

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

TESI DOCTORAL

**PREPARACIÓ D'ANTÍGENS RECOMBINANTS PER A LA DETECCIÓ
D'AUTOANTICOSSOS MITJANÇANT ENZIMOIMMUNOANÀLISI EN
LA SÍNDROME DE SJÖGREN**

Memòria presentada per MARC BRUGUERA i VILALTA, llicenciat en
Química, per optar al grau de Doctor en Bioquímica.

Marc Bruguera i Vilalta

Bellaterra, 5 de novembre de 2001

PETRAKI MUNUJOS i VINYOLES, Doctor en Biologia i FRANCISCO JAVIER GELLA TOMÁS, Doctor en Farmàcia i professor titular del departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFIQUEN: que la tesi “Preparació d’antígens recombinants per a la detecció d’autoanticossos mitjançant enzimoimmunoanàlisi en la síndrome de Sjögren”, que presenta Marc Bruguera i Vilalta per optar al grau de Doctor en Bioquímica i Biologia Molecular, ha estat realitzada sota la seva direcció i tutoria, respectivament, al departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona, i es troba en condicions de ser llegida.

Bellaterra, 5 de novembre de 2001

El director

El tutor

Dr. Petraki Munujos i Vinyoles

Dr. F. Javier Gella Tomás

«De fet a la vida no hi ha coses petites o importants. Totes són iguals i tenen el mateix valor.

(...)

Les coses grans de la vida són el que semblen i, per aquesta raó, per estrany que et resulti, sovint és difícil interpretar-les. Però les coses petites són símbols. És a través d'elles que aprenem amb molta facilitat les lliçons amargues.»

Oscar Wilde

De Profundis

ÍNDEX

<u>0. JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS</u>	1
<u>1. INTRODUCCIÓ</u>	5
<u>1.1. TOLERÀNCIA I AUTOIMMUNITAT</u>	7
<u>1.1.1. L'autotolerància i els seus mecanismes</u>	7
<u>1.1.2. Mecanismes d'autoimmunitat</u>	9
<u>1.1.2.1. Alteracions immunològiques que poden causar autoimmunitat</u>	10
<u>1.1.2.2. Factors genètics en l'autoimmunitat</u>	11
<u>1.1.2.3. Altres factors en l'autoimmunitat</u>	11
<u>1.2. MALALTIES AUTOIMMUNES</u>	13
<u>1.3. LA SÍNDROME DE SJÖGREN</u>	17
<u>1.3.1. Etiologia i patogènesi</u>	17
<u>1.3.1.1. Primera etapa: l'activació de l'autoimmunitat</u>	17
<u>1.3.1.2. Segona etapa: el desenvolupament i la continuació del procés autoimmune</u>	19
<u>1.3.1.3. Patologia</u>	19
<u>1.3.2. La síndrome de Sjögren primària</u>	20
<u>1.3.3. La síndrome de Sjögren secundària</u>	21
<u>1.3.4. Diagnosi</u>	22
<u>1.4. L'AUTOANTIGEN SS-B (La)</u>	24
<u>1.4.1. Característiques bioquímiques</u>	24
<u>1.4.2. DNA i seqüència aminoacídica</u>	24
<u>1.4.3. Unió als àcids nucleics</u>	25
<u>1.4.4. Localització i funció cel·lular</u>	26
<u>1.4.5. Autoepítops</u>	27
<u>1.5. L'AUTOANTIGEN SS-A (Ro)</u>	29
<u>1.5.1. Característiques bioquímiques</u>	29
<u>1.5.2. DNA i seqüència aminoacídica</u>	30
<u>1.5.3. Localització i funció cel·lular</u>	32
<u>1.5.4. Autoepítops</u>	32
<u>1.6. EL COMPLEX Ro RNP</u>	35
<u>1.7. ELS AUTOANTICOSSOS CONTRA SS-B (La) i SS-A (Ro)</u>	37
<u>1.7.1. Paper patogènic</u>	38
<u>1.7.2. Utilitat clínica</u>	39
<u>1.8. MÈTODES DE DETECCIÓ D'AUTOANTICOSSOS CONTRA ELS ANTÍGENS SS-B (La) I</u> <u>SS-A (Ro)</u>	41
<u>1.8.1. Immunodifusió doble (IDD)</u>	41

1.8.2. Contraimmunolectroforesi (CIE)	41
1.8.3. Immunoprecipitació d'RNA	42
1.8.4. Immunoanàlisi en fase sòlida	43
1.8.5. Immunotransferència (<i>immunoblotting</i>)	44
1.8.6. Immunofluorescència indirecta (IFI)	45
1.9. ESTRATÈGIES DE L'OBTENCIÓ DE PROTEÏNES RECOMBINANTS	46
1.9.1. Sistemes d'expressió de proteïnes recombinants	46
1.9.2. Obtenció de la seqüència codificadora de la proteïna	47
1.9.3. Clonatge a un vector d'expressió adequat	48
1.9.4. Transformació de cèl·lules procariotes i inducció de l'expressió	50
1.9.5. Purificació de la proteïna recombinant	51
1.10. ENZIMOIMMUNOANÀLISIS: ASPECTES TECNOLÒGICS I CARACTERÍSTIQUES	
DIAGNÒSTIQUES	54
1.10.1. Immobilització de proteïnes	54
1.10.1.1. Immobilització per adsorció passiva	54
1.10.1.2. Immobilització covalent	55
1.10.2. Sistemes de detecció	55
1.10.2.1. Sistemes de detecció colorimètrics (ELISA tradicional)	56
1.10.2.2. Sistemes de detecció luminiscent	56
1.10.3. Característiques analítiques	58
1.10.4. Característiques diagnòstiques	59
1.11. ESTANDARDITZACIÓ DE LA MESURA DELS ANTICOSSOS ANTINUCLEARS	61
2. MATERIALS I MÈTODES	63
2.1. PRODUCTES, REACTIUS I EQUIPS INSTRUMENTALS	65
2.2. TÈCNIQUES GENERALS	70
2.2.1. Tècniques de purificació de DNA	70
2.2.1.1. Purificació de DNA plasmídic	70
2.2.1.2. Purificació de DNA d'un gel d'agarosa	71
2.2.2. Tractaments enzimàtics del DNA	71
2.2.2.1. Lligacions amb vectors plasmídics	71
2.2.2.2. Digestions	72
2.2.3. Tècniques electroforètiques de DNA	73
2.2.3.1. Determinació de la seqüència de DNA mitjançant el mètode enzimàtic	73
2.2.4. Preparació de cèl·lules competents	74
2.2.4.1. <i>Escherichia coli</i> de la soca TG1	74
2.2.4.2. <i>Escherichia coli</i> de la soca BL21(DE3)pLysE	75
2.2.5. Transformació de les cèl·lules d'<i>Escherichia coli</i> amb DNA plasmídic	75

2.2.5.1. Transformació de les cèl·lules competents de la soca INV F'	76
2.2.5.2. Transformació de les cèl·lules competents de la soca TG1	77
2.2.5.3. Transformació de les cèl·lules competents de la soca BL21(DE3)pLysE	77
2.2.5.4. Transformació de les cèl·lules competents de la soca HMS174(DE3)pLysS	77
2.2.6. Tècniques electroforètiques de proteïnes	78
2.2.6.1. Electroforesi en gels de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants	78
2.2.6.2. Tinció amb blau de Coomassie	79
2.2.6.3. Determinació de la massa molar	80
2.2.6.4. Electrotransferència a membrana de PVDF	81
2.2.6.5. Tinció amb vermell de Ponceau S	81
2.2.6.6. Immunorevelat amb anticossos específics	82
2.2.6.7. Immunoabsorció dels sèrums específics	82
2.2.7. Determinació de la concentració de proteïna	83
2.2.7.1. Absorbància a 280 nm	83
2.2.7.2. Mètode de Bradford	83
2.3. PREPARACIÓ DELS VECTORS D'EXPRESSIONI	85
2.3.1. Vector d'expressió de SS-B (La)	85
2.3.1.1. Obtenció del cDNA codificant per a la proteïna SS-B (La) humana	85
2.3.1.2. Clonatge al vector pCR [®] 2.1	85
2.3.1.3. Construcció del vector d'expressió pET-20b(+)	88
2.3.2. Vectors d'expressió de les proteïnes Ro60 i Ro52	89
2.4. EXPRESSIONI I PURIFICACIÓ DE LES PROTEÏNES DE FUSIÓ	91
2.4.1. SS-B (La)-His	91
2.4.1.1. Expressió de la proteïna recombinant	91
2.4.1.2. Preparació de la mostra per a la cromatografia d'afinitat	93
2.4.1.3. Preparació i regeneració de la resina Ni-NTA-agarosa	93
2.4.1.4. Cromatografia d'afinitat amb la resina Ni-NTA	93
2.4.1.5. Caracterització molecular i antigènica de la proteïna purificada	94
2.4.2. Ro60-GST i Ro52-GST	94
2.4.2.1. Expressió de les proteïnes recombinants	96
2.4.2.2. Preparació de les mostres	96
2.4.2.3. Preparació i regeneració de la resina Glutathione Sepharose [®] 4B	97
2.4.2.4. Cromatografia d'afinitat amb la resina Glutathione Sepharose [®] 4B	97
2.4.2.5. Caracterització molecular i antigènica de les proteïnes purificades	98
2.5. ENZIMOIMMUNOANÀLISI EN FASE SÒLIDA (ELISA)	99
2.5.1. Immobilització dels antígens per adsorció passiva	99
2.5.2. Tractament de les microplaques amb agents estabilitzants	99
2.5.2.1. Estabilitat accelerada	100
2.5.3. Procediment dels assajos per a la detecció d'anticossos	100

2.5.4. Calibració	102
2.5.4.1. Classificació de sèrums	102
2.5.4.2. Determinació dels valors d'absorbància discriminants provisionals	103
2.5.4.3. Determinació del valor d'absorbància discriminant final: corbes ROC	103
2.5.4.4. Estandardització del valor d'absorbància discriminant: control del valor discriminant	104
2.5.5. Determinació de les característiques diagnòstiques	104
2.5.5.1. Especificitat i sensibilitat relatives	104
2.5.5.2. Concordància	105
2.5.6. Determinació de les característiques analítiques	105
2.5.6.1. Estimació de la imprecisió	105
2.5.6.2. Estimació del límit de detecció	106
2.5.6.3. Estudi d'especificitats	106
2.5.6.4. Estudi d'interferència dels factors reumatoides	107
2.6. TRACTAMENTS ESTADÍSTICS	108
2.6.1. Estudi de la normalitat i dels valors aberrants	108
2.6.2. Anàlisi de la variància d'un factor (ANOVA)	108
2.6.3. Test de McNemar i distribució binomial	109
3. RESULTATS	111
3.1. OBTENCIÓ DE LA PROTEÏNA DE FUSIÓ SS-B (La)-His	113
3.1.1. Construcció del vector d'expressió de SS-B (La)-His	113
3.1.1.1. Preparació de l'insert	113
3.1.1.2. Preparació del vector d'expressió	115
3.1.1.3. Preparació del vector recombinant	115
3.1.2. Expressió de la proteïna recombinant SS-B (La)-His	117
3.1.3. Purificació de la proteïna de fusió SS-B (La)-His	118
3.1.4. Caracterització molecular i antigènica de la proteïna purificada	119
3.1.4.1. Electroforesi en gel de poliàcrilamida en condicions desnaturalitzants	119
3.1.4.2. Transferència i revelat mitjançant anticossos específics	120
3.1.4.3. Immunoabsorció del sèrum específic amb antigen natiu i immunorevelat específic	121
3.2. OBTENCIÓ DE LES PROTEÏNES RECOMBINANTS Ro60-GST I Ro52-GST	122
3.2.1. Vectors d'expressió de les proteïnes de fusió Ro60-GST i Ro52-GST	122
3.2.2. Expressió de les proteïnes recombinants Ro60-GST i Ro52-GST	122
3.2.3. Solubilització de les proteïnes de fusió Ro60-GST i Ro52-GST	124
3.2.4. Purificació de les proteïnes de fusió Ro60-GST i Ro52-GST	125
3.2.5. Caracterització molecular i antigènica de les proteïnes purificades	127
3.2.5.1. Electroforesi en gel de poliàcrilamida en condicions desnaturalitzants	127

<u>3.2.5.2. Transferència i revelat mitjançant anticossos específics</u>	129
<u>3.2.5.3. Immunoabsorció del sèrum específic amb antigen natiu i immunorevelat específic</u>	130
<u>3.3. ENZIMOIMMUNOANÀLISIS EN FASE SÒLIDA AMB ELS ANTÍGENS RECOMBINANTS</u> ...	132
<u>3.3.1. Desenvolupament de les enzimoimmunoanàlisis (ELISA)</u>	132
<u>3.3.1.1. Immobilització dels antígens</u>	132
<u>3.3.1.2. Estudis d'estabilitat de les microplaques</u>	134
<u>3.3.2. Calibració de les ELISA: establiment del valor d'absorbància discriminant</u>	140
<u>3.3.3. Determinació de les característiques diagnòstiques</u>	144
<u>3.3.4. Estandardització</u>	145
<u>3.3.5. Determinació de les característiques analítiques</u>	146
<u>3.3.5.1. Imprecisió</u>	146
<u>3.3.5.2. Límit de detecció</u>	147
<u>3.3.5.3. Especificitat analítica de les enzimoimmunoanàlisis</u>	148
<u>3.3.5.4. Interferència del factor reumatoide</u>	148
<u>4. DISCUSSIÓ</u>	151
<u>4.1. CONSTRUCCIÓ DELS VECTORS D'EXPRESSIÓ</u>	153
<u>4.1.1. Vector d'expressió de l'antigen SS-B (La)</u>	153
<u>4.1.2. Vectors d'expressió dels antígens Ro60 i Ro52</u>	154
<u>4.2. OBTENCIÓ DE LES PROTEÏNES DE FUSIÓ</u>	155
<u>4.2.1. Expressió de les proteïnes recombinants</u>	155
<u>4.2.2. Purificació de la proteïna SS-B (La)-His</u>	155
<u>4.2.2.1. Identificació de la proteïna SS-B (La)-His</u>	156
<u>4.2.3. Purificació de les proteïnes Ro60-GST i Ro52-GST</u>	157
<u>4.2.3.1. Identificació de la proteïna Ro60-GST</u>	158
<u>4.2.3.2. Identificació de la proteïna Ro52-GST</u>	160
<u>4.3. DESENVOLUPAMENT I AVALUACIÓ DE LES ENZIMOIMMUNOANÀLISIS</u>	162
<u>4.3.1. Desenvolupament de les enzimoimmunoanàlisis</u>	162
<u>4.3.1.1. Sensibilització de les microplaques amb els antígens recombinants</u>	162
<u>4.3.1.2. Estabilitat de les microplaques sensibilitzades</u>	163
<u>4.3.1.3. Calibració de les ELISA: establiment del valor d'absorbància discriminant</u>	164
<u>4.3.2. Característiques diagnòstiques</u>	166
<u>4.3.3. Característiques analítiques</u>	167
<u>5. CONCLUSIONS</u>	169
<u>6. BIBLIOGRAFIA</u>	173

0. JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS

A les malalties autoimmunes, els teixits del propi organisme són agredits per components del sistema immunològic com a conseqüència de la pèrdua de l'autotolerància. Tot i que són una causa major de morbiditat a tot el món (afecten aproximadament el 10% de la població mundial) és impossible determinar amb exactitud la seva prevalença a causa de múltiples factors que disminueixen la precisió de les estimacions.

La detecció dels anticossos antinuclears (ANA) és àmpliament acceptada com una prova important en el diagnòstic de malalties autoimmunes tals com el lupus eritematós sistèmic (SLE), la síndrome de Sjögren, l'escleroderma o la polimiositis. La utilització de la tècnica d'immunofluorescència indirecta (IFI) en la detecció d'aquests autoanticossos s'utilitza de forma habitual com a primera i principal prova de cribatge, però sovint és necessari distingir el tipus d'antigen nuclear contra el qual estan dirigits els autoanticossos. A més, l'anàlisi d'un gran nombre d'espècimens en proves de cribatge utilitzant la tècnica d'IFI pot arribar a ser costosa, tant econòmicament com pel temps que s'ha d'emprar en la realització d'aquestes proves.

Cada vegada més s'utilitza la tecnologia de les enzimoimmunoanàlisis, ja que permet una automatització de les anàlisis, una quantificació i major objectivitat dels resultats, i facilita l'estandardització i l'homogeneïtat de les dades. A més a més, permet detectar la presència d'anticossos contra qualsevol autoantigen del que es disposi.

Recentment, al departament d'Investigació i Desenvolupament de BioSystems S.A., en col·laboració amb el Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona, s'havia desenvolupat una enzimoimmunoanàlisi per poder ser utilitzada com a prova de cribatge en la detecció d'anticossos antinuclears. Seguint aquesta línia, ens vam plantejar desenvolupar enzimoimmunoanàlisis específiques per a diferents marcadors de les malalties autoimmunes. Com que les purificacions dels antígens nadius a partir de teixits animals eren uns processos complexos i amb un rendiment final força baix, vam decidir produir els antígens de forma recombinant de manera que es poguessin reduir els costos globals i estandarditzar les purificacions.

Dins els diferents sistemes d'expressió de proteïnes recombinants existents trobem els procariotes, els llevats, les cèl·lules d'insectes i les cèl·lules de mamífer. En el nostre treball vam utilitzar un sistema procariota, ja que oferia les principals avantatges de fàcil manipulació, alt rendiment i baix cost.

Vam escollir els antígens SS-B (La) i SS-A (Ro) perquè són els principals marcadors de la síndrome de Sjögren, una malaltia amb una prevalença força elevada a la població general (entre el 0,5% i el 3%). Tot i que el principal marcador serològic de la malaltia és la

Justificació i objectius

presència d'autoanticossos dirigits contra l'antigen SS-B (La), en alguns casos s'ha descrit la presència únicament d'anticossos dirigits contra l'antigen SS-A (Ro), format per dues proteïnes (Ro60 i Ro52) associades a diferents RNA citoplasmàtics. És per això que és important la complementació dels resultats obtinguts amb els dos assajos.

Finalment, un cop desenvolupades les dues enzimoimmunoanàlisis utilitzant els antígens recombinants com a font antigènica, va caldre avaluar els resultats obtinguts mitjançant la caracterització analítica i diagnòstica dels assajos. Degut a la impossibilitat de disposar dels historials clínics dels sèrums utilitzats es va optar per dur a terme una comparació amb enzimoimmunoanàlisis disponibles comercialment que empraven antigens nadius i que foren considerats els assajos de referència.

Així doncs, els objectius del present treball es dividiren en tres blocs:

1. Preparació dels vectors d'expressió dels antígens recombinants en forma de proteïnes de fusió.
2. Purificació de les proteïnes recombinants mitjançant cromatografia d'afinitat i caracterització molecular i antigènica de les proteïnes obtingudes.
3. Desenvolupament i avaluació de les enzimoimmunoanàlisis.

1. INTRODUCCIÓ

1.1. TOLERÀNCIA I AUTOIMMUNITAT

El terme immunitat deriva de la paraula llatina *immunitas* que etimològicament significa privilegi, exempció. A l'edat mitjana designava una exempció de càrregues fiscals i quan la medicina va adoptar aquest terme ho va fer, en principi, per tal de caracteritzar un exempció de la malaltia, és a dir, un estat de resistència en front de certs agents infecciosos.

Actualment, es defineix la immunitat com aquell estat de certs organismes caracteritzat per la capacitat de reaccionar sense manifestacions morbosos a la presència d'un antigen. El conjunt de cèl·lules i molècules que fan possible assolir aquest estat formen el sistema immunològic.

Una de les propietats fonamentals del sistema immune és la seva capacitat per reconèixer i respondre davant d'antígens estranys, però no davant d'antígens propis. La falta de resposta del sistema immune a l'estimulació antigènica s'anomena **tolerància immunològica**.

L'aspecte més important de la tolerància és el que evita la resposta contra el propi organisme en ser exposat a un antigen propi i rep el nom d'**autotolerància**. L'autotolerància es deu, per una banda, a l'absència de limfòcits capaços de reconèixer el que és propi dins del repertori de limfòcits madurs i, per una altra, a la forma en que els limfòcits madurs reconeixen i responen enfront als antígens propis. La pèrdua de l'autotolerància dona lloc a reaccions immunitàries contra antígens propis o autòlegs. El conjunt d'aquestes reaccions rep el nom d'**autoimmunitat** i les malalties que produeixen **malalties autoimmunes**.

1.1.1. L'autotolerància i els seus mecanismes

Es pot induir autotolerància en diferents estadis del desenvolupament i activació limfocitària, de manera que es parla de **tolerància central** o **perifèrica** segons el lloc on es produeix la inducció de tolerància.

Durant l'ontogènia dels limfòcits T i B, els reordenaments gènics són susceptibles de donar com a resultat receptors de superfície capaços de reconèixer estructures pròpies de l'organisme. Als òrgans limfoides generadors (timus i medul·la òssia) s'hi localitzen principalment antígens propis a altes concentracions, mentre que els antígens exògens són capturats i transportats als òrgans limfoides perifèrics tals com els ganglis limfàtics i la melsa. Els clons de limfòcits immadurs que presenten receptors específics per a aquests antígens són eliminats per apoptosi en un procés de selecció negativa que rep el nom de delecció clonal i que

constitueix el principal mecanisme de tolerància central (Abbas et al., 1997). D'aquesta manera s'assegura que els limfòcits que assoleixen la maduresa funcional i abandonen els òrgans limfoides generadors estiguin lliures de clons que puguin reconèixer antígens propis presents a molts teixits.

No obstant això, algunes cèl·lules autoreactives escapen d'aquest control, ja que el mecanisme de deleció clonal no pot eliminar els clons de limfòcits que reconeixen antígens propis presents únicament en teixits perifèrics. Efectivament, s'ha comprovat que l'existència de limfòcits T autoreactius i d'autoanticossos és un fet fisiològic normal (Wilkin, 1989).

Els autoanticossos, que són secretats per clons de limfòcits B autoreactius, són predominantment de tipus IgM (immunoglobulines M), però també se n'han descrit del tipus IgG i IgA. Malgrat que les seves funcions no són molt clares, es creu que podrien desenvolupar un paper important en l'eliminació de determinats productes catabòlics i lítics del propi organisme (Weir i Elson, 1969). També s'ha suggerit una funció de protecció important mitjançant el bloqueig d'epítops antigènics exògens similars, però no idèntics, a antígens propis i que podrien donar reacció encreuada (Cohen i Young, 1991). Per altra banda, els limfòcits T autoreactius es creu que podrien actuar augmentant els efectes col·laboradors de les cèl·lules T col·laboradores (T_H , *helper*) o facilitant la renovació de les cèl·lules B en absència de l'antigen exogen (Kausman et al., 1994).

Per tal de poder controlar la reactivitat dels clons de cèl·lules T i B autoreactius que per alguna raó han escapat dels mecanismes de tolerància central, és necessària l'existència d'uns mecanismes reguladors addicionals que evitin una resposta immunològica greu, i que constitueixen l'anomenada tolerància perifèrica.

És probable que els mecanismes de tolerància perifèrica en front de les proteïnes pròpies siguin similars als de la tolerància contra els antígens exògens. Principalment són els següents (Parslow, 1994; Imboden, 1994; Pujol i Santamaría, 1994):

- Abortament clonal: els limfòcits autoreactius immadurs que no han estat eliminats mitjançant deleció clonal, són silenciats de manera que no són capaços de seguir madurant i diferenciar-se. Això és possible gràcies a la inhibició de l'expressió dels receptors de superfície.
- Anèrgia clonal o inactivació funcional sense mort cel·lular: les cèl·lules T i B autoreactives circulants no responen a la presentació de l'autoantigen en el context apropiat. Es creu que la forma d'induir aquest estat d'anèrgia és mitjançant una presentació incompleta de l'antigen, és a dir, mitjançant l'absència del segon senyal co-estimulador

necessari per a l'activació del limfòcit. En el cas de les cèl·lules T, l'anèrgia pot estar causada pel baix nivell d'expressió de co-estimuladors i citocines que presenten les cèl·lules presentadores d'antigen (APC) dels teixits perifèrics responsables de presentar els antígens propis. Per a les cèl·lules B no es coneixen els mecanismes bioquímics de l'anèrgia, però s'ha observat que en alguns casos el reconeixement de l'antigen propi provoca una absència de resposta per part d'aquestes cèl·lules a la col·laboració de les cèl·lules T, mentre que en d'altres es bloqueja la diferenciació de les cèl·lules B a cèl·lules secretores d'anticossos.

- Inhibició cel·lular: es deu a l'existència de limfòcits T productors de citocines inhibidores (inicialment anomenats limfòcits T supressors, T_S) que actuen inhibint la proliferació o diferenciació de limfòcits T i B autoreactius.
- Ignorància clonal: algunes cèl·lules de teixits perifèrics no expressen molècules del complex d'histocompatibilitat de tipus II (HLA-II), necessàries pel reconeixement de l'antigen per part dels limfòcits T CD4⁺ (subpoblació de limfòcits T col·laboradors), ni molècules d'adhesió que facilitin l'ancoratge dels limfòcits. D'aquesta manera, clons de cèl·lules T autoreactius es mantenen indiferents a les cèl·lules que presenten els antígens, que els mantenen de forma immunològicament silent.
- Ocultació: per causa de la baixa concentració de molts components endògens no s'esdevé l'activació del sistema immunològic contra ells.
- Xarxa idiotip-antiidiotip: la creació d'anticossos contra un antigen endogen determinat fa que el sistema generi anticossos específics contra els primers, creant una xarxa idiotip-antiidiotip que actua com a reguladora de la resposta autoimmune.

La desregulació d'algun dels mecanismes responsables de mantenir l'autotolerància pot dur a terme un reconeixement anòmal de les estructures endògenes per part del sistema immunològic, donant lloc a una resposta autoimmune.

1.1.2. Mecanismes d'autoimmunitat

En el desenvolupament de l'autoimmunitat hi tenen un paper principal les alteracions immunològiques i la predisposició genètica, però existeix un gran nombre de factors alternatius que també poden ser importants, tals com les infeccions microbianes, el dany tissular o les influències hormonals.

1.1.2.1. Alteracions immunològiques que poden causar autoimmunitat

L'autoimmunitat pot ser el resultat d'alteracions primàries de les cèl·lules B, les cèl·lules T o ambdues. L'existència de títols d'autoanticossos naturals modificats (Avrameas, 1991) i de cèl·lules T reguladores amb la funció alterada (Sakane et al., 1978) demostra que cal que hi hagi una desregulació dels mecanismes de manteniment de la tolerància que permeti l'atac immune contra els propis antígens. La manera que s'esdevé aquesta fallida no és ben coneguda, però s'han proposat diferents mecanismes generals per intentar explicar-ho (Abbas et al., 1997):

- Fracàs de la tolerància central: si falla el procés de selecció dels limfòcits immadurs específics per als antígens propis pot aparèixer una resposta autoimmune greu. No obstant, existeixen poques proves formals que confirmin aquesta hipòtesi en qualsevol malaltia immune humana o experimental.
- Ruptura de l'anèrgia de les cèl·lules T: les condicions que activen les cèl·lules presentadores d'antigen (APC) tissulars (infeccions, necrosi tissular, inflamació local...) poden provocar un augment de l'expressió de co-estimuladors i de la producció de citocines, de manera que s'estimuli la proliferació de cèl·lules T i la seva diferenciació a efectors pro-inflamatoris perjudicials pels teixits. D'aquesta manera es trenca l'anèrgia de les cèl·lules T i s'originen reaccions autoimmunes contra el teixit.
- Fracàs en la mort cel·lular induïda per activació: defectes en el gen que codifica per a la proteïna Fas (inductora de l'apoptosi) en les cèl·lules col·laboradores o en el gen que codifica per al lligand de Fas en les cèl·lules T CD4⁺ o els limfòcits B tenen com a resultat final la supervivència de cèl·lules T i B autoreactives que en condicions normals interaccionarien mitjançant les dues proteïnes i serien eliminades per apoptosi. A més, com que la interleucina-2 (IL-2) potencia els senyals apoptòtics regulats per Fas, una inhibició gènica selectiva de la IL-2 o del seu receptor també pot actuar afavorint una resposta autoimmune.
- Fracàs de la supressió regulada per cèl·lules T: si els antígens propis indueixen habitualment cèl·lules T reguladores productores de citocines immunosupressores que ajuden a mantenir l'autotolerància, la pèrdua d'aquestes cèl·lules pot resultar en una aparició d'autoimmunitat. No obstant, no es coneix cap malaltia autoimmune humana o animal relacionada amb aquest mecanisme.
- Activació policlonal limfocitària: tot i l'absència de cèl·lules col·laboradores específiques, algunes proteïnes bacterianes o víriques poden activar directament els limfòcits B i

induir la producció d'anticossos. Com que el repertori de cèl·lules B conté clons autoreactius i, a més, manté la capacitat de generar-ne de nous durant la maduració, la potencialitat d'aquest mecanisme per produir autoanticossos és important.

- Mimetisme molecular i reactivitat creuada: els antígens exògens que presenten homologia amb proteïnes pròpies poden provocar el reconeixement de l'estructura autòloga per part dels anticossos o les cèl·lules T estimulades contra els components exògens. Per altra banda, antígens multideterminants amb un epítot propi que s'uneix a cèl·lules B autoreactives i un epítot estrany capaç d'estimular cèl·lules T col·laboradores poden provocar l'activació de les cèl·lules B i la producció d'autoanticossos.

1.1.2.2. Factors genètics en l'autoimmunitat

Un 50% de la predisposició a l'autoimmunitat conferida pels factors genètics se situa a la regió que conté els gens del complex principal d'histocompatibilitat (HLA), concretament a la regió de classe II (Pujol, 1994). S'ha comprovat que l'expressió de determinats gens HLA pot ser un dels diversos factors que contribueixin a l'autoimmunitat, però no és per si mateixa la causa de cap malaltia autoimmune.

Les dades que s'han obtingut fins a l'actualitat no permeten treure conclusions segures sobre els mecanismes pels quals els gens HLA heredats contribueixen a l'autoimmunitat. Un possible mecanisme per explicar aquesta associació es basa en el fet que les estructures de les molècules HLA-II poden determinar quins clons de limfòcits T es seleccionen negativament durant la seva maduració al timus. Així, si les cèl·lules T immadures no es poden unir amb alta afinitat a les proteïnes pròpies per a les que són específiques, podran madurar fins a adquirir competència funcional (Abbas et al. 1997). D'altres mecanismes es basen en la capacitat de les molècules HLA-II d'influir en l'activació de les cèl·lules T reguladores que tenen com a funció evitar l'autoimmunitat.

Altres gens que poden contribuir a l'autoimmunitat són els que codifiquen pels receptors dels limfòcits T (TCR), els gens de les immunoglobulines o els gens del complement, entre d'altres, que influeixen en la regulació general de la resposta immune.

1.1.2.3. Altres factors en l'autoimmunitat

A més a més de les alteracions immunològiques i dels gens de susceptibilitat, existeixen diferents factors ambientals que poden desencadenar una resposta autoimmune (Abbas et al., 1997; González de Buitrago i González, 2000):

- Agents biològics: les infeccions víriques o bacterianes poden derivar en una resposta autoimmunità mitjançant la interferència en la regulació de la resposta immune que desencadenen a l'organisme hoste. Els múltiples efectes inclouen l'activació limfocitària policlonal, la inflamació tissular local que augmenta l'expressió de co-estimuladors, les alteracions dels antígens propis per crear antígens nous amb reacció encreuada parcial, i la lesió tissular que allibera antígens anatòmicament segrestats.
- Alteracions anatòmiques en els teixits: la inflamació, la isquèmia o els traumatismes poden generar una exposició d'antígens propis que normalment estan aïllats del sistema immune, o bé poden produir alteracions estructurals en els antígens propis de manera que es formin nous epítops amb la capacitat d'induir reaccions autoimmunitàs.
- Agents físics (radiació ionitzant) o químics (fàrmacs): poden actuar modificant l'estructura immunològica d'antígens propis, canviant la localització cel·lular d'aquests antígens o desregulant l'equilibri immunològic.
- Factors hormonals: les dones presenten una incidència de malalties autoimmunitàs més gran que els homes, però es desconeix si aquest predomini és causat per la influència de les hormones sexuals o per altres factors.
- Alliberament d'autoantígens: epítops que estan amagats del sistema immune poden esdevenir accessibles en el context d'una resposta inflamatòria, bé perquè són alliberats al medi i presentats per cèl·lules APC a cèl·lules col·laboradores, bé perquè són presentats per la pròpia cèl·lula que expressa inadequadament molècules HLA-II. També poden afavorir l'aparició de nous antígens els canvis de conformació d'una proteïna, canvis de localització o canvis en el processament.

L'associació entre una resposta autoimmunità i les manifestacions d'una malaltia determinada no implica necessàriament una relació causal entre elles. Només es parla de malaltia autoimmunità com a tal quan el procés autoimmunità apareix com el responsable primari de la producció de la malaltia.

1.2. MALALTIES AUTOIMMUNES

Tot i que les malalties autoimmunes són una causa major de morbiditat a tot el món (afecten aproximadament el 10% de la població mundial) és impossible determinar amb exactitud la seva prevalença a causa de múltiples factors que disminueixen la precisió de les estimacions. Entre d'altres cal destacar l'elevada variació entre diferents subgrups poblacionals, els problemes en les definicions dels casos i la dificultat per identificar malalties asimptomàtiques. Així doncs, els valors estimats de prevalença que es proposen s'han d'entendre merament com a aproximacions.

Segons una estimació de la *American Autoimmune Related Disease Association*, l'any 1988 un de cada cinc americans patia una malaltia de tipus autoimmune i això suposava a l'Estat una despesa de més de 80.000 milions de dòlars anuals (Fessel WJ, 1988). Les diferents dades de les que es disposa sobre el cost d'aquestes malalties inclouen els costos directes (adquisició de serveis d'atenció i de salut) i els indirectes (pèrdua de funcionalitat, discapacitat i mort). No obstant, és impossible quantificar el cost psicològic i emocional derivats del dolor, l'alteració de la imatge corporal, etc. provocats per aquestes malalties. Per intentar millorar la qualitat de vida del pacient i augmentar les seves perspectives és necessari un diagnòstic precoç, de manera que es pugui iniciar el tractament el més aviat possible.

