

ROLUL IMUNOBLOTULUI ÎN DIAGNOSTICUL PARACLINIC AL PEMFIGUSULUI VULGAR ȘI PEMFIGOIDULUI BULOS

LUMINIȚA MUNTEANU*, V. BENEĂ**, A. DINU***

București

Rezumat

Dezvoltarea metodelor de laborator a adus o contribuție importantă în cercetarea, clasificarea și diagnosticul paraclinic al afecțiunilor buloase autoimune cutanate. În timp ce imunofluorescența și kiturile ELISA sunt instrumente uzuale în multe laboratoare, imunoblotul este mai puțin accesibil datorită dificultăților tehnice de realizare și a costurilor mult mai mari. Scopul articolului este prezentarea pe scurt a principiilor fizico-chimice care stau la baza realizării imunoblotului, cu evidențierea acelor aspecte utile pentru interpretarea rezultatului de către clinician pentru a ajunge la o concluzie rațională; de asemenea am încercat să stabilim rolul pe care îl joacă această investigație în algoritmul de diagnostic.

Cuvinte cheie: imunoblot, pemfigus vulgar, pemfigoid bulos

Summary

The development of the laboratory methods brings a huge contribution to research, classification and laboratory diagnosis of the autoimmune blistering skin diseases. While immunofluorescence and ELISA kits are ordinary tools in many laboratories, immunoblot method is less accessible due to the technical difficulties and higher costs. The aim of the paper is a briefly presentation of the physical and chemical basis of the immunoblot method, especially those features which are important for physicians to draw up a rational conclusion; also, we tried to establish the role played by this investigation in the diagnosis scheme.

Key words: immunoblotting, pemphigus vulgaris, bullous pemphigoid

DermatoVenerol. (Buc.), 50: 137-142

Imunoblotul

Imunoblotul reprezintă o metodă rapidă și sensibilă utilizată pentru identificarea unor antigene (proteine, glicoproteine) cu ajutorul anticorpilor monoclonali sau policlonali, pe baza legării specifice antigen-anticorp (pot fi detectate niveluri de până la 1 ng de antigen). Ca metodă de laborator, în domeniul dermatologiei imunoblotul poate aduce informații asupra:

1. prezenței în serul pacientului a autoanticorpilor circulanți și a tipului de auto-

anticorpi (IgG, IgA, IgM, IgE), dacă este cunoscut antigenul-țintă;

2. asupra antigenului – țintă pentru autoanticorpi prezenți în ser, folosindu-se ca martori pozitivi autoanticorpi monoclonali sau ser cu reactivitate cunoscută.

Antigenul-țintă este anterior fixat pe o membrană de nitroceluloză, prin electroforeză, și apoi incubat cu serul ce urmează să fie investigat. Sursa antigenului-țintă poate fi:

- Extractul epidermic. Acesta este sursă pentru antigenele pemfigoidului bulos BP230 și BP180 (molecule integrale);

* Spitalul Municipal Câmpulung-Muscel, Argeș.

** Centrul Dermato-venerologic, Spitalul Clinic de Dermato-venerologie „Prof. Dr. Scarlat Longhin”, București.

*** Colectivul de Cercetări Biofizice, U.M.F. „Carol Davila”, București.

izolarea în benzi distincte a celor două antigene pe membrana de nitroceluloză se realizează prin electroforeză în gel de poliacrilamidă în condiții denaturante [1].

- Supernatantul culturilor keratinocitare. Este sursă de LAD-1 [2], un produs de clivaj al proteinei BP180 cu greutatea moleculară de 120 kDa și care reprezintă aproape întregul domeniu extracelular al acesteia (fig. 1). Prezența și semnificația biologică ale reactivității anti-LAD-1 în pemfigoidul bulos nu sunt cunoscute [1, 2].

În scopul creșterii sensibilității metodei, se pot folosi ca ținte antigenice proteine recombinante obținute prin inginerie genetică și purificate ulterior prin tehnici de cromatografie de afinitate sau imunoprecipitare. Pentru diagnosticul de pemfigoid bulos au fost puse la punct tehnici de imunoblot care folosesc ca substrat antigenic *BP180 full-length* (molecula integrală obținută prin exprimare în baculovirus și izolată prin cromatografie de afinitate) și segmentul antigenic *BP180NC16A* (proteina recombinantă exprimată în *E. coli 5*, considerată a fi epitopul imunodominant din structura antigenului BP180).

