

PROGETTO 1. Ruolo della pentrassina lunga PTX3 nell'osteomielite, sviluppato presso la Fondazione Humanitas per la Ricerca (FHR), in collaborazione con l'Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IRGB-CNR) presso l'Istituto Clinico Humanitas IRCCS (ICH).



Stato dell'arte e rationale dello studio.

L'osteomielite è un'infezione ossea debilitante spesso sostenuta dal batterio *Staphylococcus aureus* (SA) [Kavanagh et al, *Clin Microbiol Rev.* 2018, **31**(2): e00084-17]. Con l'espandersi dei fenomeni di antibiotico-resistenza e l'aumentare del numero delle procedure chirurgiche per impianto e sostituzione di protesi articolari, nonché in considerazione dell'invecchiamento della popolazione, la domanda di nuovi approcci profilattici e terapeutici al trattamento dell'osteomielite è divenuta urgente. La pentrassina lunga PTX3 è una proteina dell'immunità innata che svolge ruoli importanti nella protezione da microrganismi patogeni [Garlanda et al, *Physiol Rev.* 2018, **98**(2):623-639] ed è riconosciuta quale potenziale biomarcatore diagnostico e prognostico in molteplici infezioni, ivi comprese quelle da ceppi di SA meticillino-resistenti (MRSA) [Porte et al, *Front Immunol.* 2019, **10**: 794].

Ipotesi. In studi precedenti abbiamo dimostrato che il deficit genetico di PTX3 in animali sperimentali è associato a ridotta formazione della matrice ossea durante il rimodellamento fisiologico dell'osso e la sua rigenerazione dopo frattura [Grčević et al, *Front Immunol.* 2018, **9**:417], il che suggerisce un ruolo importante per questa pentrassina nel turn-over del tessuto

muscoloscheletrico [Parente et al, *Front Immunol.* 2019, **10**:2628]. Sulla base di questa evidenza e del ruolo che PTX3 svolge nelle infezioni opportunistiche e nella sepsi, ipotizziamo che questa molecola possa essere coinvolta nell'eziopatogenesi dell'osteomielite.

Obiettivi generali e risultati attesi. Questo progetto di ricerca si propone di investigare il ruolo di PTX3, quale paradigma dell'immunità umorale all'interfaccia con la matrice ossea, nell'osteomielite da SA. E' atteso che questo studio generi nuove ipotesi meccanicistiche in osteoimmunologia e fornisca indicazioni originali su modalità innovative di trattamento dell'osteomielite.

Obiettivi specifici al terzo anno (2021). Nello specifico, nel corso del 2021 lo studio è stato finalizzato a:

1. completare la valutazione degli outcome primari (infezione) e secondari (morfometria, istologia, citologia e infiammazione) in un modello animale (murino) di infezione locale (nel femore) da SA che ricapitola l'osteomielite da chirurgia e/o trauma nell'uomo e consente di studiare il ruolo patogenetico di PTX3 *in vivo*. Nel quadro generale di questo obiettivo, è stato valutato il blocco farmacologico della proteina PTX3 mediante uno specifico anticorpo monoclonale quale rationale per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche per il trattamento delle infezioni ossee. E' stato, inoltre, valutato l'effetto del sesso sull'infezione sperimentale, mediante l'impiego di topi di sesso femminile;
2. finalizzare lo sviluppo di modelli sperimentali 3D *in vitro* che riproducono il microambiente dell'osso in condizioni di infezione da SA e consentono di apprezzare il ruolo di PTX3, quali strumenti di verifica e/o sviluppo di ipotesi meccanicistiche.
3. ultimare l'analisi del potenziale di PTX3 quale biomarcatore per la diagnosi delle infezioni articolari periprotetichesche sulla base dei dati

generati in un precedente studio clinico condotto in ICH. E' stato, altresì, predisposto un nuovo protocollo di studio finalizzato all'identificazione di biomarcatori genetici della suscettibilità all'infezione periprotetica e della severità di patologia.