Malgrat que existeix un gran nombre de malalties etiquetades d'autoimmunes, no s'ha pogut demostrar que totes estiguin causades per una resposta autoimmune. En molts casos es pot assolir un grau raonable de certesa que una malaltia és autoimmune per l'existència de certes evidències "indirectes" (Pujol, 1994):

- Existeix un quadre histopatològic suggestiu amb la presència de nombrosos limfòcits activats en el teixit afectat, de deposicions d'immunoglobulines i de complement seguint l'estructura del teixit, etc.
- Es detecten autoanticossos amb un títol que segueix una evolució paral·lela a la de la malaltia.
- A la perifèria s'observa un augment de limfòcits T autoreactius activats.
- Es comprova *in vitro* la capacitat dels autoanticossos o dels limfòcits de reproduir la lesió fonamental de la malaltia autoimmune, mitjançant proves de citotoxicitat dels limfòcits T o dels autoanticossos cap a les cèl·lules diana de la malaltia.

Els processos autoimmunitaris afecten a una gran varietat d'òrgans i, per tant, la simptomatologia és diversa. No obstant, totes les malalties autoimmunes comparteixen unes característiques comunes:

- Concentracions elevades d'autoanticossos en sang.
- Major incidència en edat adulta i en el sexe femení.
- Caràcter hereditari clarament significatiu, lligat a determinats subtipus d'antígens HLA.
- Important infiltració tissular de cèl·lules mononuclears en els teixits afectats.
- Curs clínic subagut.
- Existència de fases d'exacerbació i de remissió espontànies.

Gairebé la totalitat de les malalties autoimmunes es presenten amb una concentració en sang (o títol) d'autoanticossos naturals elevada, tot i que en determinades patologies no és massa clar si aquest fet reflecteix un paper patogènic dels autoanticossos o si és el resultat del dany tissular i l'alliberament de productes de degradació provocats pel procés autoimmunitari (Avrameas, 1991). L'acció dels autoanticossos es limita principalment a dos tipus de mecanismes lesius: acció citotòxica i citolítica damunt els teixits que reconeixen com a antigènics, provocant la seva destrucció; i formació i deposició de complexos autoantigen-anticòs circulants en articulacions, espais extracel·lulars i ronyó, entre d'altres, provocant danys en aquests teixits i l'aparició de processos d'inflamació crònica (Phillips, 1989). L'especificitat dels autoanticossos pot ser molt diversa i, en gran part, és la determinant de la simptomatologia clínica.

Les malalties autoimmunes es poden classificar en dos grans grups:

- Malalties autoimmunes específiques d'òrgans: es produeixen anticossos contra estructures específiques d'un òrgan determinat, en el que es manifesten les lesions. En alguns casos es poden desenvolupar complicacions sistèmiques com a resultat de la disfunció de l'òrgan, però no s'observa una extensió del dany immunològic a d'altres teixits. En algunes de les malalties s'ha demostrat que els autoanticossos són els responsables de la malaltia, mentre que en d'altres la relació entre la malaltia i els autoanticossos es desconeix. En aquests últims casos, es creu que el dany tissular pot ser causat per respostes immunològiques cel·lular i humoral de forma conjunta (Levinson, 1994). A la taula 1.1 es presenten les malalties autoimmunes específiques d'òrgans més significatives.

Òrgan	Malaltia	Anticossos detectats
Aparell digestiu	Anèmia perniciosa	IgG contra cèl·lules parietals IgG o IgA contra el factor intrínsec
	Malaltia celíaca	Ig contra endomisi, contra gliadina, contra reticulina i contra transglutaminasa tissular
	Colitis ulcerosa	Ig contra lactoferrina, contra catepsina-G i contra -glucuronidasa
	Malaltia de Crohn	Ig contra antígens associats a mucina, Ig contra <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ASCA)
Fetge	Hepatitis autoimmunes	Ig contra LKM (<i>liver kidney microsoma</i>)
	Cirrosi biliar primària	IgA o IgM contra mitocòndries
Tiroides	Malaltia de Graves-Basedow	Ig contra el receptor de la tirotropina (TSH)
	Tiroiditis de Hashimoto	Ig contra peroxidasa tiroidea (TPO)
Glàndules suprarenals	Malaltia d'Addison	IgG contra antígens del còrtex suprarenal
Ronyó	Síndrome de Goodpasture	IgG contra la membrana basal glomerular
Pàncreas	Diabetis insulino-depenent	IgG contra cèl·lules dels illots pancreàtics
Pell	Pèmfig	IgG contra la substància intercel·lular epitelial
Múscul	Miastènia greu pseudoparalítica	IgG contra receptors d'acetilcolina de la placa neuromuscular

Taula 1.1. Malalties autoimmunes específiques d'òrgans i anticossos amb els que s'han relacionat. Ig: immunoglobulina.

- Malalties autoimmunes no específiques d'òrgans o sistèmiques: els anticossos estan dirigits contra antígens de la superfície, el citoplasma o el nucli de cèl·lules disseminades per tot el cos. En general, es tracta de molècules implicades en la replicació o transcripció del DNA, o en la traducció de l'RNA missatger (mRNA). Algunes de les manifestacions d'aquestes malalties són degudes a efectes directes dels autoanticossos, mentre que d'altres són degudes a la deposició de complexos immunològics antígen-anticòs de forma sistèmica que origina els caràcters disseminats de la malaltia.

Es classifiquen en dos subgrups: malalties autoimmunes connectives o reumàtiques i malalties autoimmunes vasculars. Les malalties reumàtiques són un grup heterogeni de malalties que afecten principalment el múscul, el ronyó, la pell i les articulacions. Tot i que cadascuna es presenta de forma diferent a la resta, totes tenen com a

manifestacions clíniques comunes fatiga, pèrdua de pes, miàlgies i, en la major part dels casos, lesions articulars. Els principals marcadors d'aquestes malalties són els autoanticossos contra antígens nuclears. Per altra banda, les malalties autoimmunes vasculares, o vasculitis, són un grup heterogeni de malalties que es caracteritzen per la inflamació dels vasos sanguinis i la necrosi de la paret vascular. Tant les manifestacions clíniques com el pronòstic de la malaltia són molt diversos a causa de l'afectació de diferents òrgans, i el curs de la malaltia pot ser des de molt limitat fins a assolir conseqüències fatals.

L'anàlisi extensa del repertori d'autoanticossos en les malalties autoimmunes sistèmiques ha revelat un espectre característic d'autoanticossos per a cada malaltia (taula 1.2). En alguns casos es tracta d'una relació pràcticament inequívoca, mentre que en d'altres les correlacions són menys clares.

Subgrup	Malaltia	Especificitat
Connectives	Artritis reumatoide	Immunoglobulines (factor reumatoide); histones; filagrina; antígen RA33; queratina.
	Lupus eritematós sistèmic	dsDNA (DNA bicatenari); Sm (ribonucleoproteïna); histones; nucleosoma.
	Síndrome de Sjögren	SS-A (Ro) i SS-B (La) (ribonucleoproteïnes).
	Síndrome de CREST	Centròmer
	Esclerodèrmia	Scl-70 (DNA topoisomerasa I)
	Polimiositis	Jo-1 (histidil-tRNA sintetasa)
	Dermatomiositis	Mi-2 (helicasa)
	Malaltia mixta del teixit connectiu (MCTD)	U ₁ -snRNP (ribonucleoproteïna)
Vasculars	Granulomatosi de Wegener	PR3 (proteïnasa 3); antígen citoplasmàtic de neutròfils (ANCA)
	Microangiopatia	MPO (mieloperoxidasa); ANCA

Taula 1.2. Classificació de les malalties autoimmunes sistèmiques i especificitat amb la que s'han relacionat.

1.3. LA SÍNDROME DE SJÖGREN

La síndrome de Sjögren, o síndrome seca, és una malaltia autoimmunitària que es caracteritza per una infiltració limfocítica progressiva en glàndules exocrines (principalment les glàndules salivals i lacrimals) i les principals manifestacions clíniques són la xerostòmia (o sequedat de la boca) i la xeroftàlmia (o sequedat ocular). Afecta majoritàriament les dones (relació 9:1 respecte els homes) i generalment es manifesta entre els 40 i els 60 anys, tot i que es pot trobar a totes les edats. No es coneix amb exactitud la prevalença de la malaltia, ja que l'habitual manca de simptomatologia, sobretot en estats primerencs, porta sovint a un infradiagnòstic. A més de la malaltia aïllada (síndrome de Sjögren primària) se'n distingeix una altra associada a d'altres malalties autoimmunitàries (síndrome de Sjögren secundària) (Talal, 1985).

1.3.1. Etiologia i patogènesi

L'etiologia de la síndrome de Sjögren segueix essent desconeguda, però els estudis realitzats en immunopatologia, autoanticossos, immunogenètica i virus han permès especular un possible desenvolupament de la malaltia dividit en tres etapes: en primer lloc, l'activació de la resposta autoimmunitària per un factor ambiental que actua sobre un substrat genètic determinat; seguidament, la perpetuació de la reactivitat autoimmunitària per esdevenir crònica a través dels mecanismes reguladors immunològics normals; i finalment, les lesions derivades del procés inflamatori continu (Moutsopoulos et al., 1993).

1.3.1.1. Primera etapa: l'activació de l'autoimmunitat

S'han obtingut moltes dades que suggereixen una implicació viral en la síndrome de Sjögren. La possible infecció vírica transitòria o persistent de les cèl·lules epitelials seria el pas inicial cap al desenvolupament de la malaltia.

Es creu que una de les infeccions cròniques més relacionada amb la síndrome de Sjögren és la de citomegalovirus (CMV), ja que s'han detectat anticossos de la classe IgG i IgM contra antígens d'aquest virus en sèrums de pacients amb la forma primària de la malaltia (Shillito et al., 1982). Un altre possible candidat responsable de l'activació de l'autoimmunitat podria ser el virus d'Epstein-Barr (EBV), que es replica a les glàndules salivals, i del que s'han detectat antígens específics en aquests òrgans en pacients amb la síndrome de Sjögren (Wolf et al., 1984). També s'han proposat els retrovirus com a un altre

possible grup de virus responsables de la patogènesi de la síndrome, ja que en un 30% de pacients amb síndrome de Sjögren s'han detectat anticossos contra la glicoproteïna p24 de la càpside del virus de la immunodeficiència humana (HIV) (Talal et al., 1990).

Un altre possible factor proposat en la patogènesi de la malaltia és la infecció amb *Helicobacter pylori*. S'ha observat que la infecció amb aquest bacteri pot activar una resposta immunològica contra la proteïna de xoc tèrmic de 60 kDa (HSP60, *heat-shock protein 60*) que pot derivar, posteriorment, a una reacció autoimmune ja que existeix un alt grau d'homologia entre aquesta proteïna i la seva homòloga en l'hoste (Aragona et al., 1999).

En tots els casos, cal tenir en compte el substrat genètic del pacient. S'ha demostrat que familiars de pacients amb la síndrome de Sjögren presenten una prevalença de la malaltia i una incidència de les anormalitats autoimmunes serològiques més gran que els controls lligats a edat i sexe. A més, s'han establert associacions entre la síndrome i determinats haplotips del complex principal d'histocompatibilitat (HLA), que varien en funció de la raça tal com es mostra a la taula 1.3.

Grup ètnic	Haplotip HLA
Blancs Caucàsics	HLA-B8
	HLA-DW3
	HLA-DR3
	HLA-DRw52
Grecs	HLA-DR5
Israelians	HLA-DR11 (subtipus de DR5)
Japonesos	HLA-DRw53

Taula 1.3. Variacions ètniques en l'associació entre antígens codificats pel complex principal d'histocompatibilitat (HLA) i la síndrome de Sjögren (adaptat de Moutsopoulos et al., 1993).

Finalment, cal esmentar que el fet que la malaltia estigui tan lligada al sexe fa pensar en la possibilitat de l'existència de factors neurohormonals com a patogènics. De fet, les glàndules salivals i lacrimals (els principals òrgans afectats en la síndrome) són hormonodepenents i altament innervades, de manera que una alteració hormonal o un augment en les concentracions locals de senyals alliberats pels nervis simpàtics, parasimpàtics o sensitius podria ocasionar una atròfia glandular.

1.3.1.2. Segona etapa: el desenvolupament i la continuació del procés autoimmune

Els dos fenòmens autoimmunes principals observats en la síndrome de Sjögren són la hiperreactivitat dels limfòcits B i de les cèl·lules plasmàtiques, i els infiltrats limfocítics a les glàndules exocrines (Moutospoulos et al., 1993).

L'activació policlonal dels limfòcits B es comprova, a nivell sèric, per la presència d'hipergammaglobulinèmia. Les quantitats augmentades d'immunoglobulines en aquests pacients contenen autoanticossos contra antígens no específics d'òrgans tals com immunoglobulines (factor reumatoide), autoanticossos contra antígens específics d'òrgans tals com els conductes salivals, els conductes pancreàtics, les cèl·lules de la glàndula tiroidea i les cèl·lules de la mucosa gàstrica, i autoanticossos antinuclears contra antígens cel·lulars extraïbles. Dins l'últim grup cal destacar els autoanticossos dirigits contra dues ribonucleoproteïnes anomenades SS-A o Ro i SS-B o La i que es consideren específics per a la síndrome de Sjögren, malgrat que en determinats casos també s'han descrit en sèrums de pacients amb d'altres malalties autoimmunes. En la síndrome de Sjögren primària, la presència d'aquests autoanticossos s'associa amb el començament primerenc i la llarga durada de la malaltia, l'engrandiment recurrent de les paròtides, l'esplenomegàlia, la limfadenopatia i la vasculitis. Alguns pacients amb la síndrome de Sjögren primària, i especialment els que presenten manifestacions extraglandulars sistèmiques, expressen concentracions elevades d'immunoglobulines monoclonals associades a una expansió monoclonal de cèl·lules B a les glàndules salivals. S'ha demostrat que en aquests casos el risc de desenvolupar limfomes és major.

La infiltració limfocítica de les glàndules exocrines característica de la malaltia és majoritàriament de cèl·lules col·laboradores, mentre que les cèl·lules B constitueixen, aproximadament, un 20% de la població infiltrant total. Es creu que l'activació de les cèl·lules B té lloc en aquests òrgans i que segueix diferents etapes d'evolució, començant per una activació policlonal que deriva a una activació policlonal-oligoclonal-monoclonal i que finalitza amb una proliferació monoclonal maligne.

1.3.1.3. Patologia

La característica comú de tots els òrgans afectats en pacients amb la síndrome de Sjögren és una infiltració limfocítica potencialment progressiva. L'examen microscòpic de les glàndules salivals revela una lesió limfoepitelial benigne, caracteritzada per la substitució

limfocítica de l'epiteli salival. Aquests infiltrats són els responsables de la disfunció dels òrgans afectats i de les diferents manifestacions clíniques.

1.3.2. La síndrome de Sjögren primària

Malgrat que es creia que la síndrome de Sjögren era una malaltia rara, dades recents suggereixen que la prevalença d'aquesta malaltia podria oscil·lar entre el 0,5% i el 3% de la població general (Vitali et al, 1993). No obstant, les dades de les que es disposa varien molt segons la literatura i els criteris diagnòstics utilitzats.

La forma primària de la malaltia es caracteritza per una infiltració limfocítica i de cèl·lules plasmàtiques a les glàndules exocrines, emfatitzada en el cas de les glàndules salivals i lacrimals. Les manifestacions clíniques relacionades són xerostòmia, queratoconjuntivitis seca, xeroftàlmia, xerotràquea, dispareunia, sequedat nasal i sequedat cutània, entre d'altres.

Aquesta infiltració pot estendre's, també, a diferents òrgans no glandulars com són el ronyó, els pulmons, la pell, el sistema nerviós i les articulacions, originant l'àmplia varietat de símptomes sistèmics observats durant el curs de la malaltia (taula 1.4).

Sistema	Malalties observades
Sistema articular	Poliartritis; fibromiàlgia.
Sistema cardiovascular	Fenomen de Raynaud; pericarditis.
Sistema respiratori	Tos seca; dispnea; sequedat de la mucosa traqueobronquial.
Aparell digestiu	Disfàgia; nàusees; sequedat de la faringe i l'esòfag; gastritis crònica atrofica; hepatomegàlia; esplenomegàlia; cirrosi primària biliar.
Sistema renal	Acidosi tubular renal tipus I; disfunció tubular.
Sistema nerviós	Polineuropatia sensitivomotora; alteracions del moviment; alteracions psiquiàtriques.

Taula 1.4. Principals manifestacions extraglandulars de la síndrome de Sjögren (extret de Moutsopoulos et al., 1993).

El curs clínic de la síndrome de Sjögren primària normalment és benigne, amb un període de fins a una dècada entre el començament dels símptomes i el desenvolupament complet de la síndrome. No obstant això, els pacients amb aquesta malaltia tenen un risc relatiu de desenvolupar un limfoma en glàndules exocrines 44 vegades major que el de la població general. Els estudis immunohistològics en biòpsies de pacients demostren que els limfomes són, principalment, de tipus B, essent els limfomes de cèl·lules B indiferenciades o els immunocitomes els tipus predominants (Moutsopoulos et al., 1993). Altres òrgans que poden resultar afectats són el sistema retículoendotelial, els pulmons, els ronyons i el tracte gastrointestinal.

En un 10% de pacients amb síndrome de Sjögren es poden trobar acumulacions pseudotumorals de cèl·lules limfoides que no compleixen els criteris anatomopatològics de tumors malignes. En aquests casos es parla de pseudolinfomes.

A nivell sèric, els autoanticossos més comuns en els pacients amb la síndrome de Sjögren primària són el factor reumatoide, que pot ser de l'isotip IgG, IgA o IgM, i els autoanticossos antinuclears (ANA), principalment els dirigits contra els antígens SS-B (La) o SS-A (Ro). També s'han descrit, però en menys freqüència, valors positius d'autoanticossos específics d'òrgans, tals com anticossos contra les tiroglobulines o contra el múscul llis. De tots ells, els autoanticossos més específics per a aquesta forma de la malaltia són els que van dirigits contra la ribonucleoproteïna SS-B (La).

1.3.3. La síndrome de Sjögren secundària

La síndrome de Sjögren secundària es presenta associada a diferents malalties autoimmunes, essent l'artritis reumatoide i l'esclerodèrmia les més habituals (31% i 20%, respectivament). Altres malalties autoimmunes amb les que pot trobar-se la síndrome de Sjögren són el lupus eritematós sistèmic, la malaltia mixta del teixit connectiu, la cirrosi biliar primària, la miositis, la vasculitis, la tiroïditis i l'hepatitis crònica activa. Aquesta forma de la malaltia sol aparèixer en pacients de sexe femení d'edats més avançades que en el cas de la síndrome de Sjögren primària i sol tenir un començament més lent i insidiós, però sempre progressiu. L'evolució de la malaltia autoimmuna associada no es relaciona de forma equivalent amb l'evolució de la síndrome seca.

En el cas de l'associació amb l'artritis reumatoide, els pacients solen presentar queratoconjuntivitis seca, però l'engrandiment de les paròtides o d'altres glàndules principals és menys comú que en la forma primària de la malaltia. A més, els caràcters extraglandulars

que es donen en la síndrome primària, tals com la limfadenopatia, el fenomen de Raynaud o la implicació renal, no són habituals. Per a la resta de malalties autoimmunes amb les que s'associa la síndrome de Sjögren no s'observen tantes diferències, i les manifestacions clíniques són un cúmul de les manifestacions pròpies de cada malaltia.

A nivell sèric, els pacients amb la síndrome de Sjögren secundària presenten principalment els autoanticossos més o menys específics de la malaltia autoimmuna amb la que s'associa, i els autoanticossos contra les ribonucleoproteïnes SS-B (La) i SS-A (Ro).

1.3.4. Diagnosi

El diagnòstic de la síndrome de Sjögren es basa en la presència de xerostòmia, sequedat ocular o augment de les paròtides. L'associació amb altres malalties reumàtiques, normalment artritis reumatoide, condueix al diagnòstic de la síndrome de Sjögren secundària. En tots els casos, el diagnòstic és confirmat mitjançant una biòpsia de les glàndules salivals que permet valorar l'estructura glandular i la infiltració inflamatòria. No obstant això, el caràcter sindròmic de la forma primària de la malaltia i la seva tendència a l'evolució crònica dificulten el seu diagnòstic, ja que és possible que el pacient presenti una expressió clínica i una afectació glandular i extraglandular diferent segons el moment evolutiu de realitzar les proves. A més, les diferents proves diagnòstiques utilitzades presenten xifres de sensibilitat i especificitat variables.

Un altre punt a tenir en compte és el diagnòstic diferencial, que ha de permetre distingir la síndrome de Sjögren d'altres malalties amb les mateixes manifestacions clíniques, tals com la sarcoïdosi, les lipoproteïnèmies tipus II, IV i V, la malaltia crònica hoste-contra-empelt, l'amiloïdosi i, en alguns casos, pacients amb infecció pel virus de la immunodeficiència humana (HIV). En tots aquests casos s'han descrit manifestacions seques (sequedat ocular, xerostòmia o augment de les paròtides), però a diferència de la síndrome de Sjögren no s'han detectat autoanticossos contra l'antigen SS-B (La) o contra l'antigen SS-A (Ro) ni les biòpsies de les glàndules salivals han presentat infiltració limfocitària. És per això que aquestes dues proves es consideren fonamentals per a la diagnosi de la síndrome de Sjögren.

Existeix certa controvèrsia respecte els criteris diagnòstics de la síndrome de Sjögren, especialment entre autors americans i europeus, de manera que s'han proposat varies classificacions. A Europa se solen utilitzar els criteris proposats el 1993 pel Grup d'Estudi de la Comunitat Europea dels Criteris Diagnòstics per a la Síndrome de Sjögren que es

presenten a la taula 1.5, dels quals cal que se'n compleixin com a mínim quatre per tal d'acceptar el diagnòstic de la malaltia (Vitali et al., 1993).

Síntomes orals	Sensació de boca seca per un període superior a 3 mesos. Parotidomegalia recurrent. Necessitat constant de beure líquids.
Síntomes oculars	Sensació d'ulls secs per un període superior a 3 mesos. Sensació recurrent de cossos estranys als ulls. Utilitzar llàgrimes artificials més de tres vegades al dia.
Signes oculars	Prova de Schirmer inferior o igual a 5 mm als 5 minuts. Puntuació de 4 o més (escala de Bitsterveld) a la tinció amb rosa de Bengala.
Alteració glàndules salivals	Gammagrafia parotídea amb dèficit difús de captació. Sialografia amb alteracions difuses ductals i acinars. Flux salival sense estimular d'1,5 ml o menys durant 15 minuts.
Histopatologia	Biòpsia salival grau 3-4 de la classificació de Chisholm i Mason.
Immunologia	Anticossos antinuclears (ANA). Factor reumatoide. Anticossos contra SS-A (Ro). Anticossos contra SS-B (La).

Taula 1.5. Criteris diagnòstics europeus de la síndrome de Sjögren (adaptat de García-Carrasco et al., 1997).

De tots els criteris esmentats, cal destacar la presència dels autoanticossos dirigits contra els antígens SS-B (La) i SS-A (Ro), que són considerats els marcadors serològics específics de la síndrome de Sjögren (apartat 1.7).

1.4. L'AUTOANTIGEN SS-B (La)

L'antigen SS-B (La) fou definit originalment per la seva reactivitat amb els autoanticossos presents al sèrum de pacients amb la síndrome de Sjögren i lupus eritematós sistèmic.

1.4.1. Característiques bioquímiques

SS-B (La) és una ribonucleoproteïna altament fosforilada de 47 kDa associada a diferents RNAs. Per electroforesi bidimensional es poden diferenciar fins a 8 formes isoelèctriques amb un pI d'entre 6 i 7 (Pruijn, 1994).

A partir de les prediccions estructurals es distingeix un domini central en hèlix que conté una regió rica en els aminoàcids prolina (P), àcid glutàmic (E), serina (S) i treonina (T), sensible a proteases i que s'anomena regió PEST. La degradació proteolítica de la proteïna en aquest punt resulta en un fragment de 23 kDa corresponent a l'extrem C-terminal ric en residus (Ser i/o Thr) fosforilats, i en un de 29 kDa format per l'extrem N-terminal ric en residus Met en el que es troba la zona d'unió a l'RNA (Chan et al., 1989a) (figura 1.1).

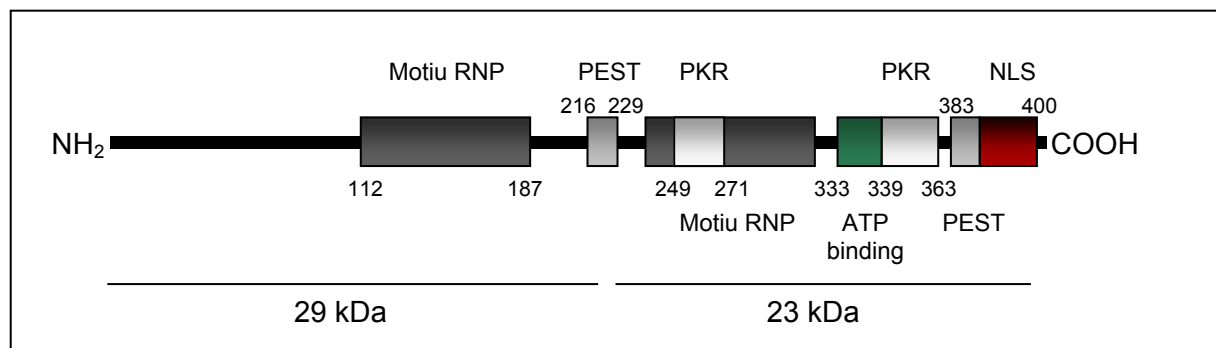


Figura 1.1. Components estructurals principals de l'autoantigen SS-B (La). Els números indiquen els residus aminoacídics. Motiu RNP: domini d'unió a RNA; PEST: regió sensible a proteases; PKR: elements de seqüència homòlegs a regions de la proteïna cinasa activada per RNA de doble cadena; ATP binding: seqüència d'unió a ATP; NLS: senyal de localització nuclear (adaptat de Pruijn, 1994; Pruijn et al., 1997).

1.4.2. DNA i seqüència aminoacídica

El gen humà de la proteïna SS-B (La) s'estén al llarg de 9.5 kb des del punt d'iniciació de la transcripció fins al lloc de poliadenilació. Està localitzat al cromosoma 2 i comprèn 11 exons, que codifiquen per una proteïna de 408 aminoàcids (figura 1.2). L'absència de la seqüència

TATA (*TATA box*) i la presència d'una regió rica en G/C al promotor és característica d'un gen domèstic (*housekeeping*) (Chambers et al., 1988).

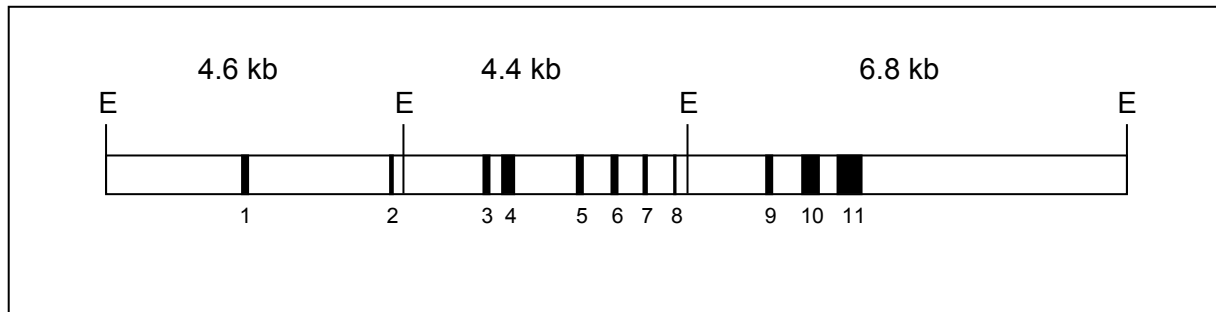


Figura 1.2. Estructura esquemàtica del gen humà de SS-B (La). Els exons estan numerats de l'1 a l'11. Les longituds estan indicades en milers de parells de bases (kb). E: punts de tall de l'endonucleasa *EcoRI* (adaptat de Pruijn, 1994).

La seqüència aminoacídica obtinguda a partir del cDNA, molt conservada a nivell evolutiu, permet distingir diferents motius estructurals importants, representats a la figura 1.1. Primerament, tres regions PEST localitzades al mig (apartat 1.4.1) i a l'extrem C-terminal de la proteïna, on també s'observa la presència d'una seqüència de consens de localització nuclear (NLS) i un lloc d'unió d'ATP (*ATP-binding*). Seguidament, dos dominis d'uns 80 aminoàcids compartits per diferents proteïnes enllaçants d'RNA anomenats motius RNP, dels quals el que es troba més a l'extrem N-terminal s'ha demostrat que intervé en la unió de l'RNA a la proteïna. Finalment, a l'extrem C-terminal de la proteïna es distingeixen dos elements de seqüència que són homòlegs a regions de la proteïna cinasa activada per RNA de doble cadena (PKR).

1.4.3. Unió als àcids nucleics

La proteïna SS-B (La) s'uneix a una gran varietat d'RNAs petits. Principalment, es tracta de productes sintetitzats per l'RNA polimerasa III, com és el cas dels precursors de RNAs de transferència (tRNA), de 5S rRNA, de 7S RNA, d'U6 snRNA i d'hY RNAs. També s'ha descrit la unió d'aquesta proteïna a l'U1RNA, transcrit per l'RNA polimerasa II, a alguns RNAs virals petits, com per exemple VA RNAs codificats per adenovirus o EBER RNAs codificats pel virus d'Epstein-Barr (Prujn, 1994), i a RNAs líders dels virus de l'estomatitis vesicular (VSV), de la ràbia, de la poliomièlitis (poliovirus), del virus d'immunodeficiència humana (HIV), del virus de la grip, del virus de la rubèola i del virus de l'hepatitis C (Kurilla i

Keene, 1983; Kurilla et al., 1984; Meerovitch et al., 1993; Chang et al., 1994; Park i Katze, 1995; Pogue et al., 1996; Ali i Siddiqui, 1997).

La unió de la proteïna SS-B (La) s'estableix pel reconeixement d'una seqüència rica en residus uridina de l'extrem 3' (UUU_{OH}) comuna als RNAs transcrits per l'RNA polimerasa III i per l'RNA polimerasa II (Stefano, 1984). Com que aquesta seqüència en molts casos es perd en el procés de maduració, la unió de la proteïna SS-B (La) a aquests precursors es dona únicament de forma transitòria. Per a la resta d'RNAs, el fet que no presentin la cua 3' d'oligouridina indica que ha d'existir un domini d'unió a la proteïna SS-B (La) alternatiu.

1.4.4. Localització i funció cel·lular

Les proteïnes immunoreactives amb anticossos humans monoclonals dirigits contra SS-B (La) s'han detectat en totes les espècies de mamífers examinades, en amfibis i en protozous. Les cèl·lules de mamífers contenen unes 2×10^7 còpies de la proteïna SS-B (La) localitzades predominantment al nucli tal com s'observa per immunofluorescència, però és evident que també s'ha de trobar al citoplasma per poder-se associar amb els hY RNA (Pruijn, 1994). En diferents estudis on les cèl·lules s'han estressat per diversos mètodes (infecció vírica, irradiació ultraviolada, inanició sèrica o tractament amb citocines) s'ha observat una inducció de l'expressió de la proteïna a la superfície de la membrana i una translocació de la proteïna cap a la superfície de la membrana (Keech et al., 1996; Lawley et al., 2000).

Al nucli, SS-B (La) s'associa transitòriament als terminals 3' rics en uridina dels transcrits de l'RNA polimerasa III sintetitzats de nou i es creu que actua facilitant la terminació de la transcripció i l'alliberament del transcrit del DNA motlle (Gottlieb i Steitz, 1989). Més recentment, s'ha relacionat SS-B (La) com a factor d'iniciació de l'RNA polimerasa III (Maraia, 1996), amb una activitat que depèn de la desfosforilació d'un residu particular, Ser 366 (Fan et al., 1997). No obstant, la participació de SS-B (La) en la transcripció de l'RNA polimerasa III s'ha qüestionat recentment a causa dels resultats obtinguts en experiments de transcripció *in vitro* en un sistema de *Xenopus laevis* (Lin-Marq i Clarkson, 1998). Altres funcions que s'han descrit per a la proteïna SS-B (La) inclouen el processament dels extrems 3' i 5' dels precursors dels RNAs de transferència (pre-tRNAs) (Fan et al., 1998), la retenció al nucli dels transcrits de l'RNA polimerasa (Boelens et al., 1995), un paper mediador important en la importació de determinats RNAs des del citoplasma al nucli (Grimm et al., 1997) i la capacitat, *in vitro*, de desfer híbrids DNA-RNA i RNA de doble cadena mitjançant un procés dependent d'ATP (Bachmann et al., 1990).

Al citoplasma, s'han descrit tres possibles funcions per a la proteïna SS-B (La): en cèl·lules infectades per alguns virus, s'uneix en forma d'homodímer a les regions 5' no codificants de l'RNA i facilita la seva traducció mitjançant diferents mecanismes (Craig et al., 1997); estableix l'RNA missatger (mRNA) codificant per histones (McLaren et al., 1997); i, finalment, participa en la iniciació de la traducció d'alguns mRNAs cel·lulars (Lin-Marq i Clarkson, 1998).

Per tal d'explicar algunes d'aquestes diverses funcions, recentment s'ha proposat que la proteïna SS-B (La) podria actuar, de forma general, estabilitzant estructures secundàries de RNA (Yoo i Wolin, 1997).

1.4.5. Autoepítops

El clonatge del cDNA de la proteïna SS-B (La) ha permès generar diversos tipus de subclons que codifiquen per a fragments de la proteïna, i comprovar la seva reactivitat davant de sèrums de pacients amb autoanticossos dirigits contra tota la proteïna.

D'aquesta manera s'han pogut determinar els diferents epítops presents a l'autoantigen. Tot i que existeixen lleugeres discrepàncies entre els estudis realitzats, els resultats obtinguts suggereixen la presència de tres epítops principals diferents localitzats en diferents parts de la molècula (figura 1.3).