Pe scurt, efectuarea imunoblotului presupune incubarea stripurilor, decupate din membrana de nitroceluloză, pe care este fixat antigenul-țintă, cu serul de la pacient, urmată de declanșarea reacției antigen-anticorp. Complexul antigen-anticorp este identificat prin incubarea cu un al doilea anticorp (denumit secundar) anti-immoglobulină umană (IgG, IgM, IgA sau IgE), marcat enzimatic (fosfatază alcalină sau peroxidază). Citirea reacției este colorimetrică iar rezultatul constă în obținerea unei benzi colorate care indică prezența complexului antigen-anticorp din serul pacientului. Pentru a evita reacțiile fals pozitive sau negative se efectuează în paralel controale pozitive și negative.

Comparativ cu imunobloturile care folosesc extractul epidermic sau supernatantul din culturile de keratinocite, imunobloturile cu proteine purificate sunt mult mai performante deoarece:

- puritatea amestecului proteic este mult mai mare, și prin urmare scade semnificativ riscul reacțiilor fals pozitive prin legări

nespecifice și crește limita de detecție a autoanticorpilor (sensibilitatea metodei);

- membranele conțin o cantitate mare de proteină-țintă antigenică ceea ce crește sensibilitatea metodei (depistarea anticorpilor circulanți cu concentrații mici în ser);
- membranele conțin o cantitate mare de proteină-țintă antigenică, nefiind necesară o expunere îndelungată în cursul dezvoltării și astfel se evită apariția unor reacții fals positive; în acest mod crește specificitatea metodei;
- fracțiunea cu proteina de interes purificată conține foarte puține substanțe contaminante astfel încât benzile finale din blot sunt mult mai clare, mai bine individualizate și mai ușor de identificat prin comparație cu standardul de greutate moleculară

Un dezavantaj este însă separarea antigenului-țintă din amestecul inițial prin electroforeză în gel în condiții denaturante. Prin denaturarea proteinelor este distrusă conformația (structura spațială nativă) epitopilor specifici, cu repercursiuni asupra sensibilității și specificității metodei.

Electroforeza în gel de poliacrilamidă în condiții denaturante (prin adăugare de sodiumdodecyl sulfat, SDS-PAGE)

Este o etapă premergătoare imunoblotului, care permite obținerea proteinei-țintă (ținta antigenică) pe membrana de nitroceluloză sub forma unei benzi proteice, separată de celelalte componente ale amestecului inițial. Sensibilitatea imunoblotului depinde în mod determinant de puritatea și de cantitatea proteinei-țintă.

Proteinele de interes (respectiv țintele antigenice) obținute prin electroforeză pot fi transferate din gel pe membrane de nitroceluloză și utilizate în imunoblot.

Gelurile de poliacrilamidă se formează prin polimerizarea acrilamidei monomerice în lanțuri polimerice și legarea între ele a lanțurilor prin N,N'-methylenacrylamida. SDS (sodiumdodecyl sulfat) este un detergent care disociază proteina (dacă este formată din mai multe subunități) și desfășoară complet fiecare lanț polipeptidic, formând un complex SDS-polipeptid (ca o

frânghie lungă). În acest complex, lanțul polipeptidic este acoperit cu un strat de molecule de SDS astfel încât lanțurile hidrocarbonate ale acestora (moleculele de SDS) sunt într-o strânsă asociere hidrofobă cu lanțul polipeptidic iar grupările sulfat încărcate electric din detergent sunt expuse la mediul apos. Astfel de complexe conțin un raport constant SDS/proteină (aproximativ 1,4 / 1) și diferă numai prin masa lor. Când proteinele cu un singur lanț polipeptidic, tratate cu SDS sunt supuse electroforezei într-un gel cu rol de sită moleculară care conține SDS, viteza lor de migrare este dată de masa moleculară a particulei SDS-polipeptid, pe baza principiului excluderii moleculare. Câmpul electric furnizează forța care dirijează "cernerea" moleculară. Pentru calibrarea unui gel se supun migrării, comparativ, proteine de masă moleculară cunoscută (standarde de greutate moleculară).

Localizarea proteinelor în gel poate fi determinată fie prin colorarea cu Coomassie blue fie cu argint [3, 4]. Detecția cu Coomassie blue depinde de legarea nespecifică a colorantului de proteine. Limita de detecție este de 0,3 până la 1 g/banda de proteină.

