

Autoanticossos humans enfront antigens associats a l'embolcall nuclear

F. Lozano, L. Borche, M.E. Vallés, F. Isart, C. Mezquita*, T. Gallart
Servei d'Immunologia, Hospital Clínic i Provincial, Villarroel 170,
08036-Barcelona

(*) Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de
Barcelona

Abstract

Human autoantibodies to nuclear envelope associated antigens

An ANA-IFI pattern specific for nuclear membrane has recently been described in primary biliary cirrhosis (PBC), but there are no data about its antigenic specificity. In this work, we have performed an Western blot analysis of a nuclear matrix preparation from mice liver resistant to high salt solutions and nondenaturing detergents, to characterize the antigenic specificity of our PBC patients sera which have this ANA-IFI pattern. The sera reacted with proteins which molecular weight (69 kD and 62 kD) correspond to the referred for lamins A and C (respectively), two of the polypeptidics components of the nuclear lamina in mammals. This finding is also supported by an IFI study in which we appreciate the disappearance of the nuclear lamina during spermatogenesis.

Introducció

Dins del curs de malalties autoimmunes organinespecífiques és freqüent trobar autoanticossos davant de components o partícules subnuclears (DNA, centromerus, nucleolus, etc), així com davant de antigens nuclears solubles en condicions salines isotòniques (ENA o extractable nuclear antigens) (Sm, U1RNP, Ma, Scl-70, SS-A/Ro, SS-B/La, etc), el significat etiopatogènic de les quals és desconegut. No obstant s'han mostrat útils en el diagnòstic d'aquestes malalties considerant-se en alguns casos com marcador serològic de les mateixes (Tan, 1982). Per el contrari, poc s'en sap en tocant els anticossos dirigits contra proteïnes nuclears no histones presents en una estructura resistent al tractament amb nucleases e insoluble en condicions altament salines, coneguda com matriu nuclear (Salden et al, 1982). Un dels components principals de la matriu nuclear en les cèl.lules eucariotes el constitueix una estructura fibrilar anomenada làmina nuclear (LN), excepte de les regions adjacents als porus nuclears (Franke et al, 1981). Encara que l'embolcall nuclear (EN) no està completament definit des de el punt de vista bioquímic, és sap que el seu principal component estructural el la LN. En mamífers, la LN és troba constituïda per l'associació de tres polipeptids principals denominats làminines A, B i C, amb un pes molecular de 69, 67 i 62 kD, respectivament (Kaufmann et al 1983). Tant per la seva seqüència primària com secundària, avui dia s'ha sap que les làminines pertanyen estructuralment a la família de filaments intermediaris (McKeon et al, 1986).

Les dues úniques referències trobades per nosaltres d'autoanticossos humans reactius amb determinants antigènics presents en l'EN provenen d'en McKeon, que descriu els sèrums d'un malalt afectat d'una escleroderma lineal i d'un altre afectat de lupus eritematós

sistémic (LES) que reaccionen amb les laminines A i C (McKeon et al, 1983) i la pericromina (McKeon et al, 1984), respectivament. Així mateix, recentment Ruffatti et al (1985) ha descrit una elevada incidència d'autoanticossos antinuclears (ANA) reactius per immunofluorescència indirecta (IFI) amb l'EN en el sèrum de pacients afectats de cirrosi biliar primària (CBP) sense rendir comptes de l'especificitat antigènica detectada per els mateixos.

Havent observat nosaltres un fenomen similar en els nostres malalts de CBP i en un malalt afectat d'una síndrome de Sjogren, hem realitzat el present treball de caracterització mitjançant tècniques de IFI i Western blot, de la especificitat antigènica reconeguda per aquests sèrums, obtenint evidències de l'implicació dels components de la LN i d'altres proteïnes de la matriu nuclear en el fenomen referit.

Material y mètodes

Pacients i sèrums: Per tal d'evaluar la presència d'anticossos dirigits contra l'EN, és va estudiar un grup seleccionat de 40 malalts afectes de CBP diagnosticats i controlats per l'unitat hepàtica del nostre hospital i un altre control de 277 malalts ANA positius afectes de diversos processos autoimmunes no CBP.