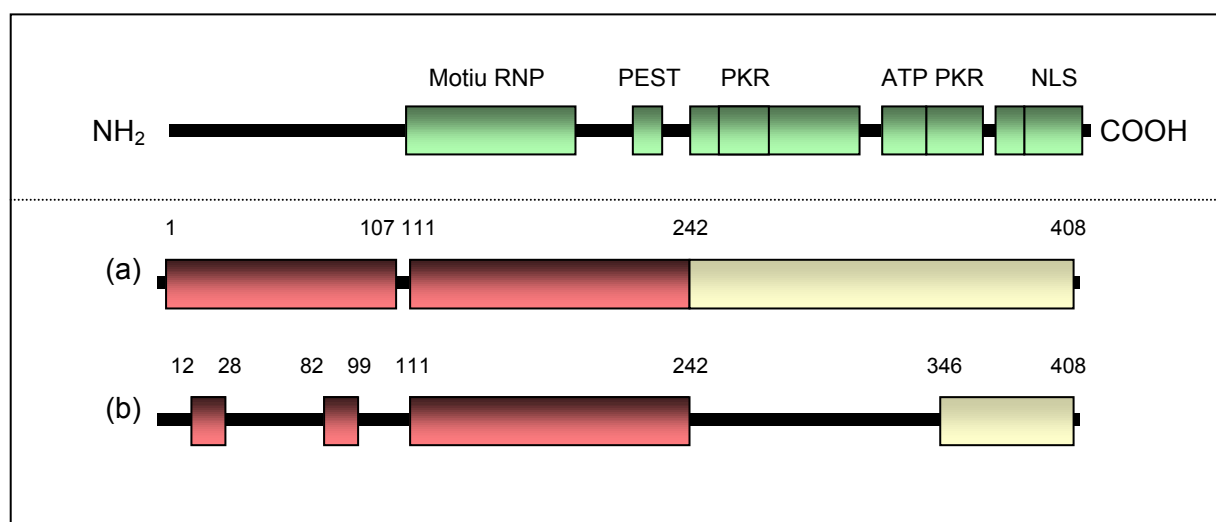


Figura 1.3. Representació esquemàtica dels epítops de l'antigen SS-B (La) descrits en diferents estudis: (a) Chambers et al., 1988; (b) McNeilage et al., 1992. A la part superior, de color verd, es mostren els motius estructurals principals de la proteïna (veure figura 1.1). A la part inferior, els epítops reconeguts per un major nombre de sèrums (epítops principals) es representen de color vermell, i els reconeguts menys freqüentment de color groc. Els números indiquen els residus aminoacídics (adaptat de Pruijn, 1994).

Introducció

A l'extrem N-terminal s'ha descrit un epítop immunodominant discontinu, probablement conformacional, que podria ser reconegut a l'inici de la resposta dirigida contra l'antigen SS-B (La) (McNeilage et al., 1992).

El segon epítop s'ha trobat al mig de la proteïna, en una zona que inclou la seqüència de consens d'unió a ribonucleoproteïnes i el domini d'hèlix . També és immunodominant i el reconeixement d'aquest epítop pels autoanticossos provocaria la inhibició de la unió de la proteïna als RNAs observada en alguns sèrums *in vitro* (Chambers et al., 1988);(McNeilage et al., 1992).

En darrer terme, el tercer epítop principal se situa a l'extrem C-terminal de la proteïna, i malgrat ser reconegut per un nombre de sèrums similar als dos anteriors, la unió d'anticòs amb aquest fragment és menor (St. Clair et al., 1989).

1.5. L'AUTOANTIGEN SS-A (Ro)

L'antigen SS-A (Ro) es va descriure, conjuntament amb el SS-B (La), a partir de la seva reactivitat amb els autoanticossos presents al sèrum de pacients amb la síndrome de Sjögren i lupus eritematós sistèmic.

1.5.1. Característiques bioquímiques

El complex SS-A (Ro) consisteix en una família de ribonucleoproteïnes cadascuna de les quals està formada per un RNA petit d'un grup de quatre RNAs diferents de la família hY (hY1, hY3, hY4 i hY5), que es troba associat a dues proteïnes de 60 kDa (**Ro60** o **SS-A-60**) i 52 kDa (**Ro52** o **SS-A-52**).

La seqüenciació dels hY RNAs, d'una longitud d'entre 83 i 112 bases, ha permès predir la seva estructura secundària en la que es produeix un aparellament dels extrems 5' i 3' de la cadena (branca inferior) i de dues zones més de l'RNA que li confereixen una estructura en forma de branques, tal com es veu a la figura 1.4 (Slobbe et al., 1992). La branca inferior és una regió altament conservada a tots els RNAs citoplasmàtics que es troba protegida contra la degradació de les ribonucleases, probablement a causa de les proteïnes que s'hi troben unides.

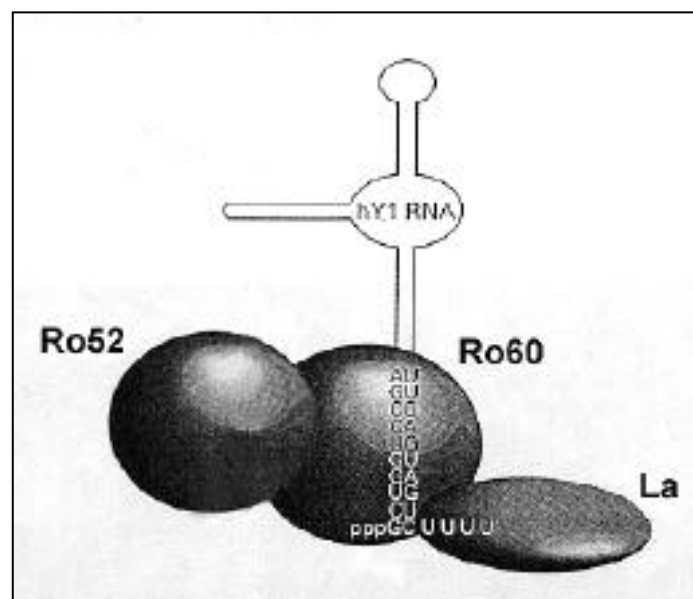


Figura 1.4. Model estructural del complex hY1RNA/Ro/La (adaptat de Slobbe et al., 1992; Keech et al., 1996).

La proteïna Ro60 pertany a la família de les proteïnes enllaçants d'RNA (*RNA-binding proteins*) amb seqüències de consens d'unió a RNA. S'ha demostrat, *in vitro*, que la forma recombinant de la proteïna Ro60 s'uneix a l'hY1 RNA (Deutscher et al., 1991), de manera que es creu que, efectivament, la proteïna Ro60 s'uneix *in vivo* als hY RNAs i que ho fa a la branca inferior d'aquests (figura 1.4). S'ha descrit una isoforma diferent de la proteïna Ro60 que es troba únicament en eritròcits, però que està molt relacionada amb la que es troba a la resta de cèl·lules nucleades (Itoh et al., 1991).

L'altra proteïna que forma part del complex SS-A (Ro) és la proteïna Ro52 que pertany a la família de proteïnes tipus RFP (*rfp-like protein family*) definida recentment. La proteïna RFP (*RET finger protein*) pertany a una família extensa de proteïnes anomenada *B-box RING finger* els membres de la qual contenen un motiu tripartit format per un domini tipus *RING finger*, un domini tipus *B-box*, i un domini *coiled-coil* amb tres hèlix definides (Saurin et al., 1996). A més, RFP conté una regió específica a l'extrem carboxílic coneguda com a domini tipus *rfp* o tipus B30.2. Fins a l'actualitat s'han descrit més de 200 membres de la família de proteïnes *RING finger*, i es creu que tenen un paper important en la formació i arquitectura de complexos proteics grans que contribueixen a diversos processos cel·lulars tals com l'oncogènesi, apoptosi i desenvolupament.

La unió de la proteïna Ro52 al complex RNA-proteïna es creu que és mitjançant una interacció del tipus proteïna-proteïna amb Ro60 (Chan i Buyon, 1994). En plaquetes i eritròcits s'han descrit dues isoformes de 52 kDa i 54 kDa, respectivament, diferents de la present a la resta de cèl·lules nucleades. En aquests casos, els complexos ribonucleo-proteics es redueixen a dos: hY1 i hY4 en eritròcits, i hY3 i hY4 en plaquetes.

1.5.2. DNA i seqüència aminoacídica

El gen que codifica per a l'antigen Ro52 es localitza al braç curt del cromosoma 11 (Frank et al., 1993) i recentment s'ha descrit la seva seqüència (Bepler et al., 1999). Per a Ro60 actualment encara no s'ha descrit la seqüència gènica, però sí que s'ha descrit la seva localització, al braç llarg del cromosoma 1 (Frank i Mattei, 1994).

S'han descrit dues seqüències de cDNA que codifiquen per l'antigen Ro60 (Deutscher et al., 1988; Ben-Chetrit et al., 1989) que probablement són resultat d'una eliminació d'introns (*splicing*) diferencial del mateix gen. Les dues seqüències aminoacídiques deduïdes, de 538 i 525 aminoàcids, s'han anomenat 60 i 60 i es diferencien només en els 25 residus de l'extrem C-terminal de la primera isoforma que són substituïts per 11 aminoàcids diferents en

la segona. El càlcul de la massa molar de les dues isoformes dóna uns valors de 60,6 i 59,2 kDa, respectivament. La part comuna d'ambdues seqüències, que comprèn des de l'aminoàcid 1 al 514, presenta un grau d'homologia raonable amb les proteïnes anàlogues de *Xenopus laevis* i *Caenorhabditis elegans*, i això demostra una conservació evolutiva important de la proteïna Ro60. L'anàlisi d'aquesta zona permet distingir un motiu estructural RNP-80 (domini d'unió a RNA) entre els aminoàcids 91 i 161 responsable de la unió als hY RNAs, i un domini de dits de zinc entre els aminoàcids 305 i 325 amb una funció no molt ben definida, però que també podria ser important en la interacció directa amb els RNAs (figura 1.5) (Chan i Buyon, 1994).

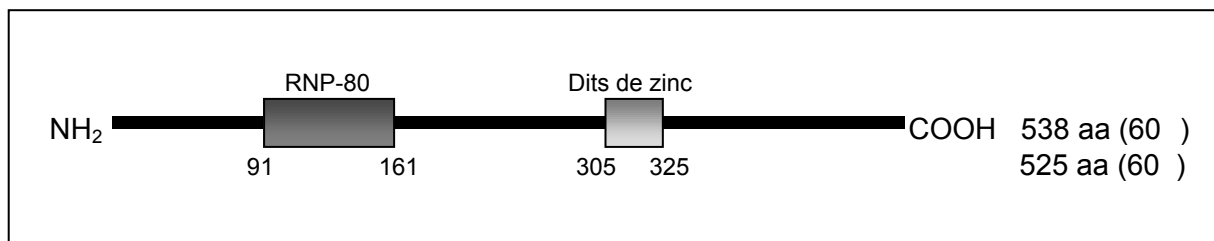


Figura 1.5. Components estructurals de les dues isoformes descrites de l'autoantigen Ro60, 60 i 60 . RNP-80: motiu estructural d'unió a RNA; Dits de zinc: motiu estructural ric en residus de cisteïna i histidina capaç d'acomplexar-se amb ions zinc. Els números indiquen els residus aminoacídics (adaptat de Chan i Buyon, 1994; Wahren-Herlenius et al., 1999).

El cDNA codificant per a l'antigen Ro52 també ha estat descrit (Chan et al., 1991; Itoh et al., 1991). Aquest cDNA codifica per una proteïna de 475 aminoàcids amb una massa molar calculada de 54 kDa i un pI calculat de 6.35 (el pI observat experimentalment per a Ro52 és de 6.5). L'anàlisi de la seqüència aminoacídica permet distingir tres motius estructurals: un domini de dits de zinc a l'extrem N-terminal que conté els motius *RING finger* i *single B box*, característics d'una nova família de proteïnes anomenades *RING finger proteins* (Reddy et al., 1992); un domini central de cremallera de leucina; i un domini característic de les proteïnes de la família *rfp* a l'extrem C-terminal (figura 1.6) (Chan i Buyon, 1994).

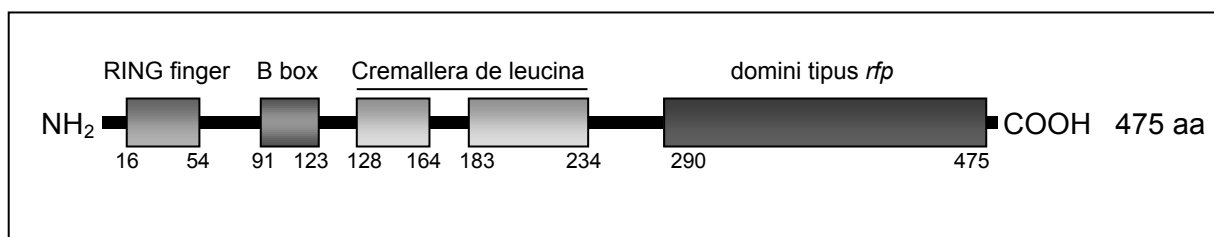


Figura 1.6. Representació esquemàtica dels diferents components estructurals de l'autoantigen Ro52. *RING finger* i *B box*: dominis de dits de zinc amb una estructura no usual en altres proteïnes amb aquests motius; cremallera de leucina: domini ric en residus leucina i flanquejat per zones riques en els aminoàcids lisina i arginina; domini tipus *rfp*: motiu estructural característic de les proteïnes de la família *rfp*. Els números indiquen els residus aminoacídics (adaptat de Ricchiuti et al., 1997).

1.5.3. Localització i funció cel·lular

La localització cel·lular de les proteïnes Ro60 i Ro52 ha sigut controvertida des de la descripció inicial d'aquests autoantígens. Diferents estudis d'immunofluorescència, han demostrat que les proteïnes Ro60 i Ro52 es troben bé únicament al nucli, bé al nucli i al citoplasma, o bé predominantment al citoplasma. No obstant, més recentment, i mitjançant tècniques més específiques, s'ha demostrat que ambdues proteïnes es troben tant al nucli com al citoplasma, tot i que la distribució no és la mateixa: la majoria de l'antigen Ro60 està localitzat al nucli, mentre que Ro52 és més abundant al citoplasma (Pruijn et al., 1997).

Les funcions de Ro60 són desconegudes actualment. En oòcits de *Xenopus laevis* aquesta proteïna s'ha trobat associada a diferents precursors de 5S rRNA processats ineficaçment que a la llarga són degradats. Per aquesta raó, es creu que aquest antigen podria actuar com a via de descart en la biosíntesi d'aquests RNAs promovent la degradació dels precursors defectuosos (O'Brien i Wolin, 1994; Shi et al., 1996).

Per a l'antigen Ro52 tampoc no s'han descrit les funcions cel·lulars que pot desenvolupar. Tanmateix, la presència de determinats dominis i l'estudi de les homologies amb d'altres proteïnes permet predir algunes possibles funcions. Primerament, els dominis de dits de zinc són típics de proteïnes que s'uneixen a DNA i involucrades en la regulació gènica. De fet, recentment s'ha descrit la unió de Ro52 a seqüències específiques de DNA mitjançant aquest domini (Frank, 1999). Seguidament, els dominis de cremallera de leucina s'han descrit en proteïnes que formen homodímers o heterodímers que són essencials per a la seva funció cel·lular. Aquestes proteïnes també solen estar implicades en mecanismes de regulació gènica. Finalment, per al domini carboxílic tipus *rfp* no s'ha descrit clarament una funció específica, però és interessant el fet que l'expressió de les proteïnes que presenten aquests tipus de dominis es doni principalment durant períodes de desenvolupament o de divisió cel·lular ràpida. Així, fent ús de totes les observacions obtingudes, es pot especular que Ro52 podria estar relacionada amb la regulació de l'expressió de determinats gens durant períodes de divisió cel·lular ràpida.

1.5.4. Autoepítops

Per determinar les regions antigèniques dels antígens Ro60 i Ro52 s'han utilitzat diferents aproximacions bioquímiques i de biologia molecular. Les tècniques més utilitzades han estat la immunoprecipitació i la immunotransferència de sèrums autoimmunes mitjançant fragments recombinants successius de les proteïnes, o l'enzimoinmunoanàlisi utilitzant com

a font antigènica pèptids sintètics solapats. La comparació dels resultats obtinguts per diferents investigadors independents permet veure diferències segons el tipus d'assaig, la font d'antigen i els sèrums utilitzats, però també s'observen certs resultats comuns importants.

Per a l'antigen Ro60 (figura 1.7) es distingeix un epítop majoritari (reconegut per la majoria dels sèrums) a la zona central de la proteïna que va des dels aminoàcids 181 al 320, 155 al 295 o 139 al 326, segons els diferents estudis realitzats (Wahren et al., 1992; Saitta et al., 1994; McCauliffe et al., 1994, respectivament). Aquesta regió és la més hidrofílica de la proteïna i, conseqüentment, la més exposada, i conté el motiu de dits de zinc. La utilització de pèptids sintètics solapats ha demostrat que es tracta, segurament, d'un epítop conformacional, ja que és necessari un fragment gran de la proteïna per tal que sigui reconeguda pels sèrums autoimmunes (Wahren-Herlenius et al., 1999).

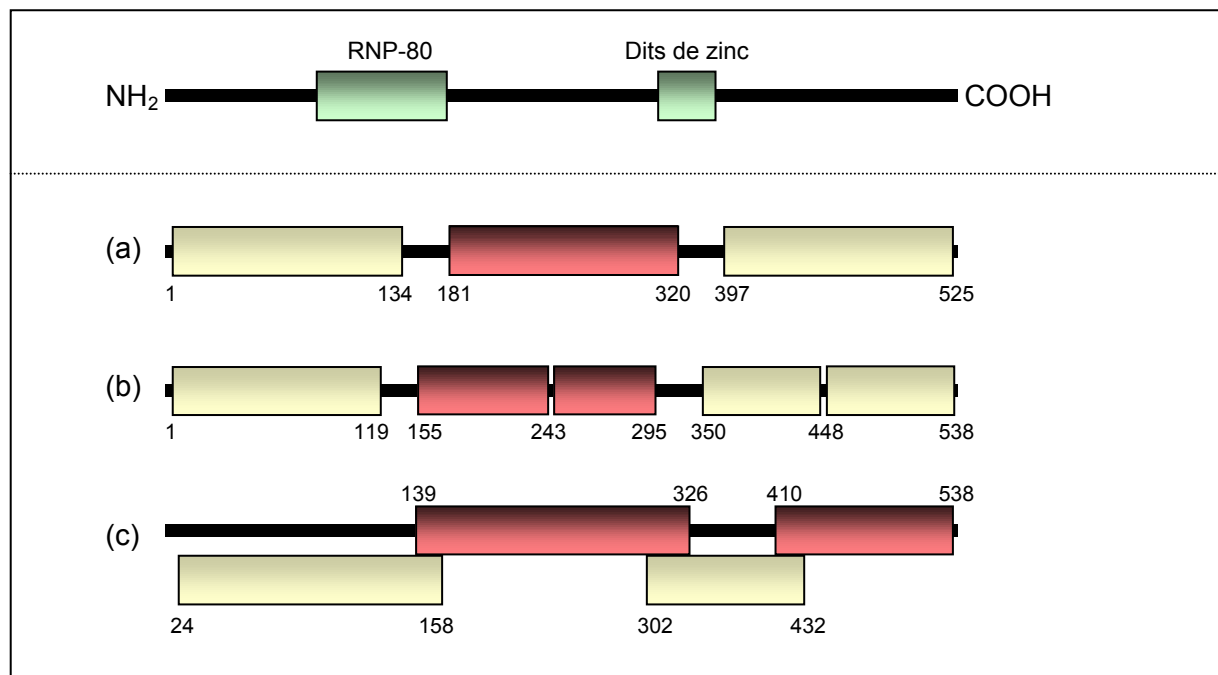


Figura 1.7. Representació esquemàtica dels autoepítops de la proteïna Ro60 descrits en diferents estudis: (a) Wahren et al., 1992; (b) Saitta et al., 1994; (c) McCauliffe et al., 1994. A la part superior, de color verd, es mostren els motius estructurals de la proteïna (veure figura 1.5). A la part inferior, els epítops reconeguts per un major nombre de sèrums (epítops principals) es representen de color vermell, i els reconeguts menys freqüentment de color groc. Els números indiquen els residus aminoacídics (adaptat de Wahren-Herlenius et al., 1999).

S'han descrit dos epítops més als extrems N i C-terminals de l'antigen Ro60, però en ambdós casos es tracta d'epítops minoritaris (reconeguts menys freqüentment pels autoanticossos dels pacients). La reactivitat d'aquestes regions presenta un perfil més

Introducció

específic per diferents malalties reumàtiques, però també hi ha discrepàncies respecte el tipus de malalties associades a aquestes regions segons els sèrums utilitzats.

L'antigen Ro52 (figura 1.8) també presenta un epítop majoritari central que s'ha descrit a la majoria d'estudis. Aquesta zona, que comprèn els residus 136-227, 169-291 o 197-245 segons l'estudi (Blange et al., 1994; Buyon et al., 1994; Dörner et al., 1996, respectivament), inclou el domini de cremallera de leucina. A diferència de Ro60, aquest epítop és continu (no depèn de la conformació de la proteïna), tal com s'ha demostrat en estudis d'immunotransferència, i és reconegut per gairebé tots els sèrums amb anticossos contra Ro52 independentment de la malaltia a la que estan associats (Dörner et al., 1996).

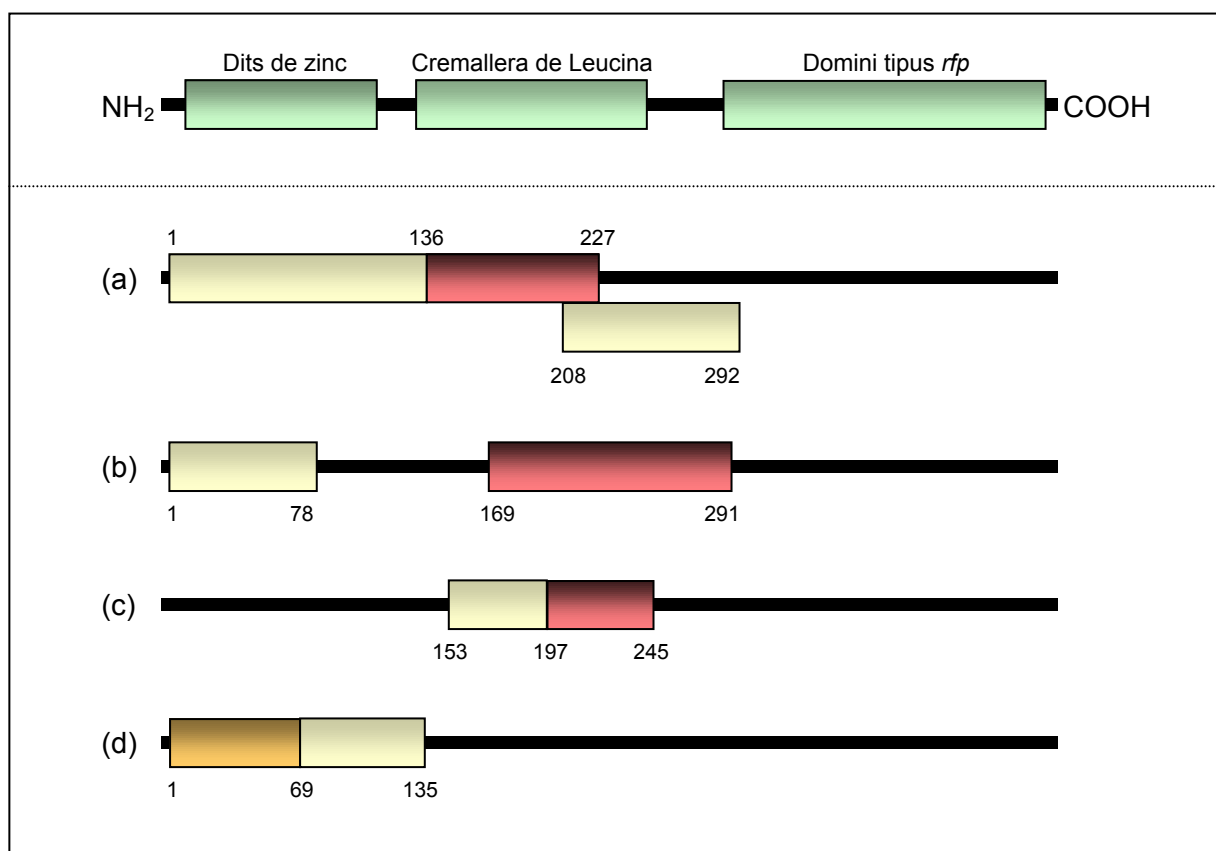


Figura 1.8. Representació esquemàtica dels autoepítops de la proteïna Ro52 descrits en diferents estudis: (a) Blange et al., 1994; (b) Buyon et al., 1994; (c) Dörner et al., 1996; (d) Pourmand i Pettersson, 1998. A la part superior, de color verd, es mostren els motius estructurals de la proteïna (veure figura 1.6). A la part inferior, els epítops reconeguts per un major nombre de sèrums (epítops principals) es representen de color vermell, els reconeguts menys freqüentment de color groc, i els que es troben en un terme intermedi de color taronja. Els números indiquen els residus aminoacídics (adaptat de Wahren-Herlenius et al., 1999).

Finalment, utilitzant fragments recombinants s'han descrit dos epítops conformacionals minoritaris a l'extrem N-terminal en una regió que inclou els dominis de dits de zinc de la proteïna (Pourmand i Pettersson, 1998).

1.6. EL COMPLEX Ro RNP

A les cèl·lules humanes, els antígens SS-B (La) i SS-A (Ro) es poden trobar de forma aïllada, però també és comú trobar-los formant un únic complex anomenat Ro RNP. Aquest complex consisteix en una molècula d'RNA citoplasmàtic petit d'un grup de quatre RNAs diferents de la família hY (hY1, hY3, hY4 i hY5) associada a les proteïnes SS-B (La), Ro60 i Ro52, i possiblement a d'altres polipèptids encara no identificats.

El model proposat per l'estructura d'aquests complexos es presenta a la figura 1.4 per al cas de l'hY1 RNP, i es creu que és vàlid per a la resta (Slobbe et al., 1992): la proteïna SS-B (La) s'uneix a la cua de poli-U de l'extrem 3' de l'RNA independentment de la presència de les proteïnes Ro; la proteïna Ro60 s'uneix a l'RNA mitjançant el motiu estructural d'unió a RNA (RNP-80) de forma independent a la presència de SS-B (La) o Ro52; i finalment, Ro52 s'uneix al complex a través de Ro60 mitjançant el domini de cremallera de leucina o el de dits de zinc.

Els diferents components dels complexos Ro RNP es localitzen en diferents compartiments, tal com ja s'ha comentat anteriorment. Així, mentre les proteïnes Ro60 i SS-B (La) no unides a proteïnes es localitzen al nucli, l'antigen Ro52 no unit a proteïnes es troba al citoplasma, i tots els hY RNAs es troben formant part dels complexos Ro RNP. La localització d'aquests complexos és controvertida, i s'han descrit tant al citoplasma com al nucli. Recentment, s'ha proposat un model d'ensamblatge (figura 1.9) dels diferents components d'aquests complexos que començaria al nucli amb la unió de la proteïna SS-B (La) als transcrits de l'RNA polimerasa III seguida per la unió de l'antigen Ro60 i, com a mínim, un altre factor d'exportació. Aquests complexos parcials serien translocats al citoplasma a través dels porus nuclears, s'alliberaria el factor d'exportació i, finalment, s'uniria l'antigen Ro52 i possiblement polipèptids encara no identificats (Pruijn et al., 1997).

La funció dels complexos Ro RNP al citoplasma no està molt clara, però podria tenir un paper regulador en algun aspecte de la síntesi de proteïnes. De fet, s'han obtingut força proves que suggereixen que l'antigen SS-B (La) intervé en la iniciació de la traducció, però no està clar si ho fa formant part del complex o no (Lin-Marq i Clarkson, 1998).

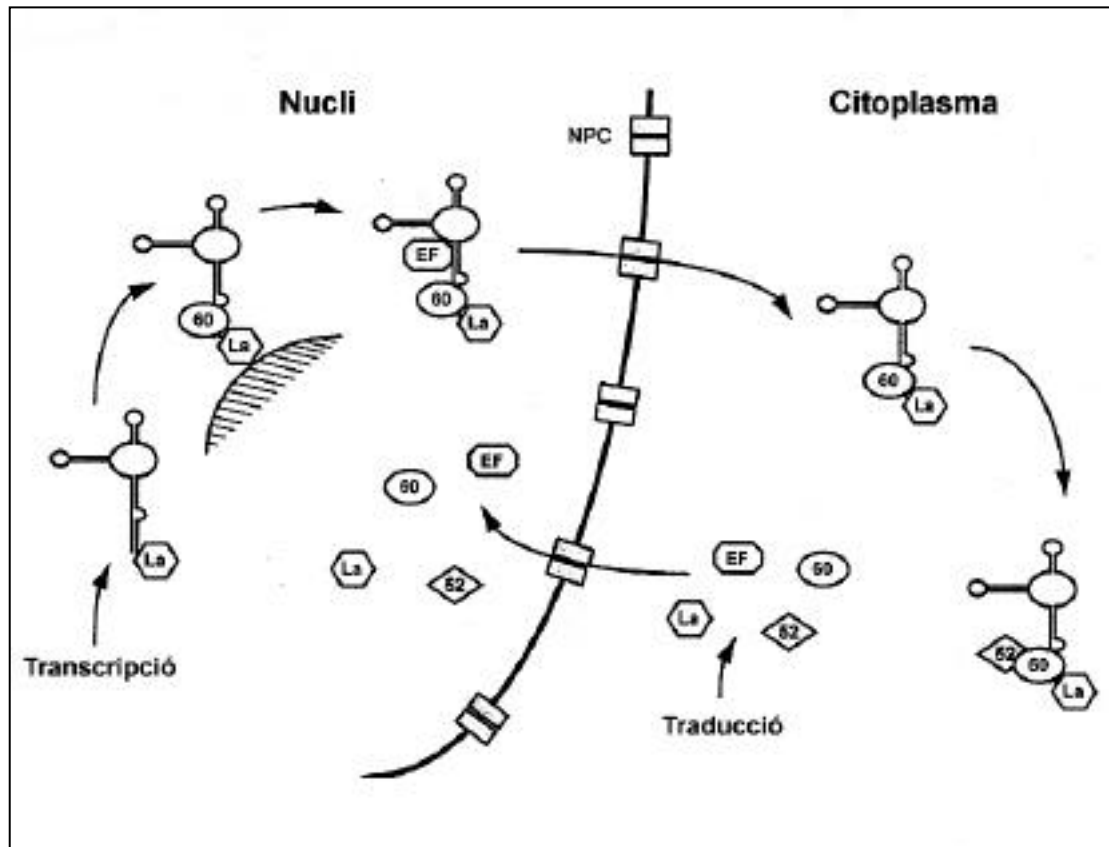


Figura 1.9. Model d'ensamblatge del complex Ro RNP. Durant la transcripció de l'RNA polimerasa III al nucli, els RNAs sintetitzats s'associen a la proteïna SS-B (La), que, com qualsevol altra proteïna Ro RNP, pot entrar al nucli després d'haver estat sintetitzada al citoplasma. La interacció amb la proteïna SS-B (La) retarda el procés d'exportació nuclear, pel qual és essencial l'associació amb la proteïna Ro60 i, com a mínim, un altre factor d'exportació (EF). Probablement, aquesta unió provoca una modificació de la proteïna La, de manera que s'inactiva el seu senyal de retenció nuclear i permet que el complex Ro RNP parcialment ensamblat sigui translocat ràpidament al citoplasma a través del complex nuclear porós (NPC). Durant aquest transport, o just després, es produeix l'alliberament de EF al citoplasma i la possible associació d'altres proteïnes encara no identificades. L'etapa durant la qual es produeix la unió de la proteïna Ro52 al complex no es coneix, ni tampoc el seu grau d'associació (adaptat de Pruijn et al., 1997).

1.7. ELS AUTOANTICOSSOS CONTRA SS-B (La) i SS-A (Ro)

Una característica comuna de les malalties autoimmunes és una resposta humoral que es manifesta per la presència d'autoanticossos contra diferents constituents cel·lulars que actuen com a antígens. Aquests autoantígens poden estar localitzats a l'exterior de les cèl·lules (hormones i receptors de membrana), al citoplasma (mitocòndries i aparell de Golgi, entre altres) o al nucli cel·lular (nuclèol i histones entre d'altres), i en la majoria de casos es tracta de proteïnes o àcids nucleics.

Els autoanticossos antinuclears (ANA) estan dirigits contra antígens del nucli o el citoplasma de la cèl·lula. Tot i que són força heterogenis, es poden subdividir en dos grans grups: anticossos contra el DNA i anticossos contra els antígens ENA, que s'uneixen a ribonucleoproteïnes solubles que reben el nom genèric d'ENA (*extractable nuclear antigens*, antígens nuclears extraïbles) (Tan, 1982). A aquest últim grup pertanyen els autoanticossos contra els antígens SS-B (La) i SS-A (Ro).

Els autoanticossos contra els antígens SS-A (Ro) i SS-B (La) es van descriure per primera vegada com a anticossos reactius amb els antígens SjD i SjT, respectivament, utilitzant el mètode de difusió en gel amb sèrums de pacients amb la síndrome de Sjögren (Anderson et al., 1961). Independentment, els mateixos anticossos també van ser detectats mitjançant la mateixa tècnica en sèrums de pacients amb lupus eritematós sistèmic i es designaren com anticossos contra l'antigen Ro i anticossos contra l'antigen La, respectivament (Clark et al., 1969). Finalment, van ser descrits per tercera vegada en sèrums de pacients amb la síndrome de Sjögren i se'ls designà com anticossos contra l'antigen SS-A i anticossos contra l'antigen SS-B, després de ser detectats amb la mateixa tècnica (Alspaugh i Tan, 1975). La identitat antigènica tant de Ro i SS-A com de La i SS-B es demostrà en una comparació interlaboratorial (Alspaugh i Maddison, 1979).

Els autoanticossos contra l'antigen SS-A (Ro) són policlonals, però no s'ha descrit l'existència d'anticossos de la classe IgA o IgM; no obstant, totes les subclasses d'IgG hi estan representades (Reichlin i Scofield, 1996). Els sèrums humans que contenen aquests anticossos reconeixen els antígens Ro52 i Ro60, tot i que en alguns casos només s'han descrit autoanticossos específics per una dels dos antígens (apartat 1.7.2). És per això que malgrat existir subpoblacions d'anticossos específiques per a cada una de les proteïnes se sol parlar, en general, d'anticossos dirigits contra l'antigen SS-A (Ro). Per altra banda, els autoanticossos contra l'antigen SS-B (La) són predominantment de l'isotip IgG, tot i que també s'ha descrit l'enriquiment d'IgA contra l'antigen SS-B (La) a la saliva (Horsfall et al., 1989).

La presència d'ambdós tipus d'autoanticossos, anti-SS-A (Ro) i anti-SS-B (La), està fortament associada amb haplotips HLA-DR i HLA-DQ del complex principal d'histocompatibilitat (HLA) i, pels autoanticossos contra SS-A (Ro), també amb un polimorfisme del gen del receptor de cèl·lules T (Reichlin i Scofield, 1996). Aquestes dades suggereixen que els antígens SS-A (Ro) i SS-B (La) són processats i presentats per molècules de l'HLA.

