

3. RESULTATS

3.1. OBTENCIÓ DE LA PROTEÏNA DE FUSIÓ SS-B (La)-His

El primer objectiu del treball fou construir un vector recombinant que permetés expressar la proteïna de fusió SS-B (La)-His en un sistema procariota i, seguidament, purificar i caracteritzar molecularment i antigènicaament aquesta proteïna.

3.1.1. Construcció del vector d'expressió de SS-B (La)-His

La construcció del vector d'expressió de la proteïna de fusió SS-B (La)-His es va dividir en 3 etapes: l'obtenció de l'insert a partir del cDNA i la seva preparació per poder ser clonat al vector d'expressió; la preparació del vector d'expressió amb uns extrems compatibles als de l'insert; i, finalment, la unió dels dos fragments per obtenir el vector recombinant d'expressió.

3.1.1.1. Preparació de l'insert

El cDNA codificant per a la proteïna SS-B (La) es va obtenir per PCR usant com a DNA motlle el plàsmid pM9, gentilment cedit pel Dr. Chan, en el que prèviament havia estat clonat (Chan et al., 1989b), i s'afegiren les dianes pels enzims de restricció *Nde* I i *Hind* III als extrems 5' i 3', respectivament (apartat 2.3.1.1). El resultat de la reacció es visualitzà mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa a l'1% (apartat 2.2.3) i s'obtingué una banda d'entre 1 i 1,5 kb que coincidia amb la mida teòrica del cDNA, 1226 pb (figura 3.1).

Seguidament es procedí a clonar el cDNA obtingut al vector pCR 2.1 mitjançant una reacció de lligació (apartat 2.2.2.1). El plàsmid recombinant resultant es transferí a cèl·lules *Escherichia coli* de la soca INV F' (apartat 2.2.5.1) que s'inocularen en plaques amb medi sòlid selectiu (LB-agar-ampicil·lina) i X-Gal. S'obtingueren 6 clons de color blanc que, en principi, corresponien a les cèl·lules que havien incorporat el plàsmid lligat amb l'insert (pCR 2.1-SS-B) i un nombre elevat de clons de color blau que corresponien, teòricament, a les cèl·lules que havien estat transformades amb el plàsmid sense insert (pCR 2.1). A partir del clons blancs es van preparar 6 minicultius diferents de 5 mL que es van deixar créixer durant tota la nit a 37°C i a 220 rpm. A continuació es recolliren i es purificà el DNA plasmídic de cadascun d'ells tal com s'ha descrit a l'apartat 2.2.1.1.

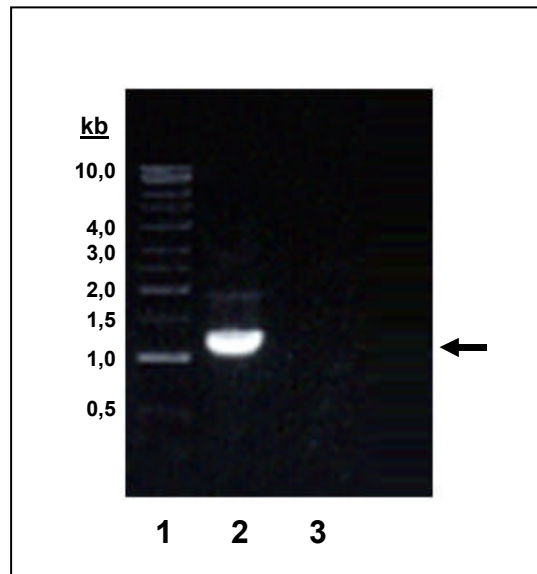


Figura 3.1. Electroforesi en gel d'agarosa a l'1% de les mostres resultants de la PCR. 1, *kb marker*; 2, pM9; 3, control.

Aprofitant l'existència al vector pCR 2.1 de dues dianes per a l'enzim de restricció *EcoR* I situades a cada banda de lloc d'inserció del fragment clonat, es realitzà una digestió amb aquest enzim per comprovar la mida de l'insert clonat (apartat 2.2.2.2). El resultat de la reacció de digestió es visualitzà de nou per electroforesi en gel d'agarosa a l'1% (figura 3.2). De les 6 purificacions efectuades, 3 (carrils 5 a 7) presentaven un patró de bandes que podien correspondre a l'insert de SS-B (La) clonat: la banda del plàsmid al voltant de la banda del marcador de 4 kb (la mida real és de 3,9 kb) i la banda de l'insert entre les bandes de 1,0 i 1,5 kb (la mida real és d'aproximadament 1,2 kb). La resta (carrils 2 a 4) també presentaven dues bandes, però es van descartar perquè la mida observada no coincidia amb la de les bandes esperades.

A continuació es procedí a la preparació de l'insert per ser clonat al vector d'expressió. Per tal d'obtenir uns extrems cohesius que asseguressin el clonatge unidireccional, es va dur a terme una digestió amb l'enzim de restricció *Nde* I del plàsmid recombinant pCR 2.1-SS-B purificat i, seguidament, una segona digestió amb l'enzim *Hind* III (apartat 2.2.2.2). El resultat de la reacció s'aplicà a un gel d'agarosa de baix punt de fusió a l'1% i es realitzà l'electroforesi (figura 3.3, carrils 2 i 3). Es va obtenir una banda per sobre del marcador de 3,5 kb i una altra entre els marcadors de 1,5 kb i 2 kb, que coincidien amb la mida esperada del plàsmid (3,7 kb) i de l'insert (1226 bp), respectivament.

Finalment, l'insert, ja a punt per a ser clonat, es recuperà del gel d'agarosa mitjançant el protocol de purificació descrit a l'apartat 2.2.1.2.

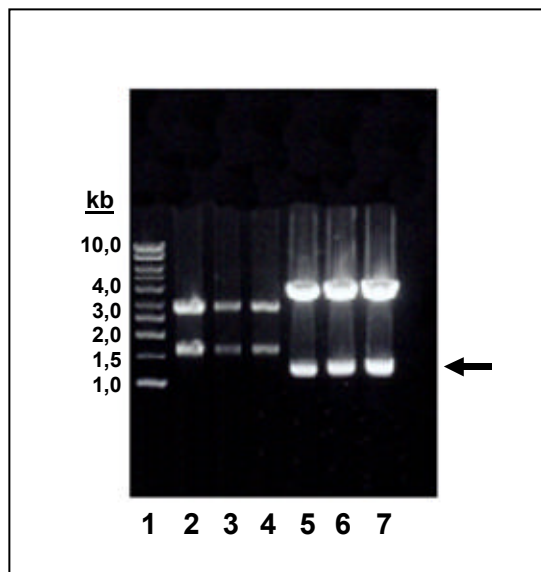


Figura 3.2. Electroforesi en gel d'agarosa a l'1% de la digestió de comprovació amb *EcoR* I dels plàsmids purificats a partir de colònies blanques. 1, *kb marker* (kb: kilobases); 2-7, plàsmids digerits.

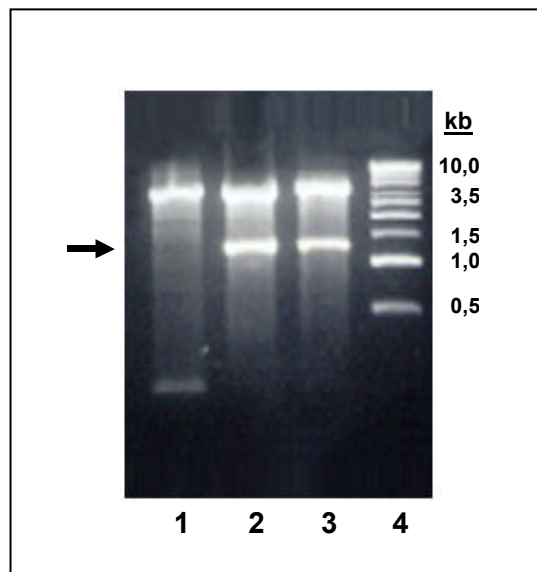


Figura 3.3. Electroforesi en gel d'agarosa a l'1% de la doble digestió amb *Nde* I i *Hind* III de: 1, plàsmid d'expressió pET-20b(+); 2-3, construcció pCR 2.1-SS-B. 4, *kb marker* (kb: kilobases).

3.1.1.2. Preparació del vector d'expressió

El vector d'expressió pET-20b(+) de Novagen es va haver de linealitzar de manera que els extrems fossin compatibles amb els de l'insert. Per tant, també es realitzà una digestió doble amb *Nde* I i *Hind* III (apartat 2.2.2.2). El resultat de la digestió s'aplicà a un gel d'agarosa de baix punt de fusió a l'1% i es realitzà l'electroforesi (figura 3.3, carril 1). S'obtingué una banda per sobre del marcador de 3,5 corresponent al vector lineal (la mida real és de 3.716 bp) i una de mida molt menor (bastant per sota de la banda del marcador de 0,5 kb) que podia correspondre al fragment del vector comprès entre les dues dianes de restricció. La presència d'una sola banda del vector en el gel d'electroforesi indicava que la digestió era total, ja que sinó s'haguessin observat diferents bandes corresponents a diferents estats d'enrotllament del DNA plasmídic.

Anàlogament a l'insert, el vector d'expressió es recuperà del gel d'electroforesi amb el protocol de purificació descrit a l'apartat 2.2.1.2.

3.1.1.3. Preparació del vector recombinant

La preparació del vector recombinant pET-SS-B va incloure els passos de lligació, transformació en cèl·lules hoste, purificació del DNA plasmídic i comprovació del DNA clonat.

Resultats

Prèviament a la lligació de l'insert amb el vector d'expressió, es realitzà una electroforesi en gel d'agarosa a l'1% d'ambdues mostres per tal de determinar la concentració relativa de cadascuna (figura 3.4). A partir de la intensitat de les bandes observada i de la mida coneguda de cada fragment de DNA es calculà el volum necessari de cada mostra per tal de mantenir una relació molar entre l'insert i el vector de 3 a 1 a l'hora de preparar la reacció de lligació, que va resultar ser de 0,75 µl i 1 µl, respectivament (apartat 2.2.2.1).

Paral·lelament es realitzà un control de lligació en les mateixes condicions, però en el que no es va incloure l'insert.

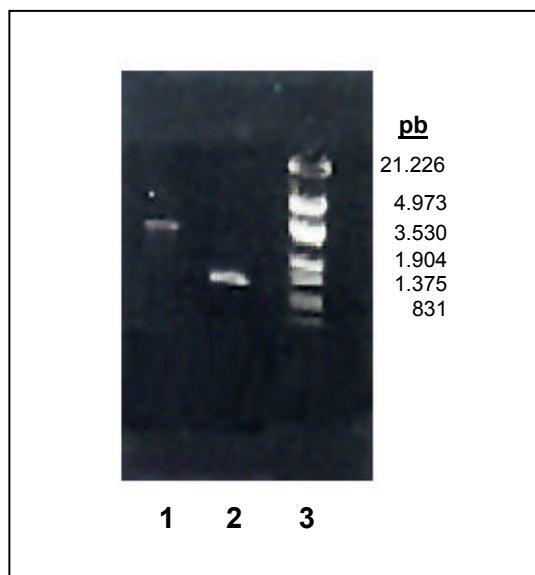


Figura 3.4. Electroforesi en gel d'agarosa a l'1% del plàsmid pET-20b(+) (1) i el fragment SS-B (La) (2) digerits amb els enzims de restricció *Nde* I i *Hind* III; 3, λ DNA (*Eco*R I/*Hind* III) marker.

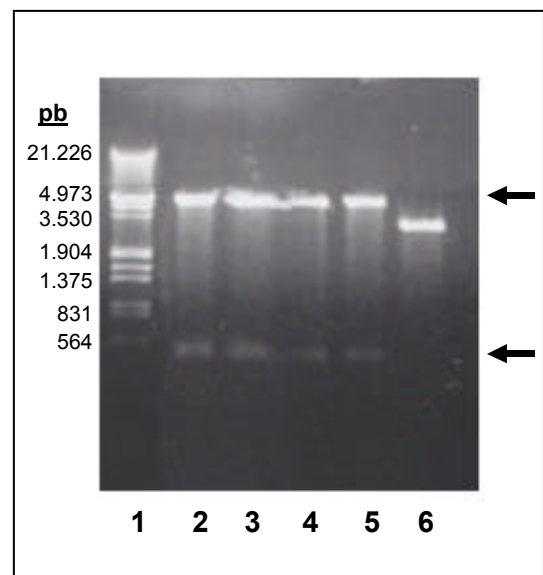


Figura 3.5, Electroforesi en gel d'agarosa a l'1% de la digestió amb *Bgl* II de la construcció pET-SS-B de 5 clons diferents (2-6). 1, λ DNA (*Eco*R I/*Hind* III) marker.

El resultat de la lligació es transferí a cèl·lules de la soca TG1 (apartat 2.2.5.2) que s'inocularen en un medi selectiu d'LB-agar-ampicil·lina i es deixaren créixer 12 hores a 37°C. S'obtingueren 15 clons diferents que, per tant, havien incorporat el plàsmid amb o sense insert, mentre que pel control de lligació s'observaren 10 clons diferents. Així doncs, de forma aproximada, de cada 3 clons obtinguts 1 hauria de tenir l'insert.

A continuació es prepararen minicultius de 5 clons diferents i es deixaren créixer durant tota la nit a 37°C i a 220 rpm. Les cèl·lules es recolliren per centrifugació i es purificà el DNA plasmídic en cadascun d'ells (apartat 2.2.1.1).

Per comprovar la presència o absència d'insert en el vector recombinant, es dugué a terme una digestió amb l'enzim de restricció *Bgl* II (apartat 2.2.2.2). Tant el plàsmid com l'insert presentaven una única diana per a aquest enzim, de manera que si el plàsmid recombinant contenia l'insert hi hauria dos llocs de tall de l'enzim, mentre que si no el contenia n'hi hauria només un. Així doncs, la digestió del plàsmid sol, pET-20b(+), resultaria en un sol fragment de DNA, però la del plàsmid amb l'insert lligat (pET-SS-B) donaria un fragment de 430 pb i un altre de 4,4 kb.

L'electroforesi en gel d'agarosa a l'1% (figura 3.5) demostrà que 4 dels 5 clons s'havien transformat amb el plàsmid recombinant pET-SS-B, ja que presentaven dues bandes que coincidien amb les esperades: una per sota del marcador de 564 pb i una propera a la banda del marcador de 4,3 kb. En el cinquè clon (carril 6), l'única banda obtinguda propera a la banda de 3,5 kb del marcador podia correspondre al vector d'expressió pET-20b(+) linealitzat.

La comprovació definitiva de la presència de l'insert en el vector recombinant es realitzà per seqüenciació. En primer lloc fou necessària l'obtenció d'una major quantitat del vector d'expressió recombinant pET-SS-B, per la qual cosa el DNA plasmídic purificat d'un dels 4 clons positius es transferí de nou a cèl·lules de la soca TG1 (apartat 2.2.5.2) que s'inocularen en plaques amb medi sòlid selectiu. D'un dels clons obtinguts es preparà un cultiu de 100 ml en medi líquid selectiu que es deixà créixer tota la nit a 37°C i a 220 rpm, i seguidament es purificà el DNA plasmídic (apartat 2.2.1.1). Aquest DNA s'utilitzà per a la seqüenciació dels extrems 5' i 3' de l'insert segons el mètode de Sanger o dels dideoxinucleòtids (apartat 2.2.3.1), utilitzant com a oligonucleòtids les seqüències universals *T7 promoter* i *T7 terminator*. La comparació de seqüències va resultar satisfactòria pels dos extrems, demostrant la presència de l'insert al vector.

3.1.2. Expressió de la proteïna recombinant SS-B (La)-His

Per expressar la proteïna de fusió calia utilitzar cèl·lules hoste que tinguessin una còpia cromosòmica del gen de la RNA polimerasa del bacteriòfag T7 (apartat 1.9.3).

Es va escollir la soca HMS174(DE3)pLysS per a l'expressió de la proteïna recombinant SS-B (La)-His i se seguí el procediment descrit a l'apartat 2.4.1.1. La tinció amb blau de Coomassie demostrà que després d'induir amb IPTG (carril 3 de la figura 3.6) apareixia una banda de proteïna per sobre del marcador de 43 kDa i que majoritàriament es trobava en forma soluble (carril 2 de la figura 3.7). El càlcul de la massa molar (apartat 2.2.6.3) donà un

Resultats

valor de 48 kDa, que coincidí amb la massa molar teòrica de la proteïna recombinant SS-B (La)-His.

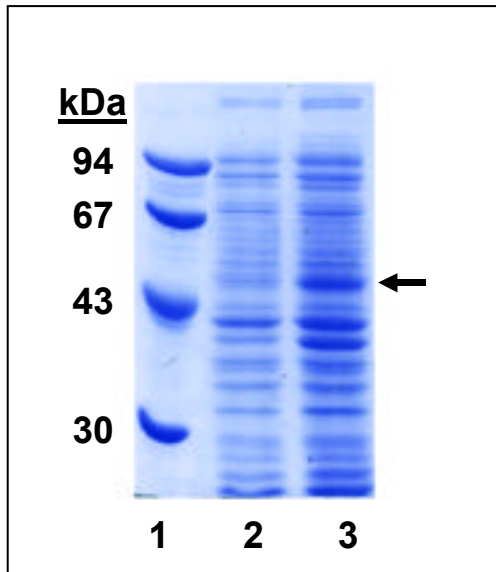


Figura 3.6. Electroforesi en gel de poliacrilamida al 10% en condicions desnaturalitzants de l'expressió de la proteïna recombinant SS-B (La)-His en cèl·lules de la soca HMS174(DE3)pLysS. 1, Patró de baixa massa molar; 2, lisat cel·lular abans de la inducció; 3, lisat cel·lular 3 hores després de la inducció.

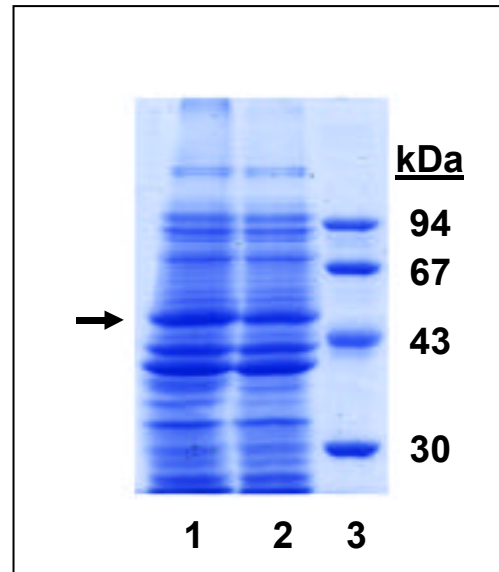


Figura 3.7. Electroforesi en gel de poliacrilamida al 10% en condicions desnaturalitzants de la solubilitat de la proteïna recombinant SS-B (La)-His. 1, lisat cel·lular 3 hores després de la inducció; 2, sobrenedant del lisat cel·lular centrifugat; 3, patró de baixa massa molar.

3.1.3. Purificació de la proteïna de fusió SS-B (La)-His

A partir d'un volum inicial d'11 mL del sobrenedant resultant de la centrifugació de les cèl·lules lisades es realitzà la cromatografia d'afinitat en resina de níquel-àcid nitrilotriacètic (NTA), *Ni-NTA-Sepharose®CL-6B*, tal com s'ha descrit a l'apartat 2.4.1.4.

A la figura 3.8 es representa el cromatograma obtingut on s'observà l'elució d'una proteïna majoritària a una concentració de 100 mmol/L d'imidazole. Les fraccions que formaven el pic de proteïna eluïda, un volum total de 20 mL, es van mesclar i es va determinar la concentració de proteïna pel mètode de Bradford (apartat 2.2.7.2), que va resultar ser de 0,1 mg/mL.

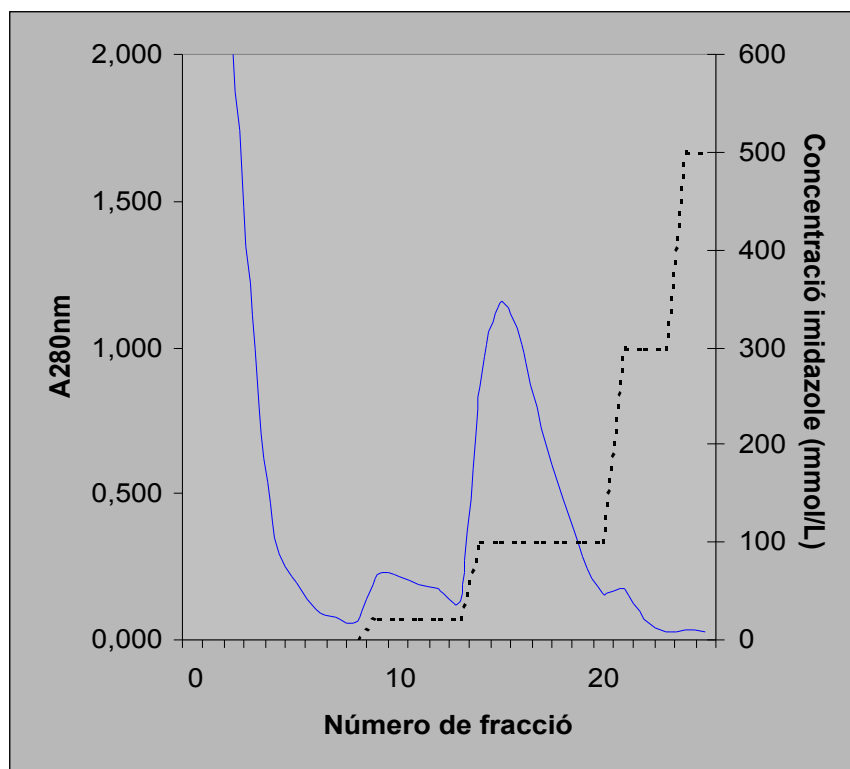


Figura 3.8. Cromatograma obtingut en la purificació de la proteïna de fusió SS-B (La)-His en resina de níquel-àcid nitrilotriacètic (NTA), *Ni-NTA-Sepharose*[®]CL-6B. Absorbància a 280 nm (—) i gradient d'imidazole (-----).