Els sèrums de referència anti-U1RNP i anti-Scl-70 utilitzats com a controls van ésser cedits per el Centers for Disease Control de Atlanta.

IFI: Es varen emprar diversos substrats tissulars de diferents espècies animals, cap d'ells sotmèsos a fixació. Per el screening dels sèrums és varen utilitzar seccions criopreservades de 4-6 um de grossor de fetge i ronyó de rata. Amb altres fins el varen utilitzar talls de les mateixes característiques de testicles de ratolí i pollastre, impromptes de fetge de ratolí i cèl.lules Vero

(fibroblastes de mico) cultivades sobre porta-objectes. Els diferents substrats foren incubats amb dilucions (superiors a 1/10) dels sèrums en PBS durant 30 min y després de 3 rentats de 5 min amb PBS, amb un segon anti-sèrum de conill anti immunoglobulines humanes fluoresceinat (DAKO) a una dilució 1/40 per 30 min, seguit d'un nou procés de rentat. En els casos en que és van practicar contraincubació nuclear amb bromur d'etidi (1 ug/ml en PBS) és va afegir una gota del mateix després del darrer rentat. Les lectures és realitzaren amb un microscopi Leitz Ortholux II.

Anticòssos anti-DNA: La determinació d'aquests anticòssos va ésser realitzada per radioimmunoassaig (RIA) mitjançant un kit comercial anti-DNA (Amersham).

Fixació per proteïnes de citoesquelet: Seguint el mètode descrit per Dighiero et al (1983), cèl.lules Vero crescudes sobre porta-objectes varen ésser rentades amb PBS i fixades durant 20 min amb formaldehid al 3% en tampó fosfat dissodíic 0.01M pH 7.4 continguent MgCl₂ 1mM i CaCl₂ 0.1mM. Després de 3 rentats amb PBS, els porta-objectes varen ésser incubats 10 min amb NH₄Cl 50mM/PBS, seguit d'una incubació de 4 min amb NP 40 0.1%/PBS.

Preparació de l'extracte de matriu nuclear: Tot el procés, menys lo específicament indicat, fou realitzat a 4.C. El mètode empleat fou el de McKeon et al (1983) amb algunes modificacions (Benavente et al, 1985). El fetge de dos ratolins albins suïssos van ésser trossejats i homogeneïtzats manualment mitjançant un homogeneïtzador tipus Potter amb èmbol de teflon, en un tampó d'extracció continguent Tris-HCl 50mM pH 7.5, NaCl 50mM, MgCl₂ 5mM, Sucrosa 250mM, 2-ME 15mM, PMSF 1mM i NP40 0.5% a una relació teixit:tampó 1:5-1:10. Els nucleos foren separats del material citoplasmàtic mitjançant dos centrifugacions de 10 min a 3000 rpm. El pellet resultant va ésser resuspendit durant 5 min a 0.C en NaCl 3M, KCl

45mM, EDTA 5mM, Hepes 15mM, NP 40 1% pH 7.2 i després centrifugat 10 min a 5000 rpm. Finalment el pellet va ésser solubilitzat amb tampó de mostra de SDS-PAGE contenint 2-ME i EDTANa2.

Dot immunoblotting: Per a comprovar la correcta preparació de l'extracte de matriu nuclear en quant a la seva riquesa en material antigènic reactiu amb els sèrums positius amb l'EN és practicà un screening per dot-immunoblotting segons el mètode de Hawkes et al (1982).

Western blot: L'extracte de matriu nuclear solubilitzat en tampó de mostra va ésser sotmès a electroforèsis en gels de poliacrilamida al 8 o 12% contenint SDS (Laemmli et al, 1970). Una volta separades electroforèticament, les proteïnes varen ésser transferides a un full de nitrocel·lulosa (NC) segons el mètode de Towbin et al (1979). Es va procedir a bloquejar la NC 16h a 4.C en agitació rotatoria amb PBS/Ovoalbúmina 5% y 2h més amb PBS/sèrum de cavall 1%. Es retallaren tires de NC que varen incubar-se durant 2h a temperatura ambient amb els sèrums humans diluïts 1/20 en PBS/Ovo 5%. Darrera tres rentades de 10 min amb agitació rotatoria en PBS/Tween 20 0.05%, les tires varen incubar-se 1h amb un sèrum de conill anti immunoglobulines humanes marcat amb peroxidasa (DAKO) diluït 1/400 en PBS/Ovo 5% contenint sèrum de conill no immune al 1%. Després de tres rentats de 10 min amb PBS/Tween 20 0.05%, les tires varen ésser incubades finalment amb un sèrum de porc anti immunoglobulines de conill marcat també amb peroxidasa (DAKO) diluït aixímateix 1/400 en PBS/Ovo 5%. Després de nous rentats es revelaren amb una solució de substrat contenint 1mg de Diaminobenzidina (Sigma) i 2ul de H2O2 30% (Panreac) per cada 10ml de PBS.