1.7.1. Paper patogènic

En general, el paper patogènic dels autoanticossos es limita als que estan dirigits contra antígens accessibles (antígens de superfície, receptors de membrana...), on la interacció antígen-anticòs és directa, o bé contra antígens involucrats en funcions no essencials per a la cèl·lula (Tan, 1991). En la majoria de casos, però, els antígens són intracel·lulars i estan localitzats en llocs que normalment són inaccessibles pels autoanticossos circulants. En aquestes situacions no és clar com té lloc el desenvolupament de les respostes cel·lular i humoral, però s'han proposat diferents hipòtesis per tal de poder explicar la producció dels autoanticossos (apartat 1.1.2). Recentment, s'ha demostrat *in vivo* que alguns subtipus d'autoanticossos antinuclears poden travessar ràpidament la membrana cel·lular de cèl·lules de diferents teixits i translocar-se al nucli (Deng et al., 2000). Aquesta internalització dels anticossos permetria explicar el seu paper patogènic contra qualsevol tipus d'antigen, però calen estudis més exhaustius.

Actualment no es disposa d'evidències directes que impliquin algun paper patogènic dels autoanticossos contra els antígens SS-A (Ro) i SS-B (La) en la síndrome de Sjögren primària o el lupus eritematós sistèmic. No obstant, nombroses manifestacions clíniques dins l'espectre de la síndrome de Sjögren i del lupus eritematós sistèmic s'han associat fortament amb la presència d'autoanticossos contra els antígens SS-A (Ro) i SS-B (La), de manera que sembla ser que aquests autoanticossos podrien desenvolupar un paper patogènic important.

El cas més rellevant és el de mares amb nadons que presenten blocatge cardíac congènit (CHB), la manifestació més seriosa del lupus eritematós neonatal (NLE). En gairebé tots els casos estudiats s'ha descrit la presència d'autoanticossos contra l'antigen SS-A (Ro) o contra l'antigen SS-B (La) tant en el sèrum de la mare com en el del nadó, i s'ha observat que el CHB comença únicament després de la dissetena setmana de gestació, que és quan comença el transport d'IgG matern al fetus (Buyon, 1997). A més, les manifestacions transitòries del NLE (que afecten la pell, el fetge i la sang) també s'han relacionat temporalment amb la desaparició de les IgG maternes en el nadó (Bouffard et al., 1996). Finalment, s'ha descrit la presència d'autoanticossos contra SS-A (Ro) o contra SS-B (La) a

la superfície de les fibres miocardiàques de fetus amb CHB (Horsfall et al., 1991) i el seu possible paper patogènic mitjançant la pertorbació del flux iònic a través de la membrana dels miòcits (Boutjdir et al., 1997).

Un altre cas que evidencia un paper patogènic dels autoanticossos contra l'antigen SS-A (Ro) es dona en l'erupció fotosensible, característica del lupus eritematós cutani subagut (SCLE): s'ha observat *in vitro* que la irradiació de queratinòcits amb rajos ultraviolets indueix l'expressió de l'antigen SS-A (Ro) a la superfície cel·lular, de manera que s'afavoreix l'acció dels autoanticossos contra SS-A (Ro) directament sobre les cèl·lules epitelials, fenomen observat en pacients amb SCLE (Furukawa et al., 1990; Lawley et al., 2000).

Respecte el paper patogènic dels autoanticossos contra l'antigen SS-B (La) per si sols, el fet que estiguin acompanyats invariablement per autoanticossos contra SS-A (Ro) fa difícil determinar si la patogenicitat està causada per una combinació dels dos o no. No obstant, existeixen diverses evidències indirectes del possible paper patogènic d'aquests autoanticossos per si sols: la presència d'autoanticossos contra l'antigen SS-B (La) en pacients amb síndrome de Sjögren s'ha relacionat amb una major incidència dels símptomes extraglandulars de la malaltia (Harley, 1989), i la concentració d'aquests autoanticossos en el sèrum s'ha correlacionat amb el grau d'infiltració limfocitària a les glàndules salivals (Atkinson et al., 1992).

1.7.2. Utilitat clínica

Tot i que els autoanticossos contra l'antigen SS-B (La) també es poden trobar en sèrums de pacients amb lupus eritematós sistèmic i, rarament, en pacients asimptomàtics, són considerats els marcadors serològics específics de la síndrome de Sjögren. La freqüència amb la que s'observen autoanticossos contra SS-B (La) en la síndrome de Sjögren varia molt segons l'assaig utilitzat per a la seva detecció, però pot arribar a ser del 90% en la forma primària de la malaltia i del 50% en la forma secundària si s'utilitzen els assajos d'immunotransferència o les enzimoimmunoanàlisis en fase sòlida (ELISA) (Keech et al., 1996).

Normalment, la presència d'autoanticossos contra l'antigen SS-B (La) va associada amb la presència d'autoanticossos contra SS-A (Ro), però en un nombre important de pacients amb síndrome de Sjögren o lupus eritematós sistèmic els únics autoanticossos detectables són els dirigits contra SS-A (Ro). Per aquest motiu, és important la complementació dels resultats obtinguts tant en la mesura dels autoanticossos contra SS-B (La) com en la dels dirigits contra SS-A (Ro).

Introducció

En general, els autoanticossos contra l'antigen SS-A (Ro) es detecten, mitjançant immunodifusió, en un 40-50% de pacients amb lupus eritematós sistèmic, 60-75% amb síndrome de Sjögren primària, i en una proporció també elevada de pacients amb síndrome de Sjögren secundària associada a lupus eritematós sistèmic, artritis reumatoide, polidermatomiositis o cirrosi biliar primària. La sensibilitat diagnòstica augmenta lleugerament si s'utilitza un assaig més sensible, tal com l'ELISA (apartat 1.8.4). Una utilitat clínica important dels autoanticossos contra SS-A (Ro) és la seva forta associació amb subtipus concrets de malalties, com són el lupus eritematós cutani subagut i la vasculitis en la síndrome de Sjögren (Reichlin i Scofield, 1996). Els autoanticossos contra els antigens SS-A (Ro) i SS-B (La) també es troben fortament associats al lupus eritematós neonatal, principalment en els casos que aquest es manifesta en forma de bloqueig cardíac congènit. En aquestes situacions se sol detectar, juntament amb els autoanticossos contra l'antigen SS-B (La), la presència d'autoanticossos contra l'antigen Ro52, però no contra l'antigen Ro60.

A la taula 1.6 es resumeixen les dades de prevalença dels autoanticossos contra SS-A (Ro) i contra SS-B (La) en diferents condicions. Cal tenir present que existeixen valors força variats en la bibliografia que poden ser causats tant per la tècnica utilitzada com per la dificultat en establir el tipus o subtipus exacte de malaltia autoimmune.

Malaltia	Prevalença			
	Ab contra SS-B (La)		Ab contra SS-A (Ro)	
	ID	ELISA	ID	ELISA
Síndrome de Sjögren primària	10-40% ¹	60-90% ¹	60-75% ²	70-95% ³
Síndrome de Sjögren secundària	5-20% ¹	30-50% ¹	10-50% ³	40-90% ³
Lupus eritematós sistèmic	6-15% ¹	25-50% ³	40-50% ²	40-60% ³
Lupus eritematós cutani subagut	25-35% ⁴	—	70-90% ⁴	—
Dones amb fills amb NLE	> 90% ¹	—	—	—
Nadons amb NLE	—	95-100% ⁴	—	95-100% ⁴

Taula 1.6 Prevalença dels anticossos contra SS-B (La) o SS-A (Ro) en diferents malalties autoimmunes, segons la tècnica emprada: ID, Immunodifusió; ELISA, enzimoimmunoanàlisi en fase sòlida.

Referències: ¹Keech et al., 1996; ²Reichlin i Scofield, 1996; ³Harley, 1989; ⁴Guma i Keil, 1994.

1.8. MÈTODES DE DETECCIÓ D'AUTOANTICOSSOS CONTRA ELS ANTÍGENS SS-B (La) I SS-A (Ro)

Molts dels mètodes existents per a la detecció d'autoanticossos són d'ús habitual en laboratoris d'anàlisi clínica, encara que n'hi ha d'altres més propis de laboratoris de recerca. Per a la detecció dels autoanticossos contra SS-A (Ro) i contra SS-B (La) s'utilitzen freqüentment les tècniques d'immunodifusió doble (IDD), contraimmunolectroforesi (CIE), immunoprecipitació d'RNA, enzimoinmunoanàlisi en fase sòlida (ELISA), immunotransferència i immunofluorescència indirecta (IFI).

1.8.1. Immunodifusió doble (IDD)

És una tècnica basada en la difusió passiva, reconeixement i precipitació de l'antigen i l'anticòs en gels. La matriu, normalment d'agarosa, té una mida de porus intermèdia entre la mida dels immunocomplexos i la de l'antigen o l'anticòs aïllats, de manera que permet la migració d'aquests, però no dels complexos. Si ambdós components reaccionen, el complex format es posa de manifest en forma de banda de precipitació després de rentar les fraccions solubles del gel i tenyir amb blau de Coomassie.

La seva aplicació depèn de la solubilitat i la concentració d'antigen, i de la capacitat del complex antigen-anticòs per formar un precipitat visible. Es limita, per tant, a la detecció d'anticossos dirigits contra les ribonucleoproteïnes solubles, ja que són els únics antígens capaços de difondre en l'agarosa.

Malgrat que es tracta d'una tècnica poc sensible i qualitativa, s'ha usat de forma àmplia a causa de la seva simplicitat. En la detecció d'autoanticossos contra SS-B (La) i contra SS-A (Ro), la immunodifusió doble (IDD) s'utilitza cada vegada menys perquè presenta una sensibilitat baixa i no permet diferenciar els subtipus d'autoanticossos contra l'antigen Ro60 dels dirigits contra l'antigen Ro52. A més, s'ha observat l'existència d'anticossos no precipitants en determinats sèrums que, per tant, no poden ser detectats mitjançant aquesta tècnica.

1.8.2. Contraimmunolectroforesi (CIE)

La contraimmunolectroforesi (CIE) es basa en el mateix principi que la IDD, però incorpora un camp elèctric per tal de facilitar el procés de precipitació. És una tècnica restringida a

antígens àcids. L'aplicació del camp elèctric produeix la migració electromotriu dels antígens àcids, carregats positivament, cap a l'ànode i al mateix temps el flux electroendosmòtic arrossega els anticossos cap al càtode. Si existeix reconeixement entre l'antigen i l'anticòs, en el punt on es creuen les dues mostres es formarà un arc de precipitació.

En la detecció d'autoanticossos contra l'antigen SS-A (Ro), la CIE és una de les tècniques preferides per a la diagnosi clínica perquè presenta una bona fiabilitat i una senzilla manipulació. Contràriament, en la detecció d'autoanticossos contra la proteïna SS-B (La) la CIE és una tècnica poc utilitzada, ja que tendeix a l'obtenció d'un gran nombre de resultats falsos negatius a causa de l'existència d'una subpoblació d'anticossos no precipitants. En tots els casos, però, es tracta d'una tècnica qualitativa i de baixa sensibilitat, tot i que respecte la IDD presenta una millora significativa (Kurata i Tan, 1976).

1.8.3. Immunoprecipitació d'RNA

La immunoprecipitació d'extractes cel·lulars amb sèrums autoimmunes és un assaig sensible per a la detecció d'anticossos dirigits contra les ribonucleoproteïnes SS-B (La), SS-A (Ro) i snRNP (inclou els antígens Sm i U1-RNP). Els RNAs associats a aquests complexos són abundants i presenten una única massa molar, de manera que són fàcils d'identificar (taula 1.7).

La tècnica d'immunoprecipitació d'RNA consisteix en precipitar els complexos ribonucleoproteïcs de la cèl·lula mitjançant els autoanticossos dels sèrums, prèviament units a proteïna A o G unida a boletes d'agarosa, i analitzar el seu contingut d'RNA.

Els diferents passos de l'assaig són: marcatge radioactiu dels RNAs amb ^{32}P o ^3H ; fraccionament cel·lular bé en fraccions nuclear i citoplasmàtica, o bé en un extracte cel·lular total; unió dels anticossos dels sèrums a les boletes d'agarosa-proteïna A o agarosa-proteïna G; immunoprecipitació dels complexos ribonucleoproteïcs; electroforesi en gel dels RNAs; i, finalment, revelat. Per evitar el fet de treballar amb material radioactiu, existeix un mètode alternatiu en el qual es revela mitjançant tinció amb plata, i es suprimeix el primer pas de marcatge de l'RNA. Aquesta variant presenta una menor sensibilitat, però en moltes ocasions ja és suficient.

La tècnica d'immunoprecipitació és la tècnica més sensible de les que es disposa, però la seva complexa manipulació fa difícil l'anàlisi d'un elevat nombre de mostres, i es limita als laboratoris de recerca o bé per realitzar diagnòstics quan els altres procediments utilitzats no han resultat conclusius.

Antigens	RNA	Nucleòtids
Sm	U1	165
	U2	188/189
	U4	143-145
	U5	116/117
	U6	106/107
	U1(RNP)	U1
SS-A (Ro)	hY1	112
	hY3	101
	hY4	93
	hY5	82
SS-B (La)	hY RNAs	83-112
	U6	106/107
	pre-tRNAs	aprox. 80-90
	5S rRNA	aprox. 123
	7SL	300/301
	7SK	331

Taula 1.7. RNAs precipitats per anticossos dirigits contra RNPs (adaptat de Zieve et al., 1993).

1.8.4. Immunoanàlisi en fase sòlida

Aquesta tècnica es basa en el reconeixement d'un antigen o una solució antigènica adsorbida a un suport de plàstic per part dels autoanticossos del sèrum a analitzar. Després d'un blocatge dels llocs d'unió residuals susceptibles a unions inespecífiques, es porta a terme una incubació amb el sèrum problema, que conté els autoanticossos. La detecció es realitza mitjançant una incubació amb un segon anticòs contra immunoglobulines humanes que reconeix els autoanticossos units a l'antigen, conjugat amb un marcador, i finalment es fa un revelat específic.

Si l'anticòs secundari està conjugat amb un marcador isotòpic la tècnica rep el nom de radioimmunoanàlisi (RIA) i el revelat es fa mitjançant una autorradiografia o un comptador de centelleig (Fish i Ziff, 1981); (Whittingham, 1983).

Si, per altra banda, el segon anticòs està conjugat a un enzim (peroxidasa o fosfatasa alcalina, principalment) es parla d'una enzimoimmunoanàlisi en fase sòlida (ELISA) i per al

revelat s'empra un substrat cromogènic específic de l'enzim, de manera que la reacció produeixi un canvi de color (Struckmann et al., 1981; Pisetsky i Peters, 1981).

L'enzimoimmunoanàlisi és una de les tècniques més utilitzades, a causa de la seva alta sensibilitat, el seu caràcter quantitatiu i la seva fàcil automatització. A més, si s'utilitza com a font antigènica un antigen purificat o un fragment d'aquest, ja sigui natiu o recombinant, la tècnica presenta una especificitat més elevada (Whittingham et al., 1987).

En la detecció dels autoanticossos contra l'antigen SS-B (La) o contra SS-A (Ro), l'ELISA és un dels mètodes més utilitzats, ja que s'obtenen uns nivells de sensibilitat molt alts, similars als obtinguts en la tècnica d'immunoprecipitació de RNA. A més, la utilització de les formes recombinants dels antigens permet la distinció entre subtipus d'autoanticossos contra l'antigen Ro52 o contra l'antigen Ro60. L'inconvenient de la tècnica és que l'augment observat de sensibilitat de l'ELISA respecte les tècniques convencionals (IDD i CIE) va acompanyat d'una disminució de l'especificitat. Tanmateix, aquesta disminució es pot minimitzar si s'utilitzen proteïnes recombinants (Guma i Keil, 1994).

1.8.5. Immunotransferència (immunoblotting)

La immunotransferència consisteix en l'adsorció sobre una membrana de nylon o nitrocel·lulosa d'una mescla dels antigens nuclears solubles bé directament (immunotransferència en taca o dot-blot), o bé després d'una separació electroforètica en gel de poliacrilamida (electroimmunotransferència o western-blot). En el primer cas l'adsorció pot ser passiva o amb l'ajut d'algun sistema de buit, mentre que en el segon cas la transferència del gel a la membrana es realitza mitjançant l'aplicació d'un camp elèctric (Westgeest et al., 1986; Moretti et al., 1990).

Després de la transferència, s'incuba la membrana amb el sèrum a estudiar, i seguidament amb un segon anticòs contra immunoglobulines humanes conjugat amb un enzim o amb un marcador isotòpic. Finalment, es revela la membrana mitjançant la incubació amb un substrat de l'enzim conjugat que dóna un producte insoluble, o bé mitjançant una autoradiografia, si l'enzim secundari està marcat radioactivament.

En la detecció dels autoanticossos contra l'antigen SS-B (La) la immunotransferència és la tècnica més sensible i específica, però el seu ús pràcticament es restringeix a laboratoris amb poc volum de mostres o laboratoris de recerca, ja que es tracta d'un mètode força laboriós i no automatitzable. També s'utilitza per discriminar els sèrums positius per ELISA (apartat 1.8.4), però propers al valor discriminant. En la detecció dels autoanticossos contra

l'antigen SS-A (Ro), la immunotransferència és una tècnica poc pràctica, ja que malgrat que presenta una elevada sensibilitat, no permet detectar el 15% d'anticossos que van dirigits contra les estructures tridimensionals de l'antigen. Durant l'electroforesi existeix la possibilitat que les proteïnes es desnaturalitzin i això pot afectar al reconeixement antigen-anticòs de diferents maneres: es poden perdre les estructures tridimensionals de manera que els anticossos dirigits contra els epítops discontinus o conformacionals deixin de ser reactius; nous epítops que a la proteïna nativa estaven amagats poden quedar exposats i conseqüentment poden augmentar el nombre d'anticossos reactius; finalment, les proteïnes desnaturalitzades o una part d'elles podrien interferir d'alguna manera en la unió entre l'anticòs i l'antigen natiu (Guma i Keil, 1994).

1.8.6. Immunofluorescència indirecta (IFI)

La immunofluorescència indirecta (IFI) és el mètode més extensament usat per a la detecció d'autoanticossos. És una tècnica d'elevada sensibilitat, i que permet detectar qualsevol anticòs dirigit contra antigens cel·lulars que estiguin presents en una quantitat suficient a les cèl·lules o teixits que actuen com a substrat. S'aplica principalment en el rastreig de sèrums positius per anticossos antinuclears (ANA), ja que es tracta d'una tècnica de baix cost, fàcil manipulació i elevada reproductibilitat (Guma i Keil, 1994).

La font antigènica està constituïda per seccions de teixits o cèl·lules humanes de determinades línies, que contenen les estructures reconegudes pel sèrum dels pacients autoimmunes. Després de la incubació amb el sèrum, un segon anticòs contra immunoglobulines humanes conjugat amb un substrat fluorescent (fluoresceïna, rodamina...) es fa reaccionar amb els anticossos que s'han unit a l'antigen, de manera que la visualització de les cèl·lules en un microscopi de fluorescència en permetrà determinar la seva presència. Segons el patró de marcatge observat es pot distingir la identitat de l'antigen i mitjançant l'ús de dilucions en sèrie, es pot realitzar una titulació dels sèrums.

L'ús de cèl·lules de la línia cel·lular HEP-2 (de carcinoma de laringe humana) com a substrat ha permès augmentar la sensibilitat en la detecció d'autoanticossos contra SS-B (La) i contra SS-A (Ro) (Keil et al., 1984). No obstant, aquesta tècnica no permet diferenciar entre anticossos contra Ro52 o Ro60.

1.9. ESTRATÈGIES DE L'OBTENCIÓ DE PROTEÏNES RECOMBINANTS

En les diferents tècniques utilitzades per a la detecció d'autoanticossos en sèrums de pacients autoimmunes l'analít el constitueix l'anticòs i, per tant, és necessari disposar del corresponent antigen específic per poder realitzar la mesura. Existeix un gran ventall de possibles fonts antigèniques que obliga a valorar quina d'elles és més idònia en cada cas. Així, algunes tècniques utilitzen extractes cel·lulars (com és el cas de la immunodifusió) o seccions de teixit (la immunofluorescència indirecta) que no requereixen una separació de l'antigen del seu entorn natural. En canvi per a tècniques més específiques i quantitatives és necessari disposar de l'antigen en un elevat grau de puresa, bé sigui purificat a partir de teixit o de cèl·lules en cultiu (antigen natiu) o a partir de cèl·lules recombinants procariotes o eucariotes a les que s'ha introduït un DNA exogen codificant per a l'antigen. La tecnologia del DNA recombinant ha permès assolir els criteris de purificació i de quantitat d'antigen requerits, substituint els tradicionals mètodes de purificació complexos, laboriosos i sovint amb un baix rendiment final.

Els diferents sistemes d'expressió de proteïnes recombinants utilitzats en l'actualitat es classifiquen segons el tipus de cèl·lules utilitzades. Cal distingir els organismes procariotes dels eucariotes, i dins d'aquest segon grup podem trobar llevats, cèl·lules d'insectes o bé cèl·lules de mamífers.

1.9.1. Sistemes d'expressió de proteïnes recombinants

Cada sistema d'expressió presenta avantatges i inconvenients respecte els altres. Així, per ordre creixent de dificultat en la manipulació trobem els procariotes (*Escherichia coli*, principalment), els llevats (*Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe*, principalment), les cèl·lules d'insectes i finalment les cèl·lules de mamífer (diferents línies cel·lulars tumorals humanes).

Pel cas dels procariotes, la manipulació és relativament senzilla i, de fet, *Escherichia coli* és utilitzat tant per expressar proteïnes heteròlogues com per dur a terme les manipulacions de DNA necessàries prèvies a l'expressió en un organisme superior. La producció de proteïnes heteròlogues en *Escherichia coli* presenta un rendiment força elevat i es poden assolir quantitats de proteïna de l'ordre del mg per cada ml de cultiu. A més, els costos econòmics derivats de la producció de proteïnes recombinants amb aquest sistema són els més baixos. El principal inconvenient d'aquest sistema d'expressió és la manca de modificacions post-

traduccionals de la proteïna, de manera que s'ha d'anar en compte a l'hora d'intentar expressar proteïnes d'eucariotes.

Els sistemes d'expressió eucariotes presenten l'avantatge de l'existència de modificacions post-traduccionals, de manera que es poden obtenir proteïnes heteròlogues de cèl·lules eucariotes més similars a les natives. Pels llevats, aquestes modificacions únicament inclouen fosforilacions, però no glicosilacions. Per tal d'expressar proteïnes glicosilades s'ha de recórrer al sistema que utilitza cèl·lules d'insecte. Finalment, l'expressió en cèl·lules de mamífers permet l'obtenció de proteïnes amb les mateixes modificacions post-traduccionals que les natives. En tots els casos, la manipulació és més complexa i els rendiments obtinguts de proteïna més baixos que en el cas dels sistemes d'expressió procariotes. En el cas de les cèl·lules de mamífer, el manteniment de les cèl·lules és costós econòmicament i molt laboriós, i es poden obtenir línies cel·lulars que expressin la proteïna recombinant de forma transitòria o bé estable.

1.9.2. Obtenció de la seqüència codificadora de la proteïna

Els diferents sistemes d'expressió existents es caracteritzen per la necessitat, en primer lloc, d'obtenir la seqüència codificadora per a la proteïna i, seguidament, introduir-la a un vector d'expressió adient segons l'hoste utilitzat.

La utilització de preparacions d'anticossos per seleccionar clons de llibreries d'expressió de cDNA (Young i Davis, 1983) ha estat un dels mètodes més utilitzat per al clonatge de gens codificants per a autoantígens. Aquestes llibreries estan formades pel DNA obtingut per transcripció inversa de les còpies de l'RNA missatger present a una cèl·lula d'un determinat teixit, que s'ha inserit en un vector d'expressió. Els vectors usats més habitualment són el plàsmid pUC i el gt11, derivat del bacteriòfag λ , que contenen el fragment del gen *lacZ* que codifica per a l'extrem N-terminal de la proteïna β -galactosidasa i els senyals necessaris per a la transcripció i traducció en *Escherichia coli*. La tècnica consisteix en obtenir clons de bacteris recombinants en plaques d'agar, provocar l'expressió a partir del promotor *lacZ* de la proteïna de fusió formada pel fragment de β -galactosidasa i la proteïna codificada per l'insert, transferir les proteïnes a un filtre i comprovar la reactivitat d'aquestes proteïnes amb un antisèrum específic per a la proteïna d'interès (per exemple, un sèrum contra l'antigen SS-B (La)). Finalment, els clons reactius positius es poden agafar de la placa d'agar per tal de confirmar la seqüència de l'insert.

Un cop obtingut el clon amb la seqüència codificadora per a la proteïna d'interès s'ha de recuperar el cDNA per poder-lo inserir, posteriorment, al vector d'expressió adient segons el sistema d'expressió que es vulgui utilitzar. S'utilitza la tècnica de reacció en cadena de la polimerasa (PCR) que permet amplificar la seqüència d'interès amb uns extrems modificats que incorporin unes dianes de restricció no presents al gen i úniques al vector d'expressió que s'utilitzarà. D'aquesta manera, al final obtenim la seqüència de DNA que codifica per a la proteïna d'interès a punt per ser clonada al vector d'expressió.

1.9.3. Clonatge a un vector d'expressió adequat

El vector d'expressió necessari per a l'expressió de la proteïna ha de tenir els elements necessaris per a la transcripció del DNA (promotor i terminador) i per a la traducció del DNA (zones d'unió del ribosoma). Per això, com que la maquinària de transcripció i traducció no és la mateixa en procariotes, en llevats o en cèl·lules de mamífers caldrà utilitzar un vector adequat al sistema d'expressió utilitzat.

En procariotes s'utilitzen els anomenats plàsmids d'expressió, que es caracteritzen per la presència de les següents estructures:

- Origen de replicació. Seqüència que és reconeguda per la maquinària de replicació de la cèl·lula hoste i que dirigeix l'amplificació del vector.
- Gen codificant per un factor de resistència que permeti créixer les cèl·lules que hagin captat el plàsmid en un medi de creixement selectiu (p. ex. un antibiòtic).
- Polilligador (*polylinker*) o lloc de clonatge múltiple (MCS), format per una seqüència rica en dianes de restricció úniques en tot el vector.
- Promotor específic per a RNA polimerases de fags (per exemple, la T7 RNA polimerasa). D'aquesta manera només es podrà transcriure el DNA si s'afegeix la RNA polimerasa adient o si la cèl·lula té una còpia integrada al cromosoma del gen que codifica per a la RNA polimerasa del fag. Aquest sistema de transcripció és tan actiu i selectiu que s'aconsegueix que gairebé tota la maquinària cel·lular es condueixi a l'expressió del gen diana.
- Lloc d'unió del ribosoma (*Ribosome-binding site*). Seqüència situada en direcció 5' del codó d'iniciació (ATG) necessària per a la unió del ribosoma per tal que s'iniciï la traducció.

- Seqüència codificadora per a un pèptid portador que permeti detectar o purificar fàcilment la proteïna expressada. Existeixen una gran varietat d'aquestes proteïnes portadores que es poden fusionar a la proteïna diana tant a l'extrem N-terminal com al C-terminal: glutatió S-transferasa (GST), proteïna enllaçant de maltosa (MBP), domini d'oligohistidines (*His-tag*)... Entre la seqüència de la proteïna portadora i la de la proteïna del nostre interès sol haver-hi una diana per a una proteasa que permet la separació de les dues unitats mitjançant una digestió enzimàtica, un cop purificada la proteïna de fusió.

Els vectors d'expressió utilitzats en eucariotes solen ser variacions dels utilitzats en procariotes. Així, l'híbrid resultant es pot utilitzar en els dos organismes i això és important perquè la manipulació del DNA es pot dur a terme en *Escherichia coli* aprofitant que els rendiments de transformació són més alts i que el creixement dels bacteris és molt més ràpid que el de les cèl·lules eucariotes.

En llevats, els vectors d'expressió més utilitzats són derivats del plàsmid natural 2 μ del que es poden trobar fins a 50 o 100 còpies. Aquests vectors es caracteritzen per la presència del fragment 2 μ que dona capacitat de replicació autònoma a la cèl·lula, un factor de selecció de llevat, un origen de replicació bacterià i un factor de selecció bacterià. També s'utilitzen els anomenats cromosomes artificials de llevats (YAC) que incorporen seqüències de replicació autònoma (ARS) enlloc del fragment 2 μ , una seqüència de centròmer de llevat que assegura la distribució del plàsmid de forma correcta a les cèl·lules filles i, finalment, dues seqüències de telòmers de llevat als extrems. Els vectors YAC accepten inserts de 200 a 500 kilobases.

En cèl·lules de mamífers, utilitzades en la producció de proteïnes únicament quan les modificacions post-traduccionals són essencials, existeixen dues aproximacions. La primera, i més senzilla, és utilitzar un plàsmid similar al que s'utilitza en procariotes que incorpori un factor de selecció en eucariotes i les seqüències de transcripció i processament de RNA necessàries en cèl·lules de mamífer. Aquests plàsmids, que també mantenen l'origen de replicació i el factor de selecció bacterians, únicament permeten expressar la proteïna de forma transitòria. La segona aproximació és la que utilitza vectors retrovirals i que permet l'expressió estable de la proteïna. Aquests vectors presenten dues seqüències LTR (*long terminal repeats*) entre les quals hi ha les seqüències virals necessàries per a la replicació i empaquetament de l'RNA en partícules infeccioses, un factor de selecció en cèl·lules de mamífer, un origen de replicació i un factor de selecció bacterians i, finalment, el DNA que es vol introduir. L'expressió constitutiva de proteïnes s'aconsegueix infectant cèl·lules de mamífer amb partícules pseudo-víriques obtingudes de la introducció prèvia del vector en

cèl·lules de mamífer que contenen els gens vírics codificants per les proteïnes necessàries per empaquetar el vector recombinant en partícules infeccioses.

El clonatge del DNA que codifica per a la proteïna d'interès al vector d'expressió es du a terme, sempre, en *Escherichia coli*. Cal digerir el vector amb els enzims de restricció presents al MCS, les dianes dels quals s'han afegit als extrems de l'insert, i seguidament unir els dos elements mitjançant una reacció de lligació catalitzada per l'enzim T4 DNA-ligasa. Finalment, la construcció obtinguda s'ha d'introduir a l'organisme hoste adequat.

1.9.4. Transformació de cèl·lules procariotes i inducció de l'expressió

Un cop tenim l'insert clonat al vector d'expressió, cal introduir la construcció dins una cèl·lula hoste, com per exemple *Escherichia coli*, en un procés anomenat transformació. Es poden utilitzar diferents soques, però totes han de complir, com a mínim, els següents requisits:

- Presència d'una còpia del gen que codifica per la T7 RNA polimerasa, integrada al cromosoma bacterià, juntament amb el gen *lac I* i el promotor *lacUV5* induïble tèrmicament o químicament. Si el vector d'expressió ja conté una còpia del gen *lac I*, no és necessari que la soca disposi d'aquest gen en el seu genotip.
- Genotip *recA⁻* per evitar la integració del plàsmid al cromosoma per recombinació.

La transformació es pot realitzar mitjançant un xoc tèrmic o bé una despolarització de la membrana bacteriana (electroporació) de manera que es provoca l'aparició de porus a la membrana bacteriana que permet l'entrada del DNA exogen. Les cèl·lules que hagin incorporat el plàsmid amb el factor de resistència creixeran en un medi selectiu (amb antibiòtic), mentre que la resta no ho farà.

A partir dels clons transformats es realitzen cultius en medi líquid i s'indueix l'expressió de la proteïna quan es troben en la fase exponencial de creixement. La inducció es du a terme amb l'addició d'IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosid), que inhibeix la repressió a la que es troba sotmesa el promotor *lacUV5* per part del pèptid codificat pel gen *lac I*, de manera que es pot transcriure el gen de la T7 RNA polimerasa que, alhora, dirigirà la transcripció de l'insert del plàsmid. La transcripció basal (o inespecífica) es pot minimitzar utilitzant un mutant del gen *lac I* (*lac I^q*) que sobreexpressa el repressor del promotor *lacUV5* o bé mitjançant un inhibidor natural de la T7 RNA polimerasa, lisozim T7, codificat per un plàsmid compatible en determinades soques d'*Escherichia coli* (pLysS i pLysE).

1.9.5. Purificació de la proteïna recombinant

En ocasions, el bacteri reacciona davant la presència d'una proteïna exògena formant cossos d'inclusió (agregats insolubles de proteïnes que inclouen la proteïna recombinant). En aquests casos, cal un tractament de solubilització de la proteïna mitjançant detergents o agents desnaturalitzants com la urea o el clorur de guanidini. Una alternativa a l'ús d'aquests reactius és intentar evitar la formació dels cossos d'inclusió durant l'expressió de la proteïna recombinant mitjançant la modificació de les condicions de cultiu, ja que es tracta d'un procés sensible a la temperatura i a la concentració d'oxigen.