Locul imunoblotului în algoritmul de diagnostic al pemfigusului vulgar și pemfigoidului bulos

În cazul pemfigusului vulgar, prezența autoanticorpilor circulanți anti-desmogleină 1 și 3 (anti-Dsg 1 și 3) nu este verificată de rutină prin imunoblot deoarece sunt disponibile truse ELISA care sunt mult mai ușor de folosit, au un cost mai mic și sunt foarte sensibile în identificarea reactivității IgG față de forme recombinante ale Dsg 1 și 3 (domeniile extracelulare). Titrul autoanticorpilor circulanți mai poate fi determinat, dar cu o sensibilitate mai mică, prin imunofluorescența indirectă. Titrul autoanticorpilor circulanți (determinat prin imunofluorescența indirectă sau ELISA) se corelează cu gradul de activitate al bolii și evoluția sub tratament. Dificultatea constă în excluderea pemfigusului cu reactivitatea de tip IgA, situație în care imunofluorescența directă și indirectă sunt de neînlocuit (kiturile ELISA comerciale nu sunt utile deoarece nu măsoară decât autoanticorpi circulanți IgG). În cazul în care rezultatul

imunofluorescenței nu este satisfăcător (rezultate neinterpretabile, titrul mic al autoanticorpilor circulanți) se poate recurge la verificarea prezenței autoanticorpilor prin imunoblot. Imunoblotul este obligatoriu pentru confirmarea sau excluderea din diagnosticul diferențial a pemfigusului paraneoplazic; detectarea prin imunoblot a autoanticorpilor circulanți față de periplakine și envoplakine este unul dintre cele trei criterii cu specificitate și sensibilitate foarte mari în diagnosticul pemfigusului paraneoplazic [5].

Imunoblotul este mult mai util în stabilirea diagnosticului de pemfigoid bulos (BP). Pemfigoidul bulos a fost descris prima dată de Lever în 1953 [6] iar în 1967 Jordon et al [7] au demonstrat că în serul pacienților cu BP există autoanticorpi care se fixează la nivelul zonei membranei bazale cutanate, în asociere sau nu cu depozite de C3.

Tehnicile avansate de biochimie și imunologie au permis descrierea amănunțită la nivel molecular a autoantigenelor din BP, respectiv PB180 și PB230. Aceste două structuri sunt produsul a două gene distincte [8-10]: gena care codifică PB230 se află pe brațul scurt al cromozomului 6, locusul 6p11-12 [11] iar gena care codifică PB180 se află pe brațul lung al cromozomului 10, locusul 10q24.3 [12].

BP230 este membră a familiei plakinelor și este omologă cu desmoplakinele și plectina, componente ale plăcii desmozomale [13-15]. PB230 este localizată în placa hemidesmozomală intracelulară [16, 17] și are un rol important în atașarea citoscheletului (filamentele de keratină) de hemidesmozomi. Autoanticorpii din BP recunosc epitopi multipli localizați la nivelul domeniului -helicoidal central, flancat de două domenii globulare. În practica medicală autoanticorpii anti-BP230 pot fi măsurați prin imunofluorescența indirectă, metodă care determină simultan anticorpii circulanți anti-BP230 și anti-BP180, fără a se cunoaște proporția lor. Titrul autoanticorpilor circulanți măsurat prin imunofluorescența indirectă nu se corelează cu evoluția bolii. Din acest motiv, cercetătorii au încercat să găsească alți parametri paraclinici de urmărire a evoluției. Se consideră că localizarea intracelulară a BP230 nu îi conferă un rol în inițierea răspunsului inflamator autoimun, dar că ar putea interveni în amplificarea reacției

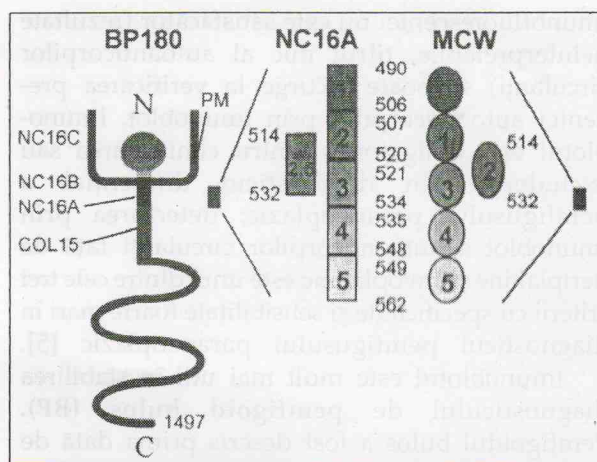


Fig. 1. Reprezentarea schematică a BP180 (după E. Schmidt și D. Zillikens [1])

BP180 este alcătuită din trei domenii: intracelular (NC16C), transmembranar (NC16B) și extracelular

inflamatorii după lezarea celulelor bazale care oferă accesul autoanticorpilor la antigen.

