto di vista storico, il cDNA della ST6Gal1 venne isolato per la prima volta nel ratto da Weinstein *et al.* nel 1987 e tre anni più tardi, da Grundmann *et al.* venne isolato il cDNA umano (Weinstein *et al.* 1987; Grundmann *et al.* 1990). Le sialiltrasferasi sono glicoproteine transmembrana di tipo 2 in cui è possibile distinguere tre domini ben definiti: 1) una piccola coda in posizione NH₂ terminale rivolta verso il versante citoplasmatico 2) una porzione transmembrana di dimensioni variabili tra i 20-200 amminoacidi che termina con 3) la porzione C-terminale, rivolta nella parte luminale (del Golgi) e in cui è contenuto il dominio catalitico dell'enzima. Tutte le sialiltrasferasi umane pur essendo molto diverse tra loro da un punto di vista strutturale, condividono 3 sequenze consenso (L, S, VS), altamente conservate, dette sialil-motivi (Harduin-Lepers *et al.* 2001). Il significato funzionale di queste regioni è stato messo in evidenza da studi di mutagenesi sulla ST6Gal1 ed in particolare è emerso che l'alto grado di conservazione di queste sequenze abbia un significato funzionale molto importante. Infatti il dominio L lega il donatore di nucleotidi zuccheri, il CMP-acido sialico, il dominio S lega sia il donatore zucchero che l'accettore e infine il dominio VS, che consiste essenzialmente di due amminoacidi altamente conservati (una Glu ed una His separate da 4 amminoacidi), è coinvolto nel processo catalitico (Datta *et al.* 1998).

La localizzazione della ST6Gal1 è sia intracellulare e, più precisamente, nel trans-Golgi, sia plasmatica. Elevati livelli intracellulari di ST6Gal1 sono spesso presenti in diverse neoplasie come quella del colon (Dall'Olio *et al.* 1989) ed associate a diverse funzioni cellulari (Dall'Olio & Chiricolo; Dall'Olio *et al.* 2014). In particolare è stato dimostrato che l'incremento di attività α 2,6 sialiltransferasica intracellulare sia responsabile dell'aumentata sialilazione delle integrine in conseguenza della quale mostrerebbero una maggiore affinità per la fibronectina

(Semel et al. 2002; Chiricolo et al. 2006). La ST6Gal1 plasmatica invece, è il risultato del clivaggio e secrezione della forma epatica (Weinstein et al. 1987; Colley et al. 1989). Il clivaggio della ST6Gal1 epatica è operato dal *β -site amyloid precursor protein (APP)-cleaving enzyme 1* (BACE1) (Kitazume et al. 2001; Kitazume et al. 2003; Kitazume et al. 2005), lo stesso enzima coinvolto nella malattia di Alzheimer in quanto responsabile della produzione del peptide neurotossico β amiloide ($A\beta$) derivato dal clivaggio di APP (Yan et al. 1999; Hussain et al. 1999; Bennett et al. 2000). L'attività plasmatica dell'ST6Gal1 aumenta in condizioni infiammatorie, infatti studi condotti su topi, indicano che, in seguito a induzione di uno stato infiammatorio mediato da inoculazioni sottocutanee di acqueragia, si verifica un aumento dei livelli sierici di glicoproteine epatiche tra cui la ST6Gal1, che si mostra tra le prime proteine di fase acuta rilevabili in circolo (Kaplan et al. 1983; Dalziel et al. 2004). Altri studi, condotti su topi *Long-Evans Cinnamon* (LEC), caratterizzati da un difetto genetico del trasportatore ATPasico del Cu^{++} (ATP7B) e che incorrono spontaneamente in danno epatico (Mori et al. 1994; Suzuki et al. 1993), mostrano come i segni evidenti di epatite siano preceduti molto precocemente da un innalzamento dei livelli sierici di ST6Gal1 (Kitazume et al. 2005). In questo contesto, la ST6Gal1 sierica risulta essere un ottimo e sensibile marker di infiammazione epatica. Infine, studi condotti su pazienti affetti da epatite C, indicano chiaramente che i livelli sierici di ST6Gal1 correlano positivamente con il grado di infiammazione epatica (Kitazume et al. 2009).

1.2.2 β 1,4Galattosiltransferasi

Le glicosiltransferasi β 1,4galattosiltransferasi (β 1,4GalTs) catalizzano il trasferimento di galattosio dall'UDP-galattoso a residui terminali di GlcNAc durante l'allungamento della catena oligosaccaridica di glicoproteine, tra cui le IgA e le IgG (McGuire et al. 1989). La localizzazione dell'enzima è sia intracellulare che extracellulare; in particolare all'interno della cellula si trova o inserito nella membrana dell'apparato di Golgi (Berger et al. 1987) o sulla superficie della membrana plasmatica, mentre, a livello extracellulare lo ritroviamo in diversi liquidi biologici tra cui latte, liquido amniotico e cerebrospinale, urina, saliva e siero (Axford et al. 1992). Il gene che codifica per la β 1,4GalT è sul cromosoma 9 (Shaper et al. 1986) e viene trascritto in più di una molecola di mRNA (Russo et al. 1990) per dare origine a diverse isoforme, caratterizzate ognuna per la specificità dell'accettore. Studi eseguiti su omogenati di cellule B derivati da pazienti affetti da artrite reumatoide (AR), che presentano una ridotta galattosilazione delle Immunoglobuline G (IgG), dimostrano una riduzione dell'attività enzimatica β 1,4GalT se si utilizzano le IgG come accettore, mentre, fornendo l' α -lattoalbumina come accettore glicoproteico, l'attività resta costante (Furukawa et al. 1990). Altri studi hanno riportato che l'attività galattosiltrasferasica è invariata nei B linfociti dei pazienti con AR (Delves et al. 1990; Furukawa et al. 1990). La famiglia delle β 1,4GalTs comprende, infatti, 7 isoforme (I-VII) (Amado 1999) e, da studi in vitro, eseguiti misurando l'attività enzimatica utilizzando diversi accettori è emerso che : 1) le isoforme II e V operano la galattosilazione di catene N-linked (Almeida et al. 1999); 2) le β 1,4GalT IV e V lavorano su catene O-linked (Ujita et al. 1998); 3) le forme III, IV, V e VI catalizzano il trasferimento di Gal a residui di GlcNAc o Glu di

glicolipidi (Almeida et al. 1997; T. Nomura et al. 1998; Schwientek et al. 1998);

4) l'isoforma VII catalizza la galattosilazione dello xilosio dei proteoglicani (Almeida et al. 1999). La struttura glucidica formata dalla $\beta 1,4\text{GalT}$ è di tipo $\text{Gal}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}$ ed è spesso associata al dominio esterno di glicoproteine di membrana (Guo et al. 2001) in quanto gioca un ruolo molto importante nei contatti cellula-cellula (K. H. Nomura et al. 1998). Il galattosio terminale, infatti, è riconosciuto e legato da diverse proteine come le galectine (Perillo et al. 1995), la contatto-inibina (Wieser & Oesch 1992) e il recettore delle asialoglicoproteine epatico (Lodish 1991) ed è pertanto coinvolto nella regolazione di numerosi processi biologici quali apoptosi, crescita cellulare o clearance di glicoproteine sieriche (Guo et al. 2001). Topi knock-out per il gene $\beta 1,4\text{GalT}$ mostrano una crescita embrionale ritardata e mortalità precoce, evidenziando l'importanza della galattosilazione delle glicoproteine nel processo di crescita e sviluppo dell'animale (Asano et al. 1997; Lu et al. 1997). Tuttavia difetti del processo di galattosilazione di proteine si riscontrano anche in alcuni quadri patologici quali malattie infiammatorie croniche come la già citata AR, dove, l'alterata galattosilazione riguarda in modo specifico le IgG. Studi di cinetica enzimatica su linfociti B di pazienti con AR, hanno dimostrato che causa della ridotta galattosilazione delle IgG è la scarsa affinità dell'enzima per l'UDP-Gal, ma non per l'asialo-agalatto-IgG, mentre l'affinità per il donatore e accettore nel caso dell' α -lattoalbumina è paragonabile tra cellule B di pazienti AR e individui sani (Furukawa et al. 1990), dimostrando ancora una volta la specificità dell'enzima per all'accettore.

1.3 IMMUNOGLOBULINE DI CLASSE G

Le immunoglobuline (Ig) sono tra le proteine plasmatiche più abbondanti e sono divise in 5 classi : IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Tra le Ig plasmatiche, le più rappresentate sono le IgG che da sole, costituiscono circa l'85% delle Ig totali e il 10-20% delle proteine sieriche (Vidarsson et al. 2014). Le immunoglobuline sono glicoproteine costituite per l' 82-96% dalla componente proteica e per il 4-18% da quella glicidica (Vidarsson et al. 2014). Studi iniziati nel 1960 utilizzando uno specifico anti-siero di coniglio contro proteine prodotte da cellule di mieloma umano, hanno messo in evidenza 4 classi di IgG classificate come: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (Schur 1988). Tutte e 4 le sottoclassi, pur condividendo il 90% della sequenza amminoacidica, si differenziavano tra loro per le seguenti proprietà: vita media, capacità di formare immunocomplessi e attivare il complemento, abilità ad attraversare la placenta e legame all'antigene (Schur 1988). Un calo selettivo di alcune sottoclassi di IgG, che si manifesta più di consueto in una riduzione delle IgG2 e/o IgG4 in individui sani, non è critico per la salute dell'individuo, ma può essere responsabile di una maggiore suscettibilità verso alcuni patogeni (Vidarsson et al. 2014). Esaminiamo brevemente le diverse classi di IgG: **1)** Le IgG1 sono le più abbondanti e risultano essere anche le prime, tra le IgG, ad essere prodotte in risposta alla presenza di un antigene e spesso, la loro presenza è associata a bassi livelli di IgG3 e IgG4 (Ferrante et al. 1990). La riduzione di IgG1 spesso si traduce in un calo della concentrazione totale di IgG sieriche (ipogammaglobulinemia) e, se accompagnata da riduzione di IgG appartenenti ad altre sottoclassi, si associa facilmente ad infezioni ricorrenti (Jefferis & Kumararatne 1990); **2)** Le IgG2 riconoscono in modo selettivo e specifico molecole glucidiche e sono, pertanto, associate principalmente alla difesa

dell'organismo contro batteri capsulati, in quanto ne riconoscono in modo specifico, la componente polisaccaridica (Hammarström & Smith 1983). La riduzione di IgG2, sebbene spesso compensata con un aumento di altre sottoclassi, si manifesta con una maggiore suscettibilità alle infezioni sostenute da particolari batteri (Kuijpers et al. 1992) **3** le IgG3, sono l'unica classe ad essere diretta contro rari antigeni eritrocitari come il caso degli antigeni P e P^k (Söderström et al. 1985). Inoltre, in associazione con le IgG1, guidano le risposte immunitarie contro alcuni antigeni eritrocitari (fattore RhD) (Pollock & Bowman 1990) e piastrinici (*human platelet antigen 1a*) in caso di incompatibilità trasfusionale o madre/figlio durante la gravidanza. (Brouwers et al. 1988; Mawas et al. 1997); **4** le IgG4, come le IgE, sono indotte spesso da allergeni. In caso di patologie allergiche, la desensibilizzazione può essere effettuata, talvolta, eseguendo una terapia immunologica, ovvero somministrando al paziente dosi minime e crescenti dell'allergene purificato al fine di indurre tolleranza. Le IgG4 rivestono un ruolo cruciale in questa pratica clinica, in quanto è stato osservato che, il miglioramento dei sintomi coincide con l'induzione della sottoclasse 4 di IgG che può essere modulata dall'IL-10 (Aalberse et al. 2009). Le IgG4 sono anche alla base di una rara patologia nota come *IgG4 related disease* (IgG4-RD) caratterizzata da un'elevata concentrazione plasmatica di IgG4 seguita da infiltrazione tissutale da parte di plasmacellule IgG4-positive e può riguardare numerosi organi e tessuti (Yamamoto et al. 2012).

1.3.1 IgG : struttura e funzioni

Le IgG sono prodotte da cellule del sistema immunitario adattativo, le plasmacellule e sono formate da 4 catene polipetidiche a due a due uguali (Fig.3). Ogni IgG è costituita da 2 catene leggere (L) di tipo κ o λ , ciascuna di 25kD e da due catene pesanti (H) di tipo γ , da 50 kDa e legate tra loro mediante ponti disolfuro. Le catene H sono caratterizzate dalla presenza di una regione N-terminale variabile (VH) e tre costanti (CH1, CH2 e CH3). Allo stesso modo le catene L hanno una regione N-terminale variabile (VL) ed una costante (CL). La porzione costante della catena leggera è associata alla catena pesante mediante VH e CH1 e forma il Fab (*Fragment antigen binding*), una struttura molto importante sia da un punto di vista strutturale che funzionale. Il Fab, ed in particolare la regione V delle due catene, è deputato al riconoscimento dell'antigene. La porzione compresa fra CH1 e CH2 prende il nome di regione cerniera ed è caratterizzata dall'essere molto flessibile in modo da permettere il legame simultaneo di più antigeni. Infine, le regioni CH2 e CH3 si uniscono a formare la porzione Fc (*fragment crystalline*).

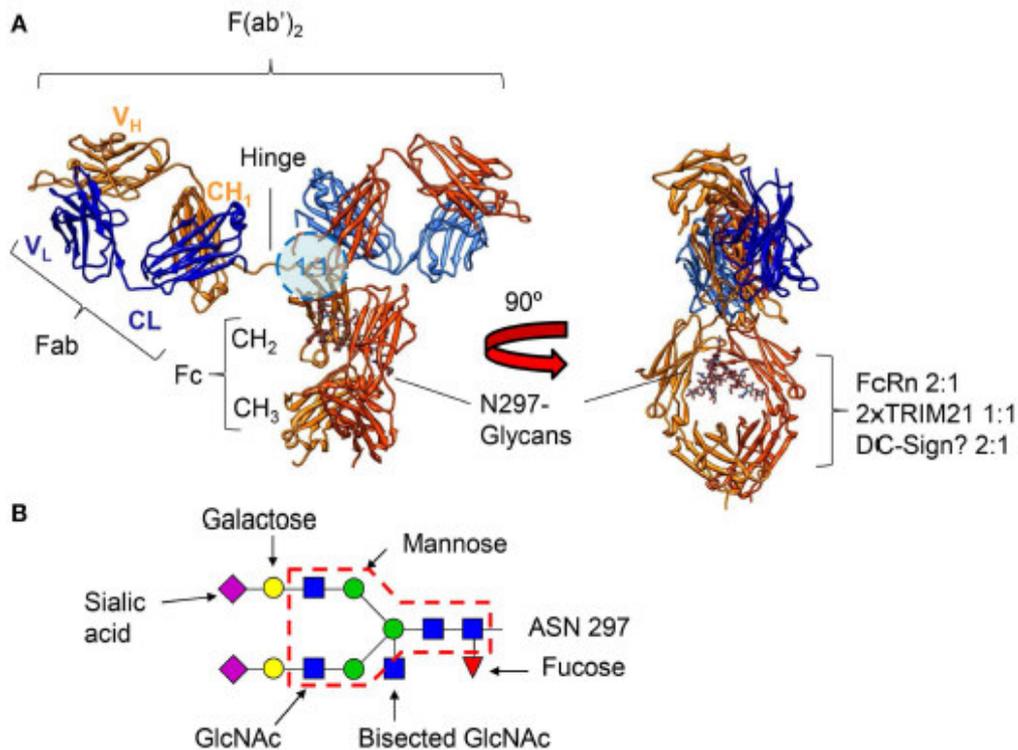


Fig.3: Rappresentazione schematica della struttura di IgG e della catena N-linked associata all'Asn297. Le IgG sono formate da due catene leggere (L) e due pesanti (H). Le catene leggere hanno due domini, uno variabile (VL) e uno costante (CL), invece le catene pesanti hanno un dominio variabile (VH) e tre costanti (CH1, CH2 e CH3). La porzione Fab (*Fragment antigen binding*) riconosce e lega l'antigene ed è costituita dai domini VL, CL, VH e CH1. La zona compresa tra CH1 e CH2 forma la cerniera, mentre l'associazione tra CH2 e CH3 genera il frammento cristallizzabile (Fc). Viene inoltre evidenziato il residuo amminoacidico Asn 297 nell'interfaccia tra CH2 e CH3, importante per essere il principale sito di N-glicosilazione delle IgG (A). Le catene N-linked associate alle IgG (B) possono essere completate con l'aggiunta di galattosio, acido sialico, *core fucose* o *bisecting GlcNAc*. (Da: Vidarsson et al, 2006)

Come detto in precedenza, gli anticorpi sono in grado di riconoscere una grande varietà di antigeni, anche molto diversi tra loro e questa capacità è delegata alla porzione Fab. In particolare ciò è reso possibile grazie al riassortimento genico di tre segmenti genici posti sui locus delle catene pesanti e leggere: V (*Variable*), D (*Diversity*) e J (*Joining*). In particolare, i loci per le Ig nell'uomo sono 3 di cui uno per la catena pesante sul cromosoma 14, uno sul cromosoma 2 per la catena leggera di tipo κ e uno per quella di tipo λ sul cromosoma 22. Ogni locus, partendo dall'estremità 3' possiede una regione costante C e due variabili (V e J), e per le catene pesanti, ma non per le leggere, la porzione V è separata da quella J

da una regione D. Ciascuna regione è formata da un numero diverso di segmenti V, (D), J che vanno incontro a ricombinazione durante la maturazione delle plasmacellule. In particolare il locus della catena λ possiede 30 segmenti V, 4 J tutti in posizione 5' rispetto ai 4 segmenti C. Il locus κ è composto da 40 segmenti V, 5J e un solo C ed è molto simile a quello della catena pesante che presenta 40 segmenti V, 27D, 6J ed uno C. La struttura finale della porzione variabile sarà costituita da un frammento V e uno J per le catene leggere e da un segmento VDJ per le catene pesanti. Il DNA codificante per i diversi loci, così riarrangiato, sarà trascritto in un trascritto primario che subirà uno splicing alternativo e darà origine all'RNA maturo che verrà tradotto. La proteina matura sarà dunque il risultato di un meccanismo di ricombinazione genico e/o mutazioni somatiche che generano una grande variabilità della porzione variabile delle Ig (Potter 1983).