Resultats

Mitjançant la tècnica de IFI sobre talls de fetge i ronyó de rata es

va detectar la presència d'un fi anell fluorescent nuclear (Fig. 1) reproduint l'EN en 21 (52.5%) del 40 sèrums de malalts afectats de CBP. Per el contrari, tan sols 2 malalts (un afecta d'una síndrome de Sjogren associat a un linfooma no Hodgkin i un altre amb una tiroiditis de Hashimoto) d'un grup control de 277 pacients ANA positius portadors de diversos processos autoimmunes no CBP (0.72%), presentaven el esmentat anell nuclear. En alguns casos, la presència d'anticòssos antimitocondrials en els sèrums de CBP a dilucions baixes, impedia la visualització del patró de fluorescència descrit, i tan sols la dilució seriada dels mateixos permetia objectivar-los finalment.

Alguns dels sèrums més significatius en quant aquest patró van ésser testats amb cèl.lules Vero cultivades sobre porta-objectes, comprovant-se, encara que tènue, idèntica reactivitat amb l'EN. Per el contrari, mitjançant impromptes de fetge de ratolí és va poder caracteritzar morfològicament amb més nitidesa la reactivitat amb l'esmentat EN (Fig. 2).

Amb una fixació específica per el citoesquelet no és va apreciar reactivitat creuada d'aquests sèrums amb filaments intermediaris citoplasmàtics presents en cèl.lules d'estirp fibroblàstica Vero. Aquests mateixos sèrums van ésser testats sobre talls de testicle de ratolí i pollastre poden-se comprovar com reproduïen l'anell de fluorescència nuclear sobre cèl.lules somàtiques presents en l'interstici tubular i sobre cèl.lules de Sertoli i espermatogonies situades a prop de la membrana basal del túbul seminífer. Per el contrari, el esmentat anell era ausent en cèl.lules germinals diferenciades situades més cap a la llum tubular (Fig. 3).

Tots els sèrums amb el patró de fluorescència nuclear en anell foren testats per una tècnica de RIA per descartar la existència d'anticòssos anti-DNA sense haver-se trobat en cap cas valors