3.1.4. Caracterització molecular i antigènica de la proteïna purificada

La proteïna de fusió purificada es caracteritzà molecularment mitjançant una electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants. La caracterització antigènica es realitzà mitjançant una electrotransferència de la proteïna a una membrana de PVDF i un revelat amb anticossos específics. Finalment, es comprovà que l'antigenicitat de la proteïna recombinant era equivalent a la de la proteïna nativa mitjançant una immunoabsorció del sèrum amb l'antigen natiu abans de l'immunorevelat específic.

3.1.4.1. Electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants

Amb les fraccions obtingudes a la cromatografia, es realitzà una electroforesi en presència de dodecilsulfat de sodi (apartat 2.2.6.1) i el resultat es visualitzà mitjançant un mètode de tinció inespecífic com és la tinció amb blau de Coomassie (apartat 2.2.6.2). Tal com es pot veure a la figura 3.9, les fraccions corresponents a l'eluït de 100 mmol/L d'imidazole presentaren una única banda per sobre la banda del marcador de 43 kDa. El càlcul de la massa molar (apartat 2.2.6.3) donà un valor de 48 kDa, que coincidia amb el valor teòric.

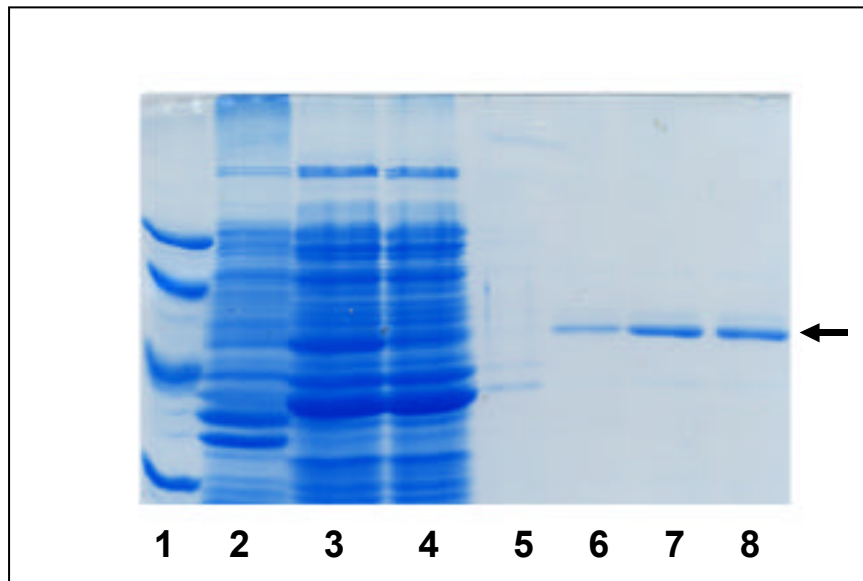


Figura 3.9. Electroforesi en gel de poliacrilamida al 10% en condicions desnaturalitzants de les diferents fraccions de la purificació de la proteïna SS-B (La)-His (tinció amb blau de Coomassie): 1, patró de baixa massa molar; 2, precipitat del lisat cel·lular; 3, sobrenedant del lisat cel·lular (fracció aplicada a la columna); 4, fracció no retinguda; 5, rentat amb tampó de rentat; 6 a 8, eluïts amb tampó d'elució (amb imidazole 100 mmol/L).

3.1.4.2. Transferència i revelat mitjançant anticossos específics

Per tal de comprovar que la banda visualitzada a l'electroforesi corresponia a la proteïna de fusió SS-B (La)-His, es realitzà una electroforesi en condicions desnaturalitzants amb una posterior transferència de les proteïnes a membranes de PVDF i un revelat amb anticossos específics (apartat 2.2.6).

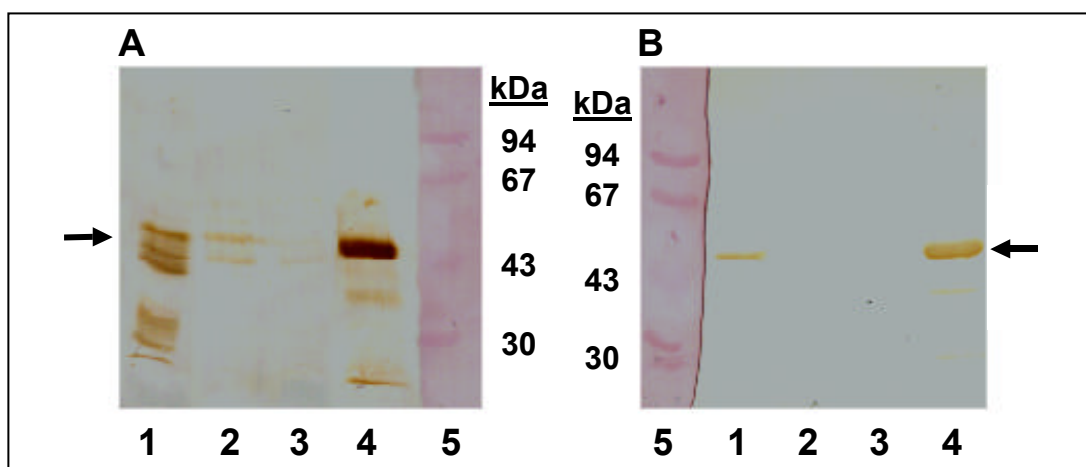


Figura 3.10. Immunodetecció sobre membrana de PVDF de la purificació de la proteïna de fusió SS-B (La)-His amb: A, antisèrum específic anti-SS-B (La); B, anticòs monoclonal contra l'oligopèptid d'histidines de l'extrem C-terminal. 1, fracció aplicada a la columna; 2, fracció no retinguda; 3, rentat; 4, eluït (100 mmol/L imidazole); 5, patró de baixa massa molar (tenyit amb vermell de Ponceau S).

Es realitzaren dues transferències, que es revelaren, respectivament, amb un sèrum que presentava anticossos contra la proteïna SS-B (La) detectats mitjançant la tècnica d'ELISA i amb un anticòs monoclonal contra l'oligopèptid d'histidines de l'extrem C-terminal (figura 3.10). En ambdós casos s'observà la presència d'una banda majoritària per sobre del marcador de 43 kDa en la fracció corresponent a l'eluït. El càlcul de la massa molar donà un valor de 48 kDa, que coincidí amb el valor teòric per a la proteïna de fusió SS-B (La)-His.

3.1.4.3. Immunoabsorció del sèrum específic amb antigen natiu i immunorevelat específic

L'última prova, prèvia al desenvolupament de l'ELISA anti-SS-B (La), consistí en comprovar que l'antigenicitat de la proteïna purificada era equivalent a la proteïna anàloga nativa.

Es realitzà una electroforesi en condicions desnaturalitzants de la fracció corresponent a l'eluït per duplicat i una posterior transferència de les proteïnes a una membrana de PVDF. Seguidament es va retallar la membrana en dues parts i es van revelar amb l'antisèrum específic anti-SS-B (La) (condicions control) i amb el mateix sèrum prèviament immunoabsorbit (apartat 2.2.6.7), respectivament. Tal com es pot observar a la figura 3.11, la banda obtinguda en l'assaig en condicions control (carril 2) desapareixia quan es realitzava l'immunorevelat amb el sèrum prèviament incubat amb l'antigen natiu (carril 4).

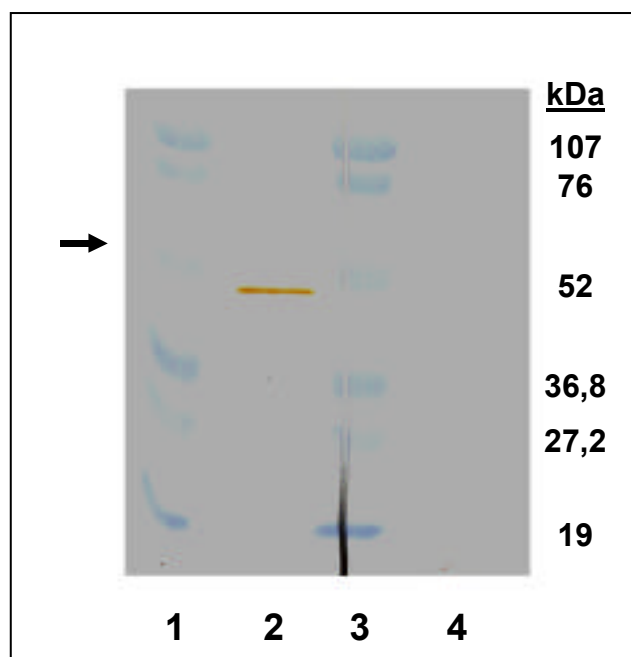


Figura 3.11. Immunodetecció sobre membrana de PVDF amb antisèrum específic anti-SS-B (La) (carril 2) i el mateix antisèrum prèviament absorbit amb antigen natiu (carril 4) de la fracció corresponent a l'eluït. Carrils 1 i 3, patró d'electroforesi de proteïnes de baixa massa molar pre-tenyit, *pre-stained SDS-PAGE standard low range*.

3.2. OBTENCIÓ DE LES PROTEÏNES RECOMBINANTS Ro60-GST I Ro52-GST

La segona part s'incia amb l'expressió de les proteïnes de fusió Ro60-GST i Ro52-GST en un sistema d'expressió procariota, seguida per la seva purificació i la seva caracterització molecular i antigènica.

3.2.1. Vectors d'expressió de les proteïnes de fusió Ro60-GST i Ro52-GST

Els dos vectors codificants per a les proteïnes de fusió Ro60-GST i Ro52-GST, cedits gentilment pel Dr. McCauliffe, foren tractats de la mateixa manera: es transferí el cDNA a la soca TG1 seguint el procediment descrit a l'apartat 2.2.5.2, seguidament es realitzà un cultiu de 100 mL i finalment es purificà el DNA plasmídic (apartat 2.2.1.1). Aquests DNA foren els que es van utilitzar, posteriorment, per transformar soques adients per a l'expressió de les proteïnes recombinants.

3.2.2. Expressió de les proteïnes recombinants Ro60-GST i Ro52-GST

L'expressió de la proteïna de fusió Ro60-GST es va provar en dues soques diferents: BL21(DE3)pLysE i HMS174(DE3)pLysS, que complien el requisit de presentar una còpia cromosòmica del gen codificant per a la RNA polimerasa del bacteriòfag T7 (apartat 1.9.3).

En primer lloc es transferí el plàsmid a ambdues soques (apartats 2.2.5.3 i 2.2.5.4) i seguidament s'expressaren les proteïnes mitjançant el procediment descrit a l'apartat 2.4.2.1. El grau d'expressió assolit després de la inducció es visualitzà mitjançant una electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants (figura 3.12). En ambdós casos s'observà una banda molt intensa per sobre del marcador de 76 kDa, però només per a les cèl·lules HMS174(DE3)pLysS (figura 3.12A) s'observà un bon control de l'expressió, ja que la proteïna no començà a expressar-se fins que no s'afegí IPTG (carril 2). En canvi, en el cas de les cèl·lules de la soca BL21(DE3)pLysE (figura 3.12B) la proteïna començà a expressar-se abans d'induir el cultiu, ja que s'observà una banda d'intensitat similar, tant al cultiu induït com al no induït. Així doncs, s'escollí la soca HMS174(DE3)pLysS per a l'expressió de les proteïnes recombinants Ro52-GST i Ro60-GST: els vectors d'expressió de les dues proteïnes es transferiren a les cèl·lules de la soca HMS174(DE3)pLysS (apartat 2.2.5.4) i l'expressió es realitzà segons el procediment descrit a l'apartat 2.4.2.1

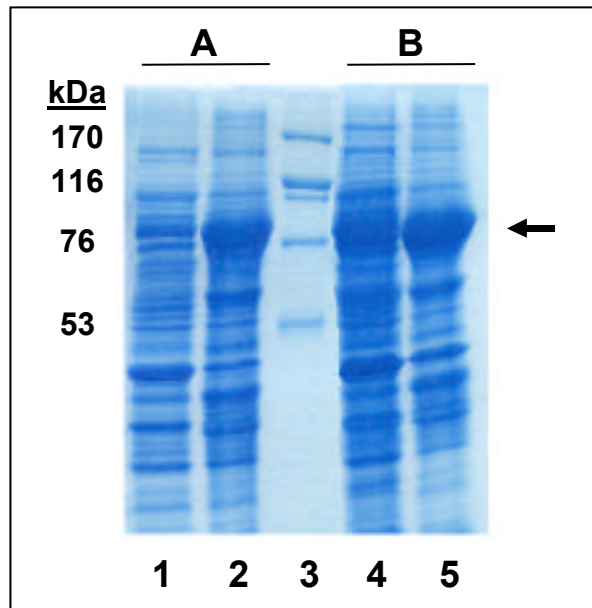


Figura 3.12. Electroforesi en gel de poliacrilamida al 10% en condicions desnaturalitzants de l'expressió de la proteïna recombinant Ro60-GST en cèl·lules HMS174(DE3)pLysS (A) o BL21(DE3)pLysE (B) (tinció amb blau de Coomassie). 1 i 4, lisats cel·lulars abans de la inducció; 2 i 5, lisats cel·lulars 3 hores després de l'addició d'IPTG; 3, patró d'alta massa molar.

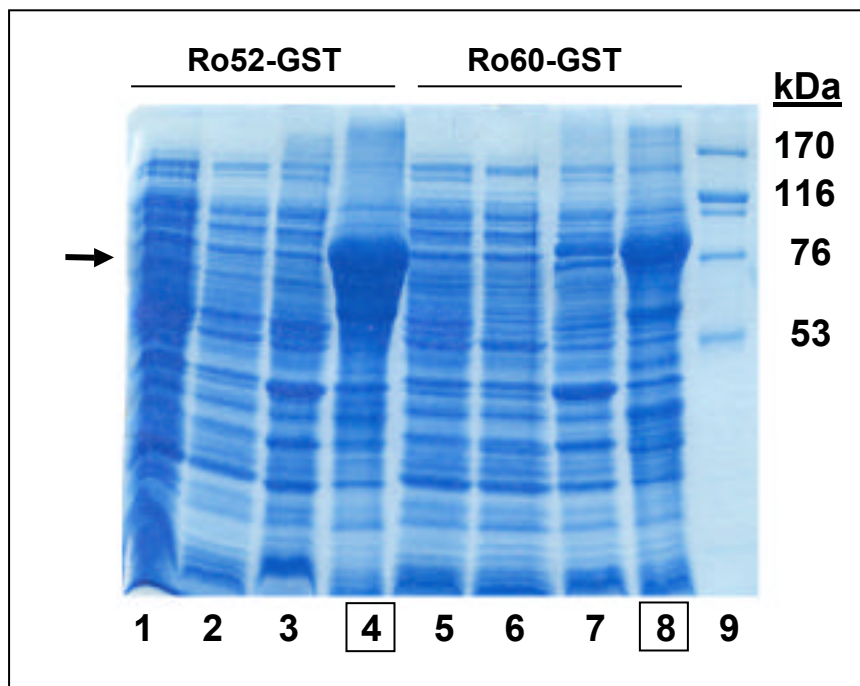


Figura 3.13. Electroforesi en gel de poliacrilamida al 10% en condicions desnaturalitzants de l'expressió de les proteïnes recombinants Ro52-GST i Ro60-GST en cèl·lules HMS174(DE3)pLysS (tinció amb blau de Coomassie). Ro52-GST: 1 i 2, sobrenedants dels lisats cel·lulars abans de la inducció i 3 hores després, respectivament; 3 i 4, precipitats dels lisats cel·lulars abans de la inducció i 3 hores després, respectivament; Ro60-GST: 5 i 6, sobrenedants dels lisats cel·lulars abans de la inducció i 3 hores després, respectivament; 7 i 8, precipitats dels lisats cel·lulars abans de la inducció i 3 hores després, respectivament; 9, patró d'alta massa molar.

Resultats

La tinció amb blau de Coomassie demostrà la presència d'una banda molt intensa per sobre de la banda del marcador de 76 kDa únicament als precipitats dels lisats cel·lulars centrifugats que havien estat induïts mitjançant l'addició d'IPTG (figura 3.13, carrils 4 i 8).

3.2.3. Solubilització de les proteïnes de fusió Ro60-GST i Ro52-GST

Les proteïnes recombinants presents als precipitats dels lisats cel·lulars es van haver de solubilitzar per poder ser aplicades a la columna d'afinitat. La solubilització tant de la proteïna de fusió Ro60-GST com de Ro52-GST es realitzà seguint el procediment descrit a l'apartat 2.4.2.2. Seguidament, les mostres es van dialitzar per tal d'eliminar la urea present, tal com s'ha descrit al mateix apartat.

En el cas de la proteïna recombinant Ro60-GST, l'electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants (figura 3.14) presentava d'una banda per sobre del marcador de 67 kDa tant en el precipitat com en el sobrenedant obtinguts després de centrifugar el dialitzat.

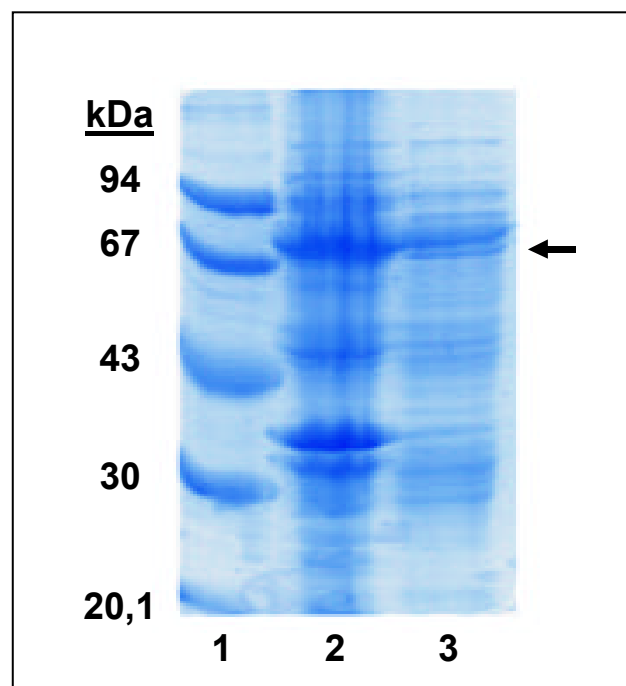


Figura 3.14. Electroforesi en gel de poliacrilamida al 10% en condicions desnaturalitzants de la solubilització de la proteïna de fusió Ro60-GST (tinció amb blau de Coomassie). 1, patró de baixa massa molar; 2, precipitat obtingut després de centrifugar el dialitzat; 3, sobrenedant obtingut després de centrifugar el dialitzat.

Cal tenir en compte, però, que la mostra del precipitat estava 15 vegades més concentrada que la del sobrenedant, de manera que el gel demostrà que la major part de la proteïna recombinant es quedà al sobrenedant final.

En el cas de la proteïna recombinant Ro52-GST, l'electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants (figura 3.15) demostrà la presència d'una banda molt intensa de proteïna al sobrenedant final per sobre del marcador de 67 kDa, que coincidí amb la banda majoritària que apareixia després de la inducció amb IPTG.

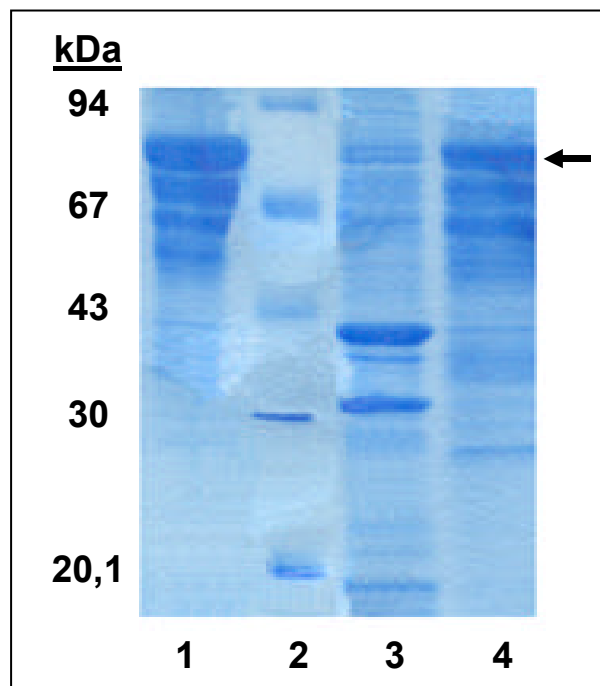


Figura 3.15. Electroforesi en gel de poliacrilamida al 10% en condicions desnaturalitzants de la solubilització de la proteïna de fusió Ro52-GST (tinció amb blau de Coomassie). 1, lisat cel·lular 3 hores després de la inducció; 2, patró de baixa massa molar; 3, precipitat obtingut després de centrifugar el dialitzat; 4, sobrenedant obtingut després de centrifugar el dialitzat.