Due regioni della molecola particolarmente importanti sono: la parte più prossimale della cerniera al dominio CH2, in quanto sito di legame del fattore C1q del complemento ed i recettori della porzione Fc delle IgG (Fc γ Rs) ed il residuo Asn 297 situato all'interfaccia tra CH2 e CH3 in quanto principale sito di N-glicosilazione delle IgG (Fig.3). La glicosilazione riveste un ruolo fondamentale nelle attività effettrici delle IgG in quanto ne modula in modo significativo la propria attività in senso pro-/anti-infiammatorio. Anche la regione V ha dei siti di glicosilazione, in particolare circa il 10-15% del totale degli anticorpi risultano glicosilati nella porzione variabile e la presenza di catene di zuccheri insieme al meccanismo di ricombinazione V(D)J è alla base della capacità degli anticorpi di riconoscere una moltitudine di antigeni anche molto diversi tra loro (Wright et al. 1991). Gli anticorpi rappresentano il link tra l'immunità innata e quella di tipo adattativa e sono in grado di riconoscere e neutralizzare agenti patogeni quali virus, batteri, tossine. In alcuni casi, possono reagire nei confronti di antigeni self

e dare origine a quadri patologici noti come malattie autoimmuni: un esempio è dato dall'artrite reumatoide, una patologia autoimmune caratterizzata, in una grossa percentuale di casi, dalla presenza, nel siero, del fattore reumatoide, ossia auto-anticorpi diretti contro la porzione Fc delle IgG. Inoltre gli anticorpi possono riconoscere anche degli antigeni non patogeni, come ad esempio il polline e dare origine a manifestazioni allergiche. In condizioni fisiologiche, gli anticorpi rivestono un ruolo fondamentale per la difesa dell'organismo, esplicato fondamentalmente mediante l'attivazione del complemento ed il legame con i recettori Fc γ su linfociti B, cellule dendritiche, macrofagi, neutrofilo, basofili, eosinofili e cellule natural killer.

1.3.1.1 Attivazione del complemento

Il sistema del complemento consta di oltre 30 proteine e al momento della sua attivazione alcune proteine risultano solubili e altre legate alla membrana del patogeno. L'attivazione del complemento comporta una serie di reazioni a cascata e può avvenire mediante tre vie: classica, alternativa e lectinica, attraverso una serie di reazioni a cascata, come nel caso della coagulazione e che convergono tutte nell'attivazione del fattore C3 che genera i prodotti attivati C3a, C3b e C5a ed infine il MAC (*Membrane Attack Complex*) (Fig.4) (Sarma & Ward 2012). Le IgG, insieme alle IgM, attivano il complemento attraverso la via classica: in seguito al riconoscimento dell'antigene, mediato dalla porzione Fc, legano C1, un complesso multimerico composto di 3 subunità: C1q, C1r e C1s. La componente C1q riconosce la porzione Fc dell'anticorpo legato all'antigene e dal legame simultaneo di C1q con 2 o più porzioni Fc dell'anticorpo attiva C1r che svolge un'azione proteasica scindendo C1s. C1s, anch'essa una proteasi, cliva il fattore C4 in C4a che è rilasciato in circolo e C4b che si lega alla membrana del patogeno

garantendo il proseguimento del processo di attivazione del complemento. C4b recluta il fattore C2 che viene scisso anch'esso in C2a, rilasciato in circolo e C2b che resta legato alla membrana dove forma con C4b la C3 convertasi (C4bC2b), ossia un enzima che lega e scinde il fattore C3 in C3a e C3b. Quest'ultimo svolge due funzioni: **a)** coadiuva il processo di fagocitosi del patogeno, fungendo da opsonina e **b)** lega il complesso C3 convertasi formando il complesso C5 convertasi che cliva il fattore C5 in C5a che è riversato nel torrente circolatorio, e C5b che si lega alle altre proteine già presenti sulla membrana e recluta i fattori C6, 7, 8 e 9 conducendo alla formazione del MAC (Fig.4) (C5b-9). Il MAC si inserisce nella membrana del patogeno e ne causa la lisi (Sarma & Ward 2012).

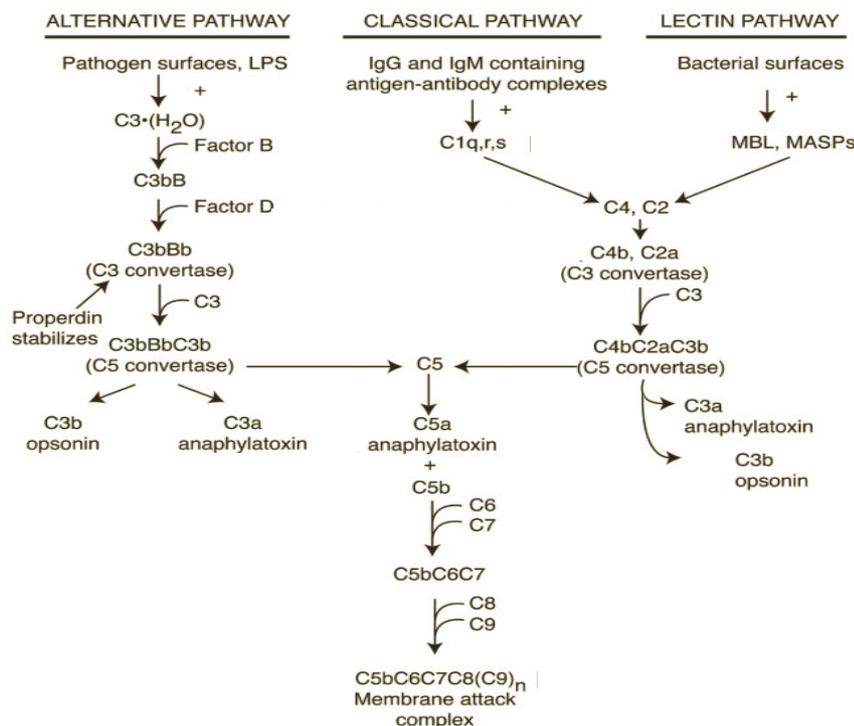


Fig.4: Rappresentazione schematica del sistema del complemento. L'attivazione può avvenire mediante tre vie: classica, alternativa e lectinica che convergono tutte nell'attivazione della componente C3 ed infine nella formazione del Membrane attack complex (MAC) (Da: Sarma and Ward, 2011).

Per quanto riguarda le IgG abbiamo visto essere in grado di legare e attivare il fattore C1q, sebbene non tutte le sottoclassi siano in grado di farlo allo stesso modo. In particolare le IgG1 e IgG3 legano con alta efficienza il C1q mentre le IgG2 e IgG4 con meno efficienza e solo in alcuni casi. La capacità di legare C1q sembra essere legata ad una particolare struttura e composizione della catena peptidica a livello della regione CH2. Ad esempio è stato dimostrato che la sostituzione di una leucina con una alanina in posizione 235 è causa di una ridotta affinità delle IgG2 verso il C1q (Morgan et al. 1995).

1.3.1.2 Interazione con FcγRs

I recettori Fcγ (FcγRs) sono localizzati su diverse cellule del sistema immunitario dove svolgono funzioni diverse. In particolare FcγRs si trovano su monociti e macrofagi, neutrofilo ed eosinofili, cellule Natural Killer (NK) e linfociti B e, da un punto di vista funzionale, sono divisi in due grandi gruppi: **a)** gli attivatori, che comprendono i FcγRI, FcγRIIa e FcγRIIIa e **b)** gli inibitori di cui ne fa parte FcγRIIb (Nimmerjahn & Ravetch 2006; Schwab & Nimmerjahn 2013) (Fig.5).

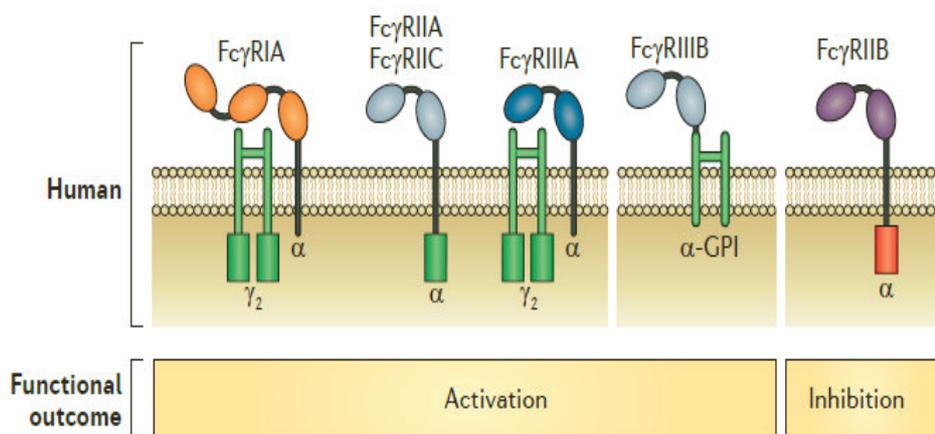


Fig.5: Visione schematica delle due grandi classi di FcγRs nell'uomo. [Da: (Schwab & Nimmerjahn 2013)]

Le classi attivatorie sono caratterizzate dalla presenza di motivi ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*), ovvero contengono due sequenze formate da una tirosina separata da due amminoacidi da una leucina e le due sequenze sono separate di solito da 6-8 amminoacidi (Barrow & Trowsdale 2006). Tali sequenze sono importantissime per la trasduzione del segnale in quanto, in seguito al legame con il recettore, la tirosina è fosforilata e dà l'avvio alla funzione effettrice. I recettori inibitori hanno invece, all'estremità citoplasmatica, delle sequenze ITIM (S/I/V/LxYxxI/V/L) (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif*) ed in seguito al legame col ligando i motivi ITIM vengono fosforilati e reclutano fosfatasi che inibiscono la trasduzione del segnale (Ravetch 2000). Il sito di legame delle IgG a Fc γ Rs è lo stesso che lega il fattore C1q e comprende i seguenti residui : 234-239,265-269,297-299,327-330 (Vidarsson et al. 2014). Ciascuna sottoclasse di IgG ha un profilo di legame unico alle varie classi di Fc γ R, ad esempio le IgG1 e IgG3 interagiscono molto bene con diverse classi Fc γ R, al contrario delle IgG2 e IgG4 che ne legano solo alcune. L'effetto del legame delle IgG alle diverse classi di Fc γ Rs ha degli effetti diversi a seconda sia del tipo di recettore coinvolto sia del tipo cellulare a cui è legato. Ad esempio l'attivazione del recettore Fc γ RIII posto su cellule NK induce la citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC). In particolare il legame di IgG, legate alla struttura target, con Fc γ RIII, induce sia il rilascio di citochine infiammatorie come l'IFN γ che stimolano altre cellule del sistema immunitario, sia la produzione di granzimi e perforine responsabili della morte della cellula target (Sun 2003). Al contrario, il legame dell'anticorpo al recettore Fc γ RIIB sui linfociti B è responsabile della soppressione dell'attività immunitaria.

1.4 LA GLICOSILAZIONE DELLE IgG

Le Immunoglobuline G hanno diversi siti di N-glicosilazione sia nel Fab (10-20% del totale delle IgG circolanti) sia nella porzione Fc dove è presente, peraltro, il principale sito N-linked delle IgG: il residuo Asn 297 (Fig. 3A) (Vidarsson et al. 2014). L’N-glicosilazione del Fab e del Fc presenta delle importanti differenze in termini di composizione, dovuta, in parte, alla diversa capacità da parte di glicosidasi e glicosiltransferasi, di accedere ai potenziali siti di N-glicosilazione; infatti, la porzione Fab, rispetto al sito Asn297 della porzione Fc risulta più facilmente accessibile. Inoltre, come visto in precedenza, la glicosilazione è un processo stocastico e quindi dipendente dalla disponibilità di donatori zuccheri e di glicosiltransferasi e/o glicosidasi, pertanto, la presenza di particolari glicoforme dipende dall’espressione di glicosiltransferasi nei linfociti B che, a sua volta, può essere influenzata da meccanismi epigenetici (Menni et al. 2013) dipendenti da diversi fattori quali età, ormoni o citochine (Chen et al. 2012). Le catene N-linked associate al Fab sono frequentemente galattosilate e sialilate (spesso presentano una di-sialilazione) e presentano strutture tipo la *bisecting GlcNAc*. Diversamente, la fucosilazione caratterizza maggiormente le catene N-linked Fc-associate (90% delle IgG totali) rispetto a quelle associate al Fab (70% delle IgG totali) (Vidarsson et al. 2014). Le catene N-linked legate alla Asn297 sono di tipo bi-antennario la cui struttura di base (2GlcNAc,5Man, 2GlcNAc) può essere completata con l’aggiunta di galattosio e acido sialico su una o entrambe le antenne, *bisecting GlcNAc* e *core fucose* (Huhn et al. 2009). Nel siero di individui sani, tuttavia, le catene N-linked IgG-associate maggiormente presenti sono fucosilate con antenne: a) prive di galattosio; 2) con uno/due residui di galattosio o 3) con due residui di galattosio e uno di acido sialico (Vidarsson et al. 2014). La

maggior variabilità riguarda, comunque, la presenza/assenza del galattosio e, di conseguenza dell'acido sialico, su una o entrambe le antenne ed in particolare, a seconda della presenza di catene N-linked completate con una, due o nessuna molecola di galattosio le IgG sono classificate come G2, G1 o G0 rispettivamente (Huhn et al. 2009).

1.5 EFFETTI DELLA GLICOSILAZIONE SULL'ATTIVITA' DELLE IgG

1.5.1 Galattosilazione

La presenza del galattosio terminale sulla catena N-linked Fc-associata conferisce alle IgG un'attività di tipo anti-infiammatorio. Ad esempio, in seguito a somministrazione di vaccini contro il virus influenzale o la tossina tetanica, è stato dimostrato che le IgG prodotte contro l'antigene, ma non le totali, risultano più galattosilate inducendo quindi una risposta immunitaria, ma non infiammatoria (Selman et al. 2012). Al contrario, nell'artrite reumatoide (RA), si osserva una diminuzione di IgG galattosilate nella porzione Fc (IgG-G0) (Parekh et al.) e la reversione del fenotipo IgG-G0 la si osserva invece in donne affette da AR in corso di gravidanza, soprattutto durante il terzo trimestre (Rook et al. 1991), condizione a cui è spesso associata la remissione della sintomatologia (Pekelharing et al. 1988; Bondt et al. 2013).