Piano sperimentale. Il perseguimento degli obiettivi progettuali precedentemente elencati ha richiesto una pianificazione delle attività sperimentali su livelli multipli come di seguito dettagliato:

Piano sperimentale dell'obiettivo 1: infettare con SA (per via intra-femorale) topi wild type (WT) e geneticamente modificati (PTX3 deficienti, o PTX3^{-/-}) di entrambi i sessi, e monitorare l'evoluzione della patologia scheletrica in termini di carica microbica, parametri sierologici, immunologici, osteologici e morfometrici. In un modello sperimentale di profilassi, abbiamo inoltre quantificato l'infezione nell'arto di topi WT cui è stato somministrato (per via intraperitoneale) un anticorpo monoclonale che riconosce e blocca la proteina PTX3. Queste attività sono state svolte in collaborazione con la dott.ssa Cristina Sobacchi (IRGB).

Piano sperimentale dell'obiettivo 2: ottimizzare le condizioni di co-cultura di cellule MC3T3 (linea murina pre-osteoblastica) e SA su scaffold ossei biomimetici di nuova concezione [Menale et al, *Stem Cells Transl Med.* 2019, **8**(1):22-34], e definire protocolli di estrazione di mRNA da cellule MC3T3 e batteri con l'obiettivo di valutare l'espressione di geni di interesse nel corso dell'infezione (meta-trascrittomica). Queste attività hanno visto il coinvolgimento delle dott.sse Monica Sandri (Istituto di Scienza e Tecnologia dei Materiali Ceramici del CNR, ISTECC) ed Anna Tampieri (ISTECC ed Istituto per lo Studio dei Materiali Nanostrutturati del CNR, ISMN).

Piano sperimentale dell'obiettivo 3: analisi dei dati generati nell'ambito di uno studio diagnostico coordinato dal dott. Mattia Loppini (Medico Assistente presso l'Unità di Ortopedia dell'Anca e Chirurgia Protetica di ICH) e dalla dott.ssa Barbara Bottazzi (Responsabile del Laboratorio di Immunofarmacologia di ICH) in cui sono stati arruolati soggetti con protesi d'anca o ginocchio e sospetta infezione periprotetica, sottoposti a chirurgia di revisione. In questi soggetti è stata misurata la concentrazione di PTX3 nel plasma e nel liquido sinoviale e ne è stata valutata l'associazione con la presenza di infezione ed il suo grado di

severità. E' stato inoltre redatto, approvato (dal Comitato Etico indipendente di ICH) ed avviato un nuovo protocollo di studio clinico di tipo retrospettivo che, basandosi sulla coorte arruolata nello studio precedente, integrerà i dati clinici e biochimici già disponibili con informazioni di natura genetica (da DNA genomico) allo scopo ultimo di identificare biomarcatori genetici della suscettibilità all'infezione periprotetica.

Metodologia applicata. Le attività proposte sono state svolte applicando una strategia sperimentale interdisciplinare che combina tecniche e metodologie della microchirurgia, della microbiologia, dell'immunologia molecolare e cellulare, dell'imaging nel piccolo animale e della diagnostica clinica.

Conclusioni al terzo anno (2021) dello studio.

Obiettivo 1. I risultati ottenuti nel corso del 2021, in combinazione e ad integrazione di quelli generati nei primi due anni dello studio, indicano che il deficit genetico di PTX3 protegge dall'infezione da SA quando il patogeno è iniettato direttamente nella cavità midollare del femore di animali sperimentali (topi), condizione che mima l'osteomielite da chirurgia e/o trauma nell'uomo. In particolare, abbiamo osservato che gli animali PTX3 deficienti mostrano una considerevole riduzione della carica batterica nell'arto infetto e presentano, in generale, sintomi di sofferenza più lievi rispetto agli animali WT. In linea con queste osservazioni, la risposta infiammatoria è più accentuata negli animali WT SA rispetto a quelli PTX3^{-/-} SA, in termini di espansione del compartimento leucocitario e contrazione di quello linfocitario nella milza. Inoltre, l'effetto protettivo associato al deficit di PTX3 è evidente già a tempi brevi (6 giorni) dall'infezione con SA. A tempi brevissimi (3 giorni), non vi è differenza in termini di carica batterica nell'arto infetto tra topi WT e PTX3^{-/-}. Considerando che la proteina PTX3 è indotta nel tessuto osseo a 6 giorni dall'infezione, quest'ultima evidenza suggerisce che questa proteina svolge un ruolo diretto nella patogenesi dell'osteomielite.

Inoltre, abbiamo dimostrato che in questo modello l'effetto protettivo associato al deficit di PTX3 è indipendente dal sesso degli animali sperimentali, un dato di potenziale rilievo traslazionale nella medicina di genere.