La purificació de les proteïnes recombinants es fa mitjançant cromatografia d'afinitat, aprofitant la presència del pèptid portador, que determina la matriu cromatogràfica que cal utilitzar. Com que existeixen múltiples sistemes d'expressió, cadascun dels quals presenta una proteïna portadora diferent, s'han desenvolupat múltiples matrius cromatogràfiques per a la seva purificació. Les més emprades són:

- Resina de glutatió: les proteïnes expressades mitjançant el sistema de fusió gènica GST presenten la proteïna glutatió S-transferasa (GST) com a pèptid portador. Aquesta proteïna, de 26 kDa, manté la seva activitat biològica quan s'expressa en *Escherichia coli* independentment de si es fa de forma aïllada o bé fusionada a un altre polipèptid. Aquest fet s'aprofita per a la purificació de proteïnes recombinants resultants de la fusió gènica amb GST. El glutatió (-glutamilcisteïnilglicina) -tripèptid natural compost d'àcid glutàmic, cisteïna i àcid aminoacètic (glicina) i substrat natural de la GST- s'uneix a través del grup tiol de la cisteïna a un oxirà unit a un braç espadiador de 10 carbonis unit a un suport sòlid d'agarosa (figura 1.10a). En aplicar la mostra, únicament la GST s'uneix al glutatió immobilitzat a la resina i consegüentment la proteïna fusionada a ella, mentre que la resta de proteïnes elueix en el rentat. L'elució de la proteïna es du a terme mitjançant un tampó que conté glutatió reduït (l·ligand lliure), que competeix amb el l·ligand unit a la resina en la unió a la proteïna. Com que el l·ligand lliure es troba en excés respecte l'unit a la resina, l'equilibri es desplaça afavorint la unió de la proteïna amb el l·ligand lliure i, per tant, s'allibera la proteïna retinduda:



- Resina de níquel: en el sistema d'expressió "cua d'histidines" (*His-tag*), es fusiona un domini de sis histidines a l'extrem N o C terminal de la proteïna que és del nostre

interès. Aquest domini presenta la propietat de poder-se acomplexar amb un catió bivalent (Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} ...) unit a un suport sòlid d'agarosa a través d'un grup de naturalesa imino (àcid iminodiacètic (IDA) o àcid nitrilotriacètic (NTA)) i un braç espaiador (figura 1.10b). D'aquesta manera, es pot purificar la proteïna de fusió que quedarà retinguda a través de la interacció entre el catió bivalent i les histidines. L'elució es realitza mitjançant un gradient d'imidazole, aprofitant la propietat que presenta aquest reactiu de poder-se acomplexar amb els cations bivalents i, per tant, de competir amb la proteïna de fusió en la unió a l'ió immobilitzat. Si la concentració d'imidazole es troba en excés respecte la de la proteïna, l'equilibri es desplaçarà cap a la unió de l'ió amb l'imidazole, de manera que s'alliberarà la proteïna:

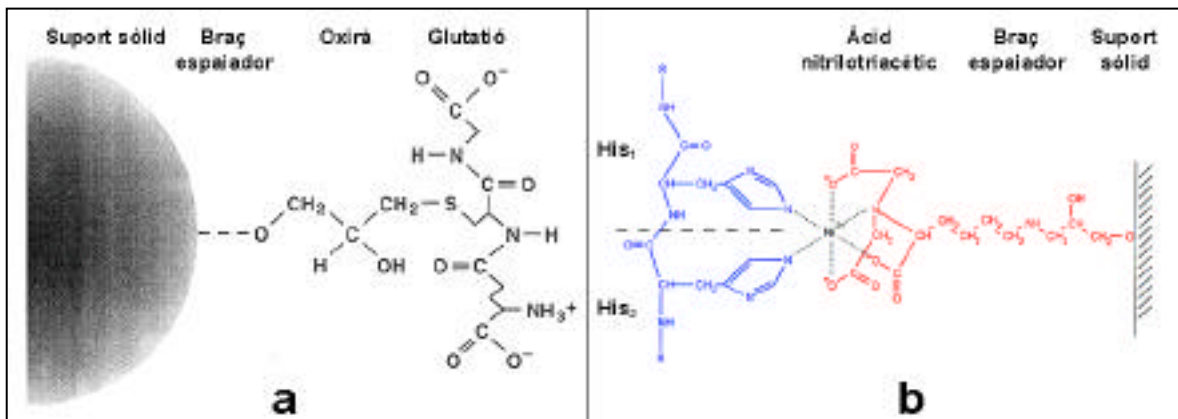
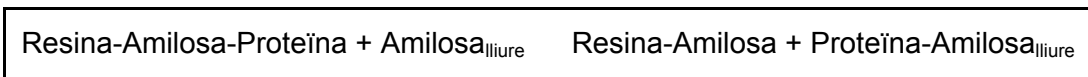


Figura 1.10. Esquemes de les resines de glutatió (a) i de níquel (b), on a més es representa les interaccions que s'estableixen entre l'ió immobilitzat i les histidines del pèptid portador (en blau).

- Resina d'amilosa: si el pèptid portador és la proteïna enllaçant de maltosa (*maltose binding protein*), s'utilitza amilosa unida a un suport sòlid d'agarosa mitjançant un braç espaiador per purificar la proteïna de fusió, ja que l'amilosa actua com a substrat de la proteïna. L'elució de la proteïna es du a terme mitjançant un tampó que conté amilosa (lligand lliure), que competeix amb el lligand unit a la resina en la unió a la proteïna. Com que el lligand lliure es troba en excés respecte l'unit a la resina, l'equilibri es desplaça afavorint la unió de la proteïna amb el lligand lliure i, per tant, s'allibera la proteïna retinguda:



Cal tenir en compte que la proteïna purificada segueix mantenint el pèptid portador unit, que en alguns casos pot interferir en assajos posteriors. Si és així les dues unitats es poden separar mitjançant una digestió enzimàtica específica (cal que existeixi una diana per proteases entremig de les dues seqüències), i una segona purificació per afinitat en la mateixa matriu, de manera que el pèptid portador quedarà unit a la columna mentre que la proteïna diana s'eluirà amb el rentat. Finalment, cal realitzar una purificació de gel-filtració per separar la proteasa utilitzada en la digestió de la proteïna recombinant.

1.10. ENZIMOIMMUNOANÀLISIS: ASPECTES TECNOLÒGICS I CARACTERÍSTIQUES DIAGNÒSTIQUES

1.10.1. Immobilització de proteïnes

Un aspecte important en el desenvolupament de les enzimoimmunoanàlisis en fase sòlida (ELISA) és l'adsorció de l'antigen a la microplaca de poliestirè. Per tal que la unió sigui estable i es mantinguin les propietats antigèniques de l'antigen, és necessari escollir una superfície adequada. A més, cal optimitzar la quantitat d'antigen immobilitzat per a poder ajustar la sensibilitat analítica de l'assaig.

Fonamentalment existeixen dues estratègies per immobilitzar proteïnes al poliestirè:

- Adsorció passiva de les superfícies hidrofòbiques de la proteïna al poliestirè, aprofitant el fet que el poliestirè és un polímer orgànic amb un marcat caràcter hidrofòbic a causa de l'esquelet de carboni amb benzens.
- Unió covalent de la proteïna a través de les seves superfícies hidrofíliques al plàstic modificat i activat amb grups polars.

1.10.1.1. Immobilització per adsorció passiva

La capacitat d'unió de les proteïnes a la superfície hidrofòbica del plàstic és específica per a cada proteïna en qüestió i sol augmentar en funció de la quantitat de proteïna afegida fins a un punt d'equilibri a partir del qual existeix la tendència a la formació d'agregats i una pèrdua en l'eficàcia de la immobilització (Butler, 1991).

Un factor important en la immobilització passiva de proteïnes és el pH, ja que l'eficàcia de la unió està relacionada amb l'augment del nombre de zones hidrofòbiques exposades, normalment internes. L'altra variable important és la temperatura, de manera que una immobilització a temperatura més alta presenta una eficàcia menor, però augmenta l'estabilitat de les unions assolides.

L'avantatge més important d'aquesta estratègia d'immobilització és el fet que els canvis conformacionals són lleus, ja que els centres actius de les molècules adsorbides, generalment externs i hidrofílics, se solen mantenir exposats i mantenen la seva funcionalitat (centres actius d'enzims, epítops antigènics...).

1.10.1.2. Immobilització covalent

Quan es pretén augmentar la quantitat d'antigen immobilitzat amb la finalitat d'assolir assajos més sensibles, s'utilitzen microplaques de poliestirè activades amb grups covalents que permeten la immobilització proteica a través dels seus grups polars (Tarcha, 1991; Hermanson et al., 1992). Les superfícies covalents emprades més comunament són:

- Poliestirè activat amb succinimida, per a la immobilització a pH lleugerament bàsic (8-9) de les proteïnes a través dels seus grups amino.
- Poliestirè activat amb hidrazida, per a la immobilització a pH àcid (5-5,5) de les proteïnes a través dels seus grups aldèhid.
- Poliestirè activat amb maleïmida, per a la immobilització a pH lleugerament àcid (6-6,5) de les proteïnes a través dels seus grups tiol.
- Poliestirè activat amb llum ultraviolada, per a la immobilització inespecífica a través dels hidrògens de les proteïnes.

L'avantatge d'aquesta estratègia d'immobilització és l'increment en la capacitat d'immobilització proteica, però té l'inconvenient que els canvis conformacionals són freqüents i els centres actius de les molècules adsorbides poden quedar ocults i bloquejats afectant la seva funcionalitat.

1.10.2. Sistemes de detecció

Fonamentalment, existeixen dos sistemes de detecció aplicats a les ELISA en funció del tipus d'enzim conjugat a l'anticòs secundari i dels substrat emprat: colorimètrics (ELISA tradicional) i luminescents (bioluminiscència, quimioluminiscència, fluorescència –ELFIA-) (Gibbs, 1996a).

Els enzims més comunament emprats són la peroxidasa de rave, la fosfatasa alcalina intestinal i la α -galactosidasa bacteriana:

- La peroxidasa és una molècula de 40 kDa de massa molar, amb una capacitat molar de conjugació a les immunoglobulines de 4:1, de manera que els conjugats amb aquest enzim són considerats d'elevada sensibilitat. Presenta l'inconvenient de ser inhibida per alguns metalls i per l'azida de sodi, el conservant més utilitzat en els reactius de diagnòstic *in vitro*.

- La fosfatasa alcalina és una molècula de 86 kDa de massa molar que, per tant, presenta una capacitat molar de conjugació a les immunoglobulines inferior a la de la peroxidasa. Això fa que sigui considerat un enzim de menor sensibilitat. La fosfatasa alcalina és inhibida per l'àcid etilendiaminotetraacètic (EDTA) i el fòsfor inorgànic.
- La α -galactosidasa és una molècula molt gran, de més de 300 kDa, de manera que la seva capacitat d'unió molar a les immunoglobulines és molt petita. A més, aquest enzim freqüentment es troba inactivat per motius estèrics. És per això que és l'enzim que s'utilitza menys dels tres.

1.10.2.1. Sistemes de detecció colorimètrics (ELISA tradicional)

Els sistemes de detecció colorimètrics utilitzen substrats líquids estabilitzats, el producte dels quals és soluble, estable i mesurable colorimètricament. Es tracta de substrats amb diferent velocitat de reacció i coeficient d'extinció molar, de manera que la sensibilitat final desitjada per l'assaig i les condicions d'incubació (temps, temperatura, composició dels tampons) condicionen la seva elecció. Generalment, s'aconsella evitar l'exposició directa a la llum, ja que presenten una certa tendència a la fotohidrólisi. Els més comunament utilitzats són:

- Per a la peroxidasa, el 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) que forma un producte mesurable de forma contínua a 650 nm, o bé a punt final a 450 nm si s'atura la reacció mitjançant acidificació del medi. És el substrat més sensible. També és molt comú l'o-fenilendiamina (OPD), una mica menys sensible que l'anterior i que forma un producte soluble mesurable de forma contínua a 490 nm, o bé a punt final si es desnatura prèviament la peroxidasa mitjançant l'alcalinització del medi. Finalment, l'àcid 2,2'-azino-bis[3-etilbenziazolina-6-sulfònic] (ABTS), que és el menys sensible, forma un producte que es pot mesurar a 405 nm bé de forma contínua o bé a punt final després de desnaturar la peroxidasa mitjançant l'addició de dodecilsulfat de sodi (SDS).
- El p-nitrofenilfosfat (p-NPP) en el cas de la fosfatasa alcalina. Aquest substrat, considerat de baixa sensibilitat, forma un producte soluble mesurable a 405 nm. La seva baixa velocitat de reacció aconsella realitzar les mesures a punt final després de desnaturar la fosfatasa alcalina mitjançant alcalinització del medi.

1.10.2.2. Sistemes de detecció lumíniscents

Les ELISA lumíniscents són una variació de les ELISA tradicionals, en les que el substrat de la reacció es converteix en un producte capaç d'emetre fotons i desenvolupar un color que

es mesura en unitats relatives. Són sistemes de detecció força més sensibles que els colorimètrics.

Els substrats són substàncies quimioluminiscent amb la capacitat d'emetre fotons a través d'una reacció química (luminol o polifenols) o bé substàncies bioluminiscent (luciferina). La peroxidasa té com a substrat quimioluminiscent el luminol i com a bioluminiscent la luciferina, sobre la que actua substituint l'activitat *in vivo* de la luciferasa. El substrat quimioluminiscent de la fosfatasa alcalina és el 3-[2'-espiroadamantà]-4-metil-4-[3''-fosforiloxifenil-1,2-dioxietà] (AMPPD), mentre que la β -galactosidasa té un substrat molt similar, el 3-[2'-espiroadamantà]-4-metoxi-4-[3''- β -galactopiranosiloxifenil-1,2-dioxietà] (AMPGD).

Les enzimoinmunoanàlisis en fase sòlida fluorimètriques (ELFIA) són un cas concret de sistema luminescent, on el substrat de la reacció és un fluorogen que és transformat a un producte fotoluminiscent. Aquestes substàncies es caracteritzen pel fet que sota l'estimulació de radiació a una longitud d'ona determinada emeten fotons a una longitud d'ona diferent. Els fluorògens més utilitzats són:

- Per a la peroxidasa, l'àcid hidroxifenilacètic (HPA) que en presència de peròxid d'hidrogen (H_2O_2) i per acció de l'enzim dóna un producte fluorescent amb una longitud d'ona d'excitació de 320 nm i una d'emissió de 404 nm.
- En el cas de la fosfatasa alcalina, el 4-metilumbel·liferil-fosfat (4-MUP). Aquest substrat és defosforilat a 4-metilumbel·liferona, que presenta unes longituds d'ona d'excitació i d'emissió de 360 nm i 440 nm, respectivament.
- El substrat fluorogènic de la β -galactosidasa és el 4-metilumbel·liferil- β -D-galactòsid (4-MUG), que és convertit a 4-metilumbel·liferona, com en el cas de la fosfatasa alcalina.

Les enzimoinmunoanàlisis fluorimètriques tenen com a principal inconvenient l'elevat grau d'inespecificitat que presenten. Hi ha moltes molècules que presenten fluorescència endògena (*scattering*), cal treballar amb reactius d'elevada puresa, no tots els plàstics són adequats per a aquests tipus d'anàlisi i sol ser recomanable la utilització de microplaques negres i opaques. A més, és important que les solucions estiguin desgasificades, ja que l'oxigen dissolt absorbeix a les longituds d'ona d'emissió i, per tant, pot provocar una reducció de la resposta (fenomen anomenat *quenching*).

1.10.3. Característiques analítiques

Les característiques analítiques que és recomanable definir per a qualsevol mètode són (Cortés et al., 1994; Fuentes, 1990; Gella, 2000):

- Imprecisió: referida a l'error aleatori, és el grau de dispersió que existeix entre els resultats de mesures independents d'una mateixa mostra obtingudes sota unes condicions establertes. Si es mantenen constants les condicions de mesura (reactius, calibrador, instrument, operari, etc.) es parla de *repetibilitat* o d'imprecisió *intraserial*, mentre que si es varien les condicions es parla de *reproductibilitat*. Si la variació de condicions es du a terme mitjançant la repetició de les mesures en series diferents la reproductibilitat s'anomena *interserial* i si es tracta de mesures repetides en diferents laboratoris amb diferents procediments de mesura s'anomena reproductibilitat *interlaboratorial*.

La imprecisió es pot expressar numèricament mitjançant la *desviació estàndard* (s) dels resultats obtinguts en múltiples repeticions (x_i) i que es pot calcular segons la següent fórmula:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - x_m)^2}{n - 1}}$$

També s'utilitza el quadrat de la desviació estàndard o *variància* (s^2) i la desviació estàndard relativa a la mitjana (x_m) o *coeficient de variació* (CV):

$$CV (\%) = \frac{s}{x_m} \cdot 100$$

- Inexactitud: referida a l'error sistemàtic del mètode, és la diferència entre el valor trobat i el valor real de la mostra. Aquest error sistemàtic pot ser constant, si la magnitud de l'error és la mateixa en totes les concentracions del paràmetre determinat, o proporcional, si varia de forma proporcional al valor de la magnitud mesurada. L'error constant es pot determinar mitjançant estudis d'interferents i l'error proporcional es pot quantificar mitjançant proves de recuperació, per comparació dels resultats amb dos mètodes analítics diferents o mitjançant la reproducció del valor certificat de mostres patró.
- Detectabilitat i límit de detecció: la detectabilitat d'un mètode analític és la capacitat de detectar petites quantitats del constituent analitzat. És una característica abstracta, no

quantificable, i per això s'utilitza el límit de detecció per tenir una informació quantitativa relacionada amb la detectabilitat. El límit de detecció ha estat definit per la Federació Internacional de Química Clínica (IFCC) com el menor resultat individual que pot distingir-se d'un blanc adequat amb una probabilitat preestablerta. És, per tant, directament proporcional a la imprecisió del mètode analític a concentració zero.

- Sensibilitat analítica: és l'increment de resposta mesurable degut a un canvi en la concentració de l'analit. Per tant, com més gran sigui l'increment de la magnitud mesurada davant un canvi en la concentració de l'analit, més sensible serà el mètode analític.
- Especificitat analítica: es defineix com la capacitat d'un procediment de mesura de no ser afectat per magnituds que no són el mesurand, també anomenades interferents o magnituds influents. Així doncs, un interferent es defineix com aquell component que a partir d'una concentració determinada causa una interferència analítica en un procés de mesura basat en un procés químic (Fuentes, 1999).

1.10.4. Característiques diagnòstiques

La capacitat d'un mètode analític per donar resultats discriminant que permetin classificar els individus en el grup poblacional dicotòmic adequat (sans, malalts...) és el què defineix les característiques diagnòstiques del mètode. Aquesta dicotomització és possible si se selecciona un valor discriminant que efectuï la partició en el conjunt de tots els resultats possibles. L'aproximació més utilitzada per determinar el valor discriminant òptim és la representació del rendiment diagnòstic de les possibles dicotomitzacions amb l'anomenada corba ROC (*Receiver Operating Characteristics*), que utilitza la representació d'un sistema cartesià dels parells (1-especificitat diagnòstica, sensibilitat diagnòstica) corresponent a cada valor discriminant. Els criteris diagnòstics es defineixen de la següent manera:

- Sensibilitat diagnòstica: és la probabilitat que la determinació d'un analit concret en mostres d'individus malalts amb un determinat sistema analític de valor discriminant definit sigui positiva. Es pot quantificar de la següent forma:

$$\text{SENSIBILITAT} = \frac{\text{VERITABLES POSITIUS}}{\text{VERITABLES POSITIUS} + \text{FALSOS NEGATIUS}}$$

Introducció

- Especificitat diagnòstica: és la probabilitat que la determinació d'un analit concret en mostres d'individus no malalts amb un determinat sistema analític de valor discriminant definit sigui positiva. Es pot quantificar de la següent forma:

$$\text{ESPECIFICITAT} = \frac{\text{VERITABLES NEGATIUS}}{\text{VERITABLES NEGATIUS} + \text{FALSOS POSITIUS}}$$

- Eficàcia diagnòstica: entesa com el quocient entre els individus ben classificats amb el sistema analític de valor discriminant definit i el total d'individus de la població analitzada. Es pot quantificar segons:

$$\text{EFICÀCIA} = \frac{\text{VERITABLES POSITIUS} + \text{VERITABLES NEGATIUS}}{\text{TOTAL}}$$

Com més allunyada sigui la proporció de veritables positius (sensibilitat diagnòstica) de la proporció de falsos negatius (1-especificitat diagnòstica) millor serà la discriminació del mètode analític.

La determinació de sensibilitat i especificitat diagnòstiques d'un mètode, es realitza mitjançant l'estudi d'un nombre elevats de sèrums de pacients sans o malalts. Quan no es disposa de l'historial clínic associat a cada sèrum, llavors es consideren com a valors reals (positiu o negatiu) aquells que s'han obtingut amb un assaig de referència. En aquest cas, no es parla de sensibilitat i especificitat diagnòstiques, sinó de **sensibilitat relativa** i **especificitat relativa**, i de **concordància** enlloc d'eficàcia.

1.11. ESTANDARDITZACIÓ DE LA MESURA DELS ANTICOSSOS ANTINUCLEARS

Cada any, als laboratoris de tot el món es realitzen milions d'anàlisis per a la detecció d'autoanticossos que s'utilitzen en el diagnòstic de diferents malalties reumatològiques. Per tal de maximitzar la utilitat d'aquestes proves, és important que els resultats obtinguts estiguin estandarditzats de manera que es minimitzin els errors que condueixin a interpretacions errònies, i que es puguin intercanviar dades d'una forma completament fiable entre els diferents laboratoris.

Tot i l'extensió de tècniques útils per a la determinació qualitativa o quantitativa de molècules útils en el diagnòstic de malalties immunològiques (entre les quals hi ha les reumatològiques), el desenvolupament d'assajos precisos i fidedignes per a la detecció d'aquestes molècules s'ha vist retardat per la manca d'estandardització en la majoria d'ells.

Per tal de millorar aquesta situació, en el camp dels anticossos antinuclears (ANA) l'any 1982 el subcomitè ANA del comitè d'estandardització de la Unió Internacional de Societats Immunològiques (IUIS) i de l'Organització Mundial de la Salut (OMS), amb l'ajuda de l'*Arthritis Foundation* (AF) i el *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), va recollir una sèrie de sèrums amb la finalitat de poder ser utilitzats com a material de referència en les tècniques d'immunofluorescència i immunodifusió doble (Tan et al., 1982). Posteriorment es demostrà que aquests sèrums de referència també podien ser útils en la tècnica d'immunotransferència (Smolen et al., 1997). Actualment es disposa de 10 sèrums de referència amb una especificitat determinada (taula 1.8).

Com que la quantitat de cada sèrum és limitada, es preparen sèrums de referència secundaris en comparació amb el material de referència acceptat, anomenat primari. Aquest material de referència secundari serveix per a les necessitats d'un cert país o àrea. Finalment, cada laboratori s'ha de preparar els seus propis sèrums de referència terciaris en comparació amb els secundaris. Així doncs, els sèrums de referència AF/CDC han permès una mínima estandardització de determinats marcatges ANA per immunofluorescència, i de determinades especificitats mitjançant tècniques d'immunodifusió i immunotransferència.

Malgrat l'existència d'aquests sèrums de referència, un altre requisit important per a l'estandardització és l'existència d'una metodologia reproduïble i precisa. Aquest fet ha estat el centre d'interès els últims anys dels *European Consensus Workshops for the Detection of Autoantibodies* (van Venrooij et al., 1991; Charles et al., 1992). En aquests seminaris es va presentar l'avaluació dels resultats obtinguts en l'anàlisi d'autoanticossos en un elevat

Introducció

nombre de laboratoris europeus i es posaren de manifest les discrepàncies existents entre diferents centres tot i utilitzar les mateixes tècniques. A més a més, s'emfatitzà la necessitat d'utilitzar més d'una tècnica per tal de cobrir tot l'interval d'especificitats. El resultat d'aquests seminaris fou l'edició d'un llibre de mètodes de referència per a les diferents tècniques i determinacions (van Venrooij i Maini, 1994-1996), que si bé no constitueix un mètode de referència únic per a la detecció d'autoanticossos, sí que serveix com a guia per tal de minimitzar les variacions entre diferents laboratoris.

Reactiu	Especificitat designada	Mètode utilitzat
AF/CDC1	Marcatge ANA homogeni (DNA bicatenari)	IFI
AF/CDC2	SS-B (La) (Marcatge ANA clapejat)	WB
AF/CDC3	Marcatge ANA clapejat (<i>speckled</i>)	IFI
AF/CDC4	U1 RNP (U1 <i>small nuclear</i> RNP)	WB
AF/CDC5	Sm (U1, U2, U5, U4/6 <i>small nuclear</i> RNP)	WB
AF/CDC6	Marcatge ANA nucleolar	IFI
AF/CDC7	SS-A (Ro)	WB
AF/CDC8	Marcatge ANA centromèric	IFI
AF/CDC9	Scl-70 (DNA topoisomerasa I)	WB
AF/CDC10	Jo-1 (hisitidil-tRNA sintetasa)	WB

Taula 1.8. Anticossos antinuclears (ANA) de referència disponibles del laboratori de referència ANA AF/CDC des del 1988. IFI: Immunofluorescència indirecta; WB: Immunotransferència o *Western-blot* (adaptat de Nakamura et al., 1994).

Recentment, amb l'expansió de la tècnica d'enzimoinmunoanàlisi per a la detecció d'autoanticossos s'han començat a quantificar les concentracions d'autoanticossos. Això ha afegit un nou repte en l'obtenció de sèrums de referència, ja que és necessari obtenir estàndards amb unes concentracions determinades d'autoanticossos. Els principals problemes venen de les diferents avideses que presenten els autoanticossos per determinats antigens i per la presència simultània de diferents autoanticossos, que es dona amb molta freqüència en les malalties autoimmunes. Actualment només es disposa d'un sèrum de referència quantitatiu per a determinar anticossos contra el DNA bicatenari.

Finalment, cal esmentar que a més dels sèrums de referència, és important seguir desenvolupant tècniques i reactius de referència que minimitzin les variacions tant interlaboratorials com intralaboratorials.

2. MATERIALS I MÈTODES

2.1. PRODUCTES, REACTIUS I EQUIPS INSTRUMENTALS

A continuació es detallen els diferents productes, reactius i equips instrumentals més importants emprats en la realització d'aquest treball:

A) PRODUCTES I REACTIUS:

Antibiòtics

Ampicil·lina (SIGMA CHEMICAL, St. Louis, Missouri, Estats Units).

Cloramfenicol (SIGMA CHEMICAL).

Anticossos

IgG de ratolí contra l'oligopèptid d'histidines de l'extrem C-terminal (INVITROGEN, Carlsbad, Califòrnia, Estats Units).

Immunoglobulines de cabra contra la proteïna glutatió S-transferasa (GST) (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, Uppsala, Suècia).

Immunoglobulines de cabra contra immunoglobulines humanes conjugades amb fosfatasa alcalina (ZYMED, San Francisco, Califòrnia, Estats Units).

Immunoglobulines de conill contra immunoglobulines de ratolí conjugades amb peroxidasa de rave (DAKO, Glostrup, Dinamarca).

Immunoglobulines de conill contra immunoglobulines de cabra conjugades amb peroxidasa de rave (DAKO).

Immunoglobulines de conill contra immunoglobulines humanes conjugades amb peroxidasa de rave (DAKO).

Antígens

Antigen SS-B (La) natiu (CELLON, Luxemburg, Luxemburg).

Antigen SS-A (Ro) natiu (TRINA, Greifensee, Suïssa).

Cèl·lules

Escherichia coli de la soca HMS174(DE3)pLysS, cèl·lules competents (NOVAGEN, Madison, Wisconsin, Estats Units).

Materials i mètodes

Escherichia coli de la soca TG1.

Escherichia coli de la soca BL21(DE3)pLysE.

Escherichia coli de la soca INV F', *One shot™ competent cells* (INVITROGEN).

Colorants

Blau brillant de Coomassie R250 (MERCK, Darmstadt, Alemanya).

Blau de bromofenol (MERCK).

Equip per a la tinció de gels d'electroforesi, *Bio-Rad® Gel-Code* (BIO-RAD, Hercules, Califòrnia, Estats Units).

Vermell de Ponceau S (BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim, Alemanya).

DNA, seqüències

Oligonucleòtid complementari a l'extrem 3' del cDNA de SS-B (La) (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH).

Oligonucleòtid complementari a l'extrem 5' del cDNA de SS-B (La) (LIFE TECHNOLOGIES, Rockville, Maryland, Estats Units).

Plàsmid d'expressió pET-20b(+) (NOVAGEN).

Enzims

Desoxiribonucleasa I (DNasa I) (BOEHRINGER MANNHEIM).

DNA polimerasa *Expand™ High Fidelity* (BOEHRINGER MANNHEIM).

Enzims de restricció *Bgl* II, *Eco*R I, *Hind* III i *Nde* I (NEW ENGLAND BIOLABS, Beverly, Massachusetts, Estats Units).

Lisozim (SIGMA CHEMICAL).

Ribonucleasa pancreàtica (RNasa A) (SIGMA CHEMICAL).

T4 DNA ligasa (PROMEGA, Madison, Wisconsin, Estats Units).

Equips de reactius

Equip de reactius de purificació de DNA de gels d'agarosa, *Advantage™ PCR-Pure kit* (CLONTECH, Palo Alto, Califòrnia, Estats Units).

Equip de reactius de purificació de DNA plasmídic, *Plasmid Maxi kit* (QIAGEN, Venlo, Holanda).

Equip de reactius de purificació de DNA plasmídic, *Plasmid Mini kit* (QIAGEN).

Equip de reactius de subclonació de cDNA, *Original TA-Cloning[®] kit* (INVITROGEN).

Equip de reactius per a la detecció d'anticossos dirigits contra l'antigen SS-A (Ro), *Anti-Ro (SS-A) kit* (SHIELD DIAGNOSTICS, Dundee, Escòcia).

Equip de reactius per a la detecció d'anticossos dirigits contra l'antigen SS-B (La), *anticuerpos anti-SSB (La) EIA* (BIOSYSTEMS, Barcelona, Catalunya).

Equip de reactius per a la detecció del factor reumatoide, *factores reumatoides (FR)-turbi* (BIOSYSTEMS).

Inhibidors de proteases

Aprotinina (SIGMA CHEMICAL).

Fluorur fenilmetilsulfònic (PMSF) (SIGMA CHEMICAL).

Leupeptina (SIGMA CHEMICAL).

Pepstatina (SIGMA CHEMICAL).

Marcadors de massa molar

Marcador de massa molar de DNA, *kb marker* (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH).

Marcador de massa molar de DNA, *λ DNA (EcoR I/Hind III) marker* (PROMEGA).

Patró d'electroforesi de proteïnes de baixa massa molar, *LMW* (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH).

Patró d'electroforesi de proteïnes d'alta massa molar, *HMW-SDS* (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH).

Patró d'electroforesi de proteïnes de baixa massa molar pre-tenyit, *pre-stained SDS-PAGE standard low range* (BIO-RAD).

Reactius

Acrilamida (SIGMA).

Agarosa de tipus I (SIGMA).

Agarosa de baix punt de fusió *LMP* (SIGMA).

Materials i mètodes

Bis-acrilamida (SIGMA).

5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucopiranosid (X-Gal) (SIGMA CHEMICAL).

Diaminobenzidina (DAB) (BIOSYSTEMS).

Ditiotreitol (DTT) (SIGMA CHEMICAL).

Glutatió reduït (SIGMA CHEMICAL).

Imidazole (MERCK).

Isopropil-β-D-tiogalactopiranosid (IPTG) (SIGMA CHEMICAL).

Paranitrofenilfosfat (p-NPP) (D-TEK, Mons, Bèlgica).

Persulfat d'amoni (MERCK).

N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED) (SIGMA CHEMICAL).

Triton[®] X-100 (PANREAC, Montcada i Reixac, Catalunya).

Tween[®]-20 (MERCK).

Resines de cromatografia d'afinitat

Resina de glutatió, *Glutathione Sepharose[®] 4B* (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH).

Resina de níquel-àcid nitrilotriacètic (NTA), *Ni-NTA-Sepharose[®] CL-6B* (QIAGEN).

Tampons d'estabilització

Tampó fosfats-gelatina, *PBS/Fish Gelatin[®]* (BIOFX Laboratories, Inc., Owing Mills, Maryland, Estats Units).

Tampó fosfats-gelatina-glicerol, *PBS/Glycerol/Fish Gelatin[®]* (BIOFX).

Tampó fosfats-caseïna, *PBS/Casein[®]* (BIOFX).

Tampó fosfats-caseïna-glicerol, *PBS/Glycerol/Casein[®]* (BIOFX).

Altres

Columnes PD-10 (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH).

Membranes de fluorur de polivinilidè (PVDF) *Immobilon[®]-P* (MILLIPORE, Bedford, Massachusetts, Estats Units).

Membranes d'ultrafiltració *DIAFLO[®] PM-10* (AMICON, Beverly, Califòrnia, Estats Units).

Microplaques de poliestirè *Maxisorp[®]* de 96 pous (NUNC, Roskilde, Dinamarca).

B) EQUIPS INSTRUMENTALS:

Assecador de gels Bio-Rad® *Gel Dryer* model 543 (BIO-RAD).

Cel·la d'ultrafiltració *DIAFLO*® 8050 (AMICON, Beverly, Massachusetts, Estats Units).

Centrífuga J2.21 (BECKMAN, Ginebra, Suïssa).

Equip per a transferència horitzontal *Novablot* (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH).

Espectrofotòmetre BECKMAN DU-7 (BECKMAN).

Font electroforètica *MultiDrive XL*® (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH).

Incubador-agitador rotatori (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, Edison, New Jersey, Estats Units).

Lector de microplaques *Multiskan RC* (LABSYSTEMS, Helsinki, Finlàndia).

Microcentrífuga 5415D (EPPENDORF, Hamburg, Alemanya).

pHmetre *micropH2002* (CRISON, Alella, Catalunya).

Pipeta multicanal automàtica (LABSYSTEMS).

Rentador de microplaques *Wellwash 4* (LABSYSTEMS).

Sistema d'electroforesi MIDGET 2050 LKB (HOEFER, San Francisco, Califòrnia, Estats Units).

Sonicador *sonic dismembrator 300* (DYNATECH, Burlington, Massachusetts, Estats Units).

Termociclador *Minicycler TM* (MJ RESEARCH, Waltham, Massachusetts, Estats Units).

Transil·luminador d'ultraviolat de longitud d'ona llarga *Ultra-Lum* (MEYER INSTRUMENTS, Houston, Texas, Estats Units).

2.2. TÈCNIQUES GENERALS

A continuació es descriuen les diferents tècniques generals, tant de manipulació de DNA com de proteïnes, emprades en la realització d'aquest treball.

2.2.1. Tècniques de purificació de DNA

2.2.1.1. Purificació de DNA plasmídic

Per a la purificació del DNA plasmídic transferit a les diferents soques bacterianes, es van usar els equips de reactius *Plasmid Mini kit* per a cultius de fins a 5 mL i *Plasmid Maxi kit* per a cultius de 100 mL. Ambdós sistemes es basen en una primera etapa de lisi alcalina de les cèl·lules d'*Escherichia coli* seguida per una separació del DNA plasmídic mitjançant una cromatografia de bescanvi aniónic en condicions apropiades de força iònica i pH (Sambrook et al., 1989).

Els precipitats obtinguts de la centrifugació durant 15 minuts a 6.000 x g i a 4°C dels cultius cel·lulars de 5 mL (minicultiu) o de 100 mL (maxicultiu) es van resuspendre amb 0,3 mL o 10 mL de tampó de resuspensió (hidroximetil-aminometà (Tris)-HCl 50 mmol/L, àcid etilendiaminotetracètic (EDTA) 10 mmol/L, RNasa A 100 µg/mL, pH 8,0), respectivament. A continuació es van afegir 0,3 mL o 10 mL de tampó de lisi (dodecilsulfat de sodi (SDS) 10 g/L, NaOH 0,2 mol/L), s'agità per inversió i s'incubà a temperatura ambient durant 5 minuts.