Alterazioni della glicosilazione delle IgG sono state osservate anche in un processo fisiologico quale l'invecchiamento. In particolare i primi studi in tal senso furono condotti alla fine degli anni '80 da Parekh et al. che analizzarono il siero di 151 individui sani, di entrambi i sessi e di età compresa tra 1 e 70 anni.

L'analisi riguardava in modo selettivo il grado di galattosilazione delle IgG al netto del contributo conferito dall'aggiunta di acido sialico, fucosio o N-acetilglucosammina (Parekh et al.). Lo studio, pubblicato nel 1988 mise in evidenza che: 1) circa il 30% dei bambini analizzati presentava IgG con catene N-linked prive del galattosio terminale, 2) nei giovani (età media 25 anni) solo nel 20% dei casi entrambe le antenne delle catene N-linked delle IgG terminavano con la GlcNAc, 3) mentre in soggetti anziani, la percentuale di IgG-G0 sale al 40% (Parekh et al.). Più tardi, un gruppo di ricerca giapponese analizzò un campione più cospicuo (176 donne e 227 uomini) di età compresa fra 0 e 84 anni e confermò la correlazione negativa tra l'età anagrafica e il grado di galattosilazione delle IgG (Yamada et al. 1997).

1.5.1.1 Effetti patologici dovuti alla ridotta galattosilazione di IgG

Come descritto già in precedenza, le IgG-G0, sono delle particolari glicoforme di IgG le cui antenne della catena N-linked legata all'Asn 297 (porzione Fc), sono prive del Gal in posizione terminale e terminano pertanto con un residuo di GlcNAc. La perdita di galattosio, oltre a modificarne la struttura, conferisce alle IgG un'attività di tipo pro-infiammatorio attraverso almeno quattro meccanismi (Fig.6): **1)** interazione con il recettore MBL (*Mannose Binding Lectin*) e successiva attivazione della cascata del complemento mediante la via lectinica; **2)** attivazione delle cellule APC (*Antigen Presenting Antigen*) mediata da recettori lectinici; **3)** interazione con Fc γ Rs su cellule NK e macrofagi; **4)** formazione di aggregati di anticorpi (Dall'Olio et al. 2013).

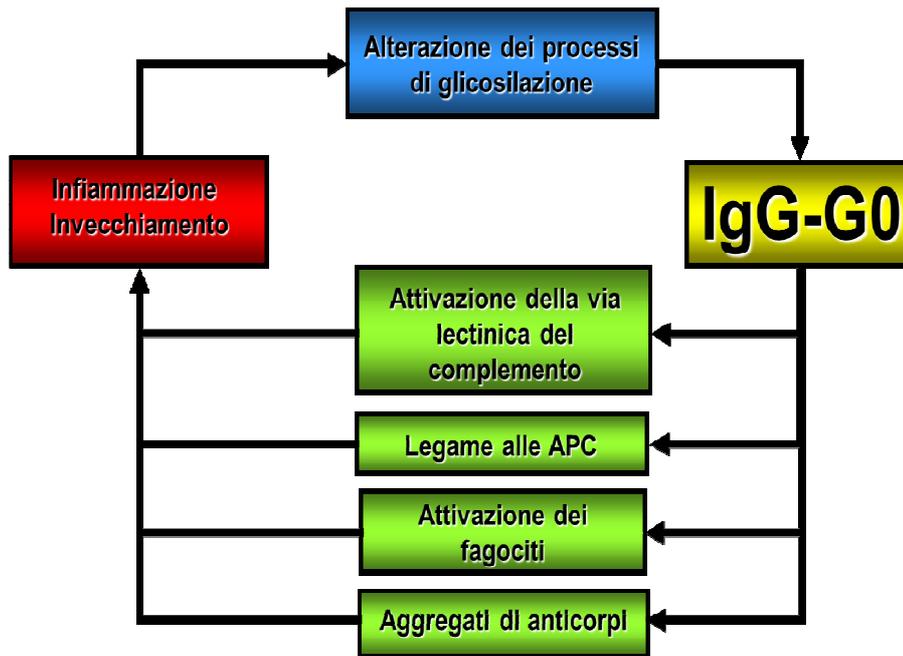


Fig.6: Le IgG-G0 come causa ed effetto dell'infiammazione. Il diagramma mostra come le IgG-G0 siano il risultato di una alterata glicosilazione e causa di infiammazione attraverso quattro meccanismi distinti: 1) attivazione del complemento, mediata dal legame a MBL; 2) attivazione delle cellule presentanti l'antigene (APC) mediata dal legame a recettori DC-SIGN o recettori per il mannosio (MBP); 3) attivazione di fagociti mediata dall'interazione con recettori Fc γ ; 4) formazione di aggregati di anticorpi. L'attivazione del processo infiammatorio agisce poi sull'apparato glicosintetico, causandone delle aberrazioni funzionali che generano le IgG-G0 [Da: (Dall'Olio et al. 2013)].

È stato proposto che le alterazioni della glicosilazione di IgG nell'invecchiamento siano causa ed effetto dell'infiammazione (Fig.6). In particolare le IgG-G0 attraverso i meccanismi sopraelencati attiverrebbero il processo infiammatorio il quale influenzerebbe e modificherebbe l'apparato glicosintetico e tali modificazioni si tradurrebbero in un'ulteriore produzione di IgG con alterata glicosilazione (Dall'Olio et al. 2013).

Legame a MBL e attivazione del complemento

Il recettore MBL è una proteina di origine epatica, analoga al fattore C1q del complemento (Malhotra et al. 1995) e capace di riconoscere residui di mannosio e GlcNAc sulla superficie di microrganismi patogeni (Troelsen et al. 2007). Il recettore MBL svolge una duplice funzione in quanto funge da proteina opsonizzatrice, incentivando l'attività di cellule ad azione fagocitaria ed è in grado di attivare la cascata del complemento (Troelsen et al. 2007). I livelli sierici di MBL sono determinati geneticamente e variano molto all'interno della popolazione in quanto determinati da almeno tre configurazioni alleliche sull'esone 1 del gene MBL2 posto sul cromosoma 10 (Garred 2003). L'effetto patogeno che, in pazienti AR, le IgG-G0 esplicano mediante il legame con MBL è legato alla loro forza di interazione, almeno cinque volte superiore rispetto alle IgG normo-glicosilate (Malhotra et al. 1995) e la conseguente capacità di attivare il complemento mediante la via lectinica contribuisce ad incrementare il processo infiammatorio nelle giunzioni sinoviali (Malhotra et al. 1995). Infine studi condotti su pazienti RA hanno dimostrato che la simultanea presenza di MBL e IgG-G0 in concentrazioni elevate è associata ad una aumentata mortalità in seguito ad eventi ischemici e/o infarti del miocardio. Tale associazione è correlata alla persistenza del processo infiammatorio cronico che aggrava i danni dovuti alla ri-perfusione dei tessuti colpiti da ischemia (Troelsen et al. 2007).

Di contro, studi condotti su pazienti RA portatori di una particolare variante allelica di MBL, descritta come incapace di attivare il complemento, non mostrano alcun tipo di protezione o miglioramento di sintomi legati al processo infiammatorio a livello delle giunzioni sinoviali (Stanworth et al. 1998). Pertanto, secondo questi dati, l'attivazione del complemento, mediata dal legame MBL-IgG-G0, non avrebbe un ruolo da protagonista nella fisiopatologia dell'artrite

reumatoide (Stanworth et al. 1998). Inoltre, studi più recenti, dimostrano che, in topi a cui è stato deletato il gene per la MBL, l'attività infiammatoria delle IgG-G0 non ne risulta compromessa (Nimmerjahn et al. 2007).

Interazione con cellule presentanti l'antigene (APC) e recettori $Fc\gamma$

Le IgG-G0, in seguito all'esposizione della GlcNAc terminale, sono in grado di attivare cellule dendritiche e macrofagi mediante il loro legame ai recettori per il mannosio, una lectina di tipo C e analoga, dal punto di vista funzionale, a MBL (Dong et al. 1999). I recettori per il mannosio sono in grado di riconoscere e legare diverse strutture di carboidrati tra cui i residui di GlcNAc (Lennartz et al. 1987) e di conseguenza le IgG-G0. In seguito al legame, le IgG-G0 vengono internalizzate nel citoplasma dove subiscono una particolare processazione che si conclude con la produzione di piccoli peptidi con caratteristiche antigeniche che, in seguito all'associazione con molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di tipo II (MCH II), vengono esposti sulla superficie cellulare al fine di stimolare una risposta immunitaria mediata dai linfociti T (Dong et al. 1999).

Le IgG-G0 stimolano il processo infiammatorio anche mediante il legame ed attivazione delle cellule dendritiche attraverso il recettore DC-SIGN (anche conosciuto come recettore CD209) (Yabe et al. 2010), un recettore appartenente alla superfamiglia delle lectine di tipo C (Soilleux et al. 2002). Il DC-SIGN è un recettore che presenta 3 domini: uno citoplasmatico, uno transmembrana ed uno extracellulare che contiene dei motivi CRD (*carbohydrate-recognition domain*) in grado di riconoscere residui terminali di Man, Fuc e GlcNAc attraverso un meccanismo Ca^{2+} -dipendente (Mitchell et al. 2001).

I recettori Fc γ , descritti in precedenza, subiscono anch'essi gli esiti dell'alterata glicosilazione delle IgG. In particolare, la perdita del galattosio terminale sembra essere cruciale nell'indurre, nella porzione Fc delle IgG, un cambio conformazionale tale da rendere più agevole il legame, e, successiva attivazione dei recettori Fc γ (Krapp et al. 2003).

Formazione di aggregati di IgG-G0

La presenza di aggregati di IgG è stata messa in evidenza nel liquido sinoviale di pazienti AR, dove le IgG-G0 (Leader et al. 1996) tendono ad aggregarsi e a peggiorare il processo infiammatorio a livello delle giunzioni sinoviali. In particolare è emerso che il grado di galattosilazione sembra ridursi sensibilmente nelle IgG che formano aggregati rispetto a quanto osservato per IgG in forma libera (Leader et al. 1996) confermando che la perdita di galattosio in posizione terminale facilita l'aggregazione di molecole anticorpali.

1.5.2 Fucosilazione

Le IgG prodotte in seguito a vaccinazione o normali risposte immunitarie risultano in gran parte fucosilate nella porzione Fc e ciò spiega perché circa il 94% delle IgG circolanti risulta fucosilato (Vidarsson et al. 2006). Nella catena N-linked legata all'Asn 297, il fucosio può essere trasferito al residuo di GlcNAc legato al peptide, dalla α 1,6fucosiltrasferasi-8 (FUT8) a formare il *core fucose* (Miyoshi et al. 1999). La presenza di un residuo di fucosio sulla catena CH2 dell'anticorpo si ripercuote sulla capacità di indurre ADCC, capacità che per altro non sembra essere influenzata dalla presenza di acido sialico, galattosio o *bisecting GlcNAc* (Mimura et al. 2000; Iida et al. 2006). Osservazioni sperimentali

dimostrano infatti che in malattie immunitarie come la trombocitopenia alloimmune fetale, si ha un incremento di anticorpi non fucosilati di origine materna diretti verso antigeni piastrinici (Wuhrer et al. 2009). L'effetto anti-infiammatorio che conferisce la presenza del fucosio alle IgG dipende dall'interazione con il recettore Fc γ RIIIa sui fagociti. La perdita del *core fucose*, infatti produce dei cambiamenti conformazionali che si traducono in una maggiore capacità di legare Fc γ RIIIa e quindi di indurre l'ADCC (Shields et al. 2002). Tale capacità viene sfruttata anche in clinica, per potenziare l'effetto terapeutico di alcuni anticorpi monoclonali (Jefferis 2009).

1.5.3 Sialilazione

La sialilazione conferisce alle IgG un'attività anti-infiammatoria che è alla base di una comune pratica clinica, la IVIG (*Intravenous Immunoglobulin*), utilizzata per attenuare i sintomi correlati a quadri clinici caratterizzati da autoimmunità associata ad infiammazione cronica (Schwab & Nimmerjahn 2013). La IVIG consiste nella somministrazione intravenosa di alte dosi di IgG purificate (1-3g/kg) (Gelfand 2006) dal siero di 5-10000 donatori (Dwyer 1992). Le IgG contenute nella soluzione inoculata comprendono tutte le sottoclassi (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) e più di 30 glicovarianti (Anthony et al. 2008). La somministrazione di IgG in pazienti affetti da malattie autoimmuni è controintuitiva e potrebbe sembrare paradossale in quanto sono le IgG stesse responsabili del quadro sintomatologico di patologie autoimmunitarie come il lupus eritematoso sistemico o l'artrite reumatoide (Schwab & Nimmerjahn 2013). In realtà l'attività terapeutica è relegata ad una piccola percentuale di IgG, ovvero a glicoforme che presentano la catena N-linked, legata all'Asn297, con una o entrambe le antenne terminanti con residui di acido sialico (Kaneko et al. 2006). Studi in vitro hanno

dimostrato che, in seguito al trattamento di IgG con Neuraminidasi, enzima che rimuove selettivamente l'acido sialico in posizione terminale, si ha la perdita dell'attività anti-infiammatoria IVIG-specifica (Böhm et al. 2012), mentre l'arricchimento di dosi di IVIG con IgG precipitate con SNA, (una lectina estratta da *Sambucus nigra*, che riconosce l'acido sialico in posizione $\alpha 2,6$), ne incrementa l'attività anti-infiammatoria (Kaneko et al. 2006). Da un punto di vista molecolare, l'attività anti-infiammatoria di IgG sialilate è legata all'interazione con il recettore dei macrofagi Fc γ RIIB (Fig.7) che è associato ad un'attività di tipo inibitorio (Böhm et al. 2012).

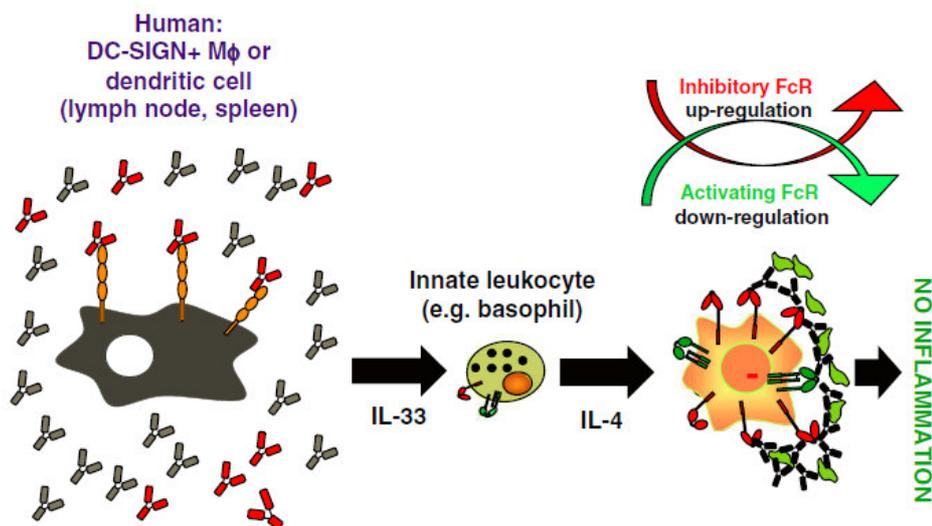


Fig.7: Effetto anti-infiammatorio di IgG sialilate. Le IgG sialilate riducono l'infiammazione attraverso un meccanismo che vede coinvolti i recettori DC-SIGN. Il legame di IgG sialilate ai recettori DC-SIGN sulle cellule dendritiche induce la produzione di IL-33, che a livello dei basofili, stimola la produzione di IL-4 e quindi un pathway Th2. L'IL-4 infine, stimola sui macrofagi l'esposizione di Fc γ RIIB (inibitori) e riduce quella di Fc γ R di tipo attivatorio. In seguito al legame del complesso autoantigene- anticorpo, tipico di malattie autoimmuni, l'abbondanza di Fc γ R inibitori blocca il processo infiammatorio. [Da: (Böhm et al. 2012)]

In particolare studi eseguiti su modelli murini indicano che la presenza di Fc γ RIIB su macrofagi o cellule della linea mieloide, presenti nel sito di infiammazione,

aumenta significativamente dopo trattamento con IVIG, mentre altre isoforme di Fc γ R di tipo attivatorio tendono a diminuire (Kaneko et al. 2006). Più nel dettaglio, il pathway indotto dalle IgG sialilate coinvolge, su cellule dendritiche, il recettore murino SIGNR1, ortologo del recettore umano DC-SIGN. Le IgG sialilate, ma non le de-sialilate, legano con grande affinità il recettore SIGNR1 e inducono il rilascio di Interleuchina 33 (IL-33) la quale stimola i basofili a produrre Interleuchina 4 (IL-4). L'effetto dell'IL-4 sui macrofagi è quello di stimolare l'esposizione di Fc γ RIIB (inibitorio) e inibire quella di Fc γ Rs di tipo attivatorio (Pricop et al. 2001; Nimmerjahn & Ravetch 2006). In tal modo, in seguito al legame del complesso autoantigene-anticorpo con i recettori Fc γ RIIB, a questo punto più abbondanti sui macrofagi attivati, riduce sensibilmente il processo infiammatorio (Fig.7).