3.2.4. Purificació de les proteïnes de fusió Ro60-GST i Ro52-GST

Per a cada una de les proteïnes es va partir d'un volum inicial de 300 mL dels sobrenedants resultants de les diàlisis i es van realitzar les cromatografies d'afinitat en la resina de glutatió, *Glutathione Sepharose*[®] 4B tal com s'ha descrit a l'apartat 2.4.2.4. A les figures 3.16 i 3.17 es representen els cromatogrames obtinguts on s'observaren els pics de les proteïnes eluïdes en el moment que s'afegí el glutatió.

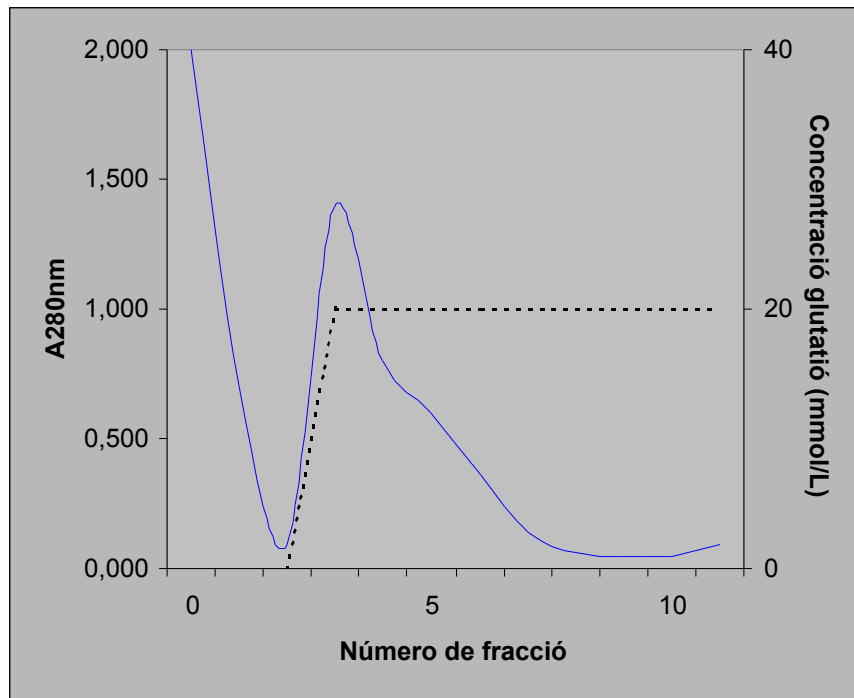


Figura 3.16. Cromatograma obtingut en la purificació de la proteïna de fusió Ro60-GST en resina de glutatí, *Glutathione Sepharose*[®] 4B. Absorbància a 280 nm (—) i gradient de glutatí (-----).

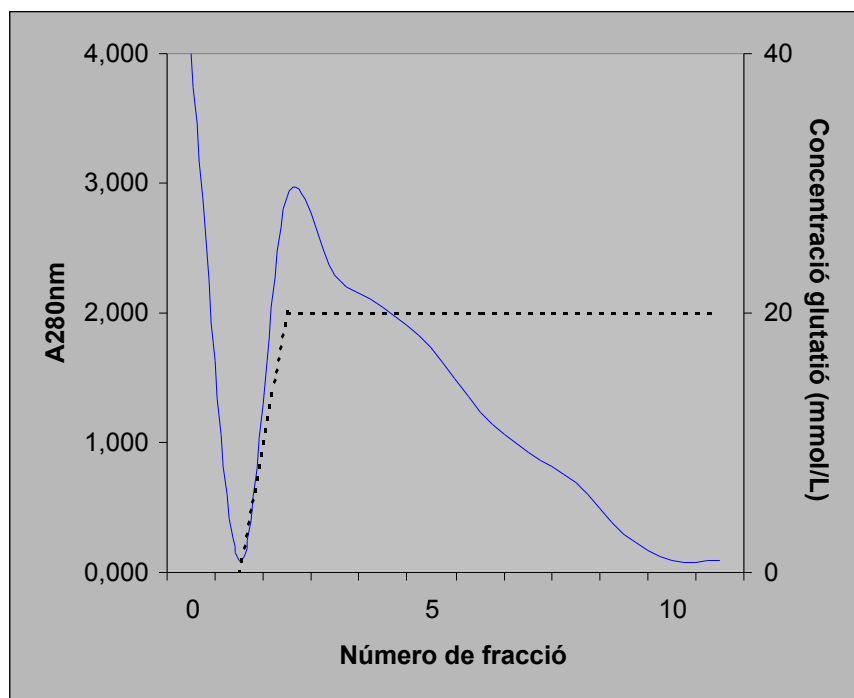


Figura 3.17. Cromatograma obtingut en la purificació de la proteïna de fusió Ro52-GST en resina de glutatí, *Glutathione Sepharose*[®] 4B. Absorbància a 280 nm (—) i gradient de glutatí (-----).

A cada purificació, les fraccions que formaven el pic de proteïna eluïda, un volum total de 25 mL, es van mesclar i es van concentrar per ultrafiltració sota pressió de nitrogen, utilitzant una membrana de polisulfona de 10,000 Da de mida d'exclusió molecular (PM10, Amicon), fins a un volum final de 10 mL. Finalment, es determinà la concentració de proteïna pel mètode de Bradford (apartat 2.2.7.2) que va resultar ser de 2 mg/mL per a la proteïna Ro60-GST i de 4 mg/mL per a Ro52-GST.

3.2.5. Caracterització molecular i antigènica de les proteïnes purificades

Les proteïnes de fusió purificades es caracteritzaren molecularment mitjançant una electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants (apartat 3.2.5.1). La caracterització antigènica es realitzà mitjançant una electrotransferència de les proteïnes a una membrana de PVDF i un revelat amb anticossos específics (apartat 3.2.5.2). Finalment, es comprovà que l'antigenicitat de la proteïna recombinant era equivalent a la de la proteïna nativa mitjançant una immunoabsorció del sèrum amb l'antigen natiu abans de l'immunorevelat específic (apartat 3.1.4.3).

3.2.5.1. Electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants

Per a cada una de les purificacions de les proteïnes recombinants es realitzà una electroforesi en presència de dodecilsulfat de sodi (apartat 2.2.6.1) amb les fraccions obtingudes, i el resultat es visualitzà mitjançant un mètode de tinció inespecífic com és la tinció amb blau de Coomassie (apartat 2.2.6.2).

Per a Ro60-GST (figura 3.18) s'observà, a la fracció corresponent a la fracció aplicada a la columna (carril 1), una banda majoritària per sobre del marcador de 67 kDa corresponent a la proteïna de fusió. Aquesta banda aparegué molt lleugerament a la fracció no retinuda per la resina (carril 2) i desaparegué en el rentat (carril 3), però tornà a aparèixer a la fracció corresponent a l'eluït de 20 mmol/L de glutatió reduït (carrils 4 i 5). El càlcul de la massa molar (apartat 2.2.6.3) donà un valor de 83 kDa per a aquesta banda.

En el cas de la purificació de Ro52-GST (figura 3.19) s'observà la presència de la proteïna únicament al sobrenedant obtingut després de centrifugar el dialitzat (carril 3) i a la fracció corresponent a l'eluït de 20 mmol/L de glutatió reduït (carril 7). En ambdós casos, apareixia un patró característic en forma de triplet. El càlcul de les masses molars (apartat 2.2.6.3) donà uns valors de 80 kDa, 72 kDa i 63 kDa per a cada una de les bandes.

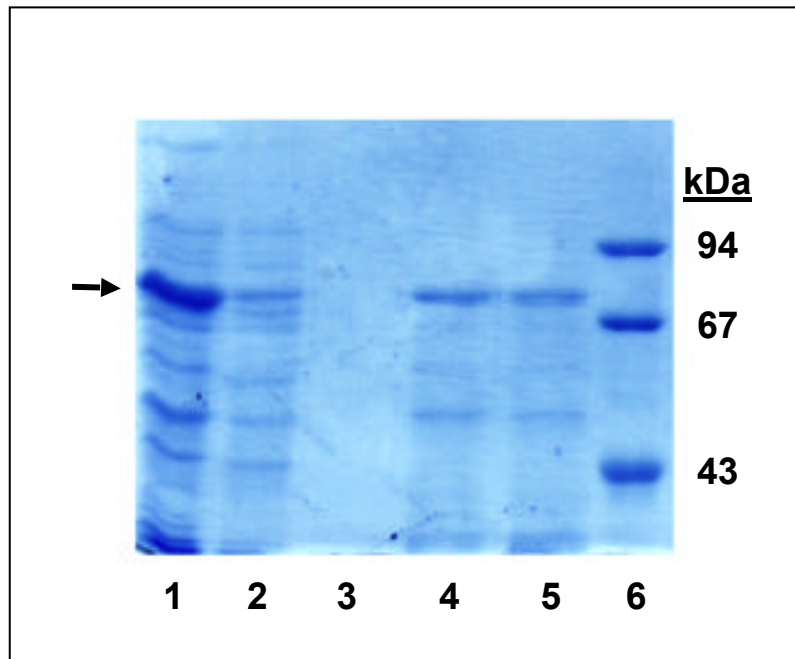


Figura 3.18. Electroforesi en gel de poliacrilamida al 10% en condicions desnaturalitzants de la purificació de la proteïna de fusió Ro60-GST (tinció amb blau de Coomassie). 1, sobrenedant del dialitzat (fracció aplicada a la columna); 2, fracció no retinguda; 3, rentat amb tampó d'aplicació; 4-5, eluïts amb tampó d'elució (amb glutatí reduït 20 mmol/L); 6, patró de baixa massa molar.

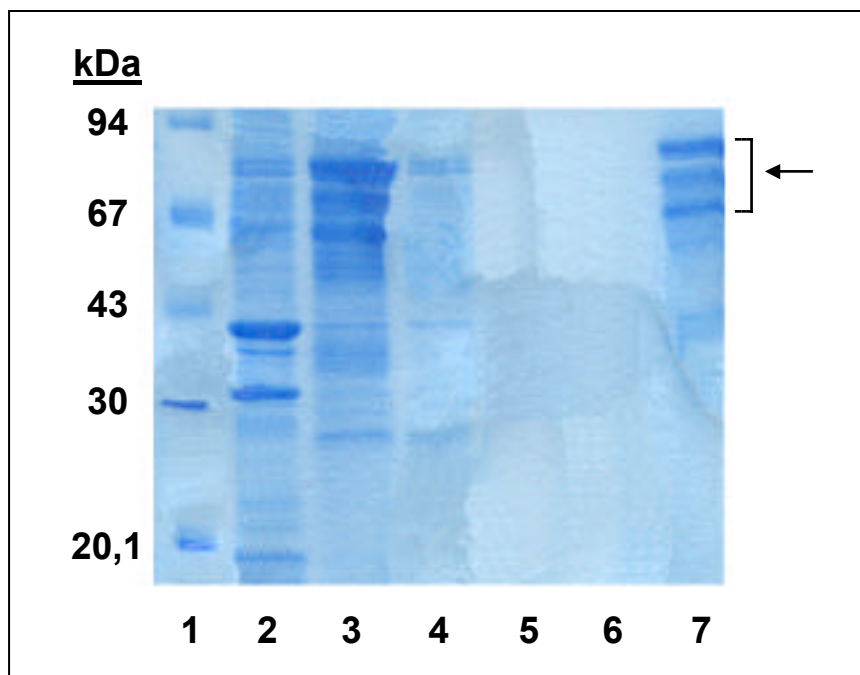


Figura 3.19. Electroforesi en gel de poliacrilamida al 10% en condicions desnaturalitzants de la purificació la proteïna de fusió Ro52-GST (tinció amb blau de Coomassie e). 1, patró de baixa massa molar; 2, precipitat del dialitzat; 3, sobrenedant del dialitzat (fracció aplicada a la columna); 4, fracció no retinguda; 5-6, rentats amb tampó d'aplicació; 7, eluït amb tampó d'elució (glutatí reduït 20 mmol/L).

3.2.5.2. Transferència i revelat mitjançant anticossos específics

Per tal de comprovar que les bandes visualitzades a les electroforesis corresponien a les proteïnes de fusió Ro60-GST i Ro52-GST, en cada cas es realitzà una electroforesi en condicions desnaturalitzants amb una posterior transferència de les proteïnes a membranes de PVDF (fluorur de polivinilidè) i un revelat amb anticossos específics (apartat 2.2.6)

Per a cada proteïna es realitzaren dues transferències, una de les quals es revelà amb un sèrum que presentava anticossos contra l'antigen SS-A (Ro) detectats mitjançant la tècnica d'ELISA, i l'altra amb un anticòs policlonal contra la proteïna glutatió S-transferasa (GST) (figura 3.20). La determinació de les masses molars de les proteïnes es realitzà tal com s'ha descrit a l'apartat 2.2.6.3.

En el cas de la proteïna Ro60-GST (figura 3.20), quan s'utilitzà el sèrum anti-SS-A (Ro) s'observà la presència d'una banda majoritària de 83 kDa i d'una banda poc intensa de 57 kDa a les fraccions corresponents a l'aplicació (carril 1), la fracció no retinguda (carril 2) i l'eluit (carril 5). En el revelat amb l'anticòs dirigit contra la proteïna GST s'observà una banda majoritària de 83 kDa i una de menys intensa de 26 kDa a les fraccions corresponents a l'aplicació (carril 7), la fracció no retinguda (carril 8) i l'eluit (carril 11).

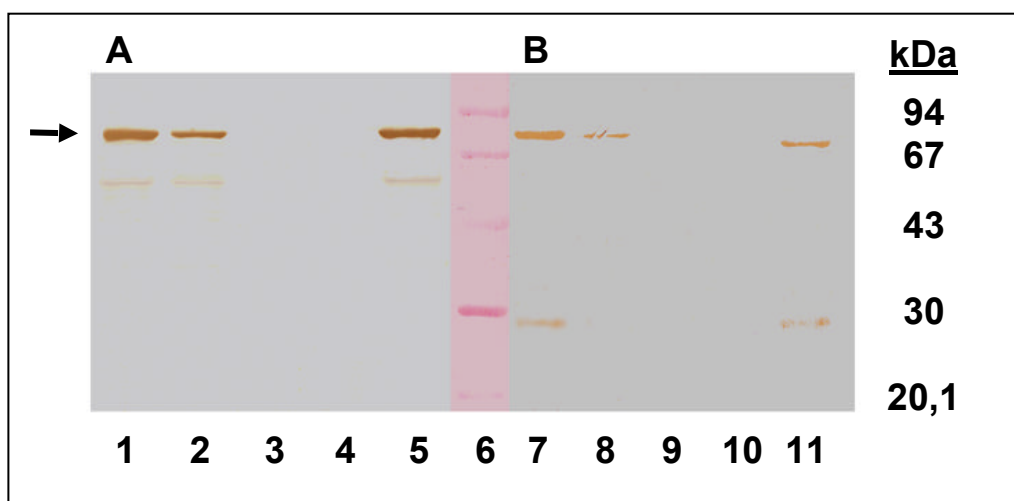


Figura 3.20. Immunodetecció sobre membrana de PVDF de la purificació de la proteïna de fusió Ro60-GST amb: A, anti-sèrum específic anti-SS-A (Ro); B, anticòs policlonal contra la proteïna glutatió S-transferasa (GST). 1 i 7, Fracció aplicada a la columna; 2 i 8, fracció no retinguda; 3-4 i 9-10, rentats; 5 i 11, eluit (20 mmol/L glutatió reduït); 6, patró de baixa massa molar (tenyit amb vermell de Ponceau S, apartat 2.2.6.5).

Resultats

Per a Ro52-GST (figura 3.21), ambdós revelats van presentar un patró de bandes similars: una banda majoritària de 63 kDa i dues bandes d'intensitat menor de 80 i 72 kDa a les fraccions corresponents a l'aplicació (carrils 1 i 6) i a l'eluït (carrils 4 i 9).

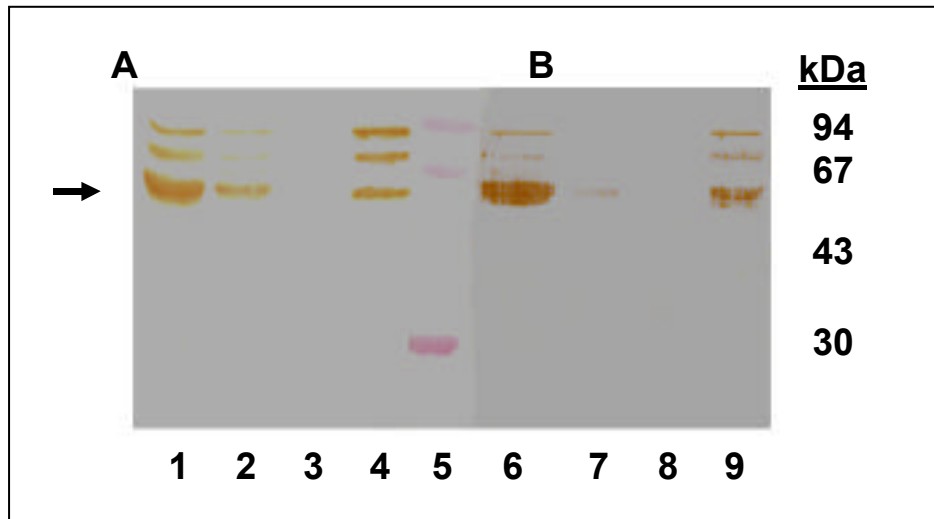


Figura 3.21. Immunodetecció sobre membrana de PVDF de la purificació de la proteïna de fusió Ro52-GST amb: A, antisèrum específic anti-SS-A (Ro); B, anticòs policlonal contra la proteïna glutatió S-transferasa (GST). 1 i 6, Fracció aplicada a la columna; 2 i 7, fracció no retinguda; 3 i 8, rentat; 4 i 9, eluït (20 mmol/L glutatió reduït); 5, patró de baixa massa molar (tenyit amb vermell de Ponceau S, apartat 2.2.6.5).

3.2.5.3. Immunoabsorció del sèrum específic amb antígen natiu i immunorevelat específic

Com en el cas de la proteïna recombinant SS-B (La)-His, l'última prova, prèvia al desenvolupament de les enzimoimmunoanàlisis fou la comprovació de l'equivalència d'antigenicitats entre les proteïnes recombinants purificades i les seves anàlogues natives.

Tant en el cas de la proteïna de fusió Ro60-GST com en el de Ro52-GST, es realitzà una electroforesi en condicions desnaturalitzants de les fracció corresponent a l'eluït per duplicat i una posterior transferència de les proteïnes a membranes de PVDF (apartat 2.2.6). Seguidament es van retallar les membranes en dues parts i es van revelar amb l'antisèrum específic anti-SS-A (Ro) (condicions control) i amb el mateix sèrum prèviament immunoabsorbit (apartat 2.2.6.7).

Tal com es pot observar a la figura 3.22, les bandes obtingudes en els assajos en condicions control (carrils 1 i 4) desapareixien completament quan es realitzaven els immunorevelats amb el sèrum prèviament incubat amb l'antigen SS-A (Ro) natiu (carrils 3 i 6).

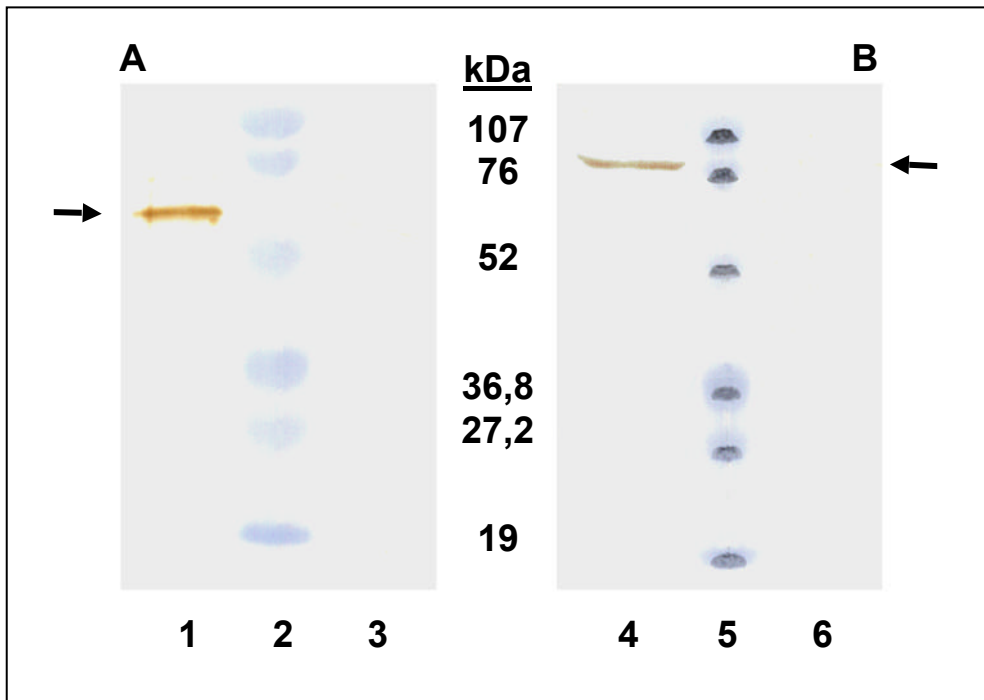


Figura 3.22. Immunodetecció sobre membrana de PVDF amb antisèrum específic anti-SS-A (Ro) (carrils 1 i 4) i el mateix antisèrum prèviament absorbit amb antigen natiu (carrils 3 i 6) de les fraccions corresponents als eluïts de les purificacions de les proteïnes de fusió Ro52-GST (A) i Ro60-GST (B). Carrils 2 i 5, patró d'electroforesi de proteïnes de baixa massa molar pre-tenyit, *pre-stained SDS-PAGE standard low range*.