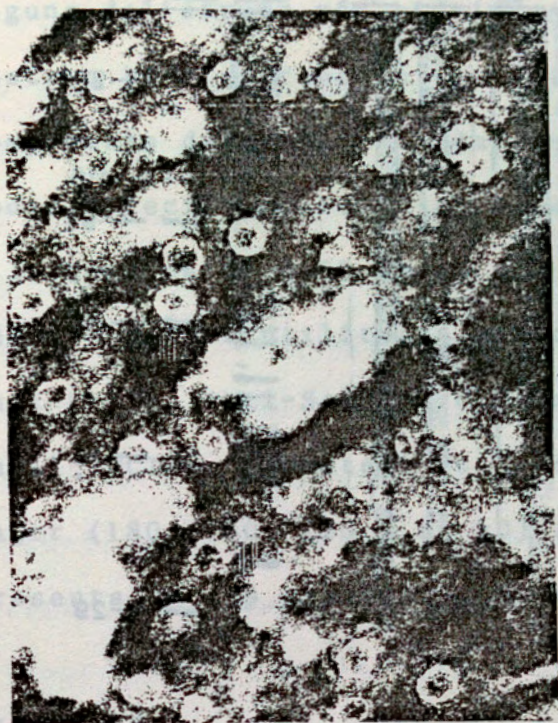


Fig. 1

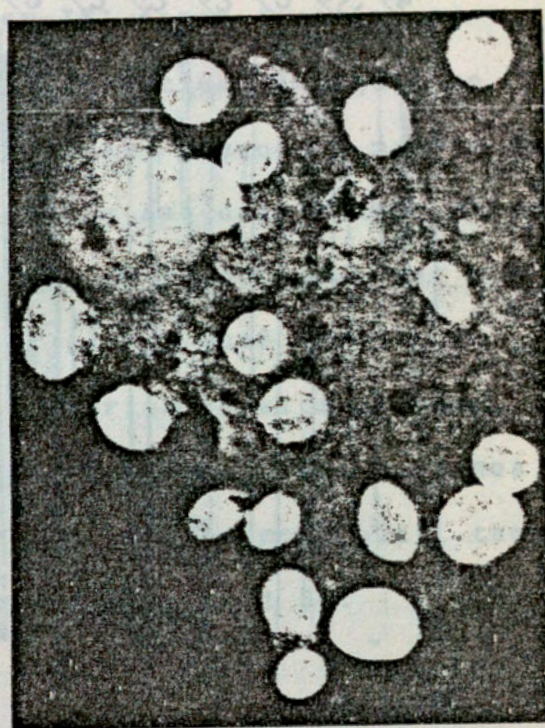


Fig. 2

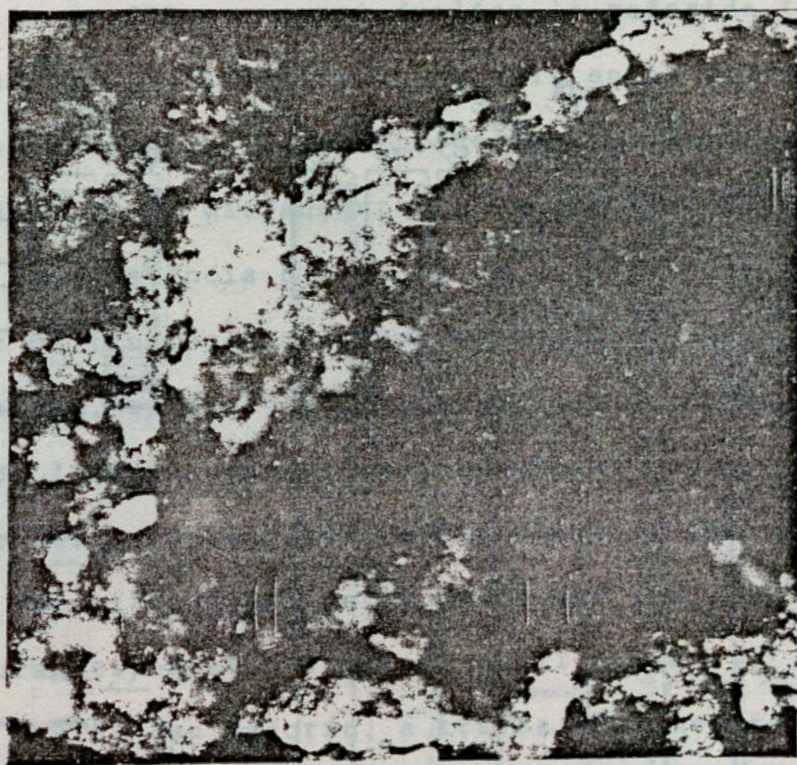


Fig. 3

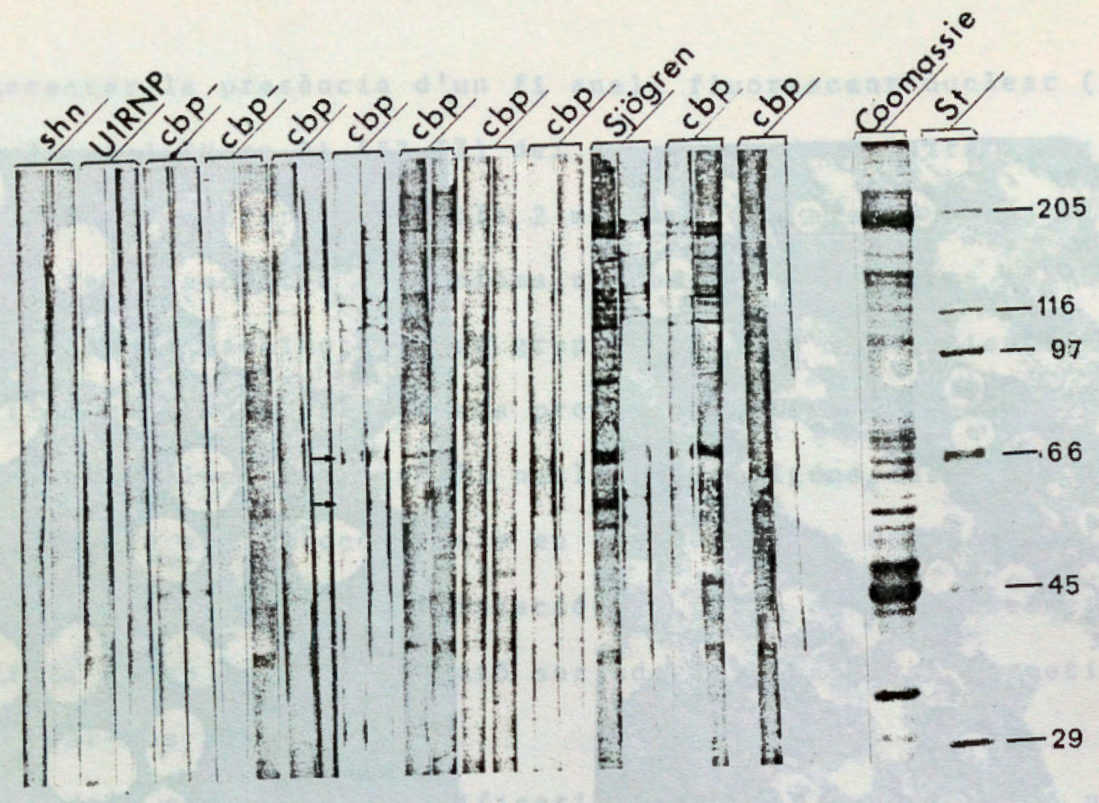


Fig. 4

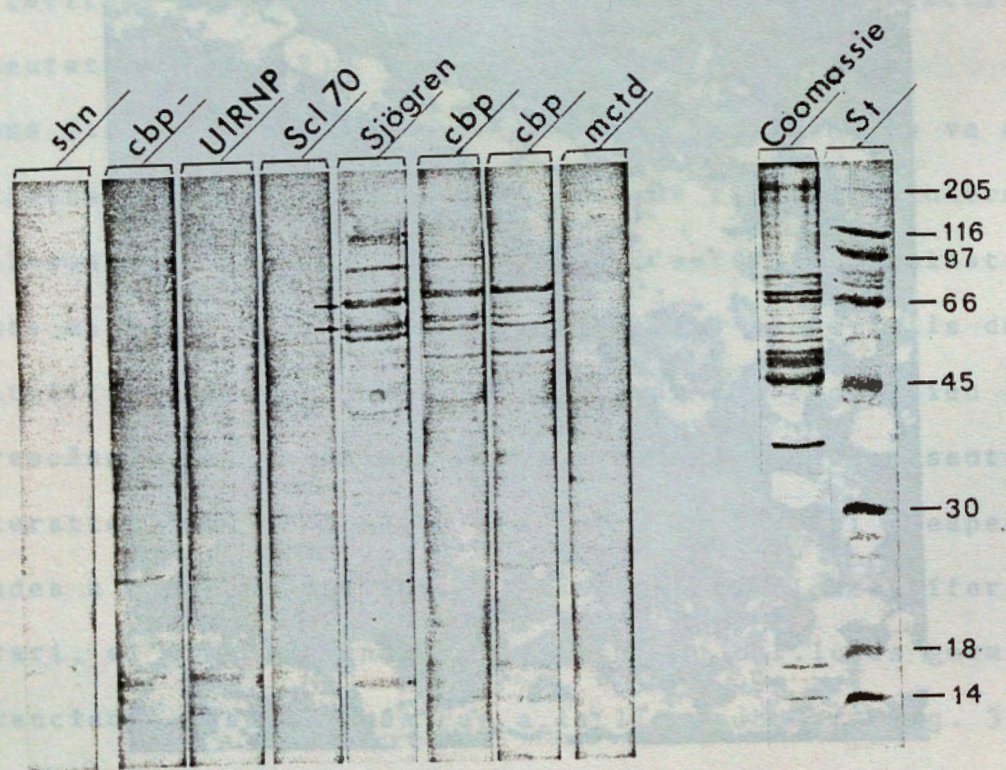


Fig. 5

superiors als normals (inferiors a 25 U/ml). Alguns del sèrums més significatius per IFI foren testats per Western blot enfront un extracte de matriu nuclear enriquit en components del complexe làmina-porus nuclear. D'aquesta manera és va poder apreciar reactivitat en alguns d'ells amb dues bandes situades a la zona de 69 i 62 kD de pes molecular, no reconegudes per els sèrums control utilitzats per nosaltres (sèrum humà normal, anti-UlRNP, anti-Scl 70, CBP anti-mitocondrials positius sense anell, MCTD). Tanmateix és detectaren bandes addicionals en zones de major (180, 150, 120 i 84 kD) i menor (58 kD) pes molecular, tampoc presents en els esmentats sèrums controls (Fig. 4 i 5).

Discussió

En el present treball hem detectat una elevada incidència (52.5%) d'anticòssos dirigits contra determinants presents en l'EN en malalts afectes de CBP que quasi duplica la referida (28.5%) per Ruffatti et al (1985), coincidint amb ells en la quasi nul·la