Da quanto discusso finora, la sialilazione della porzione Fc conferirebbe alle IgG un'attività di tipo anti-infiammatoria che vede coinvolti il recettore DC-SIGN, i basofili e i recettori Fc γ di tipo inibitorio. Tuttavia tale visione viene messa in discussione da altri studi, sia su modelli murini che umani. Studi funzionali dimostrano che il grado di sialilazione non interferisce sulla capacità delle IgG di legare Fc γ Rs o DC-SIGN. In particolare è stato evidenziato che il legame di glicoformenti di IgG (di classe 1 e 3) de-sialate o agalattosilate ai polimorfonucleati (PMN), mediato dal recettore Fc γ RIIB (di tipo attivatorio), non risulta più basso rispetto alle isoforme native (Adler et al.) e che l'affinità tra la porzione Fc delle IgG e il recettore DC-SIGN sia indipendente dal grado di sialilazione, e più in generale di glicosilazione, della porzione Fc delle IgG (Yu et al. 2013). Studi più recenti, eseguiti su pazienti affetti da trombocitopenia autoimmune, patologia caratterizzata dalla opsonizzazione (IgG-dipendente) e successiva fagocitosi di

cellule del sangue da parte dei macrofagi, mostrano che, in seguito a IVIG, si ha riduzione della fagocitosi, non dipendente dal grado di sialilazione della porzione Fc delle IgG né da un incremento dell' espressione di Fc γ RIIb (Nagelkerke et al. 2014). Tali studi risultano in accordo con i dati ottenuti su un modello murino di trombocitopenia autoimmune: anche in questo caso dal confronto tra somministrazioni di IVIG arricchite di glicoforme de-sialilate o iper-sialilate non emerge alcun tipo di differenza sull'effetto clinico manifestato e, da un punto di vista molecolare, la somministrazione di alte dosi di IgG non provoca un incremento dell'mRNA di Fc γ RIIb a livello splenico, ma solo a livello del midollo osseo (Leontyev et al. 2012). Infine Campbell et al. hanno dimostrato, su un modello murino di artrite, che l'attività anti-infiammatoria delle IVIG non dipende dai basofili (Campbell et al. 2014).

2. SCOPO DELLA RICERCA

Scopo della ricerca è studiare lo stato di glicosilazione delle proteine plasmatiche con particolare riferimento alle IgG e indagare i possibili meccanismi alla base della loro alterata glicosilazione nell'invecchiamento. Abbiamo studiato l'attività di glicosiltransferasi plasmatiche, con particolare riferimento alla β 1,4GalT e ST6Gal1, in modo da valutare, sulla base della più recente letteratura (Wandall et al. 2014; Lee et al. 2014), un eventuale ruolo di queste isoforme plasmatiche nella glicosilazione delle IgG. Lo studio è stato eseguito su plasmi derivati da individui sani di ambo i sessi e di diversa età e, come modello di invecchiamento precoce, saranno utilizzati plasmi di soggetti ambo sessi, di diversa età e affetti da Sindrome di Down.

3. MATERIALI E METODI

3.1 MISURA DELL'ATTIVITA' DI GLICOSILTRANSFERASI PLASMATICHE

Misura dell'attività α 2,6sialiltrasferasica

L'attività α 2,6sialiltrasferasica (ST6GalT) veniva misurata utilizzando come accettore l'asialotransferrina. La de-sialilazione della transferrina veniva eseguita mediante una blanda idrolisi acida con acido solforico (H₂SO₄) 50mM per 1 h a 80°C. Il campione veniva poi dializzato e liofilizzato e successivamente risospeso in H₂O alla concentrazione di 20mg/ml. Per misurare l'attività ST6Gal-T1 veniva preparata una miscela di reazione che conteneva, in un volume finale di 50 μ l: 80 μ M tampone Na-cacodilato a pH 6.5, 5 μ M di CMP-acido sialico e 1 μ l di CMP-[³H]-acido sialico (0.001mCi/ml), 500 μ g di asialotransferrina come accettore glicoproteico e 5 μ l di plasma umano. Dopo 3h di incubazione a 37°C, la componente glicoproteica veniva precipitata aggiungendo 1ml di acido fosfotungstico (FTA) 1%. Il precipitato ottenuto veniva lavato due volte con FTA 1% e una con metanolo, risospeso in HCl 1M e infine bollito per 15 min. La radioattività presente nelle glicoproteine, misura diretta dell'attività della ST6Gal-T1, veniva rilevata mediante l'utilizzo dello scintillatore *Guardian 1414 Liquid Scintillation Counter (PerkinElmer)*.

Misura dell'attività β 1,4galattosiltrasferasica

L'attività β 1,4galattosiltrasferasica (β 1,4Gal-T) veniva misurata su 5 μ l di plasma umano utilizzando, come accettore ovalbumina estratta da uovo di pollo. La reazione veniva eseguita in un volume finale di 20.5 μ l e contenente: 97.5mM Tris/HCl pH 8, 9.75mM Mn₂Cl, 4.9mM CDP-Colina, 1 μ l di UDP-[³H]-galattosio (0.025mCi/ml), 0.4mM ATP e 550 μ g di ovalbumina. Dopo 3h di incubazione a 37°C la rilevazione della radioattività associata all'accettore glicoproteico veniva eseguita come descritto in precedenza per l'attività ST6Gal1.

3.2 STUDIO DELLO STATO DI GLICOSILAZIONE DELLE IgG

Isolamento di proteine plasmatiche sialilate mediante precipitazione con SNA-agarose

A 400 μ l di plasma umano venivano aggiunti 100 μ l di PBS contenente 1% NONIDET-P40, 1% acido deossicolico e inibitori di proteasi. In seguito, venivano aggiunti 20 μ l di una soluzione SNA-biotina (2mg/ml) (Vector Laboratories) e il campione veniva incubato per 5h a 4°C in agitazione. Venivano poi aggiunti 50 μ l di Streptavidina-Agarose (1mg/ml) (Vector Laboratories) e il campione veniva incubato *overnight* a 4°C in agitazione. Dopo centrifugazione il pellet ottenuto veniva lavato 3 volte con PBS contenente 1% NONIDET-P40, 1% acido deossicolico e inibitori delle proteasi e una con Tris-HCl 50mM/NaCl 15mM. In seguito a centrifugazione il campione veniva risospeso con 70 μ l di H₂O e 50 μ l di

sample buffer riducente e incubato a 60°C per 15min, prima di sottoporlo ad elettroforesi secondo il metodo di Laemmli (Laemmli 1970).

Identificazione di proteine SNA-positive mediante MALDI-TOF/TOF

Le bande di interesse venivano isolate dal gel e processate per l'analisi MALDI MS, eseguita presso l'Unità di Proteomica dell'IPATIMUP (Università di Porto), al fine di identificare le proteine in esse contenute. Le bande escisse dal gel venivano lavate, decolorate (nel caso in cui fossero state precedentemente colorate con Blue Comassico), digerite con Tripsina e i peptidi venivano estratti secondo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice della Tripsina (Promega, USA). Le proteine digerite venivano desalinizzate, concentrate e caricate sulla piastra del MALDI usando ZipTips (Millipore, USA) seguendo le indicazioni del produttore. Per la preparazione della matrice veniva utilizzata una soluzione di 6-8mg/ml di acido α -ciano-4-idrossicinnamico in 50%ACN/0.1%TFA. I campioni venivano analizzati utilizzando un 4700 Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF (AB SCIEX, USA). I dati relativi alla *peptide mass fingerprint* (PMF) venivano acquisiti in un riflettore positivo MS in un range di 700-4000 (m/z) e la calibrazione interna dello strumento veniva eseguita utilizzando picchi derivati dall'autolisi della tripsina. Se necessario, per l'analisi MS/MS, venivano selezionati degli altri picchi, di più alta intensità, non derivati dalla digestione con tripsina. Gli spettri MS e MS/MS venivano analizzati utilizzando il software GPS Explorer (Version 3.6, AB SCIEX, USA) e, utilizzando il *Mascot search engine* (Version 2.1.04, Matrix Science, UK), le sequenze venivano ricercate nei seguenti database: UniProtKB/Swiss-Prot, UniProtKB/TrEMBL e NCBI *Inr*. L'inclusione del picco avveniva solo se il rapporto tra il segnale/rumore di fondo era maggiore di 10. L'associazione tra il picco ottenuto e la proteina identificata avveniva con

un intervallo di confidenza (CI), calcolato con il software AB SCIEX GPS, di almeno il 99%.

Lectin-blot

Le proteine contenute in 10µl di plasma umano, diluito 100X, venivano separate mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti e riducenti secondo il protocollo di Laemmli (1970). In ogni gel venivano caricate due quantità note (2,5 e 5 µg) di IgG standard (Sigma), necessarie per normalizzare l'intensità del segnale. Le proteine così separate venivano trasferite su membrana di nitrocellulosa. Il blocco dei siti aspecifici era eseguito a temperatura ambiente incubando il filtro per 1h con una soluzione di BSA 3% in PBS contenente Tween-20 0,1% (PBS-T). I lavaggi del filtro, dopo ogni incubazione, venivano effettuati con PBS-T e le soluzioni di lectine e/o di anticorpo secondario venivano diluite in PBS-T contenente BSA 10mg/ml. Si eseguivano due lavaggi da 10min ciascuno seguiti dall'incubazione con la lectina digossigenilata. Per identificare le diverse strutture glicidiche sono state utilizzate le seguenti lectine: A seconda del tipo di indagine, le lectine utilizzate sono state le seguenti: *Sambucus nigra* (SNA), *Griffonia simplicifolia II* (GSII), *Erythrina cristagalli* (ECL), *Ulex Europeans I* (UEA), *Phaseolus vulgaris erythroagglutinin* (PHA-E) [Vector Laboratories]. Le incubazioni con le lectine venivano eseguite in tutti i casi per 1h a temperatura ambiente, con soluzioni d'uso 0.5µg/ml. Si proseguiva con 2 lavaggi da 10 minuti ciascuno e infine si eseguiva, per 1h a temperatura ambiente, l'incubazione con anti-digossigenina coniugata con la perossidasi. Dopo 2 lavaggi si procedeva con la rilevazione del segnale con SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific). L'intensità del segnale corrispondente alla catena pesante delle IgG veniva

quantificato spettrofotometricamente e normalizzato con quello delle quantità note di IgG standard, ottenendo un valore assoluto che consentiva la comparazione di gel diversi.

Digossigenilazione di lectine

Le lectine da noi utilizzate per l'analisi lectin blot, venivano preventivamente coniugate con Digossigenina. Le lectine venivano risospese in H₂O alla concentrazione 1mg/ml e ad ogni ml di soluzione venivano aggiunti 9µl di una soluzione di Digossigenina (41mg/ml in etanolo). Dopo 2h di incubazione a temperatura ambiente, si dializzava esaustivamente.

3.3 GLYCOAGE TEST

Il GlycoAge test viene calcolato in seguito allo studio del profilo degli N-glicani legati a glicoproteine plasmatiche effettuato mediante DSA-FACE (*DNA Sequencer-assisted fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis*) come descritto da Callewaert *et al.* (Callewaert et al. 2001). La procedura è suddivisa in 5 steps: deglicosilazione delle glicoproteine plasmatiche mediante l'enzima N-glicosidasi F (PNGasi F), derivatizzazione con acido 8-ammino-1,3,6-PireneTriSolfonico (APTS), desialilazione delle catene N-linked mediante Neuraminidasi, separazione delle specie glicaniche mediante un sequenziatore di DNA e analisi dei dati. La procedura sopra descritta veniva eseguita secondo il metodo messo a punto da Vanhooren *et al.* (Vanhooren et al. 2008). Il GlycoAge test veniva inteso come il rapporto tra la concentrazione di catene N-linked agalattosilate (NGA2F) e di-galattosilate (NA2F), in entrambi i casi *core fucosilated* (Vanhooren et al. 2010).

4. RISULTATI

4.1 ATTIVITA' ST6Gal1 e β 1,4GalT IN PLASMA UMANO DI SOGGETTI SANI

Su un campione di 123 plasmi, derivati da individui sani di entrambi i sessi e di diversa età, è stata misurata l'attività di due glicosiltrasferasi che intervengono nelle fasi finali di biosintesi di catene N-linked: la α 2,6sialiltrasferasi (ST6Gal1) e la β 1,4galattosiltrasferasi (β 1,4GalT).

La ST6Gal1 catalizza il trasferimento di un residuo di acido sialico a livello di un residuo di galattosio terminale, mentre la β 1,4GalT trasferisce ad un residuo di GlcNAc terminale, un residuo di galattoso.

La popolazione analizzata è stata suddivisa in cinque classi di età: **a)** bambini di età compresa fra i 5 e i 12 anni; **b)** giovani tra i 24 e i 39 anni; **c)** adulti tra i 40 e i 60 anni ; **d)** anziani di età compresa fra i 61 e 80 anni ed **e)** over 80, comprensivi dei centenari (età > 98anni).

Dai dati ottenuti si evince che le attività di entrambe le glicosiltransferasi sono in relazione con l'età, sebbene con modalità differenti (Fig. 8A e C).

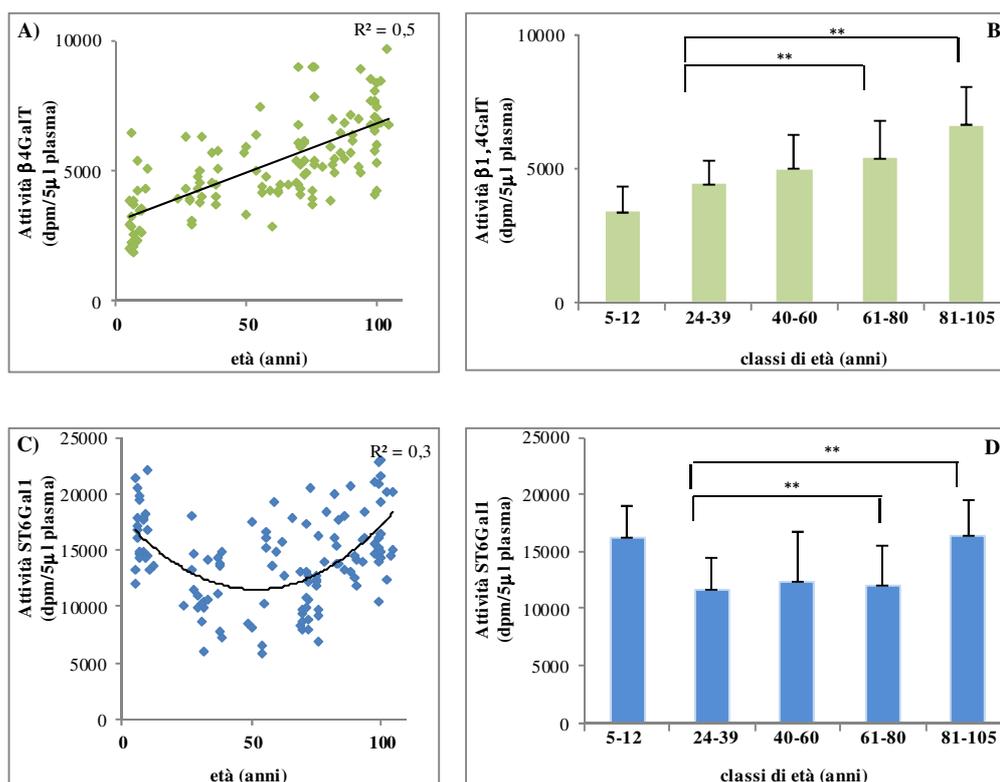


Fig. 8: Attività di glicosiltransferasi plasmatiche misurate in soggetti sani di diversa età. L'attività $\beta 1,4\text{GalT}$ e ST6GalI sono state misurate in 5 μl di plasma derivato da soggetti sani di età compresa tra 5 e 105 anni. L'attività $\beta 1,4\text{GalT}$ mostra una relazione di tipo lineare con l'età (A) al contrario di quanto osservato per l'attività ST6GalI (C). I valori massimi e minimi di attività $\beta 1,4\text{GalT}$ si riscontrano negli over-80 e nei bambini rispettivamente (B), mentre l'attività ST6GalI resta costante in tutte le classi di età ad eccezione dei bambini e degli over-80 in cui si registrano i valori massimi (D) (** Differenze statistiche misurate con il test T di Student; $p < 0,01$).