BP180 (proteină-antigen identificată după migrarea electroforetică, cu greutatea moleculară 180 kDa) este o proteina antigenică din structura hemidesmozomilor. BP180 (sau colagenul de tip XVII) este o proteină transmembranară cu o orientare de tip II: capătul NH₂ – terminal, intracitoplasmatic, și capătul COOH – terminal către *lamina lucida* (fig. 1). Proteina BP180 este alcătuită din trei domenii: domeniul intracelular globulos, necolagenic (NC16C), domeniul transmembranar, necolagenic (NC16B) și domeniul extracelular (ectodomeniul). Domeniul extracelular cuprinde trei segmente:

1. segmentul necolagenic NC16A
2. segmentul colagenic COL 15 care cuprinde 15 domenii colagenice întrerupte; acestea două segmente formează împreună un segment rigid ce străbate *lamina lucida*
3. capătul carboxi-terminal localizat în *lamina densa*.

Ectodomeniul traversează complet *lamina lucida* și se proiectează în *lamina densa*. Domeniul proximal necolagenic NC16A a fost divizat în 5 regiuni fiecare cu o lungime de aproximativ 15 aminoacizi. În interiorul segmentului BP180NC16A au fost identificați 6 epitopi diferiți denumiți MCW-0 până la MCW-5. Reactivitatea în BP este în principal adresată epitopilor MCW-0, 1, 2 și 3 [18].

Până nu demult, când nu existau truse ELISA de măsurare a titrului autoanticorpilor IgG anti-BP180NC16A, imunoblotul era metoda de elecție de identificare a reactivității anti-BP180 și BP230 și de excludere a altor afecțiuni buloase subepidermice care prezentau în imunofluorescență banda fluorescentă dermo-epidermică și autoanticorpi circulanți IgG. Acuratețea diagnosticului de BP este și mai mare dacă se efectuează concomitent și imunofluorescența indirectă pe substrat de piele umană clivată artificial pentru că se elimină din diagnosticul diferențial bolile buloase cu reactivitate IgG care marchează fluorescent versantul dermic al bulei artificiale (epidermoliza buloasă dobândită, lupusul eritematos sistemic bulos, pemfigoid anti-p200, pemfigoid anti-p105, pemfigoid cicatricial cu autoanticorpi anti-laminina 5 și 6). Dacă în imunofluorescența indirectă pe substrat de piele umană clivată artificial se obține marcarea fluorescentă a versantului epidermic a bulei artificiale devine absolut necesară efectuarea imunoblotului pentru a elimina din diagnostic alte afecțiuni cu reactivitate IgG dar cu fixare de autoanticorpi cu această morfologie (pemfigoid gestationis, lichen plan pemfigoid). Imunoblotul ajută la identificarea țintei antigenice specifice BP, adică epitopul dominant BP180NC16A. Este însă o metodă calitativă, insuficientă pentru urmărirea evoluției bolii. Din nevoia de a găsi un parametru cantitativ a fost elaborată o trusă ELISA având drept țintă antigenică fragmentul peptidic BP180NC16A care măsoară titrul autoanticorpilor circulanți de tip IgG. Acest titru se corelează cu gradul de activitate a bolii și cu evoluția sub tratament [19].

Regiunea imunodominantă BP180NC16A este ținta antigenică pentru autoanticorpi în aproximativ 90% din cazurile de BP [18-22]. Totuși, răspunsul autoimun în BP este destul de heterogen; 60% din seruri reacționează cu porțiunea intracelulară a BP180, iar 20-30% cu alți epitopi extracelulari diferiți de BP180NC16A [23-26]. Un subset mare de pacienți diagnosticați cu BP (67%) reacționează cu o proteină liniară cu greutatea moleculară de 120 kd secretată de keratinocitele în cultură [27] și denumită LAD-1 deoarece a fost identificată prima dată drept țintă antigenică pentru autoanticorpii pacienților cu dermatoza cu IgA liniare [28].