Infine, in un modello di profilassi, la

somministrazione sistemica di un anticorpo monoclonale anti-PTX3 riduce la carica batterica nell'arto infetto. Questo risultato indica che PTX3 svolge un ruolo specifico nella patogenesi dell'osteomielite, e supporta l'ipotesi che il suo blocco farmacologico possa costituire una strategia terapeutica per il trattamento delle infezioni ossee.

Obiettivo 2. Abbiamo sviluppato un modello 3D di osteomielite basato su co-culture di osteoblasti ed SA in matrici ossee biometriche (MgHA/Col) che ricapitola aspetti fondamentali del microambiente muscoloscheletrico (architettura tridimensionale, matrice extracellulare) e che ha consentito di apprezzare l'effetto della matrice ossea sulla biologia degli osteoblasti in assenza ed in presenza di batteri [Parente et al, *Pathogens* 2021, **10**: 837]. Questo modello sarà di particolare utilità per lo studio di ipotesi meccanicistiche relativamente ai meccanismi patogenetici delle infezioni ossee.

Obiettivo 3. La proteina PTX3 nel liquido sinoviale si configura quale marcatore diagnostico di infezione periprotetica ad elevata specificità e sensibilità. Sulla scia di queste evidenze, è stato elaborato un nuovo protocollo di studio che prevede di integrare i dati clinici e biochimici disponibili dalla stessa coorte di pazienti con informazioni di natura genetica. Questo studio, dal titolo "Identificazione di biomarcatori genetici della suscettibilità all'infezione periprotetica di anca e ginocchio e della severità di patologia", si propone di valutare l'associazione tra polimorfismi a singola base (SNPs) presenti nel gene PTX3 e l'incidenza di infezione periprotetica dell'anca e del ginocchio in pazienti sottoposti a chirurgia di revisione. Esso sarà coordinato dal dott. Loppini (quale responsabile clinico) e dal dott. Inforzato e dalla dott.ssa Sobacchi (quali responsabili scientifici). Il relativo protocollo è stato autorizzato dal Comitato Etico Indipendente di ICH, ed è al momento in corso l'arruolamento dei pazienti.

Pubblicazioni scientifiche. Di seguito sono riportate le pubblicazioni dei ricercatori del progetto nel 2021:

1. Parente R, Possetti V, Erreni M, D'Autilia F, Bottazzi B, Garlanda C, Mantovani A, Inforzato A, Doni A. (2021) Complementary roles of short and long pentraxins in the complement-mediated immune response to *Aspergillus fumigatus* infections. *Front Immunol.* 12:785883 [doi:

10.3389/fimmu.2021.785883]

2. Parente R, Possetti V, Schiavone ML, Campodoni E, Menale C, Loppini M, Doni A, Bottazzi B, Mantovani A, Sandri M, Tampieri A, Sobacchi C, Inforzato A. (2021) 3D Cocultures of Osteoblasts and *Staphylococcus aureus* on Biomimetic Bone Scaffolds as a Tool to Investigate the Host–Pathogen Interface in Osteomyelitis. *Pathogens* 10, 837. [https://doi.org/10.3390/pathogens10070837]

Partecipazione a congressi.

Le partecipazioni a congressi sono state:

1. 12th National Congress of the Italian Society of Immunology, Clinical Immunology and Allergology (SIICA) – May 26th/28th (VIRTUAL) – “Host-pathogen interface in staphylococcus aureus-dependent osteomyelitis: emerging roles of the long pentraxin PTX3” Raffaella Parente, Valentina Possetti, Maša Filipović, Ciro Menale, Eleonora Palagano, Maria Lucia Schiavone, Barbara Bottazzi, Alberto Mantovani, Danka Grčević, Cristina Sobacchi, Antonio Inforzato [Poster Communication]

2. 6th European Congress of Immunology – September 1st/4th (VIRTUAL) – “The long pentraxin PTX3 at the host-pathogen interface in *Staphylococcus aureus*-dependent osteomyelitis” Raffaella Parente, Valentina Possetti, Maria Lucia Schiavone, Masa Filipovic, Elisabetta Campodoni, Ciro Menale, Eleonora Palagano, Barbara Bottazzi, Monica Sandri, Anna Tampieri, Danka Grcevic, Alberto Mantovani, Antonio Inforzato