In particolare l'attività galattosiltransferasica cresce linearmente con l'età (Fig. 8 A) mostrando valori minimi nei bambini e massimi negli over 80 (Fig. 8B). Al contrario l'attività sialiltransferasica, non correla linearmente con l'età (Fig. 8C), i valori massimi sono associati alle classi a) ed e) mentre per tutte le altre fasce d'età l'attività tende a restare pressoché costante e risulta essere più bassa di circa il 30% rispetto a quanto osservato nei bambini e negli over 80 (fig. 8D).

4.2 ATTIVITA' ST6Gal1 E β 1,4GalT IN PLASMA UMANO DI SOGGETTI AFFETTI DA SINDROME DI DOWN

L'attività enzimatica della ST6Gal1 e β 1,4GalT sono state misurate su plasmi derivati da soggetti affetti da sindrome di Down (SD), in quanto tale condizione patologica è considerata un buon modello di invecchiamento precoce. La popolazione analizzata è stata suddivisa in due classi di età : < 30anni e > 30anni. I giovani affetti da SD (< 30anni) mostrano un'attività β 1,4GalT inferiore di circa il 20% rispetto a quanto osservato per il gruppo > 30 anni (Fig. 9A), mentre l'attività ST6Gal1 tende ad aumentare in modo statisticamente significativo di circa il 20% nei gruppo di età > 30 anni (Fig.9B).

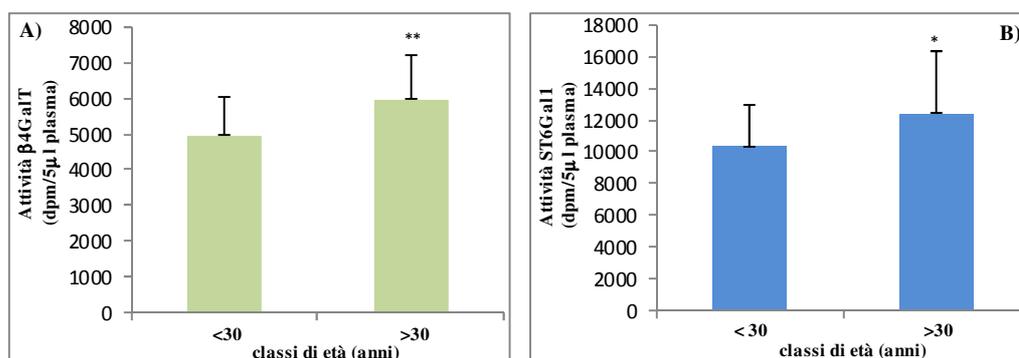


Fig. 9: Attività di glicosiltransferasi plasmatiche in soggetti di diversa età affetti da Sindrome di Down. L'attività β 1,4GalT e ST6Gal1 sono state misurate in 5 μ l di plasma. Entrambe le attività enzimatiche aumentano del 20% in soggetti di età superiore ai 30 anni e affetti da Sindrome di Down. * Differenze statistiche misurate mediante il test T di Student per campioni indipendenti tra soggetti con Sindrome di Down di età < 30 anni o > 30 anni (*p<0.05; **p<0.01)

Dal confronto con la popolazione sana, emerge che il gruppo SD < 30 anni mostra valori di attività galattosiltransferasica simili a quanto osservato in soggetti sani di età compresa tra i 40 e i 60 anni (Fig. 8B), mentre l'attività β 1,4GalT misurata in soggetti SD e con più di 30 anni è paragonabile a quanto riscontrato nella popolazione anziana (< 80 anni) ma non negli over-80 (Fig.8B). Per quanto

riguarda l'attività ST6Gal1, i valori ottenuti per soggetti SD con età > 30anni sono paragonabili a quanto misurato in soggetti sani nelle fasce d'età che vanno dai 24 agli 80 anni (Fig. 8D).

4.3 ATTIVITA' ST6Gal1 E β 1,4GalT IN PLASMA UMANO IN FIGLI DI CENTENARI

Al fine di valutare se eventuali modifiche dell'attività enzimatica potessero essere associate ad un particolare background genetico associato alla longevità, le attività plasmatiche dei due enzimi (ST6Gal1 e β 1,4GalT) sono state misurate in individui di età media pari a 70 anni caratterizzati dall'aver almeno un genitore sopravvissuto oltre l'aspettativa di vita relativa al periodo in cui viveva (longevo). Tale gruppo è stato classificato come "figli di centenari". I dati ottenuti sono stati poi confrontati con i relativi controlli, ossia individui di età paragonabile ai figli di centenari, che condividevano lo stesso ambiente di vita, ma differivano solamente per non avere genitori longevi.

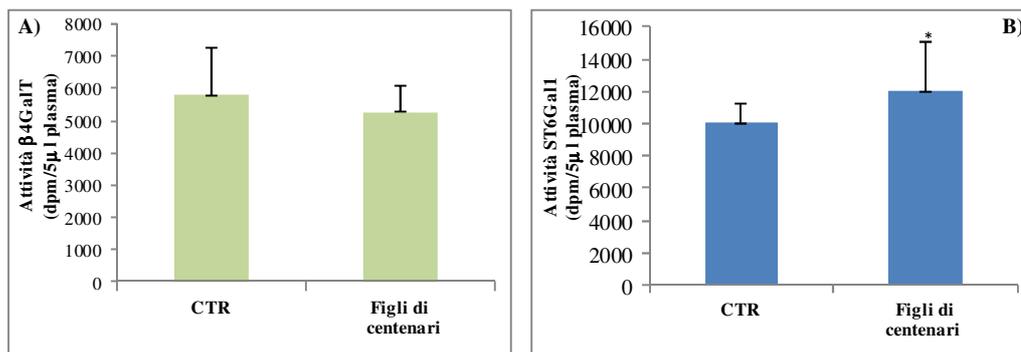


Fig. 10: Attività di glicosiltransferasi plasmatiche misurate in figli di centenari e controlli. L'attività β 1,4GalT e ST6Gal1 sono state misurate in 5µl di plasma. L'attività β 1,4GalT non mostra variazioni significative tra i due gruppi analizzati (A), mentre l'attività ST6Gal1 risulta più elevata nei figli di centenari di circa il 20% rispetto ai controlli (B). * Differenze statistiche misurate mediante il test T di Student per campioni indipendenti tra figli di centenari e relativi controlli (p < 0.05).

Come mostrato in Fig. 10A, l'attività galattosiltrasferasica risulta essere paragonabile tra i due gruppi analizzati, mentre l'attività sialiltrasferasica è più alta di circa il 20 % nei figli di centenari rispetto ai controlli (Fig. 10B).

4.4 CORRELAZIONE TRA GlycoAge test E GLICOSILTRANSFERASI PLASMATICHE

Il GlycoAge test è una misura del rapporto tra catene N-linked agalattosilate e digalattosilate associate a glicoproteine plasmatiche ed è riconosciuto come un ottimo marcatore di invecchiamento. In Fig 11A viene infatti mostrata la relazione tra il GlycoAge test, misurato su un campione di 125 individui di età compresa tra i 5 e i 105 anni, e l'età anagrafica. La correlazione risulta essere lineare e molto significativa ($R^2 = 0,6$).

Tale relazione con l'età è diversa rispetto a quanto osservato per le due glicosiltrasferasi analizzate in precedenza (Fig.11 A) e non si ha una relazione significativa tra il GlycoAge test e l'attività ST6Gal1 (Fig. 11D), mentre si osserva una debole e poco significativa relazione di tipo lineare con l'attività galattosiltrasferasica (Fig.11C). Inoltre, sebbene entrambe le glicosiltrasferasi siano in relazione, anche se con modalità differenti, con l'età, il dot-plot in Fig. 11B in cui si correlano le attività ST6Gal1 e β 1,4GalT, mostra una completa indipendenza tra i due enzimi.

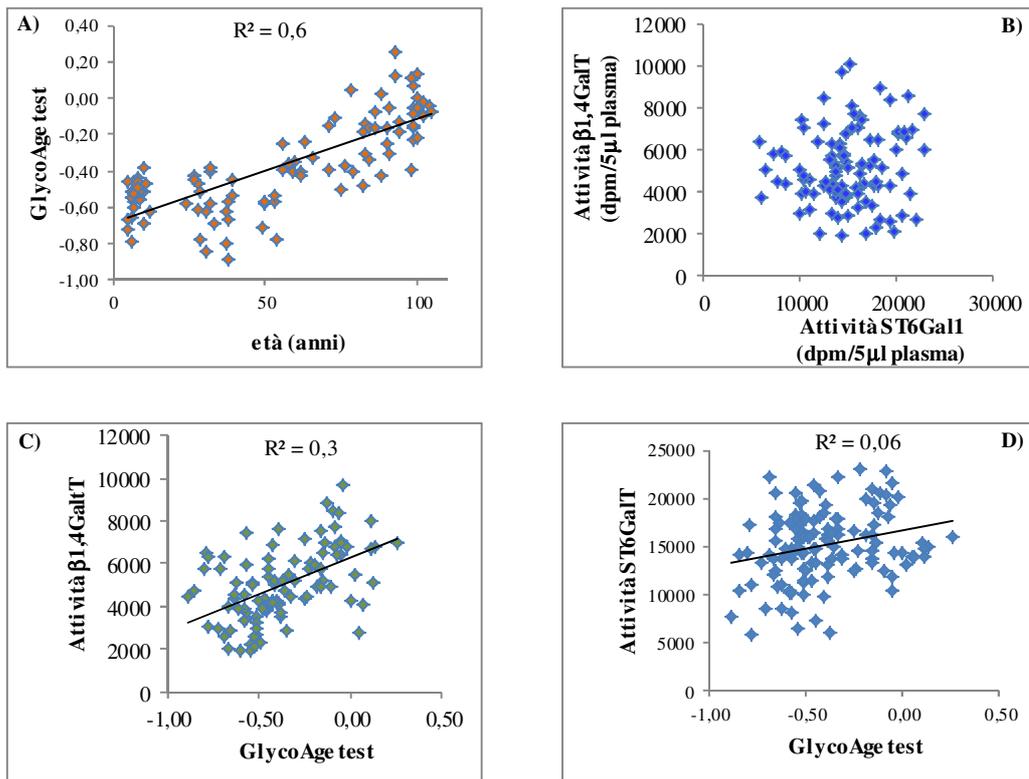


Fig.11 : Relazione tra glicosiltransferasi e tra attività $\beta 1,4\text{GalT}$ e ST6GalI con il GlycoAge test. Il GlycoAge test è in relazione lineare e molto significativa con l'età (A). L'attività delle due glicosiltransferasi misurate nel plasma di soggetti di diversa età non mostrano alcun tipo di correlazione (B). Studi di correlazione indicano che il GlycoAge non è in relazione con l'attività ST6GalI (C), ma solo e debolmente, con l'attività $\beta 1,4\text{GalT}$ ($R^2 = 0,3$).

Tale risultato indica chiaramente che il meccanismo alla base dell'attività dei due enzimi plasmatici sia differente.

I nostri dati dimostrano che, pur basandosi su meccanismi diversi, tutti e tre questi marcatori misurano indipendentemente diverse condizioni fisio-patologiche legate all'età.

4.5 ANALISI DELLO STATO DI GLICOSILAZIONE DI IgG MEDIANTE L'UTILIZZO DI LECTINE

Le lectine sono proteine di origine vegetale in grado di riconoscere particolari strutture glucidiche. In particolare la lectina estratta dal *Sambucus nigra* (SNA) riconosce in modo specifico l'acido sialico legato in posizione α 2,6 e può fornire una misura indiretta dell'attività dell'enzima ST6Gal1, in quanto ne misura il prodotto. Le proteine plasmatiche sono state separate mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide e successivamente analizzate mediante lectin-blot con SNA. L'analisi ha rilevato una serie di discreta di bande reattive all'SNA (Fig. 12A) che sono state poi isolate dal gel e successivamente identificate e caratterizzate mediante MALDI-TOF. Dall'analisi mediante spettrometria di massa è emerso che le principali bande SNA-reattive sono le seguenti: trombospondina, catena pesante delle IgM, catene β e γ del fibrinogeno e catena pesante delle IgG (Fig. 12A).

Plasmi di individui di età e sesso diversi sono stati analizzati mediante lectin-blot con l' SNA per valutare se il grado di sialilazione delle proteine identificate mediante MALDI-TOF venisse modificato con l'età. Dall'analisi è emerso che il grado di sialilazione risulta modulato solo per quanto riguarda le catene pesanti delle IgG. In particolare, come mostrato in Fig. 12B mentre per tutte le glicoproteine plasmatiche il grado di sialilazione è indipendente dall'età, per le catene pesanti delle IgG, si ha, nei giovani, un aumento della reattività all'SNA rispetto a quanto osservato nella popolazione anziana.

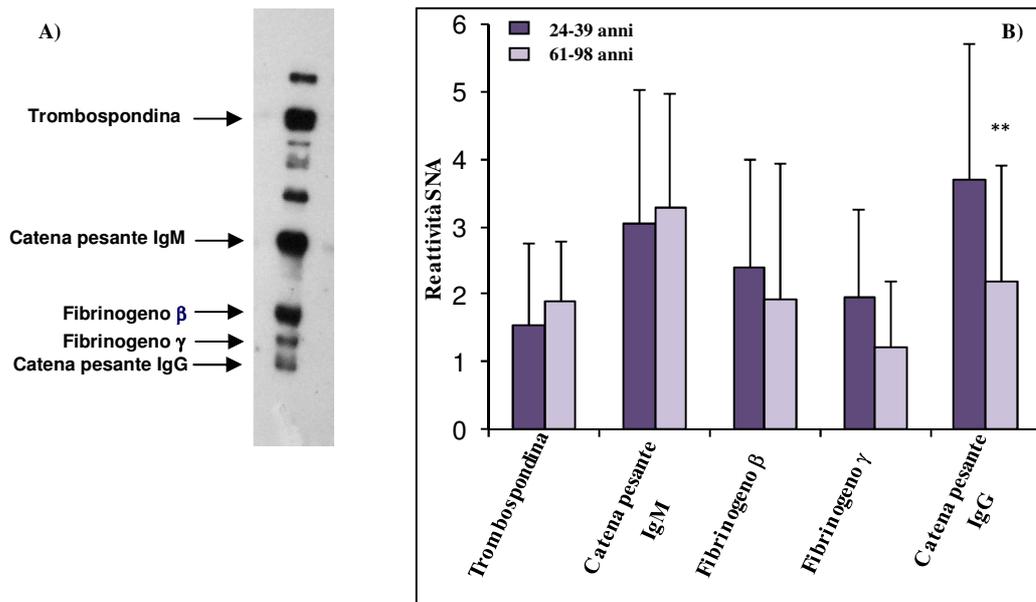


Fig.12 : Studio dell' α 2,6sialilazione di glicoproteine plasmatiche. In figura A viene riportato un lectin-blot mediante SNA di plasma umano diluito 100X. Le principali bande SNA reattive sono state isolate dal gel e caratterizzate mediante spettrometria di massa. Dall'alto verso il basso le principali glicoproteine α 2,6 sialilate sono risultate essere : trombospondina, catena pesante delle IgM, catene β e γ del fibrinogeno e catena pesante delle IgG. Lo stato di sialilazione delle glicoproteine plasmatiche è stato studiato su plasmi di individui di età e sesso diversi (B). L'istogramma riporta i valori misurati nella popolazione giovane (■, 24-39 anni) e negli anziani (□, 61-98anni). Solo per quanto riguarda le catene pesanti delle IgG si assiste ad una modulazione del livello di sialilazione statisticamente significativa (** Significatività statistica misurata con il Test T di Student per campioni indipendenti; $p < 0.01$).