3.3. ENZIMOIMMUNOANÀLISIS EN FASE SÒLIDA AMB ELS ANTÍGENS RECOMBINANTS

L'objectiu final del treball fou la utilització dels antigens recombinants com a matèria primera en dues enzimoimmunoanàlisis en fase sòlida (ELISA) per a la detecció d'anticossos dirigits contra les proteïnes SS-B (La) [ELISA anti-SS-B (La)] i contra les proteïnes Ro60 i Ro52 [ELISA anti-SS-A (Ro)].

3.3.1. Desenvolupament de les enzimoimmunoanàlisis (ELISA)

Per tal de poder integrar els nous assajos a la línia d'ELISA de BioSystems S.A., calia respectar una sèrie de característiques de la tècnica (dilució de les mostres, temps d'incubacions, composició del tampó de rentat, conjugat utilitzat i tipus de substrat) que ja estaven fixades de bon principi. Així doncs, es van haver d'optimitzar les condicions d'immobilització dels antigens recombinants a la microplaca per tal de desenvolupar unes ELISA que fossin equivalents a les que duïen incorporats els antigens nadius.

Per tant, es prengué com a punt de partida en cada fase del desenvolupament de l'ELISA aquelles condicions experimentals prèviament establertes per als antigens nadius:

- Diluent del conjugat: trietanolamina 30 mmol/L, ZnCl₂ 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
- Especificitat del conjugat : anticòs dirigit contra IgG humanes.
- Enzim marcador: fosfatasa alcalina.
- Substrat: paranitrofenilfosfat (p-NPP) (sistema de detecció colorimètric, veure apartat 1.10.2.1).
- Solució d'aturada: NaOH 5 mol/L.
- Longituds d'ona per a les lectures d'absorbància: 405 nm / 620 nm.

3.3.1.1. Immobilització dels antigens

Per a l'ELISA anti-SS-B (La) es van preparar microplaques amb 10, 20, 40 i 80 ng de proteïna per pouet (corresponents a dilucions 1/1000, 1/500, 1/250 i 1/125, respectivament, de

l'antigen purificat) i s'hi van assajar, seguint el procediment descrit a l'apartat 2.5.3, sèrums negatius i sèrums específics per a SS-B (La), prèviament valorats amb el mètode de referència (apartat 2.5.4.1).

Els resultats obtinguts (figura 3.23) demostraven un valor òptim de quantitat de proteïna d'entre 20 i 40 ng a cada pouet. S'escollí 33 ng de proteïna per pouet, que equivalia a una dilució 1/300 de l'antigen purificat.

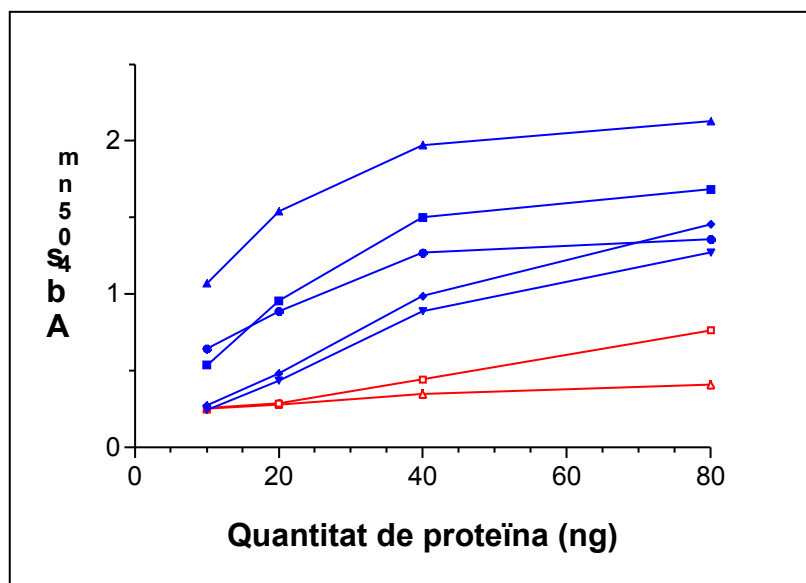


Figura 3.23. Valoracions de diferents sèrums positius (en blau) i sèrums negatius (en vermell) amb diferents quantitats de l'antigen recombinant SS-B (La)-His.

Per als antigens recombinants Ro60 i Ro52, a més d'optimitzar la quantitat de proteïna adsorbida als pouets de les microplaques, es va comprovar l'efecte de la mescla d'ambdós antigens a la resposta final. Es van preparar microplaques amb 400, 200, 100 i 75 ng de l'antigen recombinant Ro60 a cada pouet; d'altres amb les mateixes quantitats de Ro52; i d'altres amb diferents mescles dels dos antigens amb una quantitat de proteïna total de 75 ng per pouet: 18,75 ng (25%) de Ro60 i 56,25 ng (75%) de Ro52; 37,5 ng (50%) de Ro60 i 37,5 ng (50%) de Ro52; 56,25 ng (75%) de Ro60 i 18,75 ng (25%) de Ro52. Totes les microplaques foren assajades, seguint el protocol descrit a l'apartat 2.5.3, amb un sèrum negatiu i diferents sèrums específics per a SS-A (Ro), prèviament valorats amb el mètode de referència (apartat 2.5.4.1). Els resultats obtinguts (figura 3.24) demostraren un valor òptim per a una quantitat de proteïna total de 75 ng en cada pouet de la microplaca i una proporció de Ro60 i Ro52 del 50%.

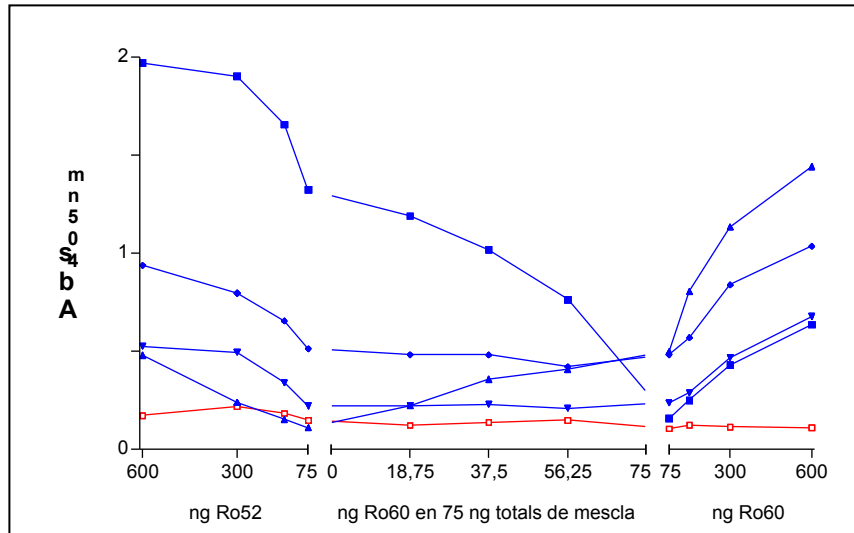


Figura 3.24. Valoracions de diferents sèrums específics per a SS-A (Ro) (en blau) i d'un sèrum negatiu (en vermell) amb diferents quantitats de l'antigen recombinant Ro52 i de l'antigen Ro60, i amb diferents quantitats de Ro60 en mescles de 75 ng de proteïna total per pouet dels dos antigens.

3.3.1.2. Estudis d'estabilitat de les microplaques

L'estabilitat de les microplaques sensibilitzades amb els antígens recombinants es va estudiar de forma accelerada tal com s'ha descrit a l'apartat 2.5.2.1. La diferència de senyal entre temps 0 (Abs_{t_0}) i després d'incubar les microplaques 7 dies a 37°C (Abs_E) s'expressà en forma de % de pèrdua respecte el senyal inicial (figura 3.25).

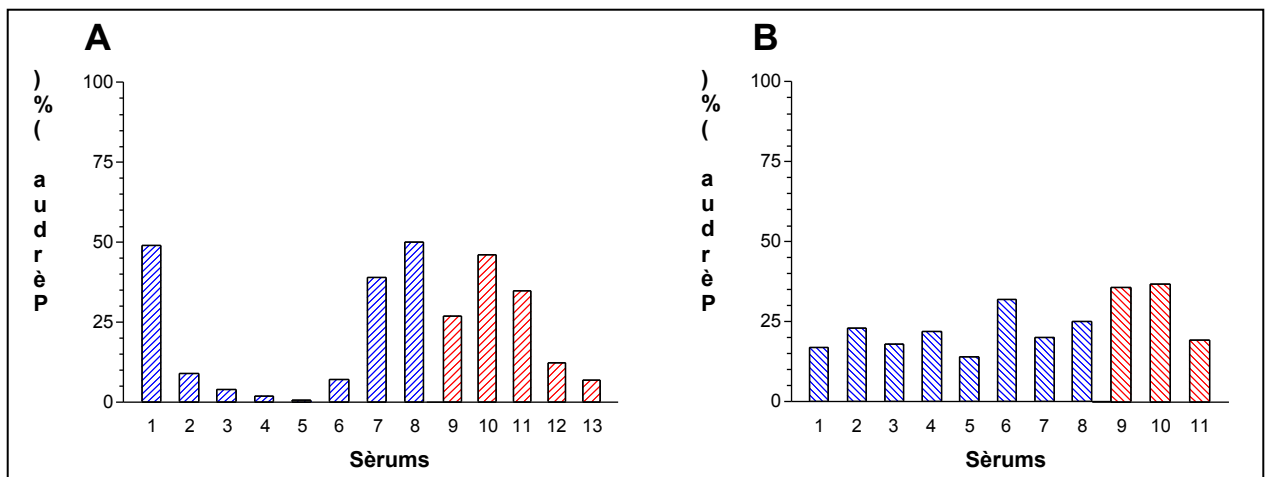


Figura 3.25. Pèrdua de senyal en els estudis d'estabilitat accelerada per a les ELISA anti-SS-B (La) (A) i anti-SS-A (Ro) (B), observada amb sèrums positius (concentració 10 U/mL, en blau) i negatius (en vermell).

En les dues enzimoimmunoanàlisis s'observà pèrdua de senyal, que era més accentuada en el cas de l'ELISA anti-SS-B (La), on alguns sèrums perdien fins la meitat del senyal obtingut en les condicions t_0 .

Així doncs, es va provar d'estabilitzar els antigens adsorbits a les microplaques mitjançant la incubació amb les següents dissolucions comercials (descrites a l'apartat 2.5.2): fosfats-gelatina (*PBS/FG*), fosfats-gelatina-glicerol (*PBS/Gly/FG*), fosfats-caseïna (*PBS/Cas*), fosfats-caseïna-glicerol (*PBS/Gly/Cas*). Seguidament, es realitzà l'estudi de l'estabilitat de forma accelerada tal com s'ha descrit a l'apartat 2.5.2.1.

Els efectes (o interferències) de les dissolucions estabilitzants sobre els senyals obtinguts en condicions t_0 s'estudià calculant la diferència (Δ) entre els senyals a t_0 per a cada dissolució i el senyal a t_0 per al control (microplaca que no s'havia tractat amb cap dissolució). Tal com s'observa a la taula 3.1, les diferents dissolucions estabilitzants van presentar diferents comportaments, que es resumeixen a continuació:

- per a les dissolucions amb gelatina de peix (*PBS/FG* i *PBS/Gly/FG*) no s'observà la mateixa tendència en tots els sèrums, ja que en alguns casos el senyal augmentà i en d'altres disminuí. No obstant, les variacions no foren molt elevades.
- Per a la dissolució fosfats-caseïna (*PBS/Cas*) s'observà un augment molt important del senyal en tots els casos, que arribava a ser de més del 80% en alguns d'ells.
- Finalment, per a la dissolució fosfats-caseïna-glicerol (*PBS/Gly/Cas*) s'observà una disminució força important del senyal, que en alguns casos arribava a més del 50%.

Sèrum	Control	PBS/FG		PBS/Gly/FG		PBS/Cas		PBS/Gly/Cas	
	Abs t_0	Abs t_0	Δ (%)	Abs t_0	Δ (%)	Abs t_0	Δ (%)	Abs t_0	Δ (%)
1	0,424	0,377	-11	0,394	-7	0,648	53	0,246	-42
2	1,458	1,537	5	1,495	3	1,694	16	1,385	-5
3	0,275	0,357	30	0,325	18	0,518	88	0,203	-26
4	0,369	0,396	7	0,359	-3	0,668	81	0,198	-46
5	0,664	0,491	-26	0,479	-28	0,737	11	0,328	-51
6	0,786	0,726	-8	0,677	-14	0,954	21	0,535	-32
7	0,334	0,382	14	0,347	4	0,504	51	0,129	-61

Taula 3.1. Efecte de les dissolucions estabilitzants sobre els senyals (valors d'absorbància) obtinguts en condicions t_0 per a diferents sèrums valorats per ELISA amb microplaques sensibilitzades amb l'antigen recombinant SS-B (La)-His. La diferència (Δ) en % es calculà tal com s'ha descrit (apartat 2.5.2.1).

Els resultats dels estudis d'estabilitat accelerada s'expressaren en forma de percentatge de pèrdua (veure apartat 2.5.2.1) i es presenten a la figura 3.26. Tal com s'observa, les

Resultats

dissolucions estabilitzants amb caseïna (en vermell i en blau a la figura) van perdre menys senyal després d'estressar que el control.

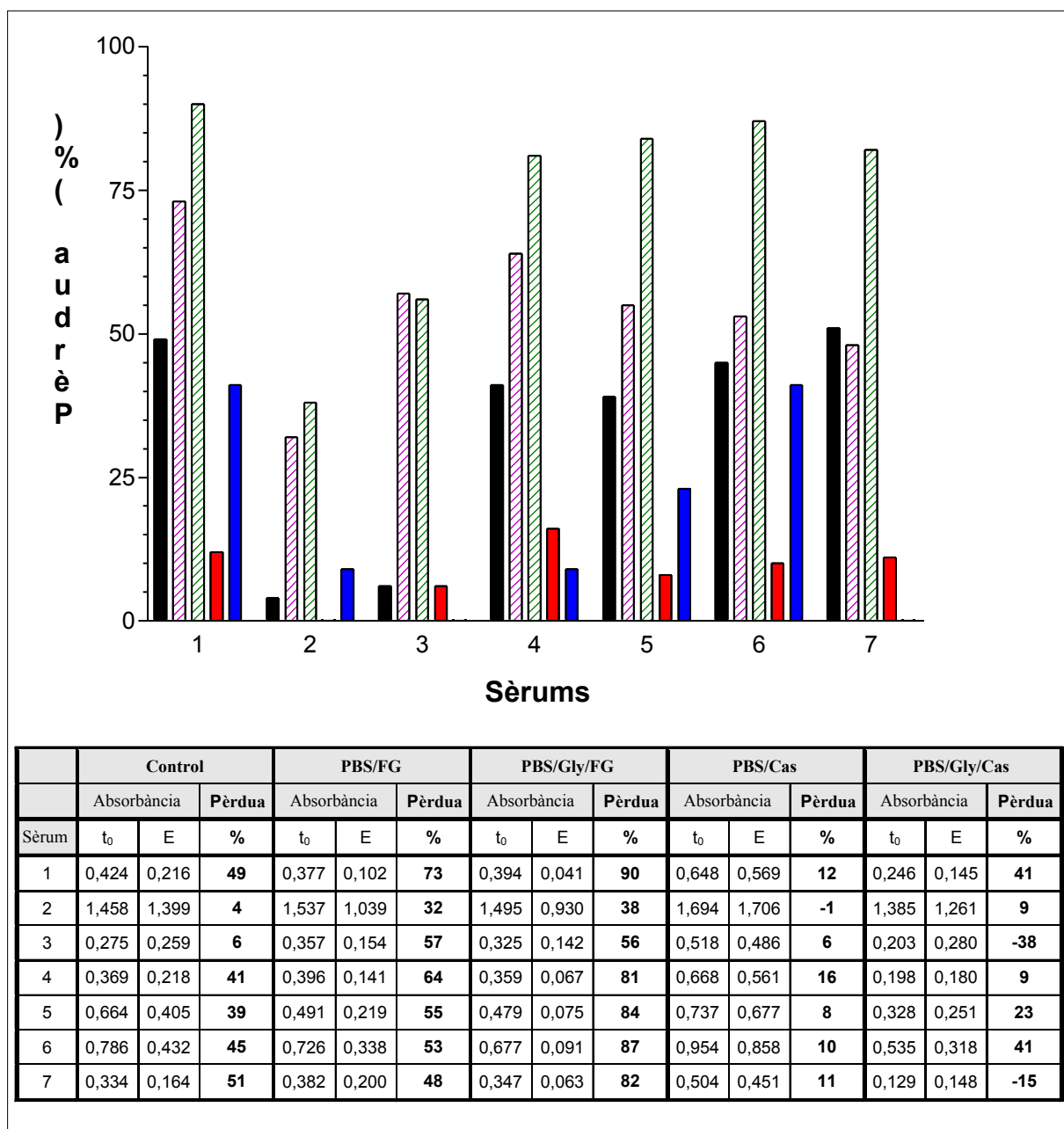


Figura 3.26. Representació de la pèrdua de senyal (en %) observada per a diferents sèrums valorats per ELISA amb microplaques sensibilitzades amb l'antigen recombinant SS-B (La)-His i tractades amb diferents dissolucions estabilitzants: control (negre), tampó fosfats-gelatina (*PBS/FG*) (lila), tampó fosfats-gelatina-glicerol (*PBS/Gly/FG*) (verd), tampó fosfats-caseïna (*PBS/Cas*) (vermell) i tampó fosfats-caseïna-glicerol (*PBS/Gly/Cas*) (blau). La pèrdua es calculà tal com s'ha descrit (veure apartat 2.5.2.1). A la taula es presenten els valors d'absorbància obtinguts en els assajos i que s'han usat per calcular la pèrdua de senyal que es representa al diagrama de barres.

Per comprovar si la caseïna era el component més important en l'estabilització de les microplaques es repetí l'assaig, però utilitzant com a dissolucions estabilitzants: tampó HEPES-Sacarosa i tampó caseïna-HCl.

L'efecte d'aquestes dues dissolucions sobre els senyals obtinguts en condicions t_0 s'estudià de la mateixa manera que en el cas anterior, i els resultats es presenten a la taula 3.2. S'observa que en ambdós casos hi hagué un augment del senyal per a tots els sèrums (excepte un en el cas d'HEPES-sacarosa) i que aquest augment fou significativament major per al cas de la dissolució de caseïna-HCl.

Sèrum	Control	HEPES-sacarosa		Caseïna-HCl	
	Abs t_0	Abs t_0	Δ (%)	Abs t_0	Δ (%)
1	0,561	0,763	36	0,788	40
2	0,724	0,875	21	1,491	106
3	1,521	1,701	12	1,922	26
4	1,784	1,847	4	2,391	34
5	0,145	0,214	48	0,984	579
6	1,561	1,571	1	1,874	20
7	0,610	0,668	10	0,863	42
8	0,589	0,771	31	0,856	45
9	0,333	0,286	-14	0,455	37

Taula 3.2. Efecte de les dissolucions estabilitzants HEPES-sacarosa i caseïna-HCl sobre els senyals (valors d'absorbància) obtinguts en condicions t_0 per a diferents sèrums valorats per ELISA amb microplaques sensibilitzades amb l'antigen recombinant SS-B (La)-His. La diferència (Δ) en % es calculà tal com s'ha descrit (apartat 2.5.2.1).

Els resultats de l'estudi de l'estabilitat accelerada utilitzant aquestes dues dissolucions estabilitzants es presenten a la figura 3.27. En ambdós casos s'aconseguí disminuir la pèrdua de senyal, però en el cas de la dissolució de caseïna-HCl, aquesta disminució fou major.