El lisat es neutralitzà amb 0,3 mL o 10 mL de tampó de neutralització fred (acetat de potassi 3 mol/L, pH 5,5), s'incubà 5 o 10 minuts en un bany de gel i es centrifugà a 16.000 x g durant 10 minuts a 4°C, en el cas del minicultiu, o a 20.000 x g durant 30 minuts a 4°C, pel maxicultiu.

Els sobrenedants recuperats es van aplicar a resines de dietilaminoetanol empaquetades en columnes i prèviament equilibrades amb tampó d'equilibrat (NaCl 750 mmol/L, àcid 3,(N-morfolino)-propanosulfònic (MOPS) 50 mmol/L, isopropanol 15% (v/v), Tritó X-100 0,15% (v/v), pH 7,0), i després de rentar 2 vegades amb 2 mL o 30 mL de tampó de rentat (NaCl 1 mol/L, MOPS 50 mmol/L, isopropanol 15% (v/v), pH 7,0) es van eluir amb 0,8 mL o 15 mL de tampó d'elució (NaCl 1,25 mol/L, Tris-HCl 50 mmol/L, isopropanol 15% (v/v), pH 8,5).

El DNA es va precipitar afegint 0,56 mL o 10,5 mL d'isopropanol a temperatura ambient i centrifugant immediatament a 16.000 x g durant 30 minuts i a 4°C. El precipitat obtingut fou

rentat amb 1 mL o 5 mL d'etanol al 70% (v/v) a temperatura ambient, centrifugat de nou a les mateixes condicions, i assecat durant 5-10 minuts.

Finalment, es va resuspendre el DNA amb un volum adient d'aigua o tampó TE (Tris-HCl 10 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, pH 8.0) i es va comprovar la concentració final mesurant l'absorbància a 260 nm i tenint en compte que una unitat d'absorbància corresponia a una dissolució de 0,05 g/L de DNA de doble cadena.

2.2.1.2. Purificació de DNA d'un gel d'agarosa

La recuperació de fragments de DNA del gel d'agarosa de baix punt de fusió es va realitzar amb l'equip de reactius *Advantage™ PCR-Pure kit*.

Les bandes desitjades, visualitzades mitjançant un transil·luminador d'ultraviolat d'ona llarga, es van tallar del gel amb un bisturí i es van introduir en tubs adequats. Es van estimar els seus volums per pesada, considerant 1 g igual a 1 mL, s'hi van afegir 3 volums de solució salina i es van incubar en un bany d'aigua durant 5-10 minuts a 55°C.

Un cop fosa l'agarosa, es van afegir 8-10 µL de solució *PCR-Pure bind* (suspensió de boletes de sílice), s'incubà a temperatura ambient durant 5 minuts i seguidament es centrifugà a 16.000 x g i a 4°C durant 5 segons.

El precipitat es resuspengué amb 1 mL de solució de rentat proporcionada en el mateix equip de reactius i es tornà a centrifugar a les mateixes condicions. Finalment, el DNA fou eluït de les boletes de sílice afegint 2 volums d'aigua o tampó TE, incubant 5 minuts a temperatura ambient i centrifugant durant 1 minut a 16.000 x g i a 4°C.

2.2.2. Tractaments enzimàtics del DNA

El DNA codificant per a l'antigen SS-B (La) obtingut en la reacció en cadena de la polimerasa (apartat 2.3.1.1) i els vectors de clonatge, pCR[®]2.1, i d'expressió, pET-20b(+), es van sotmetre a diferents tractaments enzimàtics.

2.2.2.1. Lligacions amb vectors plasmídics

Materials i mètodes

Les lligacions dels fragments de DNA als diferents vectors es van realitzar amb l'enzim T4 DNA ligasa a 14°C durant un mínim de 12 hores, mantenint una relació molar d'insert i vector d'1 a 1 o d'1 a 3. A la taula 2.1 es resumeixen els diferents tipus de lligacions realitzats. La mescla resultant de la lligació s'utilitzà per transformar cèl·lules d'*Escherichia coli* de la soca adient (apartat 2.2.5).

Per tal de comprovar el grau de relligació del vector es realitzaren controls de lligació, on se substituï l'insert pel mateix volum d'aigua. Anàlogament a les reaccions de lligació amb insert, la mescla resultant de la "lligació control" s'utilitzà per transformar les mateixes cèl·lules.

Insert	Vector	Resultat ¹
Producte de PCR	pCR [®] 2.1	pCR-SS-B
SS-B (<i>Nde</i> I / <i>Hind</i> III) ²	pET-20b(+) (<i>Nde</i> I / <i>Hind</i> III) ³	pET-SS-B

Taula 2.1. Tipus de lligacions realitzades en la preparació del vector d'expressió de l'antigen SS-B (La) (veure apartat 2.3.1). Notes: ¹Nom del plàsmid resultant si la reacció de lligació era positiva; ²fragment obtingut per digestió amb els enzims de restricció *Nde* I i *Hind* III del plàsmid pCR-SS-B (veure apartat 2.2.2.2); ³vector linealitzat mitjançant una digestió amb els enzims de restricció *Nde* I i *Hind* III (veure apartat 2.2.2.2).

2.2.2.2. Digestions

Es van realitzar dos tipus de digestions segons la finalitat. Les de comprovació es realitzaren a continuació de les reaccions de lligació i serviren per comprovar la presència de l'insert correcte. Per altra banda, les digestions preparatives, en les que es digeriria major quantitat de DNA, s'utilitzaren per preparar el DNA amb uns extrems adients per poder ser utilitzat en una posterior reacció de lligació. En aquests casos es va digerir un màxim d'1µg de DNA.

La digestió amb l'enzim *Eco*R I del plàsmid pCR-SS-B i amb l'enzim *Bgl* II del plàsmid pET-SS-B, ambdues de comprovació, es van realitzar en un bany d'aigua a 37°C durant 2 hores. Les digestions dobles amb els enzims *Nde* I i *Hind* III tant del vector pET-20b(+) com del fragment subclonat al vector pCR[®]2.1 (veure apartat 2.3.1.2) es van realitzar en primer lloc amb l'enzim *Nde* I durant 1 hora i 30 minuts en un bany d'aigua a 37°C i seguidament s'afegí el segon enzim, *Hind* III, i s'incubaren a la mateixa temperatura i el mateix temps. A la taula 2.2 es presenta, de forma esquemàtica, les diferents digestions realitzades amb les seves variables.

DNA	Enzim de restricció	t _{incubació} a 37°C	Tipus de digestió
pCR-SS-B	<i>EcoR</i> I	2 h	Comprovació
pET-20b(+)	<i>Nde</i> II / <i>Hind</i> III	2 x (1 h 30 min)	Preparativa
pCR-SS-B	<i>Nde</i> II / <i>Hind</i> III	2 x (1 h 30 min)	Preparativa
pET-SS-B	<i>Bgl</i> II	2 h	Comprovació

Taula 2.2. Tipus de digestions realitzades en la preparació del vector d'expressió de l'antigen SS-B (La) (veure apartat 2.3.1).

2.2.3. Tècniques electroforètiques de DNA

Es van realitzar dos tipus d'electroforesis de DNA en gels d'agarosa segons el tipus d'agarosa usada: agarosa de tipus I per a electroforesis analítiques; i agarosa de baix punt de fusió (LMP, *low melting point*) per a electroforesis preparatives.

En ambdós casos el gel a l'1% en agarosa es preparà escalfant amb microones una barreja d'1 g d'agarosa tipus I o LMP en 100 mL de tampó TAE 1x (Tris-HCl 40 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, àcid acètic 20 mmol/L, pH 8,0), als quals s'afegiren 10 µL d'una solució de bromur d'etidi de concentració 10 g/L, un cop s'havia refredat i ja no despenia vapors.

La mescla es diposità en un cassette, es col·locà una pinta de tefló per a 10 mostres i es deixà solidificar durant 15-20 minuts. A continuació se submergí el cassette, amb el gel d'1 a 1,5 mm de gruix, en una cubeta amb tampó TAE 1x i s'aplicaren 10 µL de mostra en tampó de mostra (TAE 1x, glicerol 6% (v/v), blau de bromofenol 0,3 g/L).

Com a patró de massa molar s'usà bé el sistema *kb marker*, que cobria el rang entre 0,5 i 10 kilobases (kb, milers de parells de bases) o bé el sistema λ DNA (*EcoR* I/*Hind* III) *marker*, que cobria el rang entre 125 i 21.227 parells de bases (pb).

La separació es realitzà amb una font electroforètica *MultiDrive XL*[®] mantenint un voltatge fix a 60 V durant 1 hora i els diferents fragments separats es visualitzaren mitjançant un transil·luminador d'ultraviolat de longitud d'ona llarga.

2.2.3.1. Determinació de la seqüència de DNA mitjançant el mètode enzimàtic

La determinació de la seqüència de DNA es realitzà al servei de seqüenciació de l'Universitat Autònoma de Barcelona mitjançant el mètode enzimàtic o dels dideoxinucleòtids desenvolupat per Sanger (Sanger et al., 1977).

Breument, el mètode es basa en l'amplificació d'un DNA motlle mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) (veure apartat 2.3.1.1) i una barreja de reacció que conté oligonucleòtids específics per a la cadena motlle que es vol amplificar, desoxiribonucleòtids (dNTPs) i dideoxiribonucleòtids (ddNTPs) marcats amb 4 molècules fluorescents diferents. En l'etapa d'elongació de la reacció es van incorporant els dNTPs, de manera que es van allargant els oligonucleòtids i es va copiant la cadena motlle. En el cas, però, que s'incorpori un ddNTP s'atura l'elongació (ja que no presenten el grup hidroxil a l'extrem 3' necessari per a la reacció amb el possible dNTP següent) i s'obté un fragment d'un cert nombre de bases marcat amb un fluorocrom concret segons el ddNTP que s'hagi incorporat. El resultat és una mescla de fragments de DNA marcats diferenciats en mida per una única base. Mitjançant una electroforesi en gel de poliacrilamida-urea es poden separar els diferents fragments per la seva mida amb una resolució d'una base. Finalment, els fragments separats es poden detectar amb un lector format per un làser d'excitació situat a la base del gel que excita el fluorocrom i un fotomultiplicador que rep el senyal emès pels fluorocroms i els transmet a un ordinador. Com que cada ddNTP està marcat amb un fluorocrom diferent, el senyal que s'obté permet saber quin és el ddNTP incorporat i, conseqüentment, quin és el dNTP de la cadena motlle de DNA. Així doncs, l'ordenació dels diferents fragments marcats segons la seva mida ens revela la seqüència del DNA motlle.

2.2.4. Preparació de cèl·lules competents

Tant les cèl·lules d'*Escherichia coli* de la soca TG1 com les de la soca BL21(DE3)pLysE, cedides ambdues gentilmente per la Dra. Rosa Aligué (Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica, Universitat de Barcelona, Catalunya), es van haver de convertir en cèl·lules competents per tal de poder ser transformades posteriorment.

2.2.4.1. *Escherichia coli* de la soca TG1

Per a la preparació de cèl·lules competents a partir de cèl·lules de la soca TG1 es va seguir el protocol *One-step* (Chung et al., 1989).

A una placa de Petri amb medi LB-agar (triptona 10 g/L, extracte de llevat 5 g/L, NaCl 10 g/L, agar 15 g/L, pH 7,0) es van inocular cèl·lules d'*Escherichia coli* TG1 congelades a

-80°C en glicerol 10% (v/v). A partir d'un únic clon dels obtinguts a la placa, es va preparar un cultiu de 5 mL en medi LB (triptona 10g/L, extracte de llevat 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7,0) i es va incubar durant tota la nit en un incubador-agitador rotatori a 37°C i a 220 rpm. Seguidament es va diluir 100 vegades en medi LB fresc, es van deixar créixer les cèl·lules de nou fins a assolir l'inici de la fase exponencial ($OD_{600\text{ nm}}$ entre 0,3 i 0,5) i es van recollir per centrifugació durant 10 minuts a 1.000 x g i a 4°C. El precipitat es va resuspendre amb tampó TSS fred (polietilenglicol 3.350 o 8.000 100 g/L, $MgSO_4$ 50 mmol/L, dimetilsulfòxid 5% (v/v), en medi LB, pH 6,5) i es van preparar alíquotes que es congelaren en nitrogen líquid i es guardaren a -80°C.

La comprovació de la competència de les cèl·lules es va dur a terme mitjançant una transformació amb una quantitat de DNA determinada i visualitzant el número de clons obtinguts (apartat 2.2.5.2).

2.2.4.2. *Escherichia coli* de la soca BL21(DE3)pLysE

En el cas de les cèl·lules de la soca BL21(DE3)pLysE, per a la preparació de cèl·lules competents es va seguir el protocol d'activació amb clorur de calci (Sambrook et al., 1989).

Cèl·lules d'*Escherichia coli* BL21(DE3)pLysE congelades a -80°C en glicerol 10% (v/v) es van inocular a una placa de Petri amb medi selectiu LB-agar-clor (LB-agar, cloramfenicol 34 µg/mL). Amb un únic clon dels obtinguts es va preparar un cultiu de 100 mL de medi selectiu LB-clor (LB, cloramfenicol 0,034 g/L) i es va incubar durant 3-4 hores en un incubador-agitador rotatori a 37°C i a 220 rpm. Les cèl·lules es van recollir per centrifugació durant 10 minuts a 2.500 x g i 4°C. El precipitat es va resuspendre amb 10 mL d'una solució de $CaCl_2$ 0,1 mol/L freda, es va incubar en un bany de gel durant 10 minuts i seguidament es va centrifugar de nou. A continuació es va resuspendre el nou precipitat amb la mateixa dissolució i es van fer alíquotes que es congelaren amb nitrogen líquid i es guardaren a -80°C.

La comprovació de la competència de les cèl·lules es va realitzar mitjançant una transformació amb una quantitat de DNA determinada i visualitzant el número de clons obtinguts (apartat 2.2.5.3).

2.2.5. Transformació de les cèl·lules d'*Escherichia coli* amb DNA plasmídic

Materials i mètodes

Els diferents plàsmids recombinants es transferiren a les cèl·lules de les diferents soques compatibles amb cadascun d'ells, segons la funció que havien de realitzar. Es van seguir diferents protocols per a les diferents soques, però tots es basaven en la mateixa seqüència d'etapes: addició del DNA a les cèl·lules; introducció del DNA a les cèl·lules mitjançant un xoc tèrmic; reconstitució de les cèl·lules en un medi energètic; i, finalment, selecció de les cèl·lules que havien incorporat el plàsmid mitjançant un cultiu en un medi sòlid selectiu. Les diferents variables utilitzades en la transformació particular de cada soca es resumeixen a la taula 2.3.

En tots els casos, el control de l'eficiència de la transformació es realitzà visualitzant el nombre de cèl·lules obtingudes en cada placa.

Soca	Ús ¹	V _{cèl·lules}	DNA ²	V _{DNA}	t _{42°C}	Medi energètic	Medi selectiu
INV F'	Selecció colònies blaves-blanques	50 µL	pCR-SS-B	5 µL	30 s	SOC	Amp, X-gal
TG1	Clonació	100 µL	pET-SS-B	5-10 µL	—	—	Amp
BL21	Expressió	100 µL	pGEX-2T-Ro60 pGEX-2T-Ro52	2 µL 2 µL	40 s	LB	Amp, Clor
HMS	Expressió	20 µL	pET-SS-B pGEX-2T-Ro60 pGEX-2T-Ro52	1-2 µL 1-2 µL 1-2 µL	40 s	SOC	Amp, Clor

Taula 2.3. Resum de les diferents transformacions de DNA en cèl·lules d'*Escherichia coli* realitzades. BL21: soca d'*Escherichia coli* BL21(DE3)pLysE; HMS: soca d'*Escherichia coli* HMS174(DE3)pLysS; Amp: ampicil·lina; Clor: cloramfenicol; X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucopiranosid; LB: veure apartat 2.2.4.1; SOC: veure apartat 2.2.5.1. ¹ Veure apartat 2.3.1. ² Veure apartats 2.2.2.1 i 2.3.2.

2.2.5.1. Transformació de les cèl·lules competents de la soca INV α F'

La transformació de les cèl·lules d'*Escherichia coli* competents de la soca INV F' es va realitzar seguint el protocol establert a l'equip de reactius *One Shot™ competent cells*, subministrat amb les mateixes cèl·lules.

A 50µL de les cèl·lules congelades a -80°C en glicerol 10% (v/v), prèviament descongelades en un bany de gel, s'hi van afegir 2-mercaptoetanol fins a 20 mmol/L i el DNA. La mescla es

va incubar durant 30 minuts en un bany de gel, es va sotmetre a un xoc tèrmic en un bany d'aigua a 42°C durant 30 segons i seguidament al bany de gel 2 minuts més. A continuació es van afegir 250 µL de medi SOC (triptona 20 g/L, extracte de llevat 5 g/L, glucosa 20 mmol/L, MgCl₂ 10 mmol/L, KCl 2,5 mmol/L, NaCl 10 mmol/L, MgSO₄ 10 mmol/L) i es va incubar durant 1 hora a 37°C en un incubador-agitador rotatori a 220 rpm. Finalment, es van inocular 50 µL i 200 µL per separat a dues plaques de Petri amb medi LB-agar-Amp-X-gal (LB-agar, ampicil·lina 0,05 g/L i 40 µL d'una solució mare de 40 g/L de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucopiranosid (X-gal)) i es van incubar a 37°C durant un mínim de 18 hores.

2.2.5.2. Transformació de les cèl·lules competents de la soca TG1

La transformació de les cèl·lules de la soca TG1 competents es va realitzar seguint el protocol *One-step* (Chung et al., 1989).

Es va afegir el DNA a 100 µL de cèl·lules descongelades en un bany de gel, la mescla es va incubar 30 minuts a un bany de gel, seguidament, s'inoculà a plaques de Petri amb medi selectiu LB-agar-Amp (LB-agar, ampicil·lina 0,05 g/L) i, finalment, s'incubà un mínim de 10 hores a 37°C.

2.2.5.3. Transformació de les cèl·lules competents de la soca BL21(DE3)pLysE

La transformació de les cèl·lules de la soca BL21(DE3)pLysE competents amb el DNA plasmídic es va realitzar seguint el protocol de xoc tèrmic (Sambrook et al., 1989) lleugerament modificat.

Es va afegir el DNA a 100 µL de cèl·lules competents descongelades en un bany de gel i es va incubar 30 minuts. Es va realitzar el xoc tèrmic durant 40 segons en un bany d'aigua a 42°C i seguidament es va incubar 2 minuts més al bany de gel. A continuació es va afegir 1 mL de medi LB i es deixà 1 hora a un incubador rotatori a 37°C i 220 rpm. Les cèl·lules ja transformades es van recollir per centrifugació durant 4 minuts a 1.500 x g i a 4°C, es van resuspendre amb una desena part de volum de sobrenedant, es van inocular a plaques de Petri amb medi selectiu LB-agar-Amp-Clor (LB-agar, ampicil·lina 0,05 g/L, cloramfenicol 0,034 g/L) i, finalment, es van incubar durant tota la nit a 37°C.

2.2.5.4. Transformació de les cèl·lules competents de la soca HMS174(DE3)pLysS

La transformació de les cèl·lules competents de la soca HMS174(DE3)pLysS amb el DNA plasmídic es va realitzar seguint el protocol subministrat amb les cèl·lules.

A 20 µL de cèl·lules descongelades en un bany de gel s'hi va afegir el DNA i es va incubar 30 minuts en un bany de gel. A continuació es realitzà el xoc tèrmic durant 40 segons en un bany d'aigua a 42°C i seguidament s'incubà durant 2 minuts més al bany de gel. Es van afegir 80 µL de medi SOC i es va incubar 1 hora a 37°C i 200 rpm. Finalment es van inocular els 100 µL a una placa de Petri amb medi selectiu LB-agar-Amp-Clor i es van incubar durant tota la nit a 37°C.

2.2.6. Tècniques electroforètiques de proteïnes

Els mètodes electroforètics s'utilitzaren per a comprovar l'expressió de la proteïna de fusió i el grau de puresa durant les etapes de la purificació.

2.2.6.1. Electroforesi en gels de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants

L'electroforesi en gels de poliacrilamida al 10% en condicions desnaturalitzants i reductores es realitzà segons el procediment descrit per Laemmli el 1970, basat en un sistema discontinu de solucions tamponadores, en un aparell d'electroforesis MIDGET 2050 LKB.

L'electroforesi s'inicià amb la preparació dels dos gels, el gel de resolució amb acrilamida al 10% (T10) i bis-acrilamida com a entrecreuador al 2,7% (C2,7), i el gel d'empaquetament amb acrilamida al 4% (T4) i bis-acrilamida al 2,7% (C2,7). La polimerització dels gels iniciada pel persulfat d'amoni i catalitzada per la N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED) es realitzà entre una placa de vidre i una d'òxid d'alumini de 10,2 x 8,2 cm, i s'obtingué un gel de 0,75 mm de gruix.

Els dos gels es prepararen a partir de les següents dissolucions concentrades:

Solució 1: Acrilamida 4,11 mol/L, bis-acrilamida 52 mmol/L.

Solució 2: Tris-HCl 1,5 mol/L, pH 8,8.

Solució 3: Tris-HCl 0,5 mol/L, pH 6,8.

Solució 4: SDS 100 g/L.

Solució 5: Persulfat d'amoni 100 g/L.

El gel de resolució es preparà barrejant 5 mL de solució 1, 3,75 mL de solució 2, 0,15 mL de solució 4, 0,005 mL de TEMED i 6 mL d'aigua bidestil·lada, es desgasificà mitjançant

una bomba de buit, i s'afegiren 0,075 mL de solució 5. Finalment, 3,75 mL de la mescla es transferiren a l'espai existent entre les dues plaques, evitant la formació de bombolles, i es deixà polimeritzar durant 60 minuts a temperatura ambient o 25 minuts a 37°C.

El gel d'empaquetament es preparà mesclant 1,33 mL de solució 1, 2,5 mL de solució 3, 0,1 mL de solució 4, 0,01 mL de TEMED i 6 mL d'aigua bidestil·lada, es desgasificà mitjançant bomba de buit, i s'afegiren 0,05 mL de solució 5. La mescla es transferí a l'espai restant entre les dues plaques, s'introduí una pinta de tefló per a 10 mostres, i es deixà polimeritzar durant 30 minuts a temperatura ambient o 15 minuts a 37°C.

Les mostres es prepararen ajustant la concentració de proteïna, prèviament estimada per absorbància a 280 nm (apartat 2.2.7.1), per sota d'1 g/L amb tampó de mostra format per 2,5 mL de solució 3, 4 mL de solució 4, 2 mL de glicerol, 5 mg de blau de bromofenol, 1 mL de 2-mercaptoetanol i 0,5 mL d'aigua bidestil·lada. Es bulliren durant 5 minuts, es refredaren, es centrifugaren i, finalment, s'aplicaren al gel amb un volum màxim de 15 µl. Els patrons d'electroforesi de proteïnes de baixa massa molar o d'alta massa molar es reconstituïren amb 0,2 mL d'aigua bidestil·lada i a continuació es tractaren de la mateixa manera que les mostres.

La separació es realitzà a temperatura ambient usant un tampó de Tris-HCl 24,7 mmol/L, glicina 0,19 mol/L, SDS 1 g/L, a una intensitat constant de 40 mA durant aproximadament 60 minuts.

Quan s'hagué de realitzar una electrotransferència, s'aplicaren 10 µL de patró d'electroforesi de proteïnes de baixa massa molar pre-tenyit, *pre-stained SDS-PAGE standard low range*, per tal de controlar-ne la seva efectivitat. La concentració de proteïna de les mostres s'ajustà aproximadament a 0,1 g/L tal com s'ha descrit i s'aplicaren 15 µL.

2.2.6.2. Tinció amb blau de Coomassie

La visualització de les bandes després de la separació electroforètica es realitzà per tinció amb blau de Coomassie.

Se submergiren els gels en una solució colorant formada per blau brillant de Coomassie R250 1,25 g/L, metanol 50% (v/v), àcid acètic 10% (v/v), durant 15 minuts a 60°C o 2 hores a temperatura ambient. Seguidament, es decoloraren amb una solució formada per metanol 50% (v/v), àcid acètic 10% (v/v), glicerol 1% (v/v), que s'anà renovant fins a aconseguir un fons transparent. Finalment, els gels es cobriren amb una membrana de cel·lofana i se

Materials i mètodes

sotmeteren a un procés d'assecat per calor i buit usant el sistema Bio-Rad® *Gel Dryer* model 543, durant 2 hores.

També s'utilitzà el mètode de *Gel-Code* per a la tinció del gel d'electroforesi. Aquest mètode és una modificació del mètode de Coomassie que presenta una major sensibilitat i permet l'eliminació del colorant més fàcilment.

Se submergiren els gels en 150 mL d'aigua bidestil·lada i s'incubaren durant 5 min. Es repetí aquest rentat dos cops més i seguidament se submergiren en 15 mL de solució colorant *Bio-Rad*® *Gel-Code* durant 1 h amb agitació a temperatura ambient. Finalment, els gels es decoloraren realitzant dos rentats amb aigua bidestil·lada durant 30 min. El procediment d'assecat fou el mateix que en el cas de la tinció amb blau de Coomassie descrit anteriorment.

2.2.6.3. Determinació de la massa molar

L'electroforesi en condicions desnaturalitzants i reductores permeté la determinació de la massa molar relativa de les proteïnes a través de la seva mobilitat electroforètica i per comparació amb la mobilitat de les bandes dels patrons de massa molar coneguda. Els equips de calibració que s'utilitzaren van ser els patrons de baixa massa molar i el d'alta massa molar d'Amersham Pharmacia Biotech, amb les proteïnes que es mostren a les taules 2.4 i 2.5, respectivament.

Proteïna	Massa molar (kDa)	R _f
Fosforilasa b	94	0,260
Albúmina	67	0,478
Ovoalbúmina	43	0,684
Anhidrasa-carbònica	30	0,978
Inhibidor de la tripsina	20,1	1,130
-Lactoalbúmina	14,4	1,304

Taula 2.4. Proteïnes del patró de baixa massa molar, *LMW*, i la seva mobilitat electroforètica (R_f).

Proteïna	Massa molar (kDa)	R _f
----------	-------------------	----------------

Miosina	220	0,000
-2-Macroglobulina	170	0,090
-Galactosidasa	116	0,179
Transferrina	76	0,290
Glutamat deshidrogenasa	53	0,463

Taula 2.5. Proteïnes del patró d'alta massa molar, *HMW-SDS*, i la seva mobilitat electroforètica (R_f).

La mobilitat electroforètica (R_f) es calculà com el quocient entre la distància migrada per la proteïna i la distància des de l'origen de la separació al front de migració. La massa molar de les mostres problema fou determinada per interpolació dels seus R_f a la recta de calibració obtinguda representant els R_f de les proteïnes patró en front del logaritme de la seva massa molar.

2.2.6.4. Electrotransferència a membrana de PVDF

Després de realitzar una electroforesi en condicions desnaturalitzants i reductores es dugué a terme una transferència de les proteïnes a una membrana de fluorur de polivinilidè (PVDF) del tipus *Immobilon[®]-P* mitjançant el sistema de transferència horitzontal i semi-seca *Novablot*.

La membrana de PVDF, de la mateixa mida que el gel, s'activà submergint-la en metanol absolut durant 10 minuts, es rentà amb aigua, i s'equilibrà amb tampó de transferència (Tris-HCl 48 mmol/L, glicina 39 mmol/L, SDS 0,375 g/L, metanol 20% (v/v), pH 8,3) durant 10 minuts més.

Per a la preparació de la unitat de transferència es dipositaren 9 papers de filtre, també de la mateixa mida que el gel i mullats amb tampó de transferència, sobre la placa de grafit anòdica; a sobre, s'hi col·locà la membrana de PVDF i el gel de poliacrilamida amb el que s'havia realitzat l'electroforesi, prèviament submergit en tampó de transferència; finalment, el gel es cobrí amb 9 papers de filtre més mullats amb tampó de transferència. Tot el procés es realitzà evitant la formació de bombolles entre les diferents capes. El conjunt es tapà amb la placa de grafit catòdica mullada amb aigua bidestil·lada. La transferència de proteïnes es realitzà a una intensitat màxima de 65,6 mA (equivalent a 0,8 mA/cm²) i un potencial màxim de 50 V, durant 90 minuts.

2.2.6.5. Tinció amb vermell de Ponceau S

Per determinar l'eficàcia de la transferència es comprovà visualment la correcta transferència dels patrons pre-tenyits i, per altra banda, es realitzà una tinció reversible amb vermell de Ponceau S.

La membrana de PVDF se submergí en una solució de colorant vermell de Ponceau S 1g/L, àcid acètic 5% (v/v), durant 5 minuts a temperatura ambient, i tot seguit es decolorà amb aigua fins a poder visualitzar de forma clara les diferents bandes.

2.2.6.6. Immunorevelat amb anticossos específics

El revelat específic amb anticossos usat es basa en la unió d'un primer anticòs específic a l'antigen immobilitzat a la membrana, i el reconeixement de l'immunocomplex format mitjançant la incubació amb un segon anticòs conjugat amb peroxidasa, capaç d'oxidar la diaminobenzidina (DAB) a un producte insoluble que precipita sobre els pèptids.

La membrana de PVDF amb les proteïnes electrotransferides se submergí en una solució de blocatge (KH_2PO_4 50 mmol/L, Na_2HPO_4 15 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, Tritó X-100 0,5% (v/v), gelatina 0,2% (v/v), Tween 20 0,1% (v/v), llet desnatada en pols 10 g/L, pH 7,5) durant tota la nit a 2-10°C. A continuació, s'incubà durant 90 minuts a temperatura ambient amb el sèrum que contenia un primer anticòs específic per a l'antigen, diluït convenientment en solució de blocatge. Seguidament, es rentà 2 vegades amb solució de blocatge durant 5 minuts i es realitzà una incubació de 90 minuts amb el segon anticòs conjugat amb peroxidasa de rave, diluït 2000 vegades en solució de blocatge. Un cop acabada la incubació, es repetí el rentat amb solució de blocatge i es realitzà un rentat final amb PBS (KH_2PO_4 50 mmol/L, Na_2HPO_4 15 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, pH 7,5). Finalment, s'incubà amb la solució reveladora (tampó fosfats 150 mmol/L, NaCl 75 mmol/L, SnCl_2 0,5 mmol/L, DAB 1,5 mmol/L, etilenglicol 1,8% (v/v), H_2O_2 5,6 mmol/L) fins a l'aparició de les bandes i es parà la reacció amb l'addició d'aigua bidestil·lada.

2.2.6.7. Immunoabsorció dels sèrums específics

Per tal de demostrar l'analogia antigènica de les proteïnes recombinants purificades amb els antigens nadius respectius, es realitzà una immunoabsorció dels sèrums específics amb antigens nadius i seguidament un immunorevelat específic.

La membrana de PVDF amb la fracció corresponent a l'eluït de la purificació electrotransferida es tractà de la mateixa manera que s'ha descrit a l'apartat anterior, però en la primera incubació s'utilitzà el sèrum immunoabsorbit.

La immunoabsorció del sèrum es realitzà de la següent manera: es va preparar una solució de 4 mg/L d'antigen natiu (SS-B (La) o SS-A (Ro) segons el cas) a partir d'una dissolució comercial concentrada i utilitzant com a diluent el sèrum amb el primer anticòs específic per a l'antigen diluït convenientment en solució de blocatge; es va deixar incubant durant tota la nit a 2-10°C; seguidament es va centrifugar a 18.000 x g durant 10 minuts i a 4°C, i finalment es va recollir el sobrenedant que s'utilitzà en la primera incubació de l'immunorevelat. La resta de l'immunorevelat es realitzà tal com s'ha descrit (apartat 2.2.6.6).

2.2.7. Determinació de la concentració de proteïna

2.2.7.1. Absorbància a 280 nm

La majoria de proteïnes presenten un pic d'absorció màxima a 280 nm degut als grups fenòlic de la tirosina i indòlic del triptòfan. Com que el contingut d'aquests dos aminoàcids varia considerablement entre diferents proteïnes, si no es coneix el coeficient d'absorció molar de la proteïna es considera arbitràriament que una unitat d'absorbància correspon a 1 g/L. La determinació de proteïna es realitzà per seguir les diferents etapes de la purificació. Les mesures d'absorbància de les diferents fraccions obtingudes durant la purificació es realitzaren en un espectrofotòmetre BECKMAN DU-7.

2.2.7.2. Mètode de Bradford

La mesura de la concentració de proteïna de les diferents mostres es realitzà utilitzant el mètode descrit per Bradford el 1976, on el blau brillant de Coomassie R250 reacciona amb la proteïna en medi àcid passant de la seva forma aniònica, amb un màxim d'absorció a 470 nm, a la forma catiònica, amb un màxim d'absorció a 595 nm. La interacció s'estableix principalment amb els residus d'arginina i, en menor proporció, amb els aminoàcids bàsics i aromàtics. Es realitzaren dues adaptacions del mètode a microplaques per poder minimitzar el volum de mostra a utilitzar. Una primera adaptació per mostres amb concentració de proteïna entre 0,08 i 1 g/L, i una segona per mostres entre 0,01 i 0,2 g/L.

Materials i mètodes

La determinació de la concentració de proteïna es realitzà per interpolació a una recta de calibració preparada amb una solució d'1 g/L d'albumina sèrica bovina en els intervals anteriorment esmentats. S'utilitzà un lector de microplaques *Multiskan RC* acoblat a un ordinador per tal de processar les dades obtingudes.

2.3. PREPARACIÓ DELS VECTORS D'EXPRESSIÓ

2.3.1. Vector d'expressió de SS-B (La)

A la figura 2.1 es presenten de forma esquematitzada l'estratègia seguida i les diferents tècniques utilitzades en la preparació del vector SS-B (La).

2.3.1.1. Obtenció del cDNA codificant per a la proteïna SS-B (La) humana

La seqüència codificant per a la proteïna SS-B (La) humana es va obtenir del plàsmid pM9, cedit gentilmente pel Dr. Chan (The Scripps Research Institute, La Jolla, Califòrnia), en el que prèviament havia estat clonada.

A partir de la seqüència prèviament descrita (Chan et al., 1989b) es van dissenyar els oligonucleòtids per extreure la zona codificadora del plàsmid mitjançant la tècnica de reacció en cadena de la polimerasa (PCR). A l'extrem 5' es va afegir una diana per l'enzim de restricció *Nde* I (CCCATATGGCTGAAAATGGT), i a l'extrem 3' una diana per l'enzim *Hind* III (GGGAAGCTTCTGGTCTCCAGC).