Sulla base dei dati ottenuti mediante l'impiego dell'SNA per valutare lo stato di sialilazione di glicoproteine plasmatiche, lo studio è stato esteso ad altre strutture glucidiche che possono caratterizzare le catene N-linked delle IgG e che hanno una valenza funzionale nel conferire attività pro- o anti-infiammatoria alle IgG stesse. In particolare il grado di galattosilazione è stato studiato mediante la lectina *Erythrina cristagalli* (ECL) che riconosce il galattoso in posizione terminale; la *Griffonia simplicifolia II* (GSII) è stata utilizzata come misura diretta delle IgG-G0 in quanto riconosce un residuo di GlcNAc terminale, la *Ulex europaeus* I (UEA) riconosce un residuo di α -fucosio ed è stata pertanto utilizzata come misura del grado di fucosilazione delle IgG ed infine la *Phaseolus vulgaris* *Erythroagglutinin* (PHA-E) come rilevatore della bisecting GlcNAc.

La popolazione analizzata, di ambo i sessi, è stata suddivisa in quattro classi di età: **a)** giovani tra i 24-39 anni; **b)** adulti tra i 40 e 60 anni; **c)** anziani di età compresa fra i 61 e 93 anni e **d)** centenari (età > 98 anni).

Come mostrato in Fig. 13 A su un campione di 82 individui, la massima concentrazione di IgG sialilate la si osserva solo nella popolazione giovane, mentre in tutte le restanti classi di età il grado di sialilazione delle IgG risulta più basso di circa il 50% (Fig. 13 A). La reattività all'ECL risulta anch'essa massima tra i giovani decrescendo gradualmente nelle restanti classi di età e raggiungendo i valori minimi tra i centenari (Fig. 13B). Al contrario la reattività delle IgG alla GSII mostra un andamento opposto rispetto a quanto osservato per la ECL, infatti si ha una minima reattività tra i giovani che aumenta gradualmente nelle altre classi di età per raggiungere i massimi valori nei centenari (Fig. 13C). Lo stato di fucosilazione e la presenza della *bisecting* GlcNAc sono state valutate su un campione più ristretto, di 55 individui di diversa età e sesso e i dati ottenuti, mostrati nelle Fig. 13 D ed E. La presenza di IgG fucosilate è massima nei giovani e minima in tutte le altre classi di età (Fig. 13D), mentre la reattività alla PHA-E non sembra essere influenzata dall'età, sebbene si osservi una tendenza, non statisticamente significativa, a decrescere con l'aumentare dell'età (Fig. 13E).

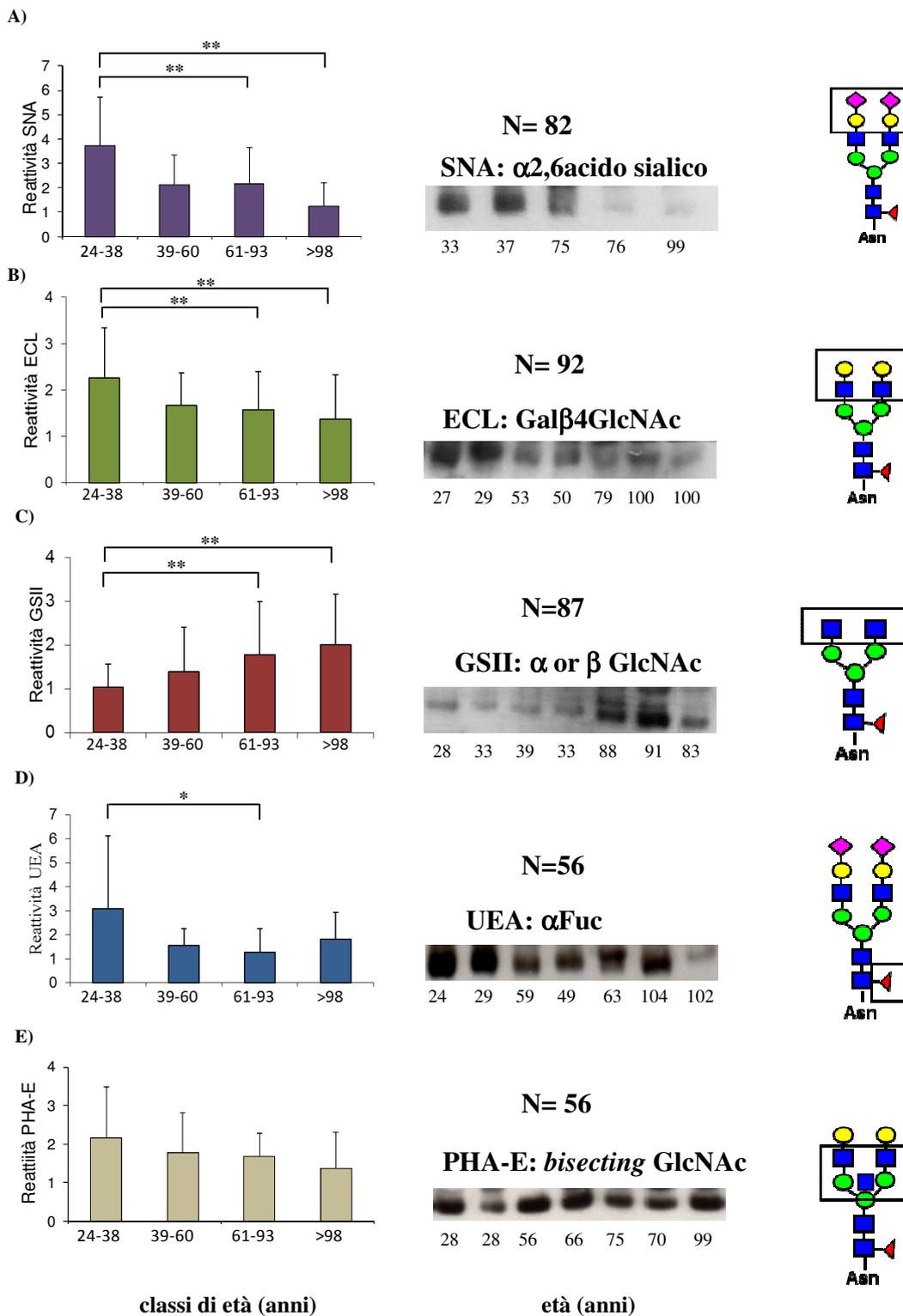


Fig.13 : Studio del grado di glicosilazione della catena pesante delle IgG mediante l'uso di lectine. Da sn., per ogni lectina vengono riportati: l'istogramma rappresentante la reattività della catena pesante delle IgG alla lectina in ciascuna classe di età, un lectin blot rappresentativo dove viene indicato con N il numero dei plasmi analizzati e, infine lo schema della struttura glicanica riconosciuta dalla lectina utilizzata. Vengono riportati i valori relativi al grado di sialilazione con SNA (A), galattosilazione con ECL (B), agalattosilazione con GSII (C), fucosilazione con UEA (D) e presenza della *bisecting* GlcNAc nella porzione Fc delle IgG con PHA-E (E).(*p<0.05;**p<0.01)
(Legenda: ■N-acetilglucosammina; ●Mannosio; ●Galattosio; ◄Fucosio; ◆Acido sialico).

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le glicoproteine sono proteine a cui sono state aggiunte una o più catene glucidiche mediante il processo di glicosilazione. Il ruolo degli zuccheri è fondamentale nella fine regolazione delle diverse funzioni biologiche delle glicoproteine. Un esempio molto chiaro di quanto detto è fornito dalle IgG, in cui la presenza di catene di zuccheri assume un significato funzionale rilevante nella regolazione delle funzioni effettrici della molecola anticorpale. In particolare, il principale sito di N-glicosilazione delle IgG è nella porzione Fc sul residuo altamente conservato Asn297 e presenta una grande microeterogeneità. La catena N-linked, situata in corrispondenza dell' interfaccia CH2-CH3, è di tipo bi-antennario e può terminare con 1 o 2 residui di: a) acido sialico; b) galattosio o c) GlcNAc. La struttura può contenere inoltre il *core fucose*, ovvero un residuo di fucosio legato alla GlcNAc direttamente legata al residuo di Asn oppure può contenere la *bisecting GlcNAc*, ossia un residuo di GlcNAc legato al Man centrale con legame β 1,4. Le diverse strutture glucidiche che possiamo ritrovare associate alla porzione Fc delle IgG hanno un significato funzionale molto importante che si ripercuote sulla capacità di indurre una risposta di tipo pro- o anti- infiammatoria. La glicosilazione dell'Asn297 regola in particolare la capacità delle IgG di: 1) attivare il complemento; 2) legare i recettori Fc γ e 3) interagire con cellule APC. In particolare, la galattosilazione delle IgG, gioca un ruolo fondamentale sia nell'attivazione del complemento sia nel legame alle cellule APC. Infatti la perdita del Gal in posizione terminale su una o entrambe le antenne garantisce l'interazione con la MBL (proteina legante il mannosio) con una forza almeno 5 volte superiore rispetto alle IgG normo-glicosilate e induce la cascata del

complemento attraverso la via lectinica (Malhotra et al. 1995). L'esposizione della GlcNAc terminale, in seguito a perdita del Gal, conferisce alle IgG un'attività pro-infiammatoria sia mediata dai recettori leganti il Man (analoghi della MBL) posti su macrofagi e cellule dendritiche (Dong et al. 1999), sia mediante il legame a cellule dendritiche attraverso DC-SIGN (Yabe et al. 2010). Infine il grado di galattosilazione influisce anche sulla capacità delle IgG di formare aggregati, infatti le IgG-G0 tendono molto più agevolmente ad aggregarsi tra loro. Sebbene molto dibattuta, la sialilazione della porzione Fc sembra conferire alle IgG un'attività di tipo anti-infiammatorio, che vede coinvolti il recettore DC-SIGN sulle cellule dendritiche, i basofili ed i recettori Fc γ RIIa dei macrofagi (Kaneko et al. 2006). Anche il legame diretto IgG-recettori Fc γ è influenzato dalla glicosilazione ed in particolare dal grado di galattosilazione e di fucosilazione: la perdita del Gal, induce cambi conformazionali della struttura della molecola facilitandone il legame a forme attivatorie di Fc γ Rs (Krapp et al. 2003), mentre la perdita di fucosio promuove la ADCC (citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente), favorendo l'interazione con Fc γ RIIIa (Shields et al. 2002) e, in entrambi i casi, il risultato finale è la promozione del processo infiammatorio.

Il ruolo biologico delle glicosiltransferasi plasmatiche è stato lungamente dibattuto, in particolare non sembrava possibile un loro coinvolgimento nel processo di glicosilazione in quanto si riteneva che solo all'interno della cellula e nello specifico nel RER o nel Golgi la concentrazione di nucleotidi zuccheri fosse sufficiente per far avvenire le reazioni di biosintesi. Tuttavia, studi recenti, condotti indipendentemente da due gruppi di ricerca, indicano chiaramente le piastrine come ottimi donatori di nucleotidi zuccheri unitamente alla possibilità di un meccanismo di glicosilazione ecto-cellulare in presenza di piastrine attivate che riversino in circolo il contenuto dei loro granuli (Wandall et al. 2014; Lee et

al. 2014). In particolare gli studi condotti da Lee et al. hanno preso in considerazione la sialilazione di proteine circolanti mediata dalla ST6Gal1 plasmatica.

Topi knock out per il promotore epatico della ST6Gal1, mostrano una normale espressione della ST6Gal1 in tutti i tessuti, inclusi i linfociti, ma non nel fegato e nel sangue dove invece è fortemente ridotta. In questi topi, non si osserva l'aumento della sialilazione delle IgG associato all'infiammazione cronica e ciò suggerisce che la ST6Gal1 plasmatica, che è principalmente di origine epatica, giochi un ruolo principale nella α 2,6-sialilazione extracellulare delle IgGs (Appenheimer et al. 2003). Alla luce degli ultimi dati riportati in letteratura sulla possibilità di una forma di glicosilazione ecto-cellulare delle proteine plasmatiche, in questo lavoro è stato valutato se vi fosse una relazione tra i livelli di attività di glicosiltransferasi plasmatiche e le strutture da esse potenzialmente sintetizzate sulle IgG. Sono state, pertanto valutate le attività degli enzimi plasmatici ST6Gal1 e β 4GalT per valutare un loro coinvolgimento nell'alterata glicosilazione delle IgG nell'invecchiamento. Dal nostro studio emerge che l'attività di entrambi gli enzimi correla, sebbene in modo differente, con l'età anagrafica. Infatti mentre l'attività β 4GalT correla in modo lineare con l'età, dai bambini fino agli ultracentenari, la ST6GalT resta costante in tutte le fasce d'età ad eccezione dei bambini e di soggetti con più di 80 anni in cui l'attività sialiltransferasica è massima. Entrambi gli enzimi non hanno mostrato una relazione positiva con le strutture glucidiche potenzialmente frutto della loro attività transferasica, infatti con l'età, il grado di galattosilazione e di sialilazione delle IgG diminuisce drasticamente al contrario di quanto osservato per le attività delle glicosiltransferasi ST6GalT e β 4GalT . ciò non depone a favore di un ruolo rilevante della ecto-glicosilazione nel determinare lo stato di glicosilazione delle

IgG umane. Inoltre, tra le attività dei due enzimi non è stata trovata alcun tipo di correlazione, indicando quindi che il meccanismo alla base del loro rilascio nel plasma sia diverso così come il loro significato biologico. Un dato interessante è quello relativo alla presenza dei due enzimi nel plasma la cui presenza risulta correlata a processi infiammatori. Condizioni infiammatorie sono associate sia a diminuzione dei livelli plasmatici della β 4GalT (Alavi et al. 2004) che all'aumento dei livelli di ST6Gal1 (Kaplan et al. 1983). In particolare la ST6GalT è una proteina di fase acuta la cui espressione è sotto il controllo del promotore epatico P1, regolato a sua volta dai glucocorticoidi (Wang et al. 1990) e dall'IL-6 (Dalziel et al. 1999). Studi su topi knock-out per il gene della ST6Gal1 hanno messo in evidenza un'aumentata presenza di neutrofili in risposta a stimoli infiammatori (Appenheimer et al. 2003). La forma epatica di ST6Gal1 gioca, infatti, un ruolo fondamentale nella sialilazione delle cellule staminali emopoietiche, riducendo di fatto la presenza di neutrofili in circolo in seguito a stimoli infiammatori, abbassando di conseguenza il grado di infiammazione (Jones et al. 2010; Nasirikenari et al. 2006; Nasirikenari et al. 2014). In accordo con quanto detto, la ST6Gal1 epatica/plasmatica sarebbe associata ad un ruolo anti-infiammatorio in quanto capace di contenere il processo infiammatorio. Traslando sull'uomo i risultati ottenuti sul topo knock-out possiamo dunque ipotizzare che la presenza della ST6Gal1 nell'anziano potrebbe contenere e contrastare gli effetti negativi dell'*Inflammaging*. Tale visione è in accordo con quanto osservato nei figli di centenari dove osserviamo un incremento dei valori di ST6Gal1 rispetto ai controlli.