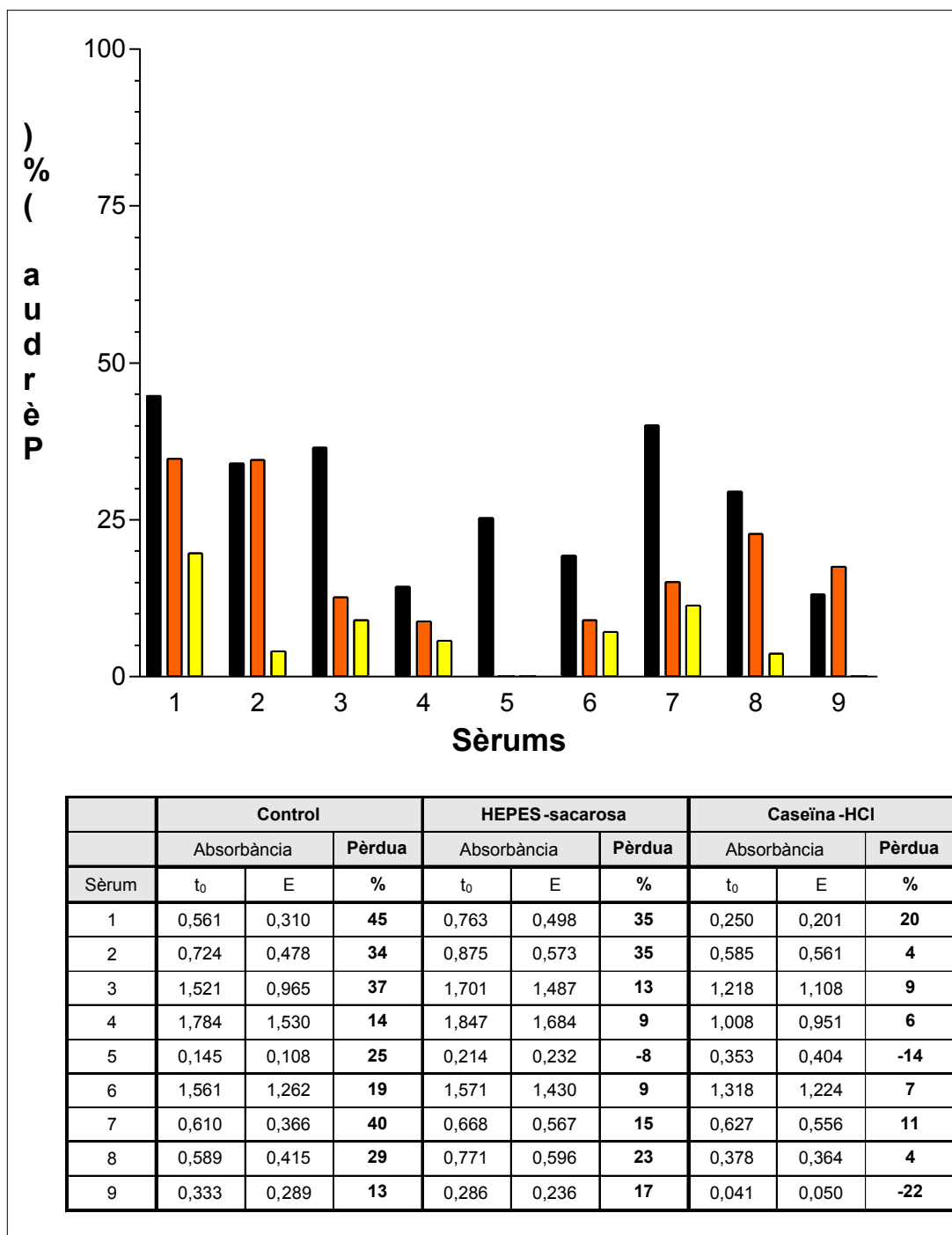


Figura 3.27. Representació de la pèrdua de senyal (en %) observada per a diferents sèrums valorats per ELISA amb microplaques sensibilitzades amb l'antigen recombinant SS-B (La)-His i tractades amb diferents dissolucions estabilitzants: control (negre), tampó HEPES-sacarosa (taronja) i tampó caseïna-HCl (groc). La pèrdua es calculà tal com s'ha descrit (veure apartat 2.5.2.1). A la taula es presenten els valors d'absorbància obtinguts en els assajos i que s'han usat per calcular la pèrdua de senyal que es representa al diagrama de barres.

En el cas de l'enzimoinmunoanàlisi anti-SS-A (Ro) es provaren únicament les dissolucions HEPES-sacarosa i caseïna-HCl. Malgrat que la pèrdua de senyal després d'incubar a 37°C durant 7 dies no era tan gran com en el cas de l'enzimoinmunoanàlisi anti-SS-B (La) (figura

3.25), també s'observà una estabilització dels senyals si s'utilitzaven les dues dissolucions, sobretot si s'emprava la dissolució caseïna-HCl (figura 3.28).

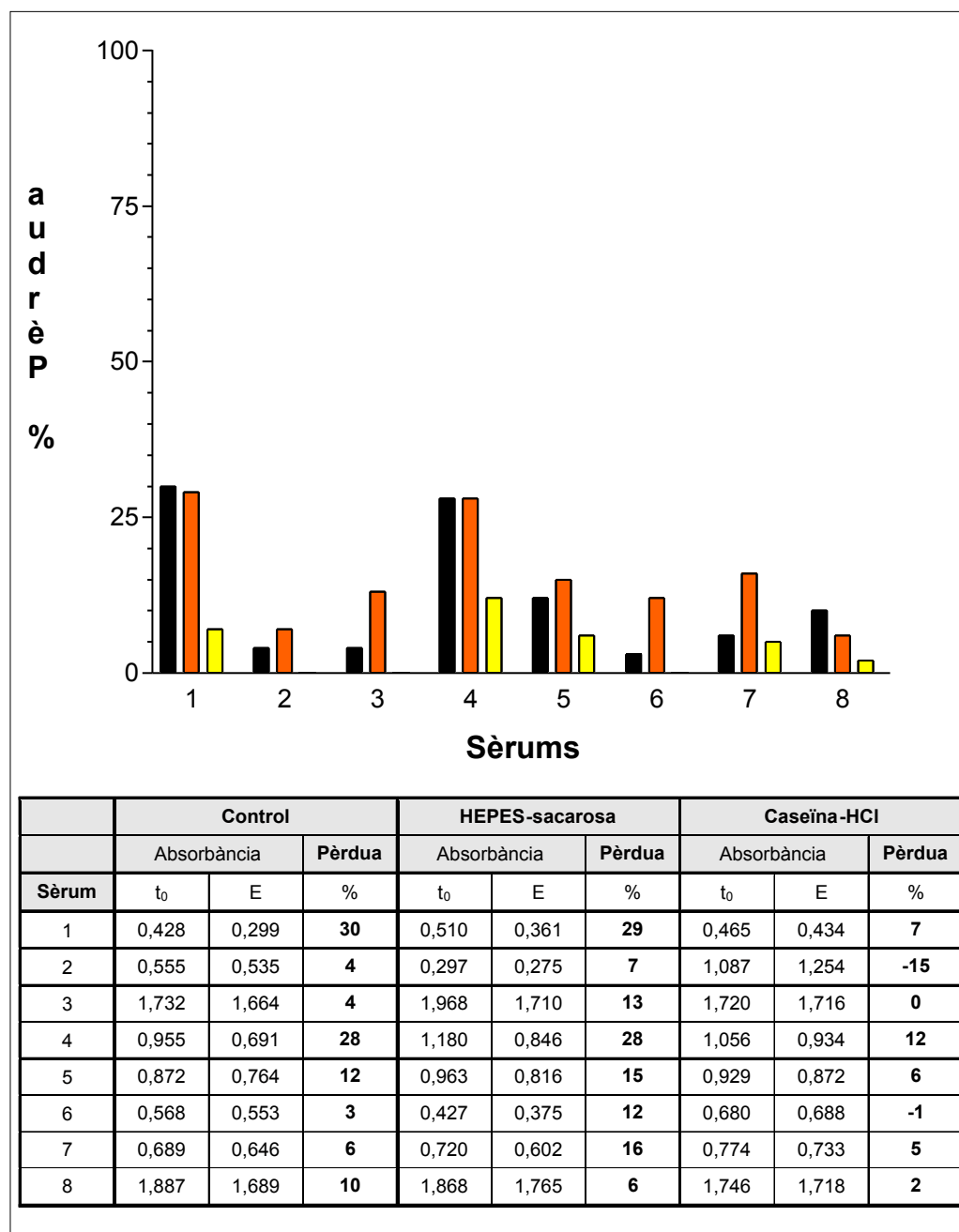


Figura 3.28. Representació de la pèrdua de senyal (en %) observada per a diferents sèrums valorats per ELISA amb microplaques sensibilitzades amb els antígens recombinants Ro60-GST i Ro52-GST i tractades amb diferents dissolucions estabilitzants: control (negre), tampó HEPES-sacarosa (taronja) i tampó caseïna-HCl (groc). La pèrdua es calculà tal com s'ha descrit (veure apartat 2.5.2.1). A la taula es presenten els valors d'absorbància obtinguts en els assajos i que s'han usat per calcular la pèrdua de senyal que es representa al diagrama de barres.

L'efecte d'aquestes dues dissolucions sobre els senyals obtinguts en condicions t₀ s'estudià de la mateixa manera que en el cas de l'ELISA anti-SS-B (La), i els resultats es presenten a

Resultats

la taula 3.3. En el cas de la dissolució HEPES-sacarosa no s'observà la mateixa tendència en tots els sèrums, ja que en alguns casos el senyal augmentà i en d'altres disminuí. En canvi, per al tampó caseïna-HCl el senyal sempre augmentà, tot i que en alguns casos l'augment fou molt important (fins a un 96%), però en d'altres fou nul o lleugerament negatiu.

Sèrum	Control	HEPES-sacarosa		Caseïna-HCl	
	Abs t_0	Abs t_0	Δ (%)	Abs t_0	Δ (%)
1	0,428	0,510	19	0,465	9
2	0,555	0,297	-47	1,087	96
3	1,732	1,968	14	1,720	-1
4	0,955	1,180	24	1,056	11
5	0,872	0,963	10	0,929	7
6	0,568	0,427	-25	0,680	20
7	0,689	0,720	5	0,774	12
8	1,887	1,868	-1	1,746	-7

Taula 3.3. Efecte de les dissolucions estabilitzants HEPES-sacarosa i caseïna-HCl sobre els senyals (valors d'absorbància) obtinguts en condicions t_0 per a diferents sèrums valorats per ELISA amb microplaques sensibilitzades amb els antigens recombinants Ro60-GST i Ro52-GST. La diferència (Δ) en % es calculà tal com s'ha descrit (apartat 2.5.2.1).

3.3.2. Calibració de les ELISA: establiment del valor d'absorbància discriminant

Per a la calibració de les ELISA va caldre determinar un valor d'absorbància discriminant, és a dir, un valor d'absorbància que permetés diferenciar els sèrums positius dels negatius.

En una primera aproximació, es va determinar un valor d'absorbància discriminant provisional que posteriorment s'utilitzà per trobar el valor definitiu. Així doncs, es van valorar 54 sèrums negatius (segons el mètode de referència, apartat 2.5.4.1) per a SS-A (Ro) i 59 per a SS-B (La) i els resultats obtinguts es representaren gràficament mitjançant un diagrama de caixes (figura 3.29). Seguidament, es van determinar els valors aberrants obtinguts en cada assaig (7 per al cas de l'ELISA anti-SS-B (La) i 2 per al de SS-A (Ro)), es van eliminar i amb la resta de dades es calcularen els estadístics descriptius i els valors d'absorbància discriminants provisionals (taula 3.4).

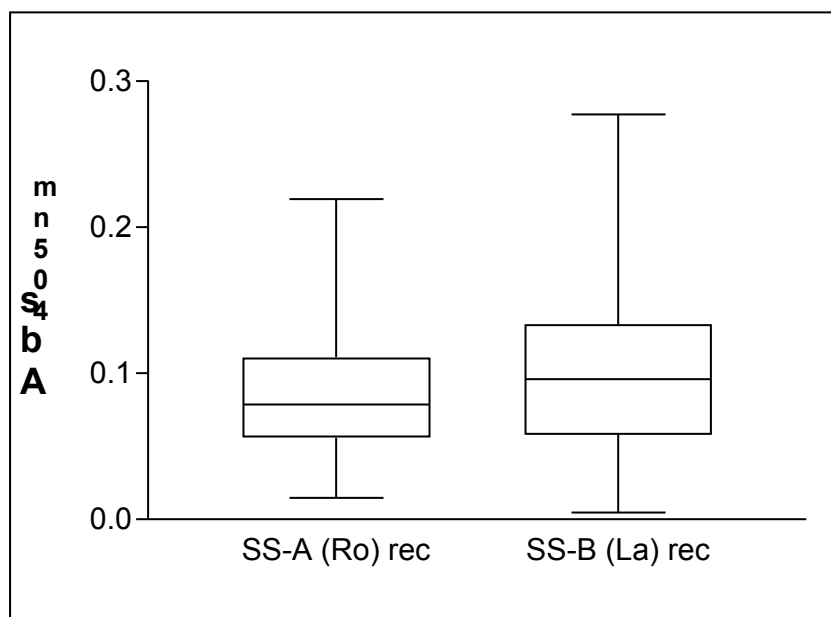


Figura 3.29. Diagrames de caixes per determinar el valor d'absorbància discriminant provisional de les ELISA anti-SS-B (La) o anti-SS-A (Ro). La línia horitzontal representa el valor de la mediana, l'extrem superior i inferior de les caixes indiquen el valor del percentil 75 i 25, respectivament, i les línies (*whiskers*) superiors i inferiors els valors màxims i mínims.

	N	Mitjana (\bar{x})	Desviació típica (s)	Valor d'abs. discriminant ($\bar{x} + 3s$)
ELISA anti-SS-B (La)	56	0,101	0,061	0,284
ELISA anti-SS-A (Ro)	54	0,098	0,061	0,281

Taula 3.4. Resultats del càlcul estadístic dels valors d'absorbància discriminants provisionals per a les dues ELISA.

Com que el percentatge de valors aberrants era força elevat, sobretot en el cas de l'ELISA anti-SS-B (La) (12,5% (7/56), mentre que per a l'ELISA anti-SS-A (Ro) era del 3,7% (2/54)), es va decidir buscar el valor d'absorbància discriminant final pel mètode de la representació de les corbes ROC.

Així doncs, s'escolliren de forma arbitrària valors a l'entorn d'aquests valors d'absorbància discriminants provisionals (0,200, 0,250, 0,300, 0,350, 0,400, 0,450, 0,500, 0,550 i 0,600), i es valoraren sèrums positius i negatius (segons el mètode de referència, apartat 2.5.4.1) tal com s'ha descrit a l'apartat 2.5.4.3. Els resultats obtinguts es representen a la figura 3.30.

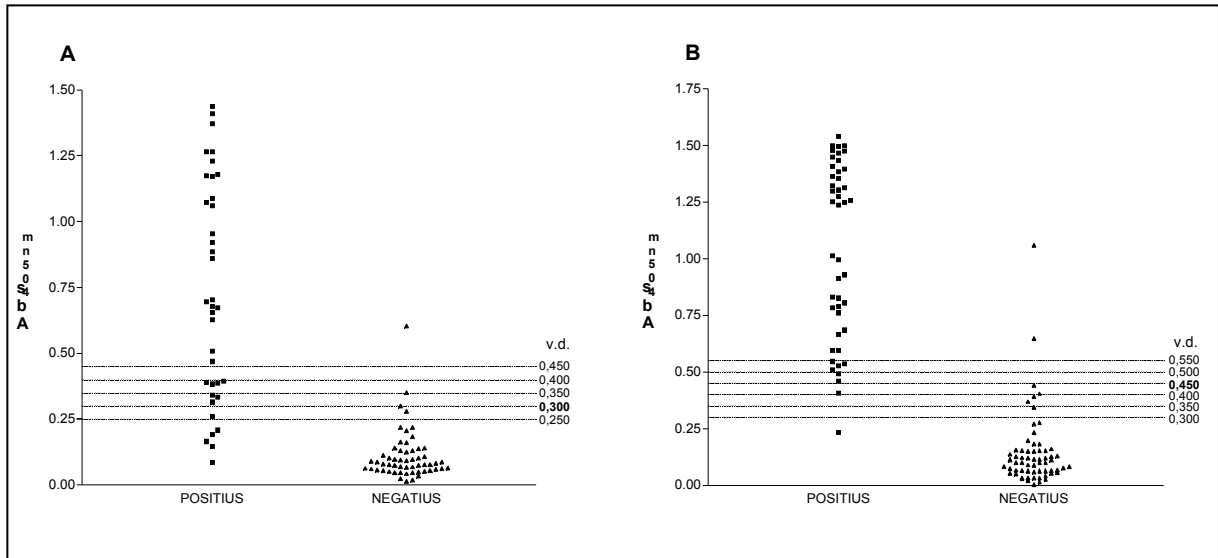


Figura 3.30. Representació gràfica de la determinació del valor d'absorbància discriminant final mitjançant ELISA de sèrums positius i negatius (segons el mètode de referència, apartat 2.5.4.1) per SS-A (Ro) (gràfic A) i SS-B (La) (gràfic B). Les línies discontinues representen els valors d'absorbància discriminants provisionals que no rebutjaren la hipòtesi nul·la plantejada en el test de McNemar (apartat 2.6.3) i pels quals es van construir les taules de contingència. En negreta es marquen els valors d'absorbància discriminants finals. v.d.: valor d'absorbància discriminant.

L'anàlisi estadístic de les taules de contingència obtingudes (apartat 2.6.3) resultà en el rebuig de la hipòtesi nul·la plantejada en el test de McNemar per als valors 0,200, 0,250 i 0,600, en el cas de SS-B (La), i per als valors 0,200, 0,450 i superiors, en el cas de SS-A (Ro). Tots aquests valors es descartaren per als càlculs posteriors, mentre que per a la resta de valors d'absorbància es calcularen la sensibilitat i l'especificitat relatives (taula 3.5) i es representaren les corbes ROC (figura 3.31).

El valor d'absorbància discriminant òptim fou el que més s'acostà al punt (0,100) en la representació de les corbes ROC (gràfiques A i C), però amb un valor d'especificitat relativa més elevat, ja que com que es tractava de proves confirmatòries es prioritzà l'especificitat sobre la sensibilitat.

Una altra forma de determinar gràficament el valor d'absorbància discriminant final fou la representació de les corbes de sensibilitat i especificitat relatives en front del valor d'absorbància discriminant (gràfiques B i D) on s'escollí com a valor òptim el punt que presentava una millor relació entre sensibilitat i especificitat, és a dir, el més proper al punt de tall de les dues corbes, però amb un valor d'especificitat relativa més elevat.

Assaig	Valor d'abs. discriminant	Sensibilitat relativa	Especificitat relativa
ELISA anti-SS-B (La)	0,300	98%	89%
	0,350	98%	90%
	0,400	98%	94%
	0,450	96%	97%
	0,500	91%	97%
	0,550	82%	97%
ELISA anti-SS-A (Ro)	0,250	90%	89%
	0,300	88%	93%
	0,350	86%	95%
	0,400	79%	97%

Taula 3.5. Valors de sensibilitat i especificitat relatives per als diferents valors d'absorbància discriminants provisionals proposats per a cada ELISA. Al requadre i en negreta es marquen els valors d'absorbància discriminants definitius escollits.

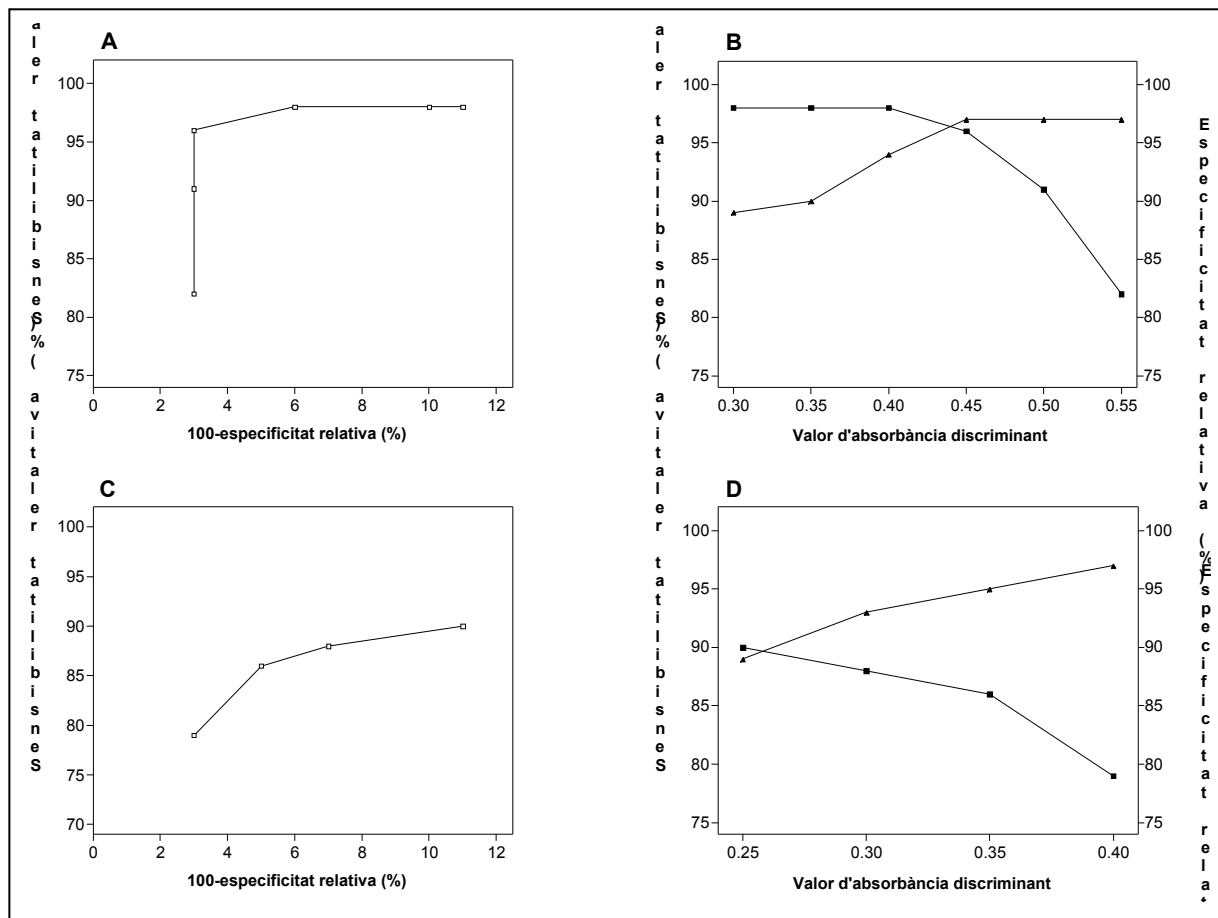


Figura 3.31. A i C, corbes ROC corresponents a les ELISA anti-SS-B (La) i anti-SS-A (Ro), respectivament. B i D, representacions gràfiques de la sensibilitat i l'especificitat relatives enfront del valor d'absorbància discriminant per a les ELISA anti-SS-B (La) i anti-SS-A (Ro), respectivament.