aparició dels mateixos en altres processos autoimmunes. En tots els casos és va descartar, mitjançant RIA (un mètode molt més sensible que la IFI), la existència d'anticòssos anti-DNA responsables d'un patró similar de fluorescència nuclear conegut com "perifèric" (Tan, 1982). No obstant, el esmentat patró perifèric es fàcilment distingible de l'anell observat per nosaltres pel seu caràcter més groller, reproduint la heterocromatina nuclear. Per un altre costat, creiem haver identificat amb certa exactitud morfològica com l'EN és l'estructura responsable d'aquest anell nuclear. Gerace et al (1978) han descrit, a través d'un heteroantisèrum, com els components polipeptídics de la LN és localitzen per IFI en la perifèria del nucli interfàsic, reproduint morfològicament l'EN. Tan sols s'han descrit dos sèrums autoimmunes humans que reaccionen

amb determinants antigènics presents en l'EN de cèl.lules interfàsiques. Un d'ells pertanyent a un malalt afecte de escleroderma lineal i que reconeix les laminines A i C (McKeon et al 1983) i un altre trobat en un malalt afecte de lupus eritematós sistèmic que identificava un altre proteïna de la matriu nuclear de 33 kD anomenada pericromina (McKeon et al, 1984).

Encara que desconeixem el comportament de la pericromina al llarg de la espermiogènesis, els nostres sèrums no donen el típic patró anular sobre les estapes maduratives més avançades de la espermatogènesis, la qual cosa concorda amb la descripció de Stick et al (1982) tocant a la desaparició de la LN en aquells mateixos estadios diferenciats.

Mitjançant SDS-PAGE i immunoblotting, els nostres sèrums més significatius identificaren bandes aparents a la zona de 69 i 62 kD, que és el pes molecular descrit per les laminines A i C respectivament (Kaufmann et al 1983), les quals, a diferència de la laminina B, estan molt interrelacionades estructuralment. La resta d'especificitats antigèniques presents a la matriu nuclear reconegudes per nostres sèrums podrien ésser degudes a la multiespecificitat dels mateixos i a la complexitat del sistema antigènic emprat en la seva detecció. Així mateix hem observat que no existeix una correlació absoluta entre les tècniques de IFI y Western blot en la detecció d'aquest sistema antigen-anticòs, tal com a estat descrit per altres sistemes. La configuració física del antigen podria col.laborar en major sensibilitat de la tècnica de IFI en el nostre cas.