L'analisi lectinica del grado di glicosilazione delle IgG indica che nell'invecchiamento si assiste ad una maggiore presenza di isoforme iposialilate, agalattosilate, prive del *core fucose* e terminanti con la GlcNAc e tali dati

risultano in accordo con la letteratura (Parekh et al. 1988; Vanhooren et al. 2007; Vanhooren et al. 2008; Vanhooren et al. 2010; Ruhaak et al. 2011). Lo studio del grado di glicosilazione effettuato mediante l'uso di lectine mostra, rispetto ad altre tecnologie, diversi vantaggi: a) ci permette di valutare in maniera univoca cambi nella glicosilazione associati solo alla catena pesante delle IgG, riducendo pertanto la variabilità associata alle catene N-linked di altre glicoproteine plasmatiche più abbondanti che non mostrano variazioni significative dipendenti dall'età. In questo lavoro, mediante l'analisi in lectin blot con SNA, su plasma intero, è stato infatti dimostrato come il grado di sialilazione della sola catena pesante delle IgG sia dipendente dall'età; b) lo studio con le lectine fornisce una risposta univoca riguardo la presenza/assenza di una determinata struttura glucidica, facilitando pertanto l'identificazione di modelli associati all'invecchiamento. È grazie a questo tipo di approccio che abbiamo trovato strutture glicaniche associate all'età come la riduzione del *core fucose* in soggetti di età superiore ai 40 anni.

Il meccanismo alla base della presenza di IgG-G0 nell'anziano non è stata chiarita e probabilmente è multifattoriale. Studi sui linfociti B di pazienti affetti da Artrite reumatoide giungono a conclusioni contrastanti. Alcuni lavori indicano una diminuzione dell'attività β 1,4GalT (Axford et al. 1987; Axford et al. 1992) che non viene però confermata da altri (Furukawa et al. 1990; Keusch et al. 1998).

In conclusione, i dati da noi ottenuti hanno permesso di identificare con chiarezza un nuovo marcatore di invecchiamento: la forma plasmatica dell'enzima β 1,4GalT. Tuttavia non esistendo una correlazione con un noto marcatore di invecchiamento, il GlycoAge test, possiamo concludere che i due marcatori siano espressione di diverse condizioni fisio-patologiche che caratterizzano l'invecchiamento.

La relazione tra l'enzima ST6Gal1 e l'età risulta essere più complessa e articolata, suggerendo un possibile ruolo protettivo nel limitare gli effetti dell'*Inflammaging*.

Nell'anziano si assiste, come detto in precedenza, alla predominanza di IgG iposialilate, agalattosilate e prive del *core fucose* che potrebbero essere causa e/o effetto della persistenza di un processo infiammatorio cronico di basso grado tipico dell'invecchiamento.

Nel nostro studio le glicosiltransferasi plasmatiche non sono responsabili nel determinare la glicosilazione delle IgG, pertanto sono necessari ulteriori studi al fine di indagare la biogenesi di glicofornie di IgG correlate all'età.

6. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Aalberse, R.C. et al., 2009. Immunoglobulin G4: an odd antibody. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 39(4), pp.469–77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19222496> [Accessed December 30, 2014].
- Adler, Y. et al., Impaired binding capacity of asialyl and agalactosyl IgG to Fc gamma receptors. *Clinical and experimental rheumatology*, 13(3), pp.315–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7554557> [Accessed January 9, 2015].
- Aebi, M., 2013. N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833(11), pp.2430–2437. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.04.001>.
- Alavi, A., Axford, J.S. & Pool, A.J., 2004. Serum galactosyltransferase isoform changes in rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*, 31(8), pp.1513–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15290729> [Accessed January 31, 2015].
- Almeida, R. et al., 1997. A family of human beta4-galactosyltransferases. Cloning and expression of two novel UDP-galactose:beta-n-acetylglucosamine beta1, 4-galactosyltransferases, beta4Gal-T2 and beta4Gal-T3. *The Journal of biological chemistry*, 272(51), pp.31979–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9405390> [Accessed January 30, 2015].
- Almeida, R. et al., 1999. Cloning and Expression of a Proteoglycan UDP-Galactose: -Xylose 1,4-Galactosyltransferase I: A SEVENTH MEMBER OF THE HUMAN 4-GALACTOSYLTRANSFERASE GENE FAMILY. *Journal of Biological Chemistry*, 274(37), pp.26165–26171. Available at: <http://www.jbc.org/content/274/37/26165.short> [Accessed January 30, 2015].
- Amado, M., 1999. Identification and characterization of large galactosyltransferase gene families: galactosyltransferases for all functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1473(1), pp.35–53. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416599001683> [Accessed January 30, 2015].
- Anthony, R.M. et al., 2008. Recapitulation of IVIG anti-inflammatory activity with a recombinant IgG Fc. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5874), pp.373–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2409116&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 21, 2014].
- Appenheimer, M.M. et al., 2003. Biologic contribution of P1 promoter-mediated expression of ST6Gal I sialyltransferase. *Glycobiology*, 13(8), pp.591–600. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12672700> [Accessed January 30, 2015].
- Asano, M. et al., 1997. Growth retardation and early death of beta-1,4-galactosyltransferase knockout mice with augmented proliferation and abnormal

differentiation of epithelial cells. *The EMBO journal*, 16(8), pp.1850–7. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1169788&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].

Axford, J.S. et al., 1992. Changes in normal glycosylation mechanisms in autoimmune rheumatic disease. *Journal of Clinical Investigation*, 89(March), pp.1021–1031.

Axford, J.S. et al., 1987. Reduced B-cell galactosyltransferase activity in rheumatoid arthritis. *Lancet*, 2(8574), pp.1486–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2892049> [Accessed January 31, 2015].

Barrow, A.D. & Trowsdale, J., 2006. You say ITAM and I say ITIM, let's call the whole thing off: The ambiguity of immunoreceptor signalling. *European Journal of Immunology*, 36, pp.1646–1653.

Bennett, B.D. et al., 2000. A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's beta -secretase. *The Journal of biological chemistry*, 275(48), pp.37712–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10956649> [Accessed January 30, 2015].

Bennett, E.P. et al., 2012. Control of mucin-type O-glycosylation: a classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Glycobiology*, 22(6), pp.736–56. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3409716&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 16, 2015].

Berger, E.G., Thurnher, M. & Müller, U., 1987. Galactosyltransferase and sialyltransferase are located in different subcellular compartments in HeLa cells. *Experimental cell research*, 173(1), pp.267–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3119357> [Accessed January 30, 2015].

Böhm, S. et al., 2012. The role of sialic acid as a modulator of the anti-inflammatory activity of IgG. *Seminars in Immunopathology*, 34, pp.443–453.

Bondt, A. et al., 2013. Association between galactosylation of immunoglobulin G and improvement of rheumatoid arthritis during pregnancy is independent of sialylation. *Journal of proteome research*, 12(10), pp.4522–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24016253> [Accessed January 30, 2015].

Breitling, J. & Aebi, M., 2013. N-linked protein glycosylation in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(8), p.a013359. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23751184> [Accessed December 30, 2014].

Brouwers, H.A. et al., 1988. Maternal antibodies against fetal blood group antigens A or B: lytic activity of IgG subclasses in monocyte-driven cytotoxicity and correlation with ABO haemolytic disease of the newborn. *British journal of haematology*, 70(4), pp.465–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3219297> [Accessed January 30, 2015].

- Callewaert, N. et al., 2001. Ultrasensitive profiling and sequencing of N-linked oligosaccharides using standard DNA-sequencing equipment. *Glycobiology*, 11(4), pp.275–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11358876> [Accessed January 31, 2015].
- Campbell, I.K. et al., 2014. Therapeutic effect of IVIG on inflammatory arthritis in mice is dependent on the Fc portion and independent of sialylation or basophils. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 192(11), pp.5031–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4025610&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 31, 2015].
- Cantagrel, V. & Lefeber, D.J., 2011. From glycosylation disorders to dolichol biosynthesis defects: a new class of metabolic diseases. *Journal of inherited metabolic disease*, 34(4), pp.859–67. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3137772&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].
- Chen, G. et al., 2012. Human IgG Fc-glycosylation profiling reveals associations with age, sex, female sex hormones and thyroid cancer. *Journal of proteomics*, 75(10), pp.2824–34. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391912000802> [Accessed January 9, 2015].
- Chiricolo, M. et al., 2006. Phenotypic changes induced by expression of beta-galactoside alpha2,6 sialyltransferase I in the human colon cancer cell line SW948. *Glycobiology*, 16(2), pp.146–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16192407> [Accessed January 30, 2015].
- Colley, K.J. et al., 1989. Conversion of a Golgi apparatus sialyltransferase to a secretory protein by replacement of the NH₂-terminal signal anchor with a signal peptide. *The Journal of biological chemistry*, 264(30), pp.17619–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2808334> [Accessed January 30, 2015].
- Dall'Olio, F. et al., 1989. Increased CMP-NeuAc:Gal beta 1,4GlcNAc-R alpha 2,6 sialyltransferase activity in human colorectal cancer tissues. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 44(3), pp.434–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2476402> [Accessed January 30, 2015].
- Dall'Olio, F. et al., 2013. N-glycomic biomarkers of biological aging and longevity: A link with inflammaging. *Ageing Research Reviews*, 12(2), pp.685–698. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2012.02.002>.
- Dall'Olio, F. et al., 2014. Sialosignaling: sialyltransferases as engines of self-fueling loops in cancer progression. *Biochimica et biophysica acta*, 1840(9), pp.2752–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24949982> [Accessed January 30, 2015].
- Dall'Olio, F., 2000. The sialyl-alpha2,6-lactosaminyl-structure: biosynthesis and functional role. *Glycoconjugate journal*, 17(10), pp.669–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11425186> [Accessed January 30, 2015].

- Dall'Olio, F. & Chiricolo, M., Sialyltransferases in cancer. *Glycoconjugate journal*, 18(11-12), pp.841–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12820717> [Accessed January 30, 2015].
- Dalziel, M. et al., 1999. Hepatic acute phase induction of murine beta-galactoside alpha 2,6 sialyltransferase (ST6Gal I) is IL-6 dependent and mediated by elevation of exon H-containing class of transcripts. *Glycobiology*, 9(10), pp.1003–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10521536> [Accessed January 31, 2015].
- Dalziel, M. et al., 2004. Ras oncogene induces beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase (ST6Gal I) via a RalGEF-mediated signal to its housekeeping promoter. *European journal of biochemistry / FEBS*, 271(18), pp.3623–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15355339> [Accessed January 30, 2015].
- Datta, A.K., Sinha, A. & Paulson, J.C., 1998. Mutation of the sialyltransferase S-sialylmotif alters the kinetics of the donor and acceptor substrates. *The Journal of biological chemistry*, 273(16), pp.9608–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9545292> [Accessed January 30, 2015].
- Delves, P.J. et al., 1990. Polymorphism and expression of the galactosyltransferase-associated protein kinase gene in normal individuals and galactosylation-defective rheumatoid arthritis patients. *Arthritis and rheumatism*, 33(11), pp.1655–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2122902> [Accessed January 30, 2015].
- Dong, X., Storkus, W.J. & Salter, R.D., 1999. Binding and uptake of agalactosyl IgG by mannose receptor on macrophages and dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163, pp.5427–5434.
- Dwyer, J.M., 1992. Manipulating the immune system with immune globulin. *The New England journal of medicine*, 326(2), pp.107–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1727218> [Accessed January 30, 2015].
- Ferrante, A., Beard, L.J. & Feldman, R.G., 1990. IgG subclass distribution of antibodies to bacterial and viral antigens. *The Pediatric infectious disease journal*, 9(8 Suppl), pp.S16–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2216603> [Accessed January 30, 2015].
- Furukawa, K. et al., 1990. Kinetic study of a galactosyltransferase in the B cells of patients with rheumatoid arthritis. *International Immunology*, 2(1), pp.105–112. Available at: <http://intimm.oxfordjournals.org/content/2/1/105.short> [Accessed January 30, 2015].
- Garred, P., 2003. Mannose-binding lectin deficiency—revisited. *Molecular Immunology*, 40(2-4), pp.73–84. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589003001044> [Accessed January 6, 2015].
- Gelfand, E.W., 2006. Differences between IGIV products: impact on clinical outcome. *International immunopharmacology*, 6(4), pp.592–9. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576905003140> [Accessed January 30, 2015].

- Grundmann, U. et al., 1990. Complete cDNA sequence encoding human beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase. *Nucleic acids research*, 18(3), p.667. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=333489&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].
- Guo, S. et al., 2001. Galactosylation of N-linked oligosaccharides by human beta-1,4-galactosyltransferases I, II, III, IV, V, and VI expressed in Sf-9 cells. *Glycobiology*, 11(10), pp.813–820.
- Hammarström, L. & Smith, C.I., 1983. IgG2 deficiency in a healthy blood donor. Concomitant lack of IgG2, IgA and IgE immunoglobulins and specific anti-carbohydrate antibodies. *Clinical and experimental immunology*, 51(3), pp.600–4. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1536779&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].
- Hansen, L. et al., 2015. A glycogene mutation map for discovery of diseases of glycosylation. *Glycobiology*, 25(2), pp.211–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25267602> [Accessed January 22, 2015].
- Harduin-Lepers, a. et al., 2001. The human sialyltransferase family. *Biochimie*, 83, pp.727–737.
- Huhn, C. et al., 2009. IgG glycosylation analysis. *Proteomics*, 9, pp.882–913.
- Hussain, I. et al., 1999. Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Molecular and cellular neurosciences*, 14(6), pp.419–27. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10656250> [Accessed January 30, 2015].
- Iida, S. et al., 2006. Nonfucosylated therapeutic IgG1 antibody can evade the inhibitory effect of serum immunoglobulin G on antibody-dependent cellular cytotoxicity through its high binding to FcγRIIIa. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12(9), pp.2879–87. Available at: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/12/9/2879.short> [Accessed January 30, 2015].
- Jefferis, R., 2009. Recombinant antibody therapeutics: the impact of glycosylation on mechanisms of action. *Trends in pharmacological sciences*, 30(7), pp.356–62. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165614709000911> [Accessed December 7, 2014].
- Jefferis, R. & Kumararatne, D.S., 1990. Selective IgG subclass deficiency: quantification and clinical relevance. *Clinical and experimental immunology*, 81(3), pp.357–67. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1534990&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].
- Jones, M.B. et al., 2010. Role for hepatic and circulatory ST6Gal-1 sialyltransferase in regulating myelopoiesis. *The Journal of biological chemistry*, 285(32), pp.25009–17. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2915736&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 31, 2015].

- Kaneko, Y., Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V, 2006. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science (New York, N.Y.)*, 313(2006), pp.670–673.
- Kaplan, H.A. et al., 1983. Studies on the effect of inflammation on rat liver and serum sialyltransferase. Evidence that inflammation causes release of Gal beta 1 leads to 4GlcNAc alpha 2 leads to 6 sialyltransferase from liver. *The Journal of biological chemistry*, 258(19), pp.11505–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6413502> [Accessed January 30, 2015].
- Keusch, J. et al., 1998. B lymphocyte galactosyltransferase protein levels in normal individuals and in patients with rheumatoid arthritis. *Glycoconjugate journal*, 15(11), pp.1093–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10386894> [Accessed January 31, 2015].
- Kitazume, S. et al., 2001. Alzheimer's beta-secretase, beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme, is responsible for cleavage secretion of a Golgi-resident sialyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(24), pp.13554–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=61079&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].
- Kitazume, S. et al., 2003. Characterization of alpha 2,6-sialyltransferase cleavage by Alzheimer's beta -secretase (BACE1). *The Journal of biological chemistry*, 278(17), pp.14865–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12473667> [Accessed January 30, 2015].
- Kitazume, S. et al., 2005. In vivo cleavage of alpha2,6-sialyltransferase by Alzheimer beta-secretase. *The Journal of biological chemistry*, 280(9), pp.8589–95. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15364953> [Accessed January 30, 2015].
- Kitazume, S. et al., 2009. Molecular insights into beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase secretion in vivo. *Glycobiology*, 19(5), pp.479–487.
- Kornfeld, R. & Kornfeld, S., 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annual review of biochemistry*, 54, pp.631–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3896128> [Accessed December 12, 2014].
- Krapp, S. et al., 2003. Structural Analysis of Human IgG-Fc Glycoforms Reveals a Correlation Between Glycosylation and Structural Integrity. *Journal of Molecular Biology*, 325(5), pp.979–989. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283602012500> [Accessed November 21, 2014].
- Kuijpers, T.W., Weening, R.S. & Out, T.A., 1992. IgG subclass deficiencies and recurrent pyogenic infections, unresponsiveness against bacterial polysaccharide antigens. *Allergologia et immunopathologia*, 20(1), pp.28–34. Available at: <http://europepmc.org/abstract/med/1509985> [Accessed January 30, 2015].
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp.680–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063> [Accessed July 9, 2014].