3.3.3. Determinació de les característiques diagnòstiques

Un cop determinats els valors d'absorbància discriminants definitius es van calcular l'especificitat i la sensibilitat relatives, així com la concordància entre el mètode de referència i el mètode desenvolupat amb l'antigen recombinant a partir de les taules de contingència per a dades aparellades obtingudes (taules 3.6 i 3.7).

		Mètode amb l'antigen recombinant		S.R.
		Positiu	Negatiu	96%
Mètode de referència (Biosystems)	Positiu (45)	43	2	E.R. 97%
	Negatiu (63)	2	61	Cdància. 96%
Total		108		

Taula 3.6. Taula de contingència per a dades aparellades dels resultats obtinguts per a l'ELISA anti-SS-B (La) considerant com a valor d'absorbància discriminant 0,450, i valors calculats de sensibilitat relativa (S.R.), especificitat relativa (E.R.) i concordància (Cdància).

		Mètode amb l'antigen recombinant		S.R.
		Positiu	Negatiu	88%
Mètode de referència (Shield)	Positiu (42)	37	5	E.R. 93%
	Negatiu (61)	4	57	Cdància. 91%
Total		103		

Taula 3.7. Taula de contingència per a dades aparellades dels resultats obtinguts per a l'ELISA anti-SS-A (La) considerant com a valor d'absorbància discriminant 0,300, i valors calculats de sensibilitat relativa (S.R.), especificitat relativa (E.R.) i concordància (Cdància).

3.3.4. Estandarització

La preparació del control del valor discriminant per a cada ELISA es va realitzar tal com s'ha descrit a l'apartat 2.5.4.4. Per a l'ELISA anti-SS-B (La) es van realitzar dilucions 1:1,5 del sèrum positiu partint d'una dilució inicial 1:2000 (o 0,00050). A la corba obtinguda (figura 3.32A) s'observà que el valor d'absorbància discriminant final per a SS-B (La) ($Abs_{405nm} = 0,450$) corresponia a una dilució 0,00010 (o 1:10.000). En el cas de l'ELISA anti-SS-A (Ro) també es van realitzar dilucions 1:1,5, però partint d'una dilució inicial 1:600 (o 0,00167). La interpol·lació a la corba obtinguda (figura 3.32B) del valor d'absorbància discriminant final per a SS-A (Ro) ($Abs_{405nm} = 0,300$) donà com a resultat una dilució 0,00018 (o 1:5556). Aquestes dilucions òptimes foren les que s'utilitzaren en la preparació dels controls del valor discriminant.

És important destacar que la valoració de les diferents dilucions del sèrum es va realitzar en el mateix assaig que s'utilitzà per determinar el valor d'absorbància discriminant, ja que únicament en les mateixes condicions es podia interpolar el valor d'absorbància discriminant final a la corba obtinguda pel sèrum.

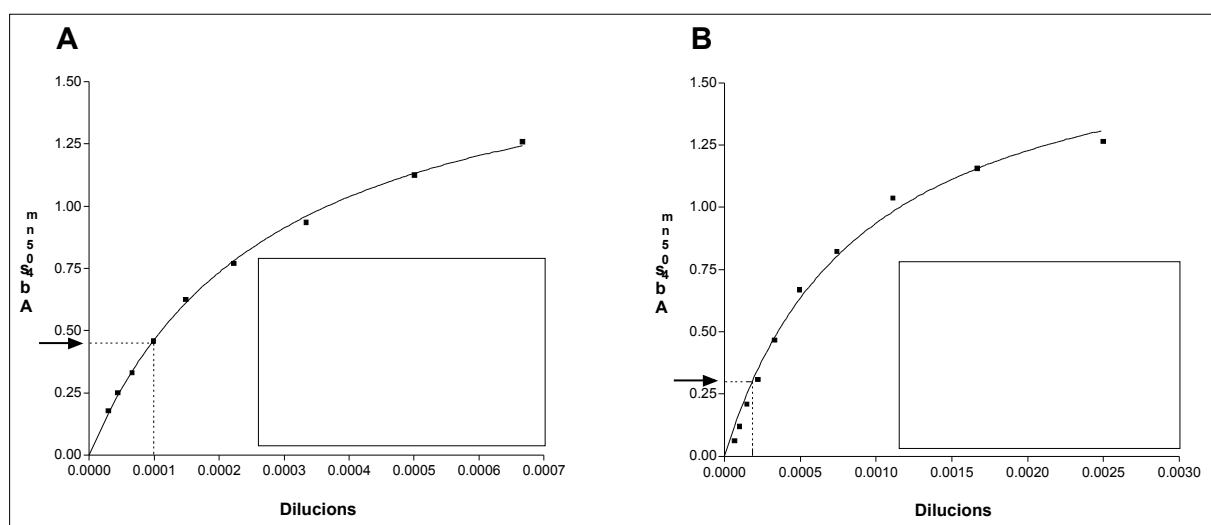


Figura 3.32. Determinació de les dilucions indicades per a la preparació dels controls del valor discriminant per SS-B (La) (gràfica A) i per SS-A (Ro) (gràfica B). La valoració dels sèrums positius (segons els mètodes de referència) es va realitzar mitjançant una sèrie de dilucions 1:1,5 i partint d'una dilució 1:2000 (0,00050) per a SS-B (La) i d'una 1:600 (0,00167) per a SS-A (Ro). A les gràfiques s'indica la interpol·lació dels valors discriminants finals ($Abs_{405nm} = 0,450$ per a SS-B (La) i $Abs_{405nm} = 0,300$ per a SS-A (Ro)) a les corbes.

3.3.5. Determinació de les característiques analítiques

3.3.5.1. Imprecisió

Per determinar la imprecisió de les enzimoimmunoanàlisis es va seguir el procediment descrit a l'apartat 2.5.6.1.

En el cas de l'ELISA anti-SS-B (La), es detectà un valor aberrant per al nivell mig que es descartà per a la resta de càlculs posteriors. Un cop comprovada la normalitat de les distribucions (apartat 2.6.1) així com l'homogeneïtat de les variàncies, es realitzaren els anàlisis de l'ANOVA (apartat 2.6.2) per determinar la principal font de variació (taula 3.8).

	Tipus de variació	Suma de quadrats	Graus de llibertat	Mitjana de quadrats	F_{Snedecor}	Nivell de significació
Nivell elevat (26 U/mL)	Interdiària	0,29000	4	0,07257	28,789	0,000
	Intradiària	0,05041	20	0,00252		
	Total	0,34100	24			
Nivell mig (11 U/mL)	Interdiària	0,05921	4	0,01480	19,323	0,000
	Intradiària	0,01455	19	0,00077		
	Total	0,07376	23			

Taula 3.8. Anàlisi de la variància per a l'ELISA anti-SS-B (La).

Per a ambdós espècimens el nivell de significació era significativament diferent de 0 (per = 0,05), de manera que es podia assegurar que la variació era deguda, principalment, a la variabilitat interdiària i no intradiària. A partir de les mitjanes de quadrats es calcularen els coeficients de variació i s'obtingueren els resultats que es presenten a la taula 3.9.

	Intradiària	Interdiària
	CV %	CV %
Nivell elevat	1,94	10,3
Nivell mig	2,21	9,73

Taula 3.9. Coeficients de variació intradiaris i interdiaris pels dos sèrums valorats en l'ELISA anti-SS-B (La).

Per a l'enzimoimmunoanàlisi anti-SS-A (Ro) no es detectaren valors aberrants en cap dels dos espècimens. Un cop comprovada la normalitat de les distribucions (apartat 2.6.1) i l'homogeneïtat de les variàncies, es realitzaren els anàlisis de l'ANOVA (apartat 2.6.2). Els resultats es presenten a la taula següent:

	Tipus de variació	Suma de quadrats	Graus de llibertat	Mitjana de quadrats	F _{Snedecor}	Nivell de significació
Nivell elevat (24 U/mL)	Interdiària	0,03689	2	0,01849	27,167	0,000
	Intradiària	0,00817	12	0,00068		
	Total	0,04515	14			
Nivell mig (13 U/mL)	Interdiària	0,00412	2	0,00206	40,288	0,000
	Intradiària	0,00061	12	0,00005		
	Total	0,00473	14			

Taula 3.10. Anàlisi de la variància per a l'ELISA anti-SS-A (Ro).

Com en el cas anterior, per a ambdós espècimens el nivell de significació era significativament diferent de 0 (per $\alpha = 0,05$), de manera que es podia assegurar que la variació era deguda, principalment, a la variabilitat interdiària i no intradiària. A partir de les mitjanes de quadrats es calcularen els coeficients de variació i s'obtingueren els resultats que es presenten a la taula 3.11.

	Intradiària	Interdiària
	CV %	CV %
Nivell elevat	2,15	11,21
Nivell mig	1,57	9,98

Taula 3.11. Coeficients de variació intradiaris i interdiaris pels dos sèrums valorats en l'ELISA anti-SS-A (Ro).

3.3.5.2. Límit de detecció

El límit de detecció s'estudià segons el protocol descrit a l'apartat 2.5.6.2 i s'expressà en termes d'unitats d'absorbància. Els valors que es van obtenir van ser de $0,094 \pm 0,010$ per a l'ELISA anti-SS-B (La) i de $0,072 \pm 0,012$ per a l'anti-SS-A (Ro).

3.3.5.3. Especificitat analítica de les enzimoimmunoanàlisis

L'estudi de l'especificitat analítica de les enzimoimmunoanàlisis es dugué a terme tal com s'ha descrit (apartat 2.5.6.3). Per a l'ELISA anti-SS-B (La), els resultats obtinguts demostraren una reactivitat positiva només pels sèrums AF/CDC2 -específic contra SS-B (La)- i AF/CDC3 -patró de marcatge clapejat que conté anticossos dirigits contra SS-B (La), SS-A (Ro) i U1-RNP. Per a la resta de sèrums no s'observà un reconeixement de l'antigen pels anticossos, de manera que es demostrà l'absència de reaccions creuades (taula 3.12). Per a SS-A (Ro), l'assaig va resultar positiu pels sèrums AF/CDC3 -marcatge clapejat que conté anticossos dirigits contra SS-B (La), SS-A (Ro) i U1-RNP-, AF/CDC7 -específic contra SS-A (Ro)- i AF/CDC10 -específic contra Jo-1-.

Sèrum	Especificitat designada	ELISA anti-SS-B (La)	ELISA anti-SS-A (Ro)
AF/CDC1	Marcatge ANA homogeni	Negatiu	Negatiu
AF/CDC2	SS-B (La)	Positiu	Negatiu
AF/CDC3	Marcatge ANA clapejat	Positiu	Positiu
AF/CDC4	U1 RNP (U1 <i>small nuclear</i> RNP)	Negatiu	Negatiu
AF/CDC5	Sm (U1, U2, U5, U4/6 <i>small nuclear</i> RNP)	Negatiu	Negatiu
AF/CDC6	Marcatge ANA nucleolar	Negatiu	Negatiu
AF/CDC7	SS-A (Ro)	Negatiu	Positiu
AF/CDC8	Marcatge ANA centromèric	Negatiu	Negatiu
AF/CDC9	Sci-70 (DNA topoisomerasa I)	Negatiu	Negatiu
AF/CDC10	Jo-1 (hisitidil-tRNA sintetasa)	Negatiu	Positiu

Taula 3.12. Resultats obtinguts en la valoració amb les enzimoimmunoanàlisis desenvolupades de diferents sèrums d'especificitat coneguda, determinada per tècniques d'immunotransferència i immunofluorescència indirecta.

3.3.5.4. Interferència del factor reumatoide

Per a cada ELISA s'estudià l'efecte interferent del factor reumatoide (anticossos dirigits contra immunoglobulines) en una mescla de diferents sèrums, seguint el protocol descrit a l'apartat 2.5.6.4.

Els resultats obtinguts es presenten gràficament a la figura 3.33. En cap de les dues enzimoimmunoanàlisis es va observar una desviació superior al 95% de l'interval de confiança.

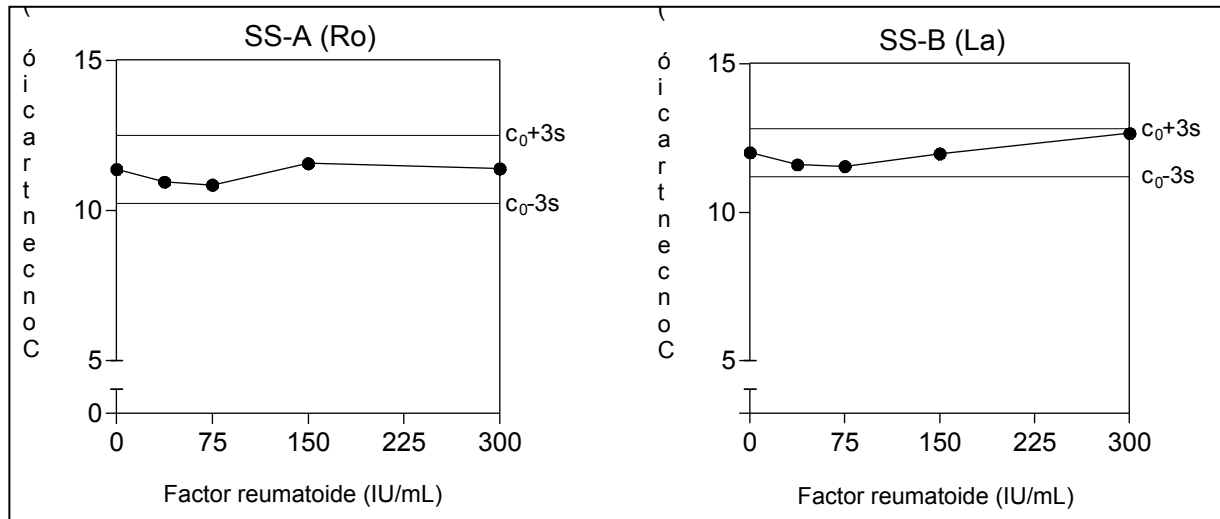


Figura 3.33. Estudi d'interferència del factor reumatoide en les enzimoimmunoanàlisis anti-SS-A (Ro) i anti-SS-B (La). El valor de concentració (IU/mL) es calculà tal com s'ha descrit a l'apartat 2.5.3. Les línies discontinües defineixen l'interval de confiança del 95% de c_0 (mescla de sèrums amb una concentració de factor reumatoide de 0 IU/mL).

4. DISCUSSIÓ

4.1. CONSTRUCCIÓ DELS VECTORS D'EXPRESSIÓ

Es van escollir sistemes d'expressió procariotes, *Escherichia coli*, perquè presentaven com a avantatges principals la fàcil manipulació, el baix cost, el creixement ràpid i la possibilitat d'obtenció de quantitats grans de proteïna. El sistema d'expressió que s'escollí fou un sistema basat en les proteïnes de fusió, ja que permetia la seva purificació per cromatografia d'afinitat i evitava protocols de purificació més llargs i no tant específics (Adam et al., 1986).

En una primera instància, els DNA codificants per a les proteïnes SS-B (La), Ro60 i Ro52 s'intentaren aconseguir mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de llibreries de cDNA obtingudes de cèl·lules de tumors de mama i de limfoma de cèl·lules B. Malgrat obtenir alguns resultats, les seqüències obtingudes no corresponien a la totalitat del cDNA d'interès. Finalment, es va optar per utilitzar el cDNA cedit gentilmente pels grups del Chan (Chan et al., 1989b) i del Dr. McCauliffe (McCauliffe et al., 1994).

4.1.1. Vector d'expressió de l'antigen SS-B (La)

El cDNA codificant per a l'antigen SS-B (La) estava clonat en un vector que li mancaven els elements necessaris per poder ser utilitzat en organismes procariotes amb l'objectiu de produir proteïnes recombinants. Així doncs, el primer pas fou extreure el cDNA del vector on estava clonat mitjançant una PCR i inserir-lo en un vector d'expressió adient. En l'amplificació del cDNA s'utilitzaren dos oligonucleòtids complementaris als extrems de la seqüència que incorporaren a l'extrem 5' les seqüències reconegudes pels enzims de restricció *Nde* I i *Hind* III. Aquestes dianes de restricció estaven absents a la seqüència de cDNA codificant per a l'antigen i presents únicament al lloc de clonatge múltiple (MCS) del vector d'expressió. D'aquesta manera s'assegurava la possibilitat d'inserir el cDNA en un únic punt del vector i de forma direccional.

Per construir el vector d'expressió recombinant calia unir el fragment de DNA obtingut per PCR amb el vector d'expressió. En un primer intent s'intentà lligar els dos fragments de DNA prèviament digerits amb els enzims de restricció, però malgrat que es provaren diferents condicions en cap cas es va obtenir el vector d'expressió recombinant. Com que els enzims de restricció són endonucleases i, per tant, presenten una activitat menor a mesura que les dianes se situen més als extrems d'una seqüència lineal de DNA, es va optar per incorporar un pas de subclonació del fragment de PCR en un vector de clonatge ja preparat per a rebre aquest tipus d'inserts. D'aquesta manera es podia mantenir un bon rendiment en les digestions posteriors, ja que es realitzaven en una cadena de DNA circular i, per tant, sense

extrems. Així doncs, en el procediment finalment escollit el fragment obtingut per PCR es clonà al vector de clonatge pCR[®]2.1 (Invitrogen) que permetia comprovar l'èxit de la lligació visualment pel mètode de les colònies blaves i blanques (apartat 2.3.1.2). La comprovació de la presència de l'insert de mida correcta es dugué a terme mitjançant una digestió amb l'enzim de restricció *EcoR* I, ja que el vector de clonatge presentava dues dianes a cada banda del punt d'inserció del fragment de DNA. Així, si el DNA plasmídic purificat d'una colònia blanca contenia l'insert, la digestió resultava en dos fragments corresponents al vector de clonatge pCR[®]2.1 i a l'insert, mentre que si la colònia era blanca per algun artefacte però no contenia l'insert, la digestió resultava en un únic fragment corresponent al vector de clonatge. Després de digerir el vector de clonatge recombinant obtingut (pCR-SS-B) amb els enzims *Nde* I i *Hind* III i inserir el fragment SS-B (La) en el vector d'expressió pET-20b(+), es va obtenir el vector d'expressió recombinant pET-SS-B. La comprovació de la seqüència es realitzà, en primer lloc, mitjançant una digestió analítica amb l'enzim de restricció *Bgl* II. Com que tant el vector d'expressió com l'insert presentaven una única diana per a aquest enzim, la digestió del DNA plasmídic dels clons que havien incorporat el vector d'expressió recombinant (pET-SS-B) resultà en dos fragments de DNA, mentre que en els casos que hi havia hagut una relligació del vector d'expressió pET-20b(+) s'observà una única banda. En seqüenciar l'insert s'observaren algunes mutacions puntuals conservatives (no canviava l'aminoàcid codificat pel triplet de bases) respecte la seqüència descrita (Chan et al., 1989b), però els fets estructurals importants (lloc d'unió del ribosoma (*RBS*, *ribosome-binding site*), codó d'iniciació, dianes de restricció, oligonucleòtid que codifica pels sis residus d'histidines i codó de terminació) foren correctes.

4.1.2. Vectors d'expressió dels antígens Ro60 i Ro52

Els cDNA dels antígens Ro60 i Ro52 es trobaven ja inserits en un vector d'expressió que codificava per a una proteïna de fusió formada per l'antigen Ro60 i la proteïna glutatió S-transferasa (GST), en un cas, i l'antigen Ro52 i la proteïna GST, en l'altre. Aquest pèptid portador permetia la purificació mitjançant cromatografia d'afinitat de les proteïnes recombinants, de manera que no fou necessari manipular els vectors. Així doncs, es procedí a introduir aquests DNA a les cèl·lules adients, a comprovar l'expressió en *Escherichia coli* i, finalment, a purificar les proteïnes recombinants obtingudes.

4.2. OBTENCIÓ DE LES PROTEÏNES DE FUSIÓ

4.2.1. Expressió de les proteïnes recombinants

Una vegada obtinguts els vectors d'expressió de les tres proteïnes de fusió s'inicià l'estudi de l'expressió en diferents soques d'*Escherichia coli*. Com que els vectors pET-20b(+) i pGEX-2T estaven sotmesos al control d'expressió del bacteriòfag T7, calia utilitzar o bé la RNA polimerasa d'aquest fag o bé soques que presentessin una còpia en el seu genoma del gen codificant per a aquesta proteïna (apartat 1.9.3). Es van provar dues soques lisogèniques DE3 que presentaven una còpia del gen codificant per a la RNA polimerasa del bacteriòfag T7 sotmesa al control d'un operó *lac*: HMS174(DE3)pLysS i BL21(DE3)pLysE. Aquestes soques presentaven el plàsmid pLys que codificava per a una liozima específica contra la RNA polimerasa del bacteriòfag T7, de manera que ajudava a disminuir l'expressió basal del gen.