Molt recentment s'ha descrit la gran homologia existent en quan a estructura primària i secundària dels components de la LN amb la família dels filaments intermediaris citoplasmàtics (McKeon et al, 1986). Basant-nos en aquest fet varen pensar en la possibilitat de

que existeixen determinants antigènics compartits per ambdós tipus de proteïnes estructurals identificables per els nostres sèrums, o més bé, que de forma espontànea existeixin anticòssos naturals enfront a les mateixes, com a descrit Guilbert et al (1982). El resultat va ésser negatiu per el que pensem que els sèrums poden reconeixer epítopes presents a les zones menys conservades d'aquestes molècules, es a dir, a les zones no alfa helicoidals a on són principalment les diferències trobades entre els integrants d'aquesta familia de proteïnes. Malgrat les evidències descrites en el present treball és fa necessari un estudi més detallat per assegurar que en el nou sistema antigen-anticòs detectat per nosaltres està implicada la LN.

Bibliografia

- BENAVENTE R., KROHNE G., FRANKE W.W. (1985). Cell type-specific expression of nuclear lamina proteins during development of *Xenopus Laevis*. *Cell* 41, 177-190
- DIGHIERO G., LYMBERI P., MAZIE J.P., ROUYRE S., BUTLER-BROWNE G.S., WHALLEN G., AVRAMEAS S. (1983). Murine hybridomas secreting natural monoclonal antibodies reacting with self antigens. *J Immunol* 131, 2267-2272
- FRANKE W.W., SCHEER U., KROHNE G., JARASCH E. (1981). The nuclear envelope and the architecture of the nuclear periphery. *J Cell Biol* 91, 39s-50s
- GERACE L., BLUM A., BLOBEL G. (1978). Immunocytochemical localization of the major polypeptides of the nuclear pore complex-lamina fraction. Interphase and mitotic distribution. *J Cell Biol* 79, 546-566
- HABETS W.J., DE ROOIJ D.J., SAKDEB M.H., VERGAGEB A.P., VAN EEKELEN C.A., VAN DE PUTTE L.B., VAN VENROOIJ W.J. (1983). Antibodies against distinct nuclear matrix proteins are characteristic for mixed connective tissue disease. *Clin Exp Immunol* 54, 265-276
- HAWKES R et al (1982). A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal Biochem* 119, 142-147
- KAUFMANN S.H., GIBSON W., SHAPER J.H. (1983). Characterization of the major polypeptides of the rat liver nuclear envelope. *J Biol Chem* 258, 2710-2719
- LAEMMLI U.K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680
- McKEON F.D., TUFFANELLI D.L., FUKUYAMA K., KIRSCHNER M.W. (1983). Autoimmune response directed against conserved determinants of nuclear envelope proteins in a patient with linear scleroderma. *Proc Natl Acad Sci USA* 80, 4374-4378

- McKEON F.D., TUFFANELLI D.L., KOBAYASHI S., KIRSCHNER M.W. (1984). The redistribution of a conserved nuclear envelope protein during the cell cycle suggest a pathway for chromosome condensation. *Cell* 36, 83-92
- McKEON F.D., KIRSCHNER M.W., CAPUT D. (1986). Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature* 319, 463-468
- PENNER E., KINDAS-MUGGE I., HITCHMAN E., SAUERMAN G. (1986). Nuclear antigens recognized by antibodies present in liver disease sera. *Clin Exp Immunol* 63, 428-433
- RUFFATTI A., ARSLAN P., FLOREANI A., DE SILVESTRO G., CALLIGARO A., NACCARATO R., TODESCO S. (1985). Nuclear membrane-staining antinuclear antibody in patients with primary biliary cirrhosis. *J Clin Immunol* 5, 357-361
- SALDEN M.H.L., VAN EEKELEN C.A.G., HABETS W.J., VIERWINDEN G., VAN DE PUTTE L.B.A., Van Venrooij W.J. (1982). Antinuclear matrix antibodies in mixed connective tissue disease. *Eur J Immunol* 12, 783-786.
- STICK R., SCHWARZ H. (1982). The disappearance of the nuclear lamina during spermatogenesis: an electron microscopic and immunofluorescence study. *Cell Diff* 11, 235-243
- TAN E.M. (1982). Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): Their immunobiology and medicine. *Adv Immunol* 33, 167-240
- TOWBIN H., STACHELIN T., GORDON J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 4350-