- Leader, K.A. et al., 1996. Agalactosyl IgG in aggregates from the rheumatoid joint. *British journal of rheumatology*, 35(4), pp.335–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8624636> [Accessed January 30, 2015].
- Lee, M. et al., 2008. Protein sialylation by sialyltransferase involves radiation resistance. *Molecular cancer research: MCR*, 6(8), pp.1316–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18708363> [Accessed December 30, 2014].
- Lee, M.M. et al., 2014. Platelets support extracellular sialylation by supplying the sugar donor substrate. *Journal of Biological Chemistry*, 289(13), pp.8742–8748.
- Lennartz, M.R. et al., 1987. Isolation and characterization of a mannose-specific endocytosis receptor from human placenta. *The Journal of biological chemistry*, 262(21), pp.9942–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3611070> [Accessed January 30, 2015].
- Leontyev, D. et al., 2012. Sialylation-independent mechanism involved in the amelioration of murine immune thrombocytopenia using intravenous gammaglobulin. *Transfusion*, 52(8), pp.1799–805. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22257295> [Accessed January 27, 2015].
- Liu, J. & Mushegian, A., 2003. Three monophyletic superfamilies account for the majority of the known glycosyltransferases. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 12(7), pp.1418–31. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2323934&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].
- Lodish, H.F., 1991. Recognition of complex oligosaccharides by the multi-subunit asialoglycoprotein receptor. *Trends in biochemical sciences*, 16(10), pp.374–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1785139> [Accessed January 30, 2015].
- Lu, Q., Hasty, P. & Shur, B.D., 1997. Targeted mutation in beta1,4-galactosyltransferase leads to pituitary insufficiency and neonatal lethality. *Developmental biology*, 181(2), pp.257–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9013935> [Accessed January 30, 2015].
- Malhotra, R. et al., 1995. Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. *Nature Medicine*, 1(3), pp.237–243. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nm0395-237> [Accessed January 30, 2015].
- Mawas, F. et al., 1997. Immunoglobulin G subclasses of anti-human platelet antigen 1a in maternal sera: relation to the severity of neonatal alloimmune thrombocytopenia. *European journal of haematology*, 59(5), pp.287–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9414639> [Accessed January 30, 2015].
- McGuire, E.J. et al., 1989. A human milk galactosyltransferase is specific for secreted, but not plasma, IgA. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 143(9), pp.2933–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2509560> [Accessed January 22, 2015].

- Menni, C. et al., 2013. Glycosylation of immunoglobulin g: role of genetic and epigenetic influences. *PloS one*, 8(12), p.e82558. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3855797&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].
- Mimura, Y. et al., 2000. The influence of glycosylation on the thermal stability and effector function expression of human IgG1-Fc: properties of a series of truncated glycoforms. *Molecular Immunology*, 37(12-13), pp.697–706. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016158900000105X> [Accessed January 30, 2015].
- Mitchell, D.A., Fadden, A.J. & Drickamer, K., 2001. A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands. *The Journal of biological chemistry*, 276(31), pp.28939–45. Available at: <http://www.jbc.org/content/276/31/28939.short> [Accessed January 30, 2015].
- Miyoshi, E. et al., 1999. The alpha1-6-fucosyltransferase gene and its biological significance. *Biochimica et biophysica acta*, 1473(1), pp.9–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10580126> [Accessed January 30, 2015].
- Morgan, A. et al., 1995. The N-terminal end of the CH2 domain of chimeric human IgG1 anti-HLA-DR is necessary for C1q, Fc gamma RI and Fc gamma RIII binding. *Immunology*, 86(2), pp.319–24. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1384012&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].
- Mori, M. et al., 1994. The LEC rat: a model for human hepatitis, liver cancer, and much more. *The American journal of pathology*, 144(1), pp.200–4. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1887108&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].
- Nagelkerke, S.Q. et al., 2014. Inhibition of FcγR-mediated phagocytosis by IVIg is independent of IgG-Fc sialylation and FcγRIIb in human macrophages. *Blood*, 124(25), pp.3709–18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25352126> [Accessed January 30, 2015].
- Nasirikenari, M. et al., 2006. Altered granulopoietic profile and exaggerated acute neutrophilic inflammation in mice with targeted deficiency in the sialyltransferase ST6Gal I. *Blood*, 108(10), pp.3397–405. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1895428&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 31, 2015].
- Nasirikenari, M. et al., 2014. Remodeling of marrow hematopoietic stem and progenitor cells by non-self ST6Gal-1 sialyltransferase. *The Journal of biological chemistry*, 289(10), pp.7178–89. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24425878> [Accessed January 31, 2015].
- Nimmerjahn, F., Anthony, R.M. & Ravetch, J. V., 2007. Agalactosylated IgG antibodies depend on cellular Fc receptors for in vivo activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(20), pp.8433–8437.

- Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V, 2008. Anti-inflammatory actions of intravenous immunoglobulin. *Annual review of immunology*, 26, pp.513–33. Available at: http://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090232?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed [Accessed January 19, 2015].
- Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V, 2006. Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity*, 24(1), pp.19–28. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16413920> [Accessed January 30, 2015].
- Nomura, K.H. et al., 1998. Involvement of blood-group-B-active trisaccharides in Ca²⁺-dependent cell-cell adhesion in the *Xenopus* blastula. *Development genes and evolution*, 208(1), pp.9–18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9518520> [Accessed January 30, 2015].
- Nomura, T. et al., 1998. Purification, cDNA cloning, and expression of UDP-Gal: glucosylceramide beta-1,4-galactosyltransferase from rat brain. *The Journal of biological chemistry*, 273(22), pp.13570–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9593693> [Accessed January 30, 2015].
- Parekh, R. et al., 1988. Age-related galactosylation of the N-linked oligosaccharides of human serum IgG. *The Journal of experimental medicine*, 167(5), pp.1731–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2188930&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 9, 2015].
- Parekh, R.B. et al., Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature*, 316(6027), pp.452–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3927174> [Accessed January 9, 2015].
- Pekelharing, J.M. et al., 1988. Alterations in carbohydrate composition of serum IgG from patients with rheumatoid arthritis and from pregnant women. *Annals of the rheumatic diseases*, 47(2), pp.91–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1003459&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].
- Perillo, N.L. et al., 1995. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature*, 378(6558), pp.736–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7501023> [Accessed January 30, 2015].
- Pollock, J.M. & Bowman, J.M., 1990. Anti-Rh(D) IgG subclasses and severity of Rh hemolytic disease of the newborn. *Vox sanguinis*, 59(3), pp.176–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2124753> [Accessed January 30, 2015].
- Potter, M., 1983. Structural correlates of immunoglobulin diversity. *Survey of immunologic research*, 2(1), pp.27–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6417753> [Accessed January 30, 2015].
- Pricop, L. et al., 2001. Differential modulation of stimulatory and inhibitory Fc gamma receptors on human monocytes by Th1 and Th2 cytokines. *Journal of immunology*

- (Baltimore, Md. : 1950), 166(1), pp.531–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11123333> [Accessed January 30, 2015].
- Ravetch, J. V., 2000. Immune Inhibitory Receptors. *Science*, 290(5489), pp.84–89. Available at: <http://www.sciencemag.org/content/290/5489/84.short> [Accessed December 3, 2014].
- Rook, G.A. et al., 1991. Changes in IgG glycoform levels are associated with remission of arthritis during pregnancy. *Journal of autoimmunity*, 4(5), pp.779–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1797027> [Accessed January 30, 2015].
- Ruhaak, L.R. et al., 2011. Plasma protein N-glycan profiles are associated with calendar age, familial longevity and health. *Journal of proteome research*, 10(4), pp.1667–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21184610> [Accessed January 31, 2015].
- Russo, R.N., Shaper, N.L. & Shaper, J.H., 1990. Bovine beta 1----4-galactosyltransferase: two sets of mRNA transcripts encode two forms of the protein with different amino-terminal domains. In vitro translation experiments demonstrate that both the short and the long forms of the enzyme are type II mem. *J. Biol. Chem.*, 265(6), pp.3324–3331. Available at: <http://www.jbc.org/content/265/6/3324.short> [Accessed January 30, 2015].
- Sarma, J.V. & Ward, P. a, 2012. The Compliment System. *NIH Public Access author manuscript*, 343(1), pp.227–235.
- Schenk, B., Fernandez, F. & Waechter, C.J., 2001. The ins(ide) and out(side) of dolichyl phosphate biosynthesis and recycling in the endoplasmic reticulum. *Glycobiology*, 11(5), p.61R–70R. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11425794> [Accessed January 30, 2015].
- Schur, P.H., 1988. IgG subclasses. A historical perspective. *Monographs in allergy*, 23, pp.1–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3290655> [Accessed January 30, 2015].
- Schwab, I. & Nimmerjahn, F., 2013. Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system? *Nature Reviews Immunology*, 13(3), pp.176–189. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3401> [Accessed January 30, 2015].
- Schwientek, T. et al., 1998. Cloning of a novel member of the UDP-galactose:beta-N-acetylglucosamine beta1,4-galactosyltransferase family, beta4Gal-T4, involved in glycosphingolipid biosynthesis. *The Journal of biological chemistry*, 273(45), pp.29331–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9792633> [Accessed January 30, 2015].
- Selman, M.H.J. et al., 2012. Changes in Antigen-specific IgG1 Fc N-glycosylation Upon Influenza and Tetanus Vaccination. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11, pp.M111.014563–M111.014563.
- Semel, A.C. et al., 2002. Hyposialylation of integrins stimulates the activity of myeloid fibronectin receptors. *The Journal of biological chemistry*, 277(36), pp.32830–6.

Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12091385> [Accessed January 30, 2015].

- Shaper, N.L. et al., 1986. The human galactosyltransferase gene is on chromosome 9 at band p13. *Somatic cell and molecular genetics*, 12(6), pp.633–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3097837> [Accessed January 30, 2015].
- Shields, R.L. et al., 2002. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fcγ₃ RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *The Journal of biological chemistry*, 277(30), pp.26733–40. Available at: <http://www.jbc.org/content/277/30/26733.short> [Accessed January 9, 2015].
- Söderström, T. et al., 1985. Immunoglobulin subclass (IgG3) restriction of anti-P and anti-Pk antibodies in patients of the rare p blood group. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 134(1), pp.1–3. Available at: <http://www.jimmunol.org/content/134/1/1.abstract> [Accessed January 30, 2015].
- Soilleux, E.J. et al., 2002. Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro. *Journal of leukocyte biology*, 71(3), pp.445–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11867682> [Accessed January 30, 2015].
- Stanworth, S.J. et al., 1998. Absence of an association between mannose-binding lectin polymorphism and rheumatoid arthritis. *British journal of rheumatology*, 37, pp.186–188.
- Sun, P.D., 2003. Structure and function of natural-killer-cell receptors. *Immunologic research*, 27(2-3), pp.539–48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12857997> [Accessed January 17, 2015].
- Suzuki, K. et al., 1993. High copper and iron levels and expression of Mn-superoxide dismutase in mutant rats displaying hereditary hepatitis and hepatoma (LEC rats). *Carcinogenesis*, 14(9), pp.1881–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8403214> [Accessed January 30, 2015].
- Swindall, A.F. & Bellis, S.L., 2011. Sialylation of the Fas death receptor by ST6Gal-I provides protection against Fas-mediated apoptosis in colon carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry*, 286(26), pp.22982–90. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3123066&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].
- Tei, K. et al., 2002. Roles of cell adhesion molecules in tumor angiogenesis induced by cotransplantation of cancer and endothelial cells to nude rats. *Cancer research*, 62(21), pp.6289–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12414659> [Accessed January 30, 2015].
- Troelsen, L.N. et al., 2007. Genetically determined high serum levels of mannose-binding lectin and agalactosyl IgG are associated with ischemic heart disease in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 56(1), pp.21–29.
- Ujita, M. et al., 1998. Synthesis of poly-N-acetylglucosamine in core 2 branched O-glycans. The requirement of novel beta-1,4-galactosyltransferase IV and beta-1,3-

- n-acetylglucosaminyltransferase. *The Journal of biological chemistry*, 273(52), pp.34843–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9857011> [Accessed January 30, 2015].
- Vanhooren, V. et al., 2008. N-glycan profiling in the study of human aging. *Biogerontology*, 9(5), pp.351–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18431686> [Accessed January 13, 2015].
- Vanhooren, V. et al., 2007. N-glycomic changes in serum proteins during human aging. *Rejuvenation research*, 10(4), pp.521–531a. Available at: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/rej.2007.0556> [Accessed January 31, 2015].
- Vanhooren, V. et al., 2010. Serum N-glycan profile shift during human ageing. *Experimental gerontology*, 45(10), pp.738–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20801208> [Accessed January 31, 2015].
- Varki, A., 1993. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, 3(2), pp.97–130. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8490246> [Accessed January 8, 2015].
- Vidarsson, G. et al., 2006. FcRn: an IgG receptor on phagocytes with a novel role in phagocytosis. *Blood*, 108(10), pp.3573–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16849638> [Accessed January 30, 2015].
- Vidarsson, G., Dekkers, G. & Rispen, T., 2014. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. , 5(October), pp.1–17.
- Wandall, H.H. et al., 2014. The origin and function of platelet glycosyltransferases The origin and function of platelet glycosyltransferases. , 120(3), pp.626–635.
- Wang, X.C., Smith, T.J. & Lau, J.T., 1990. Transcriptional regulation of the liver beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase by glucocorticoids. *The Journal of biological chemistry*, 265(29), pp.17849–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2211665> [Accessed January 31, 2015].
- Weinstein, J. et al., 1987. Primary structure of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase. Conversion of membrane-bound enzyme to soluble forms by cleavage of the NH₂-terminal signal anchor. *The Journal of biological chemistry*, 262(36), pp.17735–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3121604> [Accessed January 30, 2015].
- Wieser, R.J. & Oesch, F., 1992. Contact-Inhibition of Growth by Complex Carbohydrates. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 4(16), pp.160–167. Available at: <http://ci.nii.ac.jp/naid/130003454730/en/> [Accessed January 30, 2015].
- Wright, A. et al., 1991. Antibody variable region glycosylation: position effects on antigen binding and carbohydrate structure. *The EMBO journal*, 10(10), pp.2717–23. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=452979&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 30, 2015].

- Wuhrer, M. et al., 2009. Regulated glycosylation patterns of IgG during alloimmune responses against human platelet antigens. *Journal of proteome research*, 8(2), pp.450–6. Available at: <http://dx.doi.org/10.1021/pr800651j> [Accessed January 30, 2015].
- Xue, J., Zhu, L.P. & Wei, Q., 2013. IgG-Fc N-glycosylation at Asn297 and IgA O-glycosylation in the hinge region in health and disease. *Glycoconjugate Journal*, 30, pp.735–745.
- Yabe, R., Tateno, H. & Hirabayashi, J., 2010. Frontal affinity chromatography analysis of constructs of DC-SIGN, DC-SIGNR and LSEctin extend evidence for affinity to agalactosylated N-glycans. *The FEBS journal*, 277(19), pp.4010–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20840590> [Accessed January 30, 2015].
- Yamada, E. et al., 1997. Structural changes of immunoglobulin G oligosaccharides with age in healthy human serum. *Glycoconjugate journal*, 14(3), pp.401–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9147063> [Accessed January 30, 2015].
- Yamamoto, M. et al., 2012. Value of serum IgG4 in the diagnosis of IgG4-related disease and in differentiation from rheumatic diseases and other diseases. *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association*, 22(3), pp.419–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21953287> [Accessed January 30, 2015].
- Yan, R. et al., 1999. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature*, 402(6761), pp.533–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10591213> [Accessed January 30, 2015].
- Yu, X. et al., 2013. Dissecting the molecular mechanism of IVIg therapy: the interaction between serum IgG and DC-SIGN is independent of antibody glycoform or Fc domain. *Journal of molecular biology*, 425(8), pp.1253–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23416198> [Accessed January 30, 2015].