Les proves d'expressió es van realitzar amb el plàsmid d'expressió recombinant pGEX-2T-Ro60 que s'introduí a les dues soques d'*Escherichia coli*. El grau d'expressió es comprovà mitjançant electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants. En ambdós casos aparegué una banda de proteïna intensa de 83 kDa (calculats) al cap de 3 hores d'haver afegit l'IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosid, inductor de la transcripció de la RNA polimerasa del T7), però en el cas de la soca BL21(DE3)pLysE aquesta banda (que posteriorment es demostrà que es tractava de la proteïna de fusió Ro60-GST) també aparegué abans d'afegir l'IPTG. Així doncs, només en el cas de les cèl·lules d'*Escherichia coli* de la soca HMS174(DE3)pLysS s'observà una bona repressió de l'expressió basal (expressió observada abans d'afegir l'IPTG) i, per tant, aquesta soca fou la que s'escollí per a l'expressió dels tres antígens recombinants: SS-B (La)-His, Ro60-GST i Ro52-GST. S'obtingueren uns bons nivells i un bon control de l'expressió en tots els casos.

4.2.2. Purificació de la proteïna SS-B (La)-His

Les proves d'expressió demostraren que la proteïna es trobava majoritàriament al sobrenedant del lisat cel·lular, de manera que la mostra que s'aplicà a la columna fou aquesta fracció. La cromatografia en condicions no desnaturalitzants de la proteïna es va seguir mitjançant la determinació d'absorbància a 280 nm de les diferents fraccions obtingudes. El perfil d'elució obtingut presentava un allargament pel darrera, característic de les cromatografies d'afinitat.

4.2.2.1. Identificació de la proteïna SS-B (La)-His

La proteïna recombinant SS-B (La)-His purificada s'identificà molecularment mitjançant electroforesi en gels de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants, i antigènicament mitjançant immunotransferències i revelats amb anticossos específics (dirigits contra l'antigen SS-B (La) o contra l'oligopèptid d'histidines), i mitjançant immunotransferències competitives amb l'antigen natiu.

L'electroforesi de la fracció corresponent al sobrenedant resultant de la centrifugació del cultiu bacterià lisat presentà una banda de proteïna de massa molar de 48 kDa (calculada) que no apareixia al precipitat i que coincidí amb la massa molar de la proteïna SS-B (La)-His descrita a la bibliografia (Chan et al., 1989a). Aquesta banda també es va poder observar, però en menor intensitat, a la fracció no retinguda on sortien la majoria de la resta de proteïnes. Així doncs, part de la proteïna recombinant no havia quedat retinguda a la resina, però posteriorment es comprovà que augmentant lleugerament la quantitat de resina la banda arribava a desaparèixer, la qual cosa suggeria un problema de saturació de la resina. En les fraccions corresponents a l'elució amb el tampó amb una concentració d'imidazole de 100 mmol/L s'observà l'aparició de nou de la banda de proteïna de 48 kDa que havia desaparegut en el rentat, de manera que es podia assegurar que la proteïna eluïda havia quedat retinguda a la resina. De fet, la proteïna començava a desenganxar-se de la resina durant l'últim rentat amb el tampó amb una concentració d'imidazole de 20 mmol/L, però el rentat es va mantenir perquè ajudava eliminar proteïnes inespecífiques i obtenir, en l'eluït, la proteïna més purificada.

Les immunotransferències i els revelats amb un sèrum amb anticossos dirigits contra SS-B (La) i amb un anticòs dirigit contra l'oligopèptid d'histidines van permetre comprovar la identitat de la banda observada en la fracció eluïda en l'electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants. En amdós casos, la banda de 48 kDa va ser reconeguda pels anticossos, i això confirmà que s'havia purificat la proteïna recombinant formada per l'antigen SS-B (La) i el pèptid portador de 6 histidines.

Finalment, es comprovà que l'antigenicitat de la proteïna recombinant era equivalent a la de la proteïna nativa mitjançant immunotransferència competitiva. S'observà que si s'afegia antigen natiu en excés al sèrum utilitzat com a anticòs primari, s'incubava un temps suficient i després es centrifugava per eliminar els possibles immunocomplexos formats, la banda que s'obtenia en el control (immunotransferència i revelat amb un sèrum amb anticossos dirigits contra SS-B (La)) desapareixia. Així doncs, els mateixos anticossos que en el control s'unien a l'antigen recombinant immobilitzat a la membrana també s'unien, en l'assaig competitiu, a

l'antigen natiu. D'aquesta manera, es demostrà que l'antigen recombinant obtingut presentava la mateixa antigenicitat que el natiu quan s'enfrontava a un sèrum anti-SS-B (La) específic.

4.2.3. Purificació de les proteïnes Ro60-GST i Ro52-GST

Les proves d'expressió realitzades amb les cèl·lules a les que se'ls havia introduït el cDNA codificant per a les proteïnes de fusió Ro60-GST i Ro52-GST van demostrar que les proteïnes es trobaven únicament als precipitats dels lisats cel·lulars, segurament degut a la formació de cossos d'inclusió per part dels bacteris. Els cossos d'inclusió són agregats insolubles de formes intermitges de plegament de les proteïnes i la seva formació depèn de la naturalesa de la proteïna (càrrega promig, hidrofilitat, nombre total de residus i fracció de residus de cisteïna i de prolina, principalment), de l'entorn redox on s'expressa la proteïna exògena i del seu grau de producció (Hannig i Makrides, 1998). Malgrat que els cossos d'inclusió presenten l'avantatge de protegir la proteïna de les proteases i de mantenir-la inactiva (i per tant, de no danyar l'hoste), la seva presència suposa un inconvenient a l'hora de la purificació, degut a diferents factors: el rendiment es veu disminuït, la proteïna es troba en diferents formes de plegament (la majoria d'elles formes intermitges) i és més difícil purificar la proteïna d'altres proteïnes que també han quedat "atrapades" a l'agregat.

Per poder purificar les proteïnes de fusió Ro60-GST i Ro52-GST mitjançant cromatografia d'afinitat calia que el pèptid portador (la proteïna GST) estigués en forma nativa, ja que el reconeixement entre el glutatió unit a la resina i la GST era una unió específica del tipus enzim-substrat. Així doncs, es va haver d'afegir un pas de solubilització de les proteïnes de fusió. Es van provar diferents detergents (Tritó[®] X-100, Nonidet[®] P-40, Sarkosyl i SDS) per solubilitzar la proteïna, però els resultats finals de les purificacions no foren òptims, bé com a conseqüència de possibles interferències dels detergents en la unió entre el lligand i la proteïna portadora (GST) durant la cromatografia, o bé degut a un baix rendiment en la solubilització de les proteïnes. És per això que es provà de solubilitzar les proteïnes a través d'un cicle de desnaturalització i renaturalització, malgrat que podia implicar perdre força quantitat de proteïna. La desnaturalització de la proteïna es realitzà mitjançant la utilització d'un tampó amb urea 6 mol/L i la renaturalització per diàlisi enfront del mateix tampó sense urea. Aquesta combinació fou la que resultà en una major recuperació de proteïna en forma soluble, tal com es comprovà mitjançant electroforesis en gels de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants.

En les cromatografies, que es van seguir mitjançant la determinació d'absorbància a 280 nm de les diferents fraccions obtingudes, en ambdós casos s'obtingué un perfil similar amb un pic d'elució allargat pel darrera, característic de les cromatografies d'afinitat.

4.2.3.1. Identificació de la proteïna Ro60-GST

La proteïna recombinant Ro60-GST purificada s'identificà molecularment mitjançant electroforesis en gels de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants, i antigènica mitjançant immunotransferències i revelat amb anticossos específics (dirigits contra l'antigen SS-A (Ro) o contra el pèptid portador GST), i mitjançant immunotransferències competitives amb l'antigen natiu.

L'electroforesi de la fracció eluïda de la purificació de la proteïna Ro60-GST presentà una banda de proteïna de 83 kDa que coincidia, aproximadament, amb la suma de les masses molars de la proteïna Ro60 (60 kDa) i de la glutatió S-transferasa (GST, 26kDa) tal com s'havia descrit a la bibliografia (Chan i Buyon, 1994). La diferència podria ser deguda, a la pràctica, a una mobilitat electroforètica diferent de la proteïna de fusió a causa de la composició aminoacídica. Aquesta banda de proteïna, que també s'observà a la fracció corresponent a la mostra aplicada a la columna, desapareixia completament a la fracció corresponent al rentat previ a l'elució, de manera que es podia assegurar que la proteïna havia quedat retinuda a la resina. L'elució de la proteïna recombinant fou exclusivament competitiva quan s'afegí el glutatió reduït.

A la immunotransferència revelada amb un sèrum amb anticossos dirigits contra l'antigen SS-A (Ro) s'observà, a les fraccions aplicada i eluïda, una banda de proteïna majoritària de 83 kDa (calculats) que també apareixia en el revelat amb l'anticòs dirigit contra la proteïna GST. Així doncs, els resultats suggerien que efectivament s'havia aconseguit purificar la proteïna de fusió Ro60-GST. No obstant, també s'observaren una banda de 57 kDa (calculats) en el revelat amb anticossos anti-SS-A (Ro) i una banda de 26 kDa (calculats) en el revelat amb l'anticòs anti-GST. El fet que aquestes bandes de proteïnes eren molt menys intenses que les corresponents a la proteïna sencera i que no s'observaven en la tinció amb blau de Coomassie de l'electroforesi en condicions desnaturalitzants (que presenta una sensibilitat molt menor que la immunotransferència) posava de manifest que la concentració d'aquestes proteïnes reconegudes específicament pels anticossos era baixa. Els dos fragments podien correspondre a una degradació de la proteïna de fusió en el punt d'unió de l'antigen Ro60 i el pèptid portador GST, ja que és una zona on hi ha una seqüència aminoacídica reconeguda per proteases sensible a la degradació (McCauliffe et al., 1994).

Això explicaria l'obtenció d'un fragment reconegut únicament per anticossos anti-SS-A (Ro), que correspondria a l'antigen Ro60, i un fragment reconegut únicament per l'anticòs anti-GST, que correspondria al pèptid portador GST (figura 4.1).

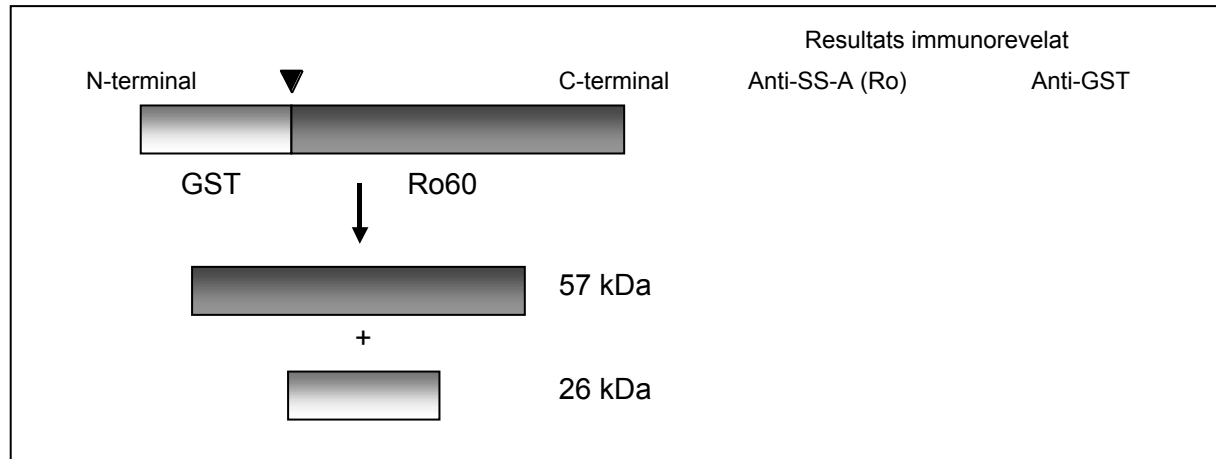


Figura 4.1. Fragments resultants de la degradació de la proteïna de fusió Ro60-GST i resultats obtinguts en els immunorevelats amb anticossos dirigits contra SS-A (Ro) o contra GST. El triangle invertit indica la posició de la diana de proteases present en la zona d'unió de la proteïna recombinant i el pèptid portador. (: positiu; :negatiu).

Aquesta proteòlisi parcial de la proteïna de fusió havia de tenir lloc durant l'etapa d'elució de la proteïna o després de la cromatografia, ja que el fragment de 57 kDa corresponent a l'antigen Ro60 no posseïa el pèptid portador (GST) responsable de la unió a la resina i, per tant, si s'hagués degradat abans de l'elució no hauria quedat retintut i no hauria aparegut a la fracció corresponent a l'eluit. No obstant, com que les bandes de 26 kDa i de 57 kDa també apareixien a la fracció corresponent a l'aplicació, la degradació s'havia d'haver iniciat abans de la cromatografia. En aquest cas, el fragment de 57 kDa havia d'aparèixer a la fracció no retinguda, ja que no presentava el pèptid portador, mentre que el fragment de 26 kDa no hi havia d'aparèixer perquè sí que quedava retintut a la columna. Efectivament, aquests resultats esperats foren els que s'observaren, suggerint que la hipòtesi de la degradació de la proteïna de fusió a la zona d'unió de l'antigen i el pèptid portador podia ser correcte. La proteòlisi no es va poder evitar ni afegint als tampons diferents inhibidors de proteases (pepstatina A, aprotinina, leupeptina i PMSF) ni mantenint la proteïna durant tot el procediment a 4°C o en un bany de gel.

Finalment, es realitzà la immunotransferència competitiva per comprovar la identitat antigènica de la proteïna recombinant purificada. S'observà que quan s'afegí un excés d'antigen SS-A (Ro) natiu al sèrum per tal de segrestar els anticossos, el senyal final obtingut desapareixia com en el cas de l'antigen SS-B (La). Així doncs, els mateixos anticossos que

s'unien a l'antigen recombinant immobilitzat a la membrana també s'unien a l'antigen natiu (en excés), de manera que en el sèrum no quedaven anticossos per poder-se unir a l'antigen immobilitzat a la membrana i, per tant, el senyal desapareixia. Els resultats van permetre comprovar que l'antigenicitat de la proteïna de fusió Ro60-GST purificada quan s'enfrontava a un sèrum anti-SS-A (Ro) específic era la mateixa que la de la proteïna nativa.

4.2.3.2. Identificació de la proteïna Ro52-GST

L'electroforesi de la fracció eluïda de la purificació de la proteïna Ro52-GST presentà un triplet característic de bandes de 80 kDa, 72 kDa i 63 kDa, ja descrit a la bibliografia (McCauliffe et al., 1994). La banda de massa molar superior coincidia, aproximadament, amb el càlcul teòric de la massa molar de la proteïna de fusió Ro52 (52 kDa) i GST (26 kDa), mentre que les altres dues podien ser resultat de la degradació de la proteïna recombinant (McCauliffe et al., 1994). Totes aquestes bandes també apareixien a la fracció corresponent a la mostra aplicada a la columna i això suggeria que la proteòlisi de la proteïna es donava abans de la cromatografia. Per altra banda, com que les tres bandes no apareixien a les fraccions corresponents als rentats, però sí que tornaven a aparèixer en la fracció corresponent a l'eluit, es podia concloure que les tres proteïnes mantenien unit el pèptid portador GST que les retenia a la resina, de forma que la degradació es donava (a diferència del cas de la proteïna de fusió Ro60-GST) per l'extrem contrari a la GST, és a dir, l'extrem C-terminal de la proteïna de fusió (figura 4.2).

La identitat de les bandes observades en l'electroforesi es va poder demostrar mitjançant les immunotransferències amb anticossos dirigits contra l'antigen SS-A (Ro) i amb anticossos contra la proteïna GST. Les fraccions corresponents a l'eluit i la mostra aplicada a la columna presentaven una banda de 63 kDa i dues bandes de menor intensitat de massa molar superior (80 i 72 kDa). La banda de 80 kDa, que segons l'electroforesi i la tinció amb blau de Coomassie podia correspondre a la proteïna sencera, era reconeguda per ambdós anticossos, de manera que es confirmava que es tractava de la proteïna de fusió Ro52-GST que s'havia aconseguit purificar. Les altres dues bandes, de 72 i 63 kDa, també eren reconegudes pels dos anticossos i això suggeria que eren fragments resultants de la proteòlisi de la proteïna sencera (figura 4.2). Els fragments restants, de 8 kDa (80 – 72), 9 kDa (72 – 63) o 17 kDa (80 – 63), no es van veure perquè migraven molt propers al front per qüestió de la resolució del gel de poliacrilamida. Aquesta degradació de la proteïna de fusió Ro52-GST podia donar-se bé per l'extrem N-terminal, que corresponia a l'extrem N-terminal del pèptid portador GST, o bé per l'extrem C-terminal, que corresponia al de l'antigen Ro52. Però el fet que les dues bandes de menor mida fossin reconegudes per l'anticòs anti-GST

suggeria que la degradació era per l'extrem C-terminal. A més, els epítops majoritaris de l'antigen Ro52 s'han descrit a la regió central i a l'extrem N-terminal de la proteïna (Wahren-Herlenius et al., 1999), de manera que si aquesta era la proteïna degradada no s'havien d'esperar diferències en el revelat dels anticossos específics anti-SS-A (Ro), tal com així va ser. La degradació es va donar en un percentatge elevat de mostra, ja que la banda de 63 kDa resultà ser la més intensa, però no es va poder evitar malgrat afegir als tampons diferents inhibidors de proteases (pepstatina A, aprotinina, leupeptina i PMSF) i tot i mantenir la proteïna durant tot el procediment a 4°C o en un bany de gel.

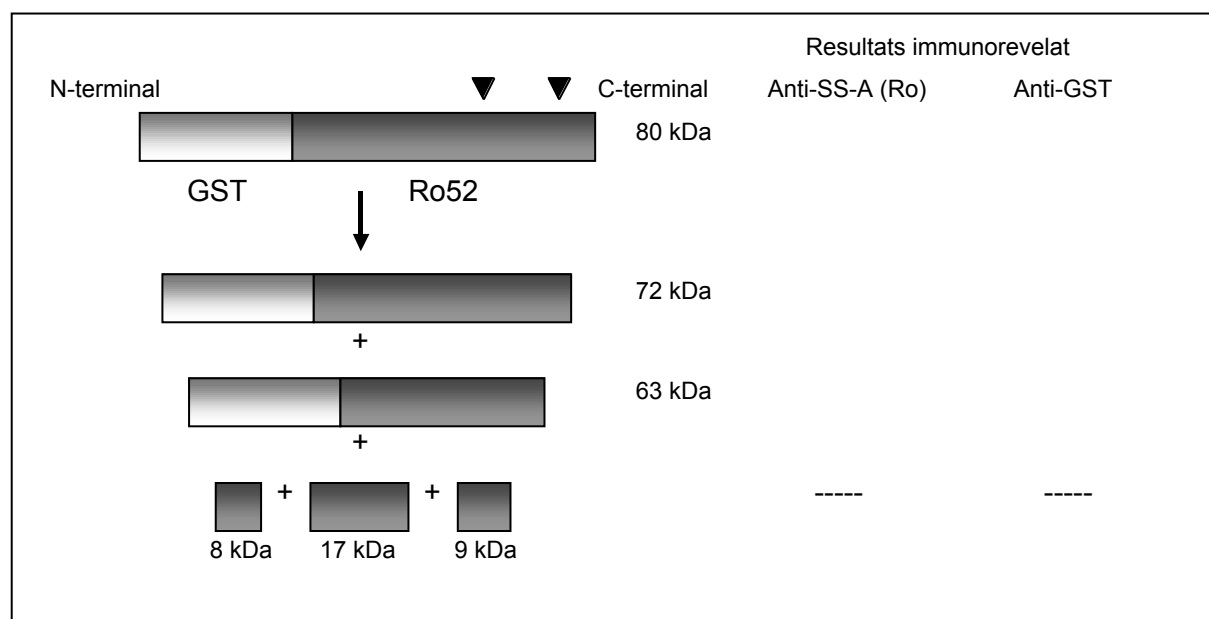


Figura 4.2. Fragments resultants de la degradació de la proteïna de fusió Ro52-GST i resultats obtinguts en els immunorevelats amb anticossos dirigits contra SS-A (Ro) o contra GST. El triangle invertit indica les posicions de proteòlisi de la proteïna de fusió (: positiu).

Finalment, la immunotransferència competitiva realitzada afegint antigen natiu al sèrum utilitzat com a anticòs primari, permeté comprovar definitivament la identitat antigènica de la proteïna purificada. Com en el cas de la proteïna de fusió Ro60-GST, per a la proteïna recombinant Ro52-GST el senyal obtingut en la immunotransferència amb el sèrum específic anti-SS-A (Ro) va desaparèixer quan s'immunoabsorbia prèviament el sèrum amb antigen natiu. Així doncs, els mateixos anticossos que s'unien a l'antigen recombinant immobilitzat a la membrana també reconeixien l'antigen natiu (en excés), de manera que el senyal desapareixia. Els resultats van permetre comprovar que l'antigenicitat de la proteïna de fusió Ro52-GST purificada quan s'enfrontava a un sèrum anti-SS-A (Ro) específic era la mateixa que la de la proteïna nativa.