L'amplificació fou realitzada en un termociclador *Minicycler TM* amb una seqüència de 30 cicles, cadascun dels quals presentava una etapa de desnaturalització del DNA motlle (30 s a 94°C), una d'hibridació entre els oligonucleòtids i les cadenes simples de DNA desnaturalitzat (30 s a 60°C) i una d'elongació (1 min 20 s a 72°C). S'utilitzà l'enzim DNA polimerasa *Expand™ High Fidelity* en un tampó de Tris-HCl 10 mmol/L, KCl 50 mmol/L, MgCl₂ 1,5 mmol/L, pH 8,3 i una barreja dels quatre desoxiribonucleòtids trifostats a una concentració de 0,2 mmol/L cadascun. El control de la reacció es va realitzar en les mateixes condicions, però substituint el DNA motlle pel mateix volum d'aigua.

2.3.1.2. Clonatge al vector pCR[®]2.1

Per facilitar i augmentar el rendiment dels posteriors tractaments enzimàtics, el fragment obtingut mitjançant PCR va ser clonat al vector pCR 2.1 (figura 2.2).

Aprofitant la propietat que presenta l'enzim Taq DNA polimerasa d'afegir una base d'adenina desaparellada a l'extrem 3' del DNA amplificat, el fragment obtingut per PCR es clonà al vector comercial pCR[®]2.1 mitjançant una reacció de lligació (apartat 2.2.2.1).

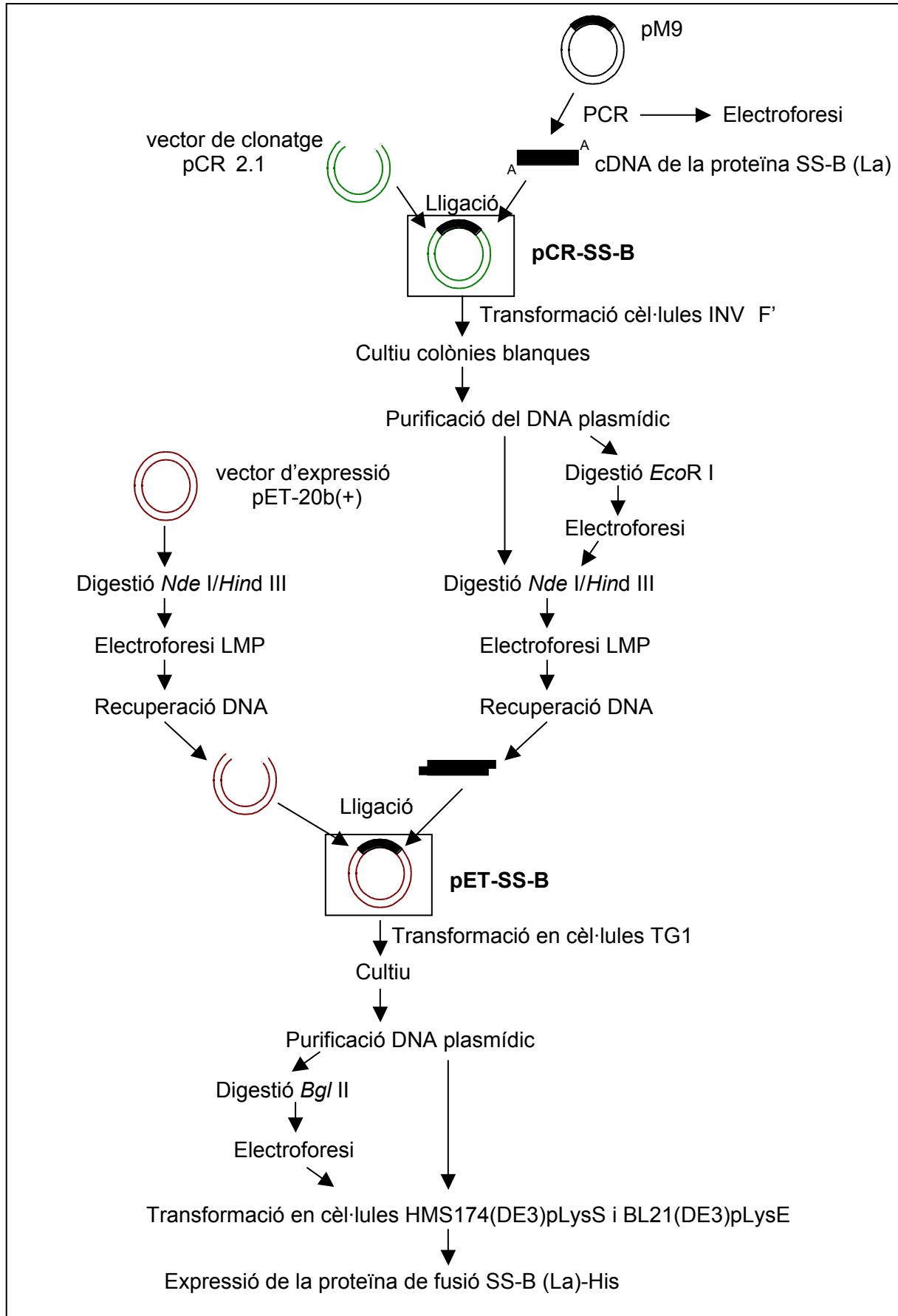


Figura 2.1. Esquema del procediment seguit per a l'obtenció del vector d'expressió de la proteïna SS-B (La)-His.

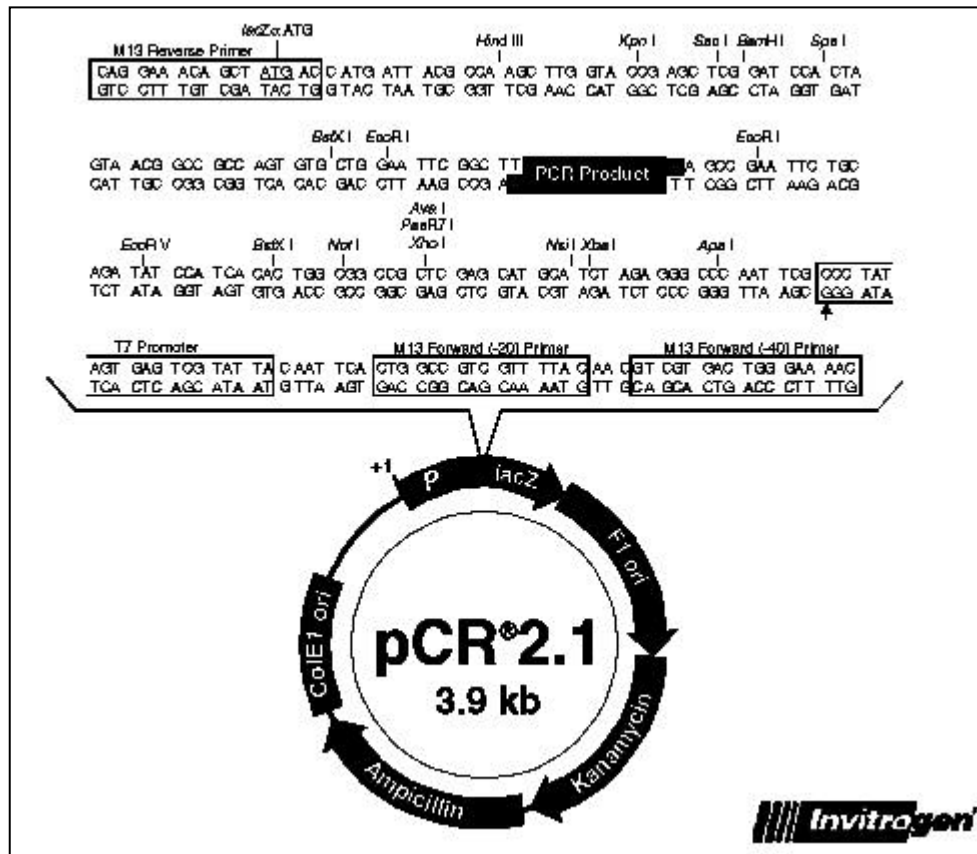


Figura 2.2. Vector de clonatge pCR 2.1. Es detallen el lloc de clonatge múltiple o poliligador, les dianes de restricció i el punt d'inserció del producte de PCR.

El vector pCR[®]2.1 té una mida de 3,9 kb, confereix resistència al seu hoste a l'ampicil·lina i a la kanamicina i es caracteritza per la presència d'una base de timina desaparellada a cada extrem 3', de manera que es pot complementar amb les bases desaparellades del producte obtingut per PCR. El lloc de clonatge múltiple o poliligador es troba enmig del gen *lacZα*, que codifica pels primers 146 aminoàcids de la proteïna β -galactosidasa. Si s'utilitza com a hoste una soca d'*Escherichia coli* que presenti en el seu cromosoma el gen que codifica pel fragment C-terminal de la proteïna (fragment β), la complementació en *trans* dels dos fragments resulta en la forma activa de la proteïna, capaç de metabolitzar el seu substrat, la lactosa, o un anàleg sintètic. En presència del substrat cromogènic sintètic 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucopiranosid (X-Gal), anàleg a la lactosa, els clons amb la forma activa de la proteïna, resultant de la complementació, poden metabolitzar-lo i s'obté un producte insoluble que els tenyeix de color blau. En canvi, els clons als que s'ha insertat un fragment de DNA enmig del gen *lacZα* expressen un pèptid no funcional format per els primers 146 aminoàcids de la β -galactosidasa i la proteïna recombinant, de manera que no es poden complementar els dos fragments. Conseqüentment, no poden obtenir la forma activa de la proteïna, no poden metabolitzar el substrat anàleg X-Gal, i no donen un producte insoluble

de color blau. Així doncs, els clons amb el plàsmid recombinant són de color blanc. Aquest sistema permet seleccionar de forma visual els clons que hagin incorporat el plàsmid recombinant.

El resultat de la reacció de lligació del vector pCR[®]2.1 i del cDNA amplificat s'introduí en cèl·lules de la soca INV F' (apartat 2.2.5.1) i es seleccionaren els clons de color blanc. Per confirmar que els clons seleccionats presentaven l'insert correcte es purificà el DNA plasmídic (apartat 2.2.1.1) i es realitzà una digestió de comprovació amb l'enzim de restricció *EcoR* I (apartat 2.2.2.2), aprofitant la presència de dues dianes d'aquest enzim a cada banda del punt d'inserció del producte de PCR al vector. El vector recombinant obtingut s'anomenà **pCR-SS-B**.

2.3.1.3. Construcció del vector d'expressió pET-20b(+)

El plàsmid usat per expressar la proteïna recombinant SS-B (La) va ser el pET-20b(+) que confereix a l'hoste resistència a l'ampicil·lina (figura 2.3).

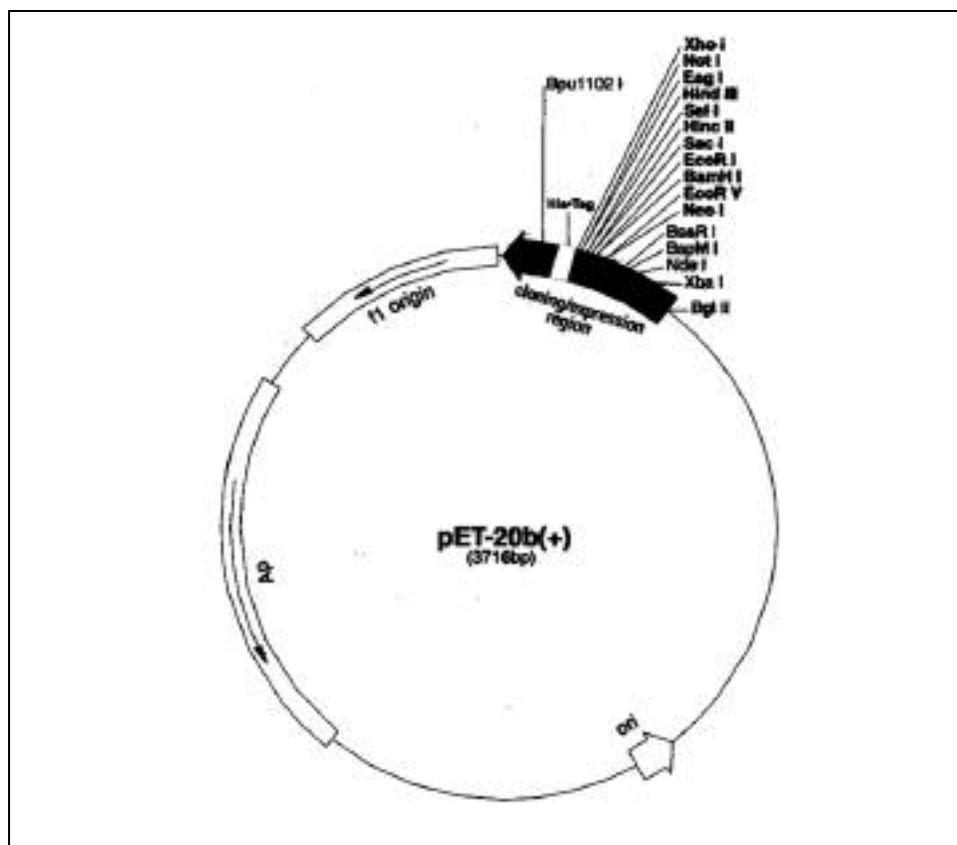


Figura 2.3. Mapa del vector d'expressió pET-20b(+). Es mostra el lloc de clonatge múltiple, el gen que confereix resistència a l'ampicil·lina (Ap) i el senyal codificant pel pèptid portador d'histidines (His-Tag) adjacent a la posició 3' del lloc de clonatge múltiple.

El plàsmid conté un promotor de tipus T7 reconegut per la T7 RNA polimerasa. El gen de la polimerasa està integrat al cromosoma bacterià juntament amb el gen *lac I* i el promotor *lacUV5*, que està sotmès al control d'un operó de tipus *lac*. L'addició d'un anàleg sintètic de la lactosa, l'isopropil-β-D-tiogalactopiranosid (IPTG), inhibeix la repressió del promotor *lacUV5* per part del pèptid codificat pel gen *lac I*, de manera que s'activa la transcripció del gen de la T7 RNA polimerasa que serà l'encarregada de la transcripció del cDNA inserit al plàsmid. Finalment, adjacent a la posició 3' del lloc de clonatge múltiple, el plàsmid presenta un oligonucleòtid que codifica sis residus d'histidina que s'uneixen a l'extrem C-terminal de la proteïna recombinant i que permeten la seva purificació mitjançant cromatografia d'afinitat.

Tant el vector d'expressió, pET-20b(+), com l'insert es van preparar seguint la mateixa seqüència: en primer lloc, es realitzà una digestió doble amb els enzims *Nde I* i *Hind III* dels vectors pET-20b(+) i pCR-SS-B (apartat 2.2.2.2); seguidament, es van separar, mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa de baix punt de fusió (apartat 2.2.3), el vector pET-20b(+) amb els extrems cohesius de la resta de DNA, i l'insert amb els extrems cohesius de la resta del vector pCR-SS-B digerit; finalment, es recuperaren els DNA del gel d'agarosa (apartat 2.2.1.2). Un cop obtinguts els dos fragments amb els extrems cohesius i compatibles, es dugué a terme una reacció de lligació (apartat 2.2.2.1) i el resultat es transformà en cèl·lules de la soca TG1 (apartat 2.2.5.2), que s'utilitzaren per obtenir una major quantitat de DNA (apartat 2.2.1.1). Com que dels clons obtinguts no es podien distingir els que havien incorporat el vector relligat dels que havien incorporat el vector amb l'insert, anomenat **pET-SS-B**, la comprovació de la presència d'insert es realitzà mitjançant una digestió amb l'enzim de restricció *Bgl II*, ja que el patró de bandes era diferent en cada cas. Finalment, la comprovació definitiva de la presència de l'insert correcte es realitzà per seqüenciació segons el mètode de Sanger o dels dideoxinucleòtids (apartat 2.2.3.1).

2.3.2. Vectors d'expressió de les proteïnes Ro60 i Ro52

Els vectors d'expressió dels antigens Ro60 i Ro52 foren obtinguts dels plàsmids pGEX-2T-Ro60 i pGEX-2T-Ro52, codificants per les proteïnes de fusió Ro60-GST i Ro52-GST, respectivament, cedits gentilment pel Dr. McCauliffe (Department of Dermatology, University of North Carolina, Chapel Hill, NC).

El plàsmid utilitzat per al clonatge dels cDNA fou el pGEX-2T d'Amersham Pharmacia Biotech (figura 2.4). Aquest plàsmid, que confereix a l'hoste resistència a l'ampicil·lina, presenta el promotor *tac* (híbrid del promotor T7) reconegut per la T7 RNA polimerasa, el gen de la qual està integrat al cromosoma bacterià, juntament amb el promotor *lacUV5*. A

Materials i mètodes

diferència del vector pET-20b(+), el plàsmid pGEX-2T ja presenta una còpia del gen *lac I^q*, de manera que no és necessari que les cèl·lules hostes continguin aquest gen al seu genoma. El promotor *lacUV5*, inactivat mitjançant el repressor codificat per *lac I^q*, s'indueix amb l'addició d'IPTG (que desbloqueja el promotor) i permet la transcripció del gen de la T7 RNA polimerasa, que, alhora, dirigirà la transcripció del cDNA inserit al plàsmid. Finalment, adjacent a la posició 5' del lloc de clonatge múltiple, el plàsmid presenta una seqüència codificadora per a la proteïna glutatió S-transferasa (GST), que s'uneix a l'extrem N-terminal de la proteïna recombinant i permet la seva purificació mitjançant cromatografia d'afinitat.

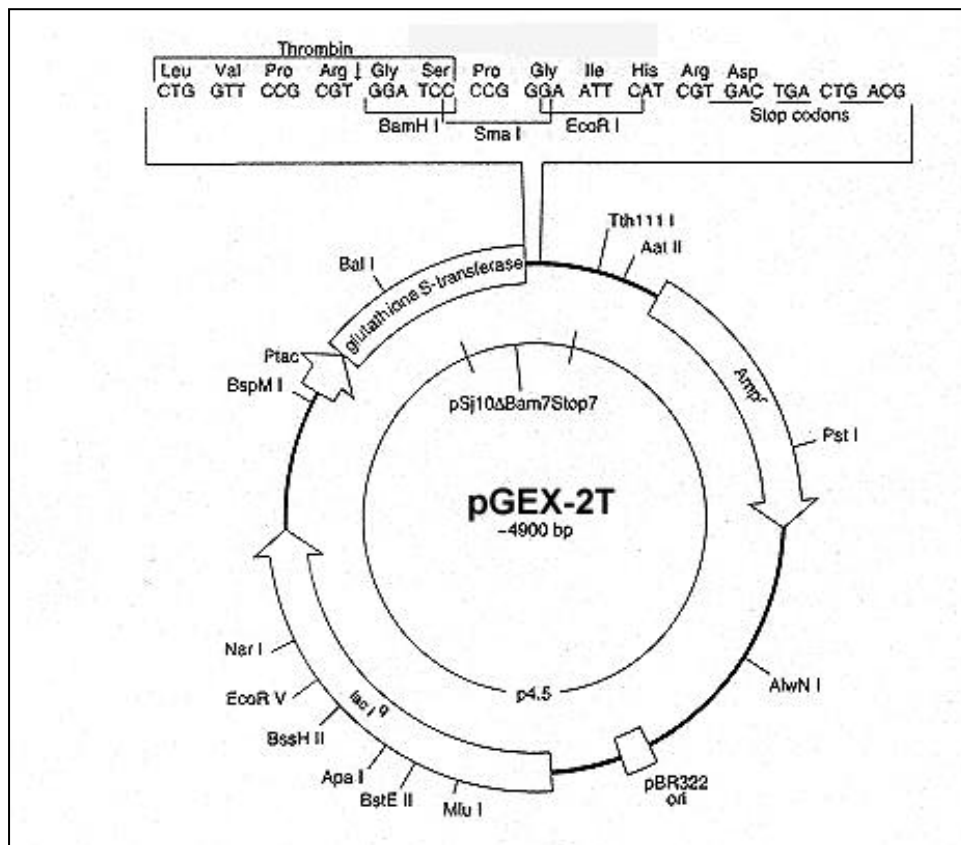


Figura 2.4. Mapa del vector d'expressió pGEX-2T. Es mostra el lloc de clonatge múltiple, el senyal codificant pel pèptid portador (glutatió S-transferasa, GST), el gen que codifica pel repressor de l'operó lac (*lac I^q*) i el gen que confereix resistència a l'ampicil·lina (*Amp^r*).

2.4. EXPRESSIÓ I PURIFICACIÓ DE LES PROTEÏNES DE FUSIÓ

L'expressió de les proteïnes de fusió es va realitzar a les soques d'*Escherichia coli* BL21(DE3)pLysE o HMS174(DE3)pLysS, que presentaven integrats al cromosoma bacterià els gens *lacI* i *lacUV5* necessaris per al control de la transcripció dels inserts (apartats 2.3.1.3 i 2.3.2). Les tres proteïnes recombinants expressades es van purificar per cromatografia d'afinitat amb la resina i el lligand adient en cada cas i seguidament es caracteritzaren molecularment.

2.4.1. SS-B (La)-His

L'expressió de la proteïna de fusió SS-B (La)-His es va realitzar a la soca d'*Escherichia coli* HMS174(DE3)pLysS. La proteïna expressada es purificà mitjançant una cromatografia d'afinitat amb la resina *Ni-NTA-Sepharose*[®]*CL-6B* seguint el protocol subministrat, però amb algunes variacions (figura 2.5).

2.4.1.1. Expressió de la proteïna recombinant

Es va preparar un pre-cultiu de 5 mL en medi selectiu LB-Amp-Clor (LB, ampicil·lina 0,05 g/L, cloramfenicol 0,034 g/L) a partir d'alíquotes de les cèl·lules transformades amb el vector pET-SS-B (apartat 2.2.5.4) i congelades a -80°C en glicerol al 8% (v/v), i es va deixar créixer durant una nit.

Seguidament es va inocular en 1 L de medi LB-Amp-Clor. Els cultius es van deixar créixer durant 4 o 5 hores fins que assoliren un valor d'absorbància a 600 nm de 0,6. En aquest moment s'induiren els cultius mitjançant l'addició d'IPTG fins a una concentració final de 0,5 mmol/L i es van deixar créixer durant 3 hores més. Els cultius es van recollir per centrifugació a 3.000 x g durant 10 minuts i a 4°C. Es van descartar els sobrenedants, i els precipitats es van congelar a -80°C.

El control de l'expressió es va realitzar mitjançant una electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants (apartat 2.2.6.1) de les alíquotes de 3 mL separades just abans de l'addició d'IPTG i 3 hores després, i tractades de la següent manera: es van recollir les cèl·lules mitjançant una centrifugació a 3.000 x g durant 10 minuts i a 4°C; i seguidament, els precipitats cel·lulars obtinguts es van resuspendre amb 0,5 mL de tampó TE i es van sonicar durant 4 cicles de 10 segons, amb 10 segons de repòs entre cicles, a 105 watts de potència mitjançant un sonicador *sonic dismembrator 300*.

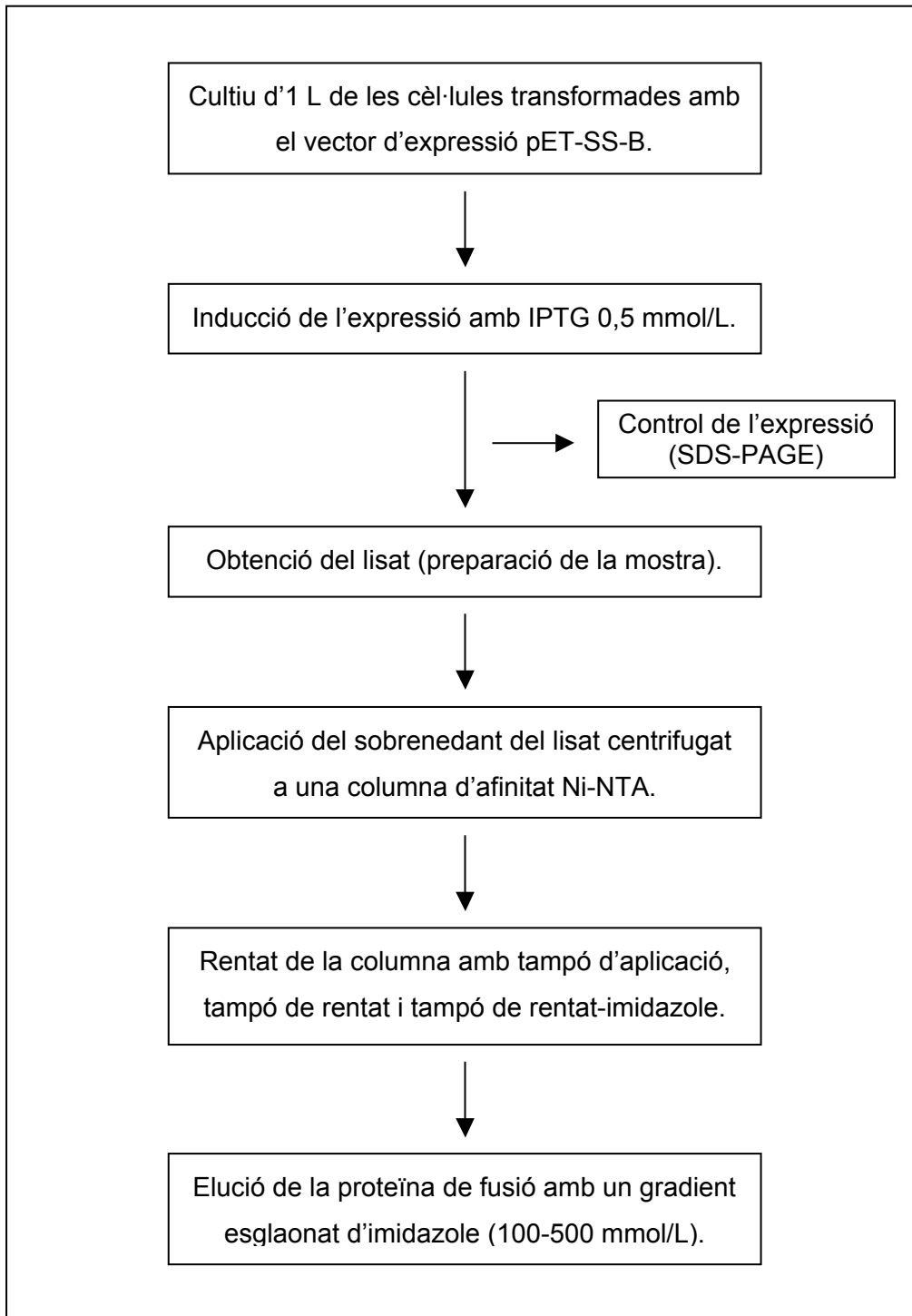


Figura 2.5. Esquema del procediment de purificació de la proteïna de fusió SS-B (La)-His.

Per comprovar la solubilitat de la proteïna recombinant, el lisat cel·lular es va centrifugar a 16.000 x g durant 15 minuts i a 4°C, es va separar el sobrenedant, el precipitat es va resuspendre amb el volum inicial de tampó TE (0,5 mL) i, finalment, es realitzà una electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants (apartat 2.2.6.1) de les dues mostres.

2.4.1.2. Preparació de la mostra per a la cromatografia d'afinitat

El precipitat de cèl·lules, obtingut a partir d'1 L de cultiu i congelat a -80°C , es descongelà en un bany de gel durant 15 minuts i es resuspengué amb 12 mL de tampó de lisi B (Na_2HPO_4 50 mmol/L, NaCl 300 mmol/L, leupeptina 1 mg/L, aprotinina 1 mg/L, pepstatina 1 mg/L, fluorur fenilmetilsulfònic (PMSF) 1 mmol/L, pH 7,8) acabat de preparar. A continuació, s'afegí lisozim fins a una concentració final d'1 g/L. S'incubà durant 30 minuts en gel. Seguidament es va sonicar durant 6 cicles de 30 segons i 1 minut de repòs entre cicles, a 105 watts de potència mitjançant un sonicador *sonic dismembrator 300*.

Al lisat obtingut s'afegí desoxiribonucleasa I (DNasa I) fins a una concentració final de 5 mg/L i ribonucleasa pancreàtica (RNasa A) fins a 10 mg/L, s'incubà durant 20 minuts en gel i, finalment, es va centrifugar durant 10 minuts a $23.000 \times g$ i a 4°C . El sobrenedant es filtrà per un filtre de $0,45 \mu\text{m}$ i s'aplicà a la resina *Ni-NTA-Sepharose[®]CL-6B* prèviament equilibrada.

2.4.1.3. Preparació i regeneració de la resina Ni-NTA-agarosa

La resina utilitzada consistia en un catió bivalent de níquel complexat a un grup NTA (àcid nitrilotriacètic) unit mitjançant un braç espaiador a un suport sòlid d'agarosa entrelaçada al 6% (*Sepharose[®]CL-6B*) (figura 1.10).

La resina s'equilibrà seguint els següents passos: es va agafar 1 mL de resina al 50% (p/v) en etanol al 30% (v/v) i es posà en un tub tipus Falcon de 15 mL; s'afegiren 10 mL de tampó d'aplicació B (Na_2HPO_4 50 mmol/L, NaCl 300 mmol/L, pH 7,8), s'agità gentilment, es centrifugà durant 3 minuts a $1.200 \times g$ i a 4°C i es descartà el sobrenedant; es va repetir aquest rentat una altra vegada; i, finalment, s'afegiren 0,5 mL de tampó d'aplicació.

Al final de la purificació, la resina es va netejar seguint el següent protocol: es va rentar amb 10 volums d'una dissolució d'àcid acètic 0,2 mol/L, 10 volums d'una solució de glicerol al 30% (v/v) i 10 volums d'aigua. Finalment, es va guardar en una solució d'etanol al 30% (v/v).

2.4.1.4. Cromatografia d'afinitat amb la resina Ni-NTA

Per dur a terme l'aplicació de la mostra, es van barrejar el lisat filtrat (apartat 2.4.1.2) i la resina al 50% (p/v) en tampó d'aplicació B (apartat 2.4.1.3) i es va incubar durant 1 hora en agitació i a $2-10^{\circ}\text{C}$. A continuació es centrifugà durant 3 minuts a $1.200 \times g$ i a 4°C i es recollí la fracció no retinguda.

La resina es rentà 5 vegades amb tampó d'aplicació B, 3 vegades amb tampó de rentat B (Na_2HPO_4 50 mmol/L, NaCl 300 mmol/L, glicerol 10% (v/v), pH 6,0) i 5 vegades amb tampó de rentat-imidazole (tampó de rentat B, imidazole 20 mmol/L, pH 6,0). Cada rentat va constar de les següents etapes: s'afegiren 10 mL de tampó (5 mL en el cas del tampó de rentat-imidazole) i s'agità gentilment; s'incubà durant 2 minuts en un bany de gel; es centrifugà durant 3 minuts a $1.200 \times g$ i a 4°C ; i, finalment, es recollí el sobrenedant que es va guardar en diferents alíquotes.

La proteïna de fusió SS-B (La)-His s'eluí mitjançant un gradient esglaonat d'imidazole. S'usaren, successivament, 35 mL de tampó d'elució-100 (tampó de rentat B, imidazole 100 mmol/L, pH 6,0), 15 mL de tampó d'elució-300 (tampó de rentat B, imidazole 300 mmol/L, pH 6,0) i 10 mL de tampó d'elució-500 (tampó de rentat B, imidazole 500 mmol/L, pH 6,0). En tots els casos es va procedir de la mateixa manera que amb els rentats anteriors.

Al final de la cromatografia, es determinà la concentració de proteïna per absorbància a 280 nm (apartat 2.2.7.1) de les diferents fraccions recollides per tal de controlar la cromatografia. Seguidament, aquestes fraccions es guardaren a -80°C per a posteriors assajos.

2.4.1.5. Caracterització molecular i antigènica de la proteïna purificada

La proteïna recombinant purificada es va caracteritzar molecularment mitjançant una electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants (apartat 2.2.6.1) que es revelà amb el colorant blau de Coomassie (apartat 2.2.6.2) i es va determinar la massa molar de les bandes (apartat 2.2.6.3). La identitat de la proteïna purificada es comprovà per reconeixement antigen-anticòs mitjançant una immunotransferència (apartat 2.2.6.6). Finalment, la demostració de l'analogia antigènica entre la proteïna de fusió i l'antigen natiu es realitzà mitjançant una immunoabsorció amb antigen natiu del sèrum amb anticossos específics per a l'antigen recombinant (apartat 2.2.6.7).

2.4.2. Ro60-GST i Ro52-GST

Per a l'expressió de la proteïna Ro60-GST, inicialment s'utilitzaren les soques d'*Escherichia coli* HMS174(DE3)pLysS i BL21(DE3)pLysE, però un cop confirmat el millor rendiment obtingut amb la primera d'elles la segona es va descartar. Per altra banda, per a l'expressió de la proteïna Ro52-GST ja únicament s'utilitzà la soca HMS174(DE3)pLysS. Les proteïnes expressades es purificaren per cromatografia d'afinitat amb la resina de glutatió, *Glutathione Sepharose*® 4B. En ambdós casos es va seguir el mateix protocol (figura 2.6).