4.3. DESENVOLUPAMENT I AVALUACIÓ DE LES ENZIMOIMMUNOANÀLISIS

L'última etapa del treball consistí en substituir els antígens nadius utilitzats a les enzimoimmunoanàlisis (ELISA) desenvolupades a BioSystems S.A. pels antígens recombinants purificats, i comprovar la utilitat d'aquests equips en la detecció d'autoanticossos dirigits contra els antígens SS-B (La) [ELISA anti-SS-B (La)] o SS-A (Ro) [ELISA anti-SS-A (Ro)].

4.3.1. Desenvolupament de les enzimoimmunoanàlisis

Les dues enzimoimmunoanàlisis s'havien d'integrar al conjunt d'ELISA desenvolupades a BioSystems S.A. La majoria de les condicions d'assaig (dilució de les mostres, temps d'incubacions, composició del tampó de rentat, conjugat utilitzat i tipus de substrat) ja estaven fixades de bon principi. Les úniques variables que es van poder canviar foren les condicions d'immobilització dels antígens recombinants.

4.3.1.1. Sensibilització de les microplaques amb els antígens recombinants

Per a ambdues ELISA, les primeres proves consistiren en immobilitzar a les microplaques diferents quantitats dels antígens a l'interior dels pouets de les microplaques i assajar sèrums negatius i positius per veure si l'antigenicitat observada en les immunotransferències es mantenia quan es realitzava una enzimoimmunoanàlisi.

Per a l'ELISA anti-SS-B (La) s'observà un augment dels senyals d'absorbància obtinguts si s'augmentava la quantitat d'antigen recombinant immobilitzat, tant per a sèrums positius com per a negatius. Per a quantitats petites d'antigen, l'augment fou major per als senyals obtinguts amb els sèrums positius que amb els sèrums negatius, però a partir d'uns 40 ng de proteïna per pouet el senyal obtingut pels sèrums positius es mantenia més o menys constant, mentre que pels sèrums negatius començava a augmentar de forma notable. Això es devia, probablement, a la saturació del pouet. Com que interessava trobar les condicions de sensibilització que permetessin obtenir la millor discriminació entre els senyals obtinguts pels sèrums positius i pels negatius, el punt òptim resultà ser aquell on la diferència entre el senyal específic i l'inespecífic era màxima.

Per a l'ELISA anti-SS-A (Ro) es va haver d'optimitzar la quantitat d'antigen total (suma de la quantitat de proteïna Ro60 i Ro52). Així doncs, les proves es realitzaren amb microplaques

sensibilitzades amb diferents quantitats de proteïnes d'un dels dos antígens recombinants i amb microplaques sensibilitzades amb una quantitat total de proteïna de 75 ng, però formada per una mescla dels dos antígens recombinants. A les microplaques on s'havien immobilitzat l'antigen Ro60 o el Ro52 per separat s'observà que el senyal dels sèrums positius (senyal específic) augmentava proporcionalment a la quantitat de proteïna sensibilitzada. En canvi, el senyal obtingut per als sèrums negatius (senyal inespecífic) es mantenia més o menys constant fins a un valor llindar a partir del qual el senyal començava a augmentar de forma proporcional. Quan s'immobilitzaren els dos antígens barrejats, s'observà que per a alguns sèrums anti-SS-A (Ro) el senyal obtingut disminuïa en augmentar un dels dos antígens recombinants. Es tractava de sèrums anti-SS-A (Ro) dirigits contra un sol dels dos antígens Ro60 o Ro52. Així doncs, es va escollir la concentració de cadascun dels dos antígens que donava uns millors resultats de discriminació, independentment que per a antisèrums específics de tots dos antígens el senyal obtingut fos molt elevat (la suma dels senyals obtinguts per separat).

4.3.1.2. Estabilitat de les microplaques sensibilitzades

Un cop determinades les condicions de sensibilització de les microplaques es va estudiar l'estabilitat dels antígens recombinants immobilitzats. Les proves es van realitzar de forma accelerada incubant les microplaques a 37°C i es va observar una pèrdua important de senyal en les dues ELISA, tot i que la pèrdua era major en el cas de l'ELISA anti-SS-B (La). Aquesta pèrdua de senyal podia ser deguda a una degradació de l'antigen immobilitzat que llavors ja no era reconegut pels anticossos dels sèrums específics. La pèrdua de senyal es feia evident amb determinats sèrums, mentre que d'altres seguien presentant uns senyals alts. Aquest fet podia deure's a l'existència d'alguns epítops més làbils que d'altres i, per tant, només els sèrums amb anticossos dirigits contra aquests epítops posaven de manifest la davallada d'estabilitat. També podia ser degut a un alliberament de l'antigen al llarg del temps, de manera que quan es realitzava l'assaig els sèrums seguien reconeixent l'antigen, però s'eliminaven en el rentat posterior en forma de complex antigen-anticòs degut a una deficient unió de l'antigen a la placa. Per poder corregir aquesta pèrdua es va provar d'estabilitzar les microplaques sensibilitzades mitjançant l'addició de diferents dissolucions bloquejants. Aquestes dissolucions s'utilitzen habitualment amb dos objectius: bloquejar els llocs no ocupats de la superfície de la microplaca, i espaiar i estabilitzar les biomolècules unides a la superfície de la microplaca per tal de disminuir els impediments estèrics i els problemes de desnaturalització associats amb els assajos de fase sòlida. Tradicionalment, els principals agents bloquejants de naturalesa proteica han estat l'albúmina de sèrum boví (BSA), la llet en pols desnatada, la gelatina de peix o un sèrum normal (Gibbs, 1996b). En el

nostre cas, l'albumina bovina ja s'havia inclòs en els tampons diluents i de rentat de la enzimoimmunoanàlisi i el sèrum normal presentava la desavantatge de les reaccions creuades amb anticossos anti-IgG que podien ser reconeguts per l'anticòs secundari anti-IgG marcat. Per altra banda, la llet en pols desnatada presentava un problema de reactivitat important, i és que algunes preparacions poden inhibir l'activitat de la fosfatasa alcalina (Vogt et al., 1987), l'enzim conjugat a l'anticòs secundari. En el seu lloc, es provà una solució de caseïna, un dels components principals de la llet en pols desnatada, que presenta l'avantatge de menor variabilitat entre lots que la llet en pols desnatada. També es va provar la sacarosa, que havia estat descrita com a bon bloquejant, i la gelatina de peix, que malgrat que s'havia descrit com un dels bloquejants menys efectius es va provar perquè els resultats calia obtenir-los empíricament (Gibbs, 1996b).

Els resultats obtinguts per l'ELISA anti-SS-B (La) van demostrar que les dissolucions de caseïna o sacarosa eren bones estabilitzants, mentre que les de gelatina de peix empitjoraven l'estabilitat. També s'observà que el glicerol no ajudava a estabilitzar els senyals obtinguts, sinó que les dissolucions que en diuen presentaven una menor estabilitat dels senyals que les mateixes dissolucions sense glicerol.

Simultàniament a l'estudi de la pèrdua de senyal de les microplaques, també s'estudià si les dissolucions estabilitzants utilitzades interferien en els senyals obtinguts per a cada sèrum (senyals a t_0). Els resultats foren molt diversos segons la dissolució estabilitzant emprada, però en general hi havia una disminució del senyal amb les dissolucions amb glicerol i un augment del senyal amb les dissolucions amb caseïna. S'escollí com a dissolució estabilitzant la que contenia caseïna, ja que fou la que presentà una menor pèrdua de senyal amb el temps. Aquesta dissolució presentà augments importants dels senyals obtinguts per a cada sèrum a temps 0, però es comprovà que es donaven en tots els sèrums i, per tant, que la capacitat de discriminació no es veia afectada.

En el cas de l'ELISA anti-SS-A (Ro) únicament es provaren dues de les sis dissolucions utilitzades per a SS-B (La) i també resultà que la millor estabilització s'obtingué amb la dissolució que contenia caseïna. Com en el cas de l'ELISA anti-SS-B (La), aquesta dissolució presentà uns augments dels senyals obtinguts per a cada sèrum, però que eren inespecífics, ja que es donaven tant per a sèrums positius com per a negatius.

4.3.1.3. Calibració de les ELISA: establiment del valor d'absorbància discriminant

Les ELISA qualitatives desenvolupades en aquest treball ens havien de permetre classificar els sèrums amb una variable dicotòmica (positius o negatius). Per aquesta raó fou necessari

calibrar les enzimoimmunoanàlisis, de manera que es pogués relacionar el valor obtingut amb el valor vertader de la mostra.

La calibració de les ELISA consistí en determinar un valor d'absorbància límit per sobre del qual la mostra assajada es diagnosticava com a positiva (amb anticossos anti-SS-B (La) o anti-SS-A (Ro)) i per sota, negativa. La forma més senzilla de determinar aquest valor discriminant hauria estat la utilització d'un sèrum de referència internacional que permetés quantificar els anticossos anti-SS-B (La) o anti-SS-A (Ro) en base a unes unitats i rangs de normalitat consensuats (veure apartat 1.11). Malauradament aquesta circumstància actualment no es dóna. Així doncs, la determinació del valor discriminant es va haver de fer mitjançant un estudi comparatiu, amb un nombre elevat de sèrums classificats prèviament com a positius o negatius mitjançant assajos considerats de referència.

En una primera aproximació, es va determinar un valor d'absorbància discriminant provisional mitjançant l'estudi de la distribució de resultats obtinguda en la valoració d'un nombre elevat de sèrums classificats com a negatius. Tanmateix, els resultats presentaren una dispersió força elevada i un nombre considerable de valors aberrants, probablement degut a l'existència d'algunes diferències entre la naturalesa dels assajos considerats de referència i els desenvolupats per nosaltres. Per aquesta raó, el valor discriminant determinat s'utilitzà com a valor orientatiu a partir del qual es realitzà la determinació del valor definitiu mitjançant el mètode de la representació de les corbes ROC (Zweig i Campbell, 1993; Queraltó, 1994).

En el mateix assaig que es realitzà per determinar el valor d'absorbància discriminant es van incloure una sèrie de dilucions d'un sèrum específic contra SS-B (La) o SS-A (Ro). La dilució que coincidí amb el valor d'absorbància discriminant, el que millor separava les poblacions de sèrums positius i de sèrums negatius, s'utilitzà per preparar el control d'aquest valor discriminant, al qual se li assignaren unitats arbitràries. D'aquesta manera, es disposà d'uns sèrums controls que permetien estandarditzar la mesura dels autoanticossos i classificar les mostres com a positives o negatives segons si presentaven un senyal superior o inferior, respectivament. Totes les determinacions posteriors i els sèrums utilitzats posteriorment en la preparació de nous controls del valor discriminant serien traçables al control del valor discriminant inicial determinat en el nostre estudi amb unitats arbitràries assignades.

4.3.2. Característiques diagnòstiques

Com que no es disposà dels historials clínics dels sèrums utilitzats, el criteri de classificació de les mostres no va poder ser el diagnòstic, sinó el resultat obtingut amb mètodes presos com a referència. Per aquest motiu, no podíem parlar de sensibilitat i especificitat diagnòstiques i vam preferir utilitzar els termes sensibilitat i especificitat relatives, que es relacionaven amb el criteri emprat de classificació dels sèrums. Els mètodes de referència escollits foren assajos tipus ELISA que tenien immobilitzats els antigens SS-B (La) o SS-A (Ro) nadius. D'aquesta manera, la comparació dels assajos desenvolupats amb els assajos considerats de referència permetia estudiar la viabilitat de la substitució dels antigens nadius per antigens recombinants en aquest tipus d'assajos.

Per a l'ELISA anti-SS-B (La) 4 sèrums dels 108 que es van assajar van donar diferent amb els dos mètodes. Dos resultaren positius discordants (no van reaccionar amb l'antigen natiu, però sí que ho van fer amb l'antigen recombinant) i 2 negatius discordants (reaccionaren amb l'antigen natiu, però no amb el recombinant). Aquestes discrepàncies probablement es derivaren del diferent plegament que presentava la proteïna recombinant respecte la nativa, ja que pel fet de ser expressada en un organisme procariota no estava sotmesa ni al mateix entorn ni a les mateixes modificacions post-traduccionals que determinen el plegament final. Els 2 negatius discordants podrien ser deguts a l'existència a l'antigen natiu d'epítops conformacionals que depenien de l'estructura tridimensional (McNeilage et al., 1992) i que, per tant, no es mantenien a l'antigen recombinant. Tanmateix, el nivell de discordància era molt similar a l'observat en comparar equips de reactius de diferent cases comercials amb la font antigènica similar, de manera que no es consideraren significatius.

Els valors obtinguts de sensibilitat i especificitat relatives (96% i 97%, respectivament), i el valor de concordància (96%) foren suficientment bons com per considerar que l'objectiu de substituir l'antigen SS-B (La) natiu pel recombinant en l'assaig tipus ELISA era viable i permetia obtenir uns resultats molt similars. Això es veu recolzat pel fet que actualment no existeixi cap tècnica de referència amb una capacitat de discriminació del 100%.

Per a l'ELISA anti-SS-A (Ro) 9 dels 103 sèrums assajats donaren uns resultats diferents segons el mètode utilitzat. Cinc d'ells foren negatius discordants i 4 positius discordants. S'ha descrit que l'antigen Ro60 presenta un epítot majoritari conformacional i dos epítots minoritaris continus als extrems C i N-terminals (Wahren et al., 1992; Saitta et al., 1994; McCauliffe et al., 1994), mentre que l'antigen Ro52 presenta un epítot majoritari continu (no depèn de la conformació tridimensional, sinó de la seqüència aminoacídica) i dos epítots minoritaris als extrems N i C-terminals. Segurament, doncs, els negatius discordants eren

sèrums amb anticossos que reconeixien alguns dels epítops conformacionals. Com que els antigens Ro60 i Ro52 presenten més epítops majoritaris conformacionals que no l'antigen SS-B (La) (veure apartats 1.4.5 i 1.5.4), és lògic que els resultats de la comparació de l'ELISA anti-SS-A (Ro) recombinant amb el mètode de referència (SS-A (Ro) natiu) no siguin tan satisfactoris com en el cas de l'ELISA anti-SS-B (La). Per tal de compensar aquesta possible manca de reconeixement d'epítops conformacionals, es va optar per afegir una petita quantitat d'antigen natiu a la mescla final, de manera que la microplaca tenia immobilitzats els antigens SS-A (Ro), Ro60-GST i Ro52-GST. Amb aquesta acció s'aconseguí també satisfer un dels objectius del treball, que consistia en la reducció del cost de producció de l'equip de reactius.

Pel què fa al pèptid portador, aquest no interferia en l'ELISA, ja que si s'immobilitzava a la microplaca la proteïna de fusió prèviament hidrolitzada amb trombina (hi ha una diana per a aquesta proteasa en la seqüència aminoacídica que separa l'antigen recombinant del pèptid portador) els resultats no canviaven (McCauliffe et al., 1994).

4.3.3. Característiques analítiques

Les característiques analítiques que es van estudiar foren la imprecisió (tant la intraserial com la interserial), el límit de detecció, l'especificitat i la interferència dels factors reumatoides.

El càlcul dels coeficients de variació intradiaris (repetibilitat) i interdiaris (reproductibilitat) demostrà que tant en l'ELISA anti-SS-B (La) com en l'ELISA anti-SS-A (Ro) la principal font d'imprecisió era deguda a la variació entre els diferents dies. No obstant, els valors obtinguts, al voltant del 10%, eren de l'ordre dels que s'obtenen habitualment amb els assajos de tipus ELISA, que clàssicament presenten una variabilitat considerable.

Respecte a l'especificitat de les ELISA desenvolupades, en el cas de l'ELISA anti-SS-B (La) només s'obtingueren resultats positius amb aquells sèrums que presentaven anticossos dirigits contra l'antigen SS-B (La) (sèrums CDC2 i CDC3), i per a l'ELISA anti-SS-A (Ro) s'obtingueren resultats positius amb els sèrums que presentaven anticossos dirigits contra l'antigen SS-A (Ro) (sèrums CDC2 i CDC7) i amb el sèrum específic per a l'antigen Jo-1 (sèrum CDC10) (veure taula 3.12). Aquests resultats també es trobaren si s'assajava el sèrum amb altres enzimoimmunoanàlisis comercials que utilitzaven tant antigens nadius com recombinants immobilitzats a les microplaques. Per tant, molt probablement aquest sèrum

presentava anticossos dirigits contra SS-A (Ro) que es detectaven mitjançant la tècnica d'ELISA, però no amb una immunotransferència.

Finalment, es va estudiar la possible interferència dels factors reumatoides en els assajos desenvolupats. La importància d'estudiar la interferència d'aquestes molècules és que es troben en títols elevats en un gran nombre de malalties autoimmunes sistèmiques, principalment l'artritis reumatoide, malaltia a la que es troba associada la síndrome de Sjögren secundària fins a un 31% de casos. Així doncs, és lògic pensar que en les mostres que s'hauran d'analitzar molt probablement hi haurà títols elevats de factors reumatoides. Els resultats obtinguts amb ambdues ELISA (anti-SS-A (Ro) i anti-SS-B (La)) van demostrar que fins a concentracions de 300 IU/mL no hi havia cap mena d'interferència dels factors reumatoides. No obstant, per a l'ELISA anti-SS-B (La) s'observà un augment de senyal en augmentar la concentració de factor reumatoide a la mostra per damunt de 300 IU/mL. El valor normal de factor reumatoide en individus sans és de fins a 30 IU/mL i s'han descrit pocs casos amb valors superiors a 300 IU/mL. Així doncs, la possible interferència d'aquestes molècules en l'ELISA anti-SS-B (La) és molt remota.

5. CONCLUSIONS

1. Es va construir el vector d'expressió codificant per a la proteïna de fusió SS-B (La)-His, que es caracteritzava per la presència d'un oligopèptid de sis residus d'histidina units a l'extrem C-terminal de l'antigen SS-B (La).
2. L'expressió de la proteïna de fusió SS-B (La)-His resultà en una proteïna soluble de 45 kDa de massa molar, mentre que l'expressió de les proteïnes de fusió Ro60-GST i Ro52-GST resultà en dues proteïnes de 83 kDa i 80 kDa, respectivament, que apareixien en forma de cossos d'inclusió.
3. La proteïna de fusió SS-B (La)-His expressada en cèl·lules d'*Escherichia coli* i purificada mitjançant cromatografia d'afinitat tenia una massa molar calculada de 45 kDa. Els revelats amb anticossos específics dirigits contra l'antigen SS-B (La) i contra l'oligopèptid d'histidines van resultar positius, demostrant la identitat de la proteïna. Aquesta antigenicitat fou revertida quan el sèrum utilitzat en el revelat s'immunoabsorbí prèviament amb antigen natiu, la qual cosa demostrà que ambdós antigens (natiu i recombinant) eren antigènicament iguals respecte el sèrum utilitzat.
4. Les proteïnes de fusió Ro60-GST i Ro52-GST expressades en cèl·lules d'*Escherichia coli* i purificades mitjançant cromatografia d'afinitat tenien una massa molar calculada de 83 i 80 kDa, respectivament. Els revelats amb anticossos específics dirigits contra l'antigen SS-A (Ro) i contra la proteïna glutatió S-transferasa (GST) van resultar positius, demostrant la identitat de les proteïnes. Aquesta antigenicitat fou revertida quan el sèrum utilitzat en el revelat s'immunoabsorbí prèviament amb antigen natiu, la qual cosa demostrà que els antigens recombinants eren antigènicament iguals als nadius respectius.
5. Les diferències entre els assajos nadius i els recombinants podrien ser degudes al diferent plegament dels antigens recombinants respecte el dels nadius, ja que les modificacions post-traduccionals i l'entorn en el que es troben els antigens recombinants durant la seva síntesi no és el mateix que en el cas del natiu. Aquestes diferències són més importants en el cas de l'ELISA anti-SS-A (Ro), ja que els antigens Ro60 i Ro52 presenten un major nombre d'epítops conformacionals que no l'antigen SS-B (La).
6. En la comparació de l'enzimoimmunoanàlisi (ELISA) anti-SS-B (La) desenvolupada utilitzant l'antigen recombinant purificat com a font antigènica respecte un assaig de referència es van obtenir uns resultats de sensibilitat relativa del 96%, d'especificitat relativa del 97% i de concordància del 96%. Aquests resultats demostraren que la substitució de l'antigen natiu pel recombinant com a font antigènica era viable.

Conclusions

7. Per a l'ELISA anti-SS-A (Ro), en la comparació de l'assaig desenvolupat utilitzant els antigens recombinants purificats com a fonts antigèniques respecte un assaig de referència es van obtenir uns resultats de sensibilitat relativa del 88%, d'especificitat relativa del 93% i de concordància del 91%. Aquests resultats no foren tant satisfactoris com en el cas de l'ELISA anti-SS-B (La) degut a l'existència, en els antigens Ro52 i Ro60, d'un major nombre d'epítops conformacionals. No obstant, s'assolí un dels objectius del treball que consistia en la reducció del cost de la producció de l'equip de reactius, ja que es pogué reduir molt considerablement la quantitat d'antigen natiu necessària.

8. En l'estudi de les característiques analítiques per a ambdós assajos es van obtenir uns resultats de repetibilitat (coeficient de variació intradiària) i de reproductibilitat (coeficient de variació interdiària) de 2,08% i de 10,02%, respectivament, per a l'ELISA anti-SS-B (La) i de 1,86% i de 10,60%, respectivament, per a l'ELISA anti-SS-A (Ro). El límit de detecció per a l'ELISA anti-SS-B (La) resultà ser de $0,094 \pm 0,010$ unitats d'absorbància i per a