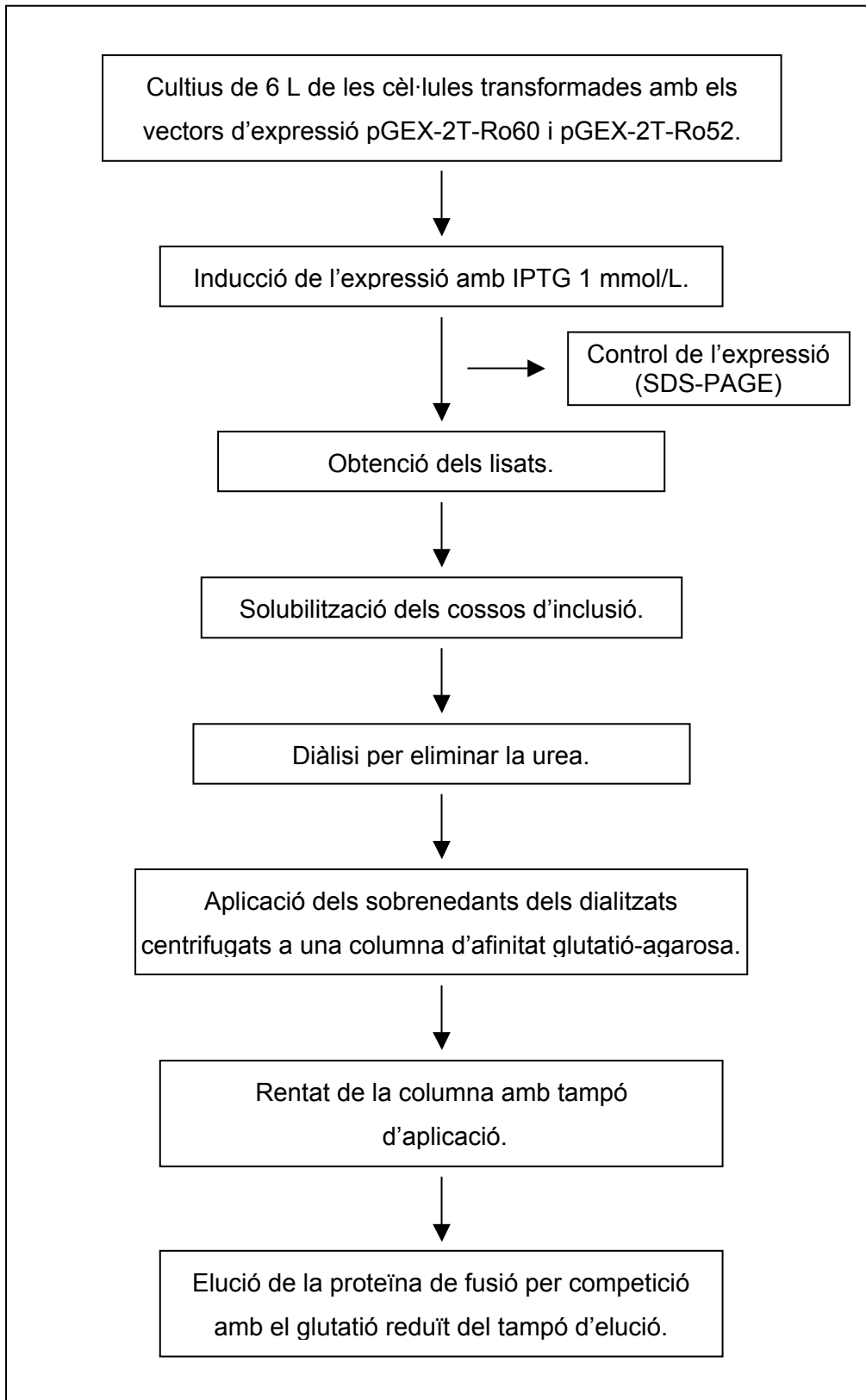


Figura 2.6. Esquema del procediment de purificació de les proteïnes de fusió Ro60-GST i Ro52-GST.

2.4.2.1. Expressió de les proteïnes recombinants

Es van preparar dos pre-cultius de 5 mL en medi selectiu LB-Amp-Clor (LB, ampicil·lina 0,05 g/L, cloramfenicol 0,034 g/L) a partir d'alíquotes de les cèl·lules de la soca HMS174(DE3)pLysS o BL21(DE3)pLysE (només en el cas de Ro60-GST) transformades amb els vectors pGEX-2T-Ro60 o pGEX-2T-Ro52 (apartats 2.2.5.3 i 2.2.5.4) i congelades a -80°C en glicerol al 8% (v/v), i es van deixar créixer durant una nit.

Seguidament, els pre-cultius es van inocular en 6 L de medi LB-Amp-Clor. Els cultius es van deixar créixer durant 4 o 5 hores fins que assoliren un valor d'absorbància a 600 nm de 0,6. En aquest moment s'induiren els cultius mitjançant l'addició d'IPTG fins a una concentració final de 1 mmol/L i es van deixar créixer durant 3 hores més. Els cultius es van recollir per centrifugació a 3.000 x g durant 10 minuts i a 4°C. Es van descartar els sobrenedants, i els precipitats es van congelar a -80°C.

El control de l'expressió es va realitzar mitjançant una electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants (apartat 2.2.6.1) de les alíquotes recollides just abans de la inducció i 3 hores després d'haver induït tractades de la de la següent manera: es van recollir les cèl·lules mitjançant una centrifugació a 3.000 x g i a 4°C durant 10 minuts i, seguidament, els precipitats cel·lulars obtinguts es van resuspendre amb 0,5 mL de tampó TE i es van sonicar durant 4 cicles de 10 segons, amb 10 segons de repòs entre cicles, a 105 watts de potència mitjançant un sonicador *sonic dismembrator 300*.

Per comprovar la solubilitat de la proteïna recombinant, el lisat cel·lular es va centrifugar a 16.000 x g durant 15 minuts i a 4°C, es va separar el sobrenedant, el precipitat es va resuspendre amb el volum inicial de tampó TE (0,5 mL) i, finalment, es realitzà una electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants (apartat 2.2.6.1) de les dues mostres.

2.4.2.2. Preparació de les mostres

El precipitat de cèl·lules obtingut a partir de 6 L de cultiu i congelat a -80°C es descongelà en un bany de gel durant 10 minuts i es va resuspendre amb tampó de lisi A (Tris-HCl 100 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, leupeptina 1 mg/L, aprotinina 1 mg/L, pepstatina 1 mg/L, PMSF 1 mmol/L, pH 8,0) acabat de preparar.

A continuació es va sonicar durant 6 cicles de 30 segons i 1 min de repòs entre cicles, a 105 watts de potència mitjançant un sonicador *sonic dismembrator 300*. El lisat obtingut es va

centrifugar durant 15 minuts a 23.000 x g i a 4°C, es va descartar el sobrenedant, i es prosseguí amb el precipitat obtingut.

La solubilització dels cossos d'inclusió que contenien la proteïna de fusió es realitzà mitjançant la resuspensió amb 300 mL de tampó de resuspensió A (Tris-HCl 100 mmol/L, ditiotreitòl (DTT) 25 mmol/L, urea 6 mol/L, pH 8,0) del precipitat obtingut en la centrifugació del lisat, seguida d'una incubació a temperatura ambient durant 1 hora. Seguidament, es va centrifugar durant 15 minuts a 1000 x g i a 4°C, es va separar el sobrenedant i es va descartar el precipitat. Els 300 mL de sobrenedant es van dialitzar enfront de 20 L de tampó d'aplicació A (Tris-HCl 20 mmol/L, NaCl 100 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, pH 8,0) durant tota la nit i a 2-10°C. El dialitzat obtingut es centrifugà a 23.000 x g durant 15 minuts i a 4°C i el sobrenedant resultant s'aplicà a la resina de glutatió *Glutathione Sepharose*[®] 4B.

2.4.2.3. Preparació i regeneració de la resina *Glutathione Sepharose*[®] 4B

La resina utilitzada per a la purificació de les dues proteïnes recombinants consistia en un suport sòlid d'agarosa al qual s'havia unit covalentment el glutatió a través d'un braç espaciador (figura 1.10).

En cada cas, la resina s'equilibrà seguint els següents passos: es van agafar 6,67 mL de resina al 75% (p/v) en etanol al 30% (v/v), es van posar en una columna PD-10 i es va deixar eluir per gravetat; seguidament, es va rentar 3 vegades amb 15 mL de tampó d'aplicació A que també s'eluien per gravetat i, finalment, es van afegir 5 mL de tampó d'aplicació A.

Al final de les purificacions, la resina es regenerà amb 3 cicles de rentats alternatius amb 3 volums d'una solució de pH alt (Tris-HCl 0,1 mol/L, NaCl 0,5 mol/L, pH 8,5) i 3 volums d'una solució de pH baix (acetat de sodi 0,1 mol/L, NaCl 0,5 mol/L, pH 4,5). Al final es guardà en una solució d'etanol al 30% (v/v).

2.4.2.4. Cromatografia d'afinitat amb la resina *Glutathione Sepharose*[®] 4B

Es va afegir la resina al 50% (p/v) en tampó d'aplicació A (apartat 2.4.2.3) al sobrenedant resultant de la centrifugació del dialitzat (apartat 2.4.2.2) i es va incubar durant 30 minuts a 2-10°C i agitant. A continuació es col·locà la columna en un suport vertical, s'afegí una fracció de la solució de resina i sobrenedant, es deixà assentar el gel i es recollí la fracció no retinguda per gravetat. Seguidament s'afegí una nova fracció de la solució a la columna i es

procedí de forma igual. El procediment es va repetir fins que tot el gel estigué empaquetat a la columna i s'hagué recollit tot l'eluit.

La resina es rentà 5 vegades amb 15 mL de tampó d'aplicació A que es van deixar eluir per gravetat.

L'elució de les proteïnes de fusió Ro60-GST i Ro52-GST es realitzà mitjançant una incubació de 15 minuts a 2-10°C amb 10 mL de tampó d'elució (Tris-HCl 50 mmol/L, NaCl 120 mmol/L, glutatió reduït 20 mmol/L, DTT 0,2 mmol/L, pH 9,6) i agitant. La fracció eluïda es recollí per gravetat i es neutralitzà amb una solució de HCl diluït. L'elució es repetí dues vegades més, amb 10 mL i 5 mL de tampó d'elució, incubant i neutralitzant les mostres de forma exactament igual.

Al final de cada cromatografia, es determinà la concentració de proteïna per absorbància a 280 nm (apartat 2.2.7.1) de les diferents fraccions recollides. Seguidament, aquestes fraccions es guardaren a -80°C per a posteriors assajos.

2.4.2.5. Caracterització molecular i antigènica de les proteïnes purificades

Les proteïnes recombinants purificades es van caracteritzar molecularment mitjançant electroforesis en gels de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants (apartat 2.2.6.1) que es revelaren amb el colorant blau de Coomassie (apartat 2.2.6.2), i es va determinar la massa molar de les bandes (apartat 2.2.6.3). La identitat de les proteïnes purificades es comprovà mitjançant una immunotransferència (apartat 2.2.6.6). Finalment, la comprovació de l'analogia antigènica entre la proteïna de fusió i l'antigen natiu es realitzà mitjançant una immunoabsorció amb antigen natiu del sèrum amb anticossos específics per a l'antigen recombinant (apartat 2.2.6.7).

2.5. ENZIMOIMMUNOANÀLISI EN FASE SÒLIDA (ELISA)

2.5.1. Immobilització dels antígens per adsorció passiva

La immobilització dels antígens a les microplaques de poliestirè del tipus *Maxisorp*[®] es realitzà per adsorció passiva (apartat 1.10.1.1). Es van incubar 100 µl de solució antigènica en tampó de sensibilització (NaHCO₃ 0,3 mol/L, pH 9,6) a cada pou de les microplaques durant una nit a 2-10°C en cambra humida. A continuació, es rentaren les microplaques amb tampó de rentat (Tris-HCl 100 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, Tween 20 1,11 g/L, pH 7,4) tres vegades en un rentador de microplaques *Wellwash 4*, i s'assecaren durant 1 hora a 37°C. Un cop seques, les microplaques s'embossaren en bosses de polièster i amb un saquet dessecant a l'interior per eliminar les restes d'humitat. Les bosses es segellaren amb una termosoldadora i es conservaren a 2-10°C fins a la seva utilització.

2.5.2. Tractament de les microplaques amb agents estabilitzants

Per millorar l'estabilitat de les microplaques amb els antígens recombinants adsorbits es van provar quatre solucions estabilitzants comercials i dues no comercials:

- Tampó fosfats-gelatina, *PBS/Fish Gelatin*[®]: tampó fosfats salí, gelatina de peix 5% (v/v), pH 7,4.
- Tampó fosfats-gelatina-glicerol, *PBS/Glycerol/Fish Gelatin*[®]: tampó fosfats salí, gelatina de peix 5% (v/v), glicerol, pH 7,4.
- Tampó fosfats-caseïna, *PBS/Casein*[®]: tampó fosfats salí, caseïna, pH 7,4.
- Tampó fosfats-caseïna-glicerol, *PBS/Glycerol/Casein*[®]: tampó fosfats salí, caseïna, glicerol, pH 7,4.
- Tampó HEPES-Sacarosa: àcid N-[2-hidroxiètil]piperazina-N'-[2-etanosulfònic] (HEPES) 10 mmol/L, NaOH 3 mmol/L, sacarosa 50 mmol/L, albúmina bovina 0,5 g/L, pH 7,2.
- Tampó Caseïna-HCl: caseïna 1 g/L hidrolitzada parcialment amb HCl 30 mmol/L mitjançant una incubació a 100°C durant 2 hores.

En tots els casos es procedí de la mateixa manera. Després d'assecar les microplaques amb els antígens immobilitzats, s'afegiren 100 µL de la solució estabilitzant a cada pouet i

s'incubà durant 2 hores a temperatura ambient en cambra humida. Seguidament, s'aspirà el sobrant de la solució estabilitzant i les microplaques es van assecar a 37°C durant 3 hores. Finalment, les microplaques seques s'embossaren en bosses de polièster i amb un saquet dessecant a l'interior per eliminar les restes d'humitat, es segellaren les bosses amb una termosoldadora i es conservaren a 2-10°C fins a la seva utilització.

2.5.2.1. Estabilitat accelerada

La meitat de les tires de cada microplaca es van incubar durant 7 dies a 37°C (condicions d'estressament), mentre que la resta es van conservar a 2-10°C (condicions t_0). Seguidament es van assajar diferents sèrums positius i negatius, segons el mètode de referència (apartat 2.5.4.1), seguint el procediment detallat a l'apartat 2.5.3.

Les diferències obtingudes es van expressar en forma de % de pèrdua calculat a partir de la fórmula següent:

$$Pèrdua (\%) = \frac{(Abs_{t_0} - Abs_E)}{Abs_{t_0}} \times 100$$

on Abs_E és l'absorbància obtinguda en les condicions d'estressament i Abs_{t_0} l'absorbància obtinguda en les condicions t_0 .

Per determinar les possibles interferències de les dissolucions estabilitzants a l'assaig, es calcularen les diferències () entre els senyals obtinguts en condicions t_0 per a cada dissolució i l'obtingut en condicions t_0 per a la microplaca control (a la que no s'havia afegit cap dissolució estabilitzant), a partir de la següent fórmula:

$$(\%) = \frac{(Abs_{t_0}) - (Abs_{t_0})_{control}}{(Abs_{t_0})_{control}} \times 100$$

2.5.3. Procediment dels assajos per a la detecció d'anticossos

Per a la detecció d'anticossos se seguí el procediment esquematitzat a la figura 2.7. Primerament, es dugué a terme una incubació a temperatura ambient durant 30 minuts amb els sèrums diluïts 100 vegades amb el diluent de la mostra (Tris-HCl 100 mmol/L, NaCl 10 mmol/L, Tween 20 0,5 g/L, albúmina bovina 40 g/L, azida de sodi 0,98 g/L, pH 7,4), es rentaren les microplaques amb tampó de rentat tres vegades, i s'incubaren a temperatura

ambient durant 30 minuts més amb un segon anticòs contra immunoglobulines humanes conjugat amb fosfatasa alcalina diluït 1000 vegades amb el diluent del conjugat (trietanolamina 30 mmol/L, $ZnCl_2$ 0,1 mmol/L, acetat de magnesi 1,5 mmol/L, albúmina bovina 40 g/L, azida de sodi 0,98 g/L, pH 8,0).

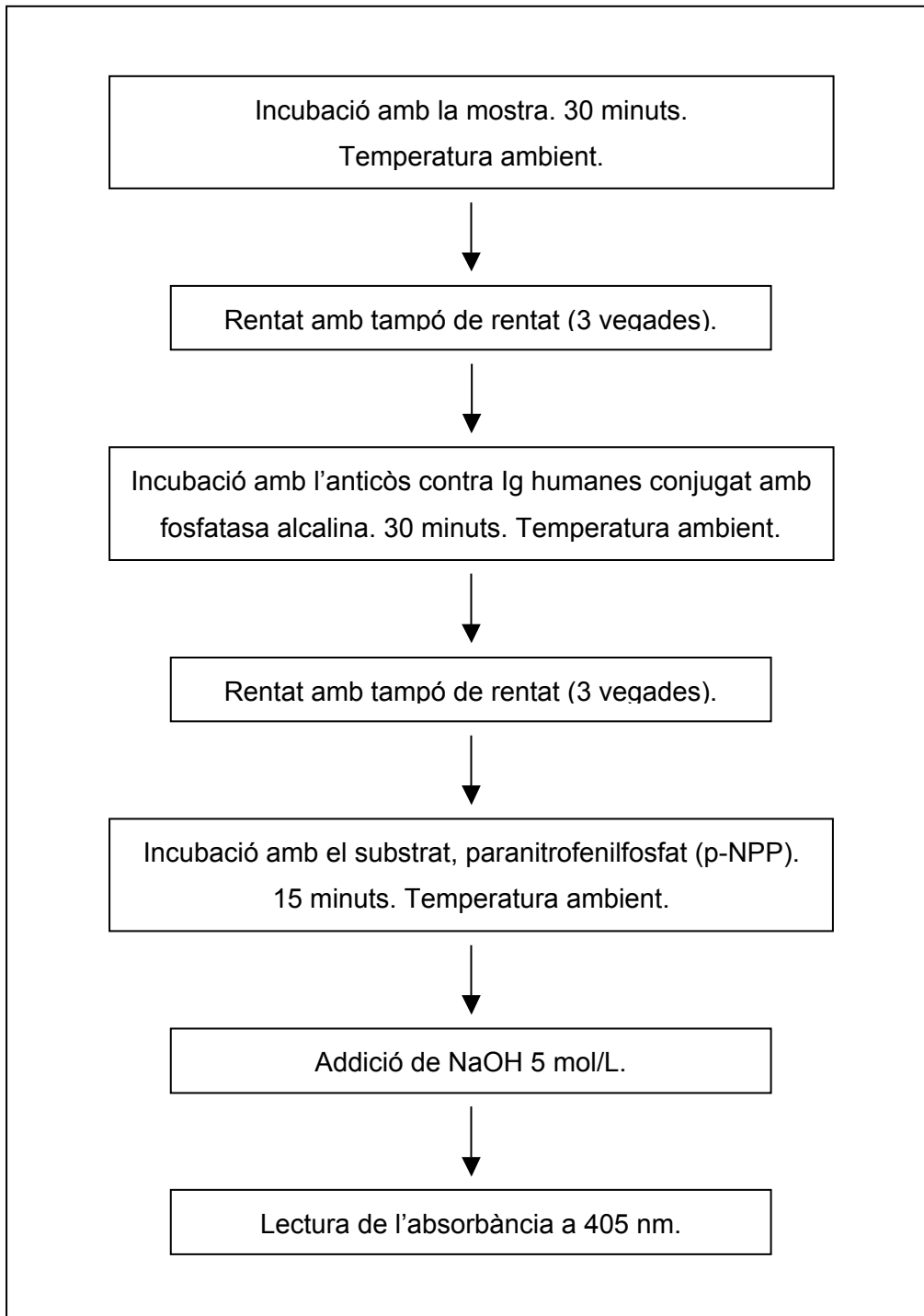


Figura 2.7. Esquema del procediment dels assajos realitzats per a la detecció dels anticossos.

Després de rentar de nou amb tampó de rentat tres vegades, s'incubà amb 100 µL del substrat, paranitrofenilfosfat (p-NPP), durant 15 minuts a temperatura ambient i s'aturà la reacció amb l'addició de 100 µL de NaOH 5 mol/L. Finalment, es llegí l'absorbància a 405 nm amb un lector de microplaques *Multiskan RC*.

En tots els assajos es realitzaren un mínim de dos blancs de reactiu, on se substituï la mostra pel diluent de la mostra, i dos controls del valor discriminant (apartat 2.5.4.4). Tots ells es van tractar de forma igual a la resta de mostres. Els resultats s'expressaren en forma de concentració (U/mL) calculada a partir de la fórmula següent:

$$U/mL = \frac{A_i - A_b}{A_d - A_b} \times 10$$

on A_b és el valor d'absorbància promig dels blancs de reactiu, A_i representa els diferents valors d'absorbància obtinguts en la valoració dels diferents sèrums, A_d és el valor d'absorbància obtingut pel control del valor discriminant i el factor 10 són les unitats arbitràries assignades al control del valor discriminant.

Els sèrums amb una concentració superior a 10 U/mL es designaren com a positius, mentre que els negatius eren els que presentaven una concentració inferior a 10 U/mL.

2.5.4. Calibració

Es defineix la calibració com el conjunt d'operacions que permeten establir la relació existent entre els valors observats o assignats i els valors convencionalment vertaders de la magnitud que es mesura (Gella, 2000). En el nostre cas, la calibració de les enzimoimmunoanàlisis (ELISA) desenvolupades tingué com a objectiu final la preparació d'un sèrum control que permetés diferenciar els sèrums positius (amb anticossos contra els antigens SS-B (La) o SS-A (Ro)) dels negatius.

2.5.4.1. Classificació de sèrums

El mètode de referència escollit fou una ELISA específica per a la detecció de SS-B (La) o de SS-A (Ro) disponible comercialment. Per a SS-B (La), s'utilitzà l'equip de reactius *anticuerpos anti-SS-B (La) EIA* de BioSystems S.A. i per a SS-A (Ro), l'equip de reactius *Anti-Ro (SS-A) kit* de Shield Diagnostics. Ambdós equips contenien immobilitzats els antigens SS-B (La) o SS-A (Ro) natius.

En ambdós casos es van valorar un mínim de 100 sèrums d'una seroteca preparada amb mostres obtingudes de Balagué Center (Barcelona), de l'Hospital Universitari de Còrdoba, del CDC (*Centers for Diseases Control and Prevention*, Atlanta, EEUU), de Biomedical Resources (Hatboro, EEUU) i de Xema Corporation (Moscú, Rússia) (Ferragut, 1999) seguint la metòdica descrita en cada equip de reactius. Els sèrums es classificaren com a sèrums positius o negatius segons els resultats obtinguts.

2.5.4.2. Determinació dels valors d'absorbància discriminants provisionals

Per determinar el valor d'absorbància discriminant, en una primera aproximació es van valorar, amb les ELISA desenvolupades, una cinquantena de sèrums negatius segons el mètode de referència (54 per a SS-A (Ro) i 59 per a SS-B (La)). Amb els valors d'absorbància obtinguts es va estudiar la presència de valors aberrants i la normalitat (apartat 2.6.1) i seguidament es calcularen els estadístics. El valor d'absorbància discriminant provisional s'estimà mitjançant l'equació: $vd = \bar{x} + 3s$, on \bar{x} és la mitjana i s és la desviació estàndard.

2.5.4.3. Determinació del valor d'absorbància discriminant final: corbes ROC

La determinació del valor d'absorbància discriminant final de les ELISA optimitzades es realitzà mitjançant la representació de les anomenades corbes ROC (Zweig i Campbell, 1993; Queraltó, 1994). Aquesta aproximació utilitza la representació en un sistema cartesià dels parells (sensibilitat, 1 – especificitat) corresponents a una sèrie de possibles valors discriminants.

Primerament, es van escollir de forma arbitrària valors d'absorbància a l'entorn del valor d'absorbància discriminant provisional i es van valorar sèrums positius i negatius per a l'especificitat assignada prèviament amb el mètode de referència. Per a cada possible valor d'absorbància discriminant escollit s'analitzà el grau de concordança dels resultats obtinguts amb l'especificitat assignada i es van calcular els positius discordants i els negatius discordants. En cada cas es construï la taula de contingència de dades aparellades i només pels casos que no presentaven una tendència estadísticament significativa a obtenir més falsos positius que falsos negatius o viceversa (apartat 2.6.3) es calcularen la sensibilitat i l'especificitat relatives amb les equacions descrites a l'apartat 2.5.5.1. El valor d'absorbància discriminant definitiu fou escollit com el valor d'absorbància que proporcionà unes millors característiques diagnòstiques (sensibilitat i especificitat), però prenent com a objectiu la prioritització de l'especificitat sobre la sensibilitat, ja que es tractava de proves selectives i no de cribatge. Gràficament, a la corba ROC aquest valor fou el que més s'acostà al punt [0,100].

Una altra forma de determinar gràficament el valor d'absorbància discriminant final fou mitjançant la representació gràfica de les corbes de sensibilitat i especificitat relatives en front dels diferents valors d'absorbància discriminants. El punt que presentà una millor relació entre sensibilitat i especificitat determinà el valor d'absorbància discriminant òptim.

2.5.4.4. Estandardització del valor d'absorbància discriminant: control del valor discriminant

S'escolliren un sèrum de la seroteca (apartat 2.5.4.1) positiu per SS-B (La) tant pel mètode de referència com per l'assaig desenvolupat i un de positiu per SS-A (Ro), i es realitzà una valoració d'una sèrie de dilucions de cada sèrum en els mateixos assajos d'assignació dels valors d'absorbància discriminant. Els resultats es representaren gràficament, es va realitzar un ajust a la funció hipèrbola quadrada ($y = B_{\max} \cdot x / (K_d + x)$) i s'hi interpolà el valor d'absorbància discriminant final. D'aquesta manera s'obtingué la dilució del sèrum que corresponia al valor d'absorbància discriminant final que s'utilitzà per preparar el control del valor discriminant de la següent manera: el sèrum positiu valorat es va diluir a la dilució obtinguda i seguidament es conservà a -80°C per a posteriors assajos. A aquest sèrum així preparat se li assignà de forma arbitrària una concentració de 10 U/mL.

2.5.5. Determinació de les característiques diagnòstiques

A partir de les valoracions dels sèrums amb els mètodes de referència (apartat 2.5.4.1) i amb els assajos desenvolupats (apartat 2.5.3) es van determinar les característiques diagnòstiques. Com que no es disposava dels historials clínics de cada sèrum i els valors reals dels sèrums es van haver de prendre d'un mètode considerat de referència, se substituï l'adjectiu *diagnòstic* per *relatiu*. Així, es calcularen l'especificitat i sensibilitat relatives de la mateixa manera que es calculen l'especificitat i sensibilitat diagnòstiques (Queraltó, 1994), i la concordància de la mateixa manera que es calcula l'eficàcia diagnòstica.

2.5.5.1. Especificitat i sensibilitat relatives

L'especificitat i sensibilitat relatives es van calcular a partir de les següents equacions (Queraltó, 1994):

$$\text{SENSIBILITAT} = \frac{\text{VERITABLES POSITIUS}}{\text{VERITABLES POSITIUS} + \text{FALSOS NEGATIUS}}$$

$$\text{ESPECIFICITAT} = \frac{\text{VERITABLES NEGATIUS}}{\text{VERITABLES NEGATIUS} + \text{FALSOS POSITIUS}}$$

on els diferents paràmetres es determinaren a partir de la taula de contingència de dades aparellades següent:

	POSITIUS REALS	NEGATIUS REALS
POSITIUS OBSERVATS	Veritables positius (VP)	Falsos positius (FP)
NEGATIUS OBSERVATS	Falsos negatius (FN)	Veritables negatius (VN)

Taula 2.6. Taula de contingència de dades aparellades pel càlcul de la sensibilitat i l'especificitat relatives.

Els valors observats es van prendre de les valoracions dels sèrums amb els assajos desenvolupats (apartat 2.5.3) i els valors reals de les valoracions realitzades mitjançant el mètode de referència (apartat 2.5.4.1).

2.5.5.2. Concordància

La concordància es va calcular de la mateixa manera que l'eficàcia diagnòstica, que resulta del quocient de totes les mostres ben classificades tant en la població de positius reals com en la de negatius reals (Queraltó, 1994), mitjançant l'equació:

$$\text{CONCORDÀNCIA} = \frac{\text{VERITABLES POSITIUS} + \text{VERITABLES NEGATIUS}}{\text{TOTAL}}$$

2.5.6. Determinació de les característiques analítiques

Les característiques analítiques que es van determinar per a les dues ELISA desenvolupades foren la imprecisió, el límit de detecció, l'especificitat i la interferència dels factors reumatoides.

2.5.6.1. Estimació de la imprecisió

La imprecisió es va determinar realitzant la valoració per quintuplicat d'un sèrum de concentració elevada (26 U/mL per SS-B (La) i 24 U/mL per SS-A (Ro)) i un de concentració

mitja o propera al control del valor discriminant (11 U/mL per SS-B (La) i 13 U/mL per SS-A (Ro)) i es va repetir 5 dies diferents. El control del valor discriminant es determinà, en cada sèrie, per triplicat. El càlcul de la concentració (U/mL) es realitzà de la forma habitual (apartat 2.5.3) i s'estudià la normalitat i la presència de valors aberrants en cada grup de dades i en el conjunt de totes les dades com a un únic grup (apartat 2.6.1). Finalment, es realitzà l'anàlisi de l'ANOVA (apartat 2.6.2) i els coeficients de variació interdiaris (repetibilitat) i intradiaris (reproductibilitat) es calcularen per a cada espècimen a partir de les següents equacions:

$$\text{Imprecisió intradiària} = CV_i(\%) = \frac{s_i}{\bar{x}} = \frac{\sqrt{MQD}}{\bar{x}}$$

$$\text{Imprecisió interdiària} = CV_e(\%) = \frac{s_e}{\bar{x}} = \frac{\sqrt{MQE}}{\bar{x}}$$

on MQD i MQE són les mitjanes dels quadrats dins els grups i entre grups, respectivament, i \bar{x} és la mitjana global.

2.5.6.2. Estimació del límit de detecció

Per a l'estimació del límit de detecció es van realitzar 20 determinacions del blanc de reactiu. El valor del límit de detecció, X_L , s'estimà mitjançant l'equació $X_L = X_b + k s_b$, on X_b és el valor del blanc (mitjana de les 20 determinacions), s_b és la desviació estàndard de les determinacions i k és un factor numèric triat segons el nivell de confiança desitjat (per a $\alpha = 0,05$, $k = 3,29$). El límit de detecció s'expressà en termes de la magnitud física mesurada, és a dir, en unitats d'absorbància.

2.5.6.3. Estudi d'especificitats

Per tal de verificar l'especificitat dels antigens recombinants purificats es van valorar per duplicat els 10 sèrums *Arthritis Foundation / Centers for Disease Control and Prevention* (AF/CDC) d'especificitat determinada (apartat 1.11). Per a cada sèrum es calculà la concentració (U/mL) de la forma habitual (apartat 2.5.3).

2.5.6.4. Estudi d'interferència dels factors reumatoides

Una característica comú en diferents malalties autoimmunes sistèmiques és la presència en títols elevats d'anticossos dirigits contra immunoglobulines (factors reumatoides) que poden interferir en la valoració d'altres tipus d'autoanticossos (veure apartat 1.3.2).

Per determinar la possible existència d'interferències degudes a la presència de factors reumatoides es van valorar per triplicat una mescla de sèrums de concentració propera al control del valor discriminant (12 U/mL per SS-A (Ro) i 8 U/mL per SS-B (La)) a les que s'havien afegit diferents quantitats d'un sèrum amb una concentració de factor reumatoide de 900 IU/mL, valorat per turbidimetria amb l'equip de reactius comercial *factores reumatoides (FR)-turbi* de BioSystems, S.A. Així, per a cada mescla de sèrums es disposà de 5 concentracions de factors reumatoides: 0, 37,5, 75, 150 i 300 IU/mL.

El tractament de les dades fou el següent:

- per a cada concentració de factors reumatoides es calculà la mitjana de les concentracions obtingudes i la desviació estàndard.
- Es va calcular la mitjana de les desviacions estàndard obtingudes en les valoracions de les mescles de diferents nivells: s
- Es va calcular l'interval de confiança del 95% de c_0 (mitjana de la concentració obtinguda per a la mescla de sèrums a la qual no s'havia afegit el sèrum amb factor reumatoide) a partir de l'equació: $c_0 \pm 3s$.

La concentració d'analit interferent es considerarà com aquella concentració que donà un valor de concentració per fora de l'interval de confiança.

2.6. TRACTAMENTS ESTADÍSTICS

Per als diferents càlculs estadístics realitzats s'utilitzà el programa SPSS (SPSS Inc., EEUU).

2.6.1. Estudi de la normalitat i dels valors aberrants

Els valors aberrants es determinaren mitjançant el test de Box-Whisker i foren eliminats per als càlculs posteriors. La normalitat de les dades obtingudes (apartats 2.5.4.2 i 2.5.6.1) s'estudià aplicant el test paramètric de Kolmogorov-Smirnov per una mostra. Un cop comprovada la normalitat de les dades es calcularen els estadístics descriptius: mitjana i desviació estàndard.

2.6.2. Anàlisi de la variància d'un factor (ANOVA)

L'anàlisi de l'ANOVA comprova la hipòtesi nul·la que les mitjanes de dos o més grups de dades d'una població tenen mitjanes idèntiques. Si els grups tenen mitjanes diferents, la variació serà deguda, per una banda, a diferències entre els components dins d'un grup i, per l'altra, a diferències entre les mitjanes dels diferents grups. És per això que es defineix una variància entre grups (o interserial), calculada com la suma dels quadrats de les diferències entre les mitjanes de cada grup i la mitjana global, i una dins de grups (o intraserial), calculada com la suma dels quadrats de les diferències entre cada valor i la mitjana del grup corresponent (Motulsky, 1995).

Les condicions d'aplicabilitat de l'ANOVA són la normalitat i l'homoscedasticitat o homogeneïtat de variàncies. La primera condició s'estudià tal com s'ha descrit (apartat 2.6.1) i la segona a partir del test de Levene.

L'anàlisi de l'ANOVA donà com a resultats les mitjanes quadrades dins els grups (MQD) i entre els grups (MQE) que equivalien a les variàncies intraserials i interserials, respectivament. A partir d'aquests valors es calcularen els coeficients de variació intradiaris i interdiaris (apartat 2.5.6.1).

2.6.3. Test de McNemar i distribució binomial

La tendència a obtenir un nombre més elevat de falsos positius (FP) que de falsos negatius (FN) o viceversa significa que s'ha escollit un valor discriminant massa baix o massa alt, respectivament. L'estudi estadístic d'aquesta característica es realitzà amb el test de McNemar per a dades aparellades. El test de McNemar utilitza únicament els números dels parells discordants, és a dir, el número de FP i de FN, i no té en compte la resta de parells, ja que no contribueixen a la informació sobre l'optimització del valor discriminant.

En el nostre cas, el test es basà en la validació de la hipòtesi nul·la (H_0) que plantejava una distribució de falsos positius i de falsos negatius equivalent. Es calculà l'estadístic χ^2 amb la correcció de continuïtat de Yates a partir de l'equació següent:

$$\chi^2 = \frac{(|FN - FP| - 1)^2}{FP + FN}$$

Si el valor obtingut era inferior al valor crític de la distribució de χ^2 amb 1 grau de llibertat i per $\alpha = 0,05$ ($\chi_{0,05;1}^2 = 3,841$), llavors no es rebutjava la hipòtesi nul·la i, per tant, es podia concloure que no hi havia cap tendència a obtenir més falsos negatius que falsos positius o viceversa.

Cal esmentar que el test de McNemar només podia aplicar-se si es complia $(FP + FN) > 10$; en la resta de casos calia aplicar un test exacte basat en la distribució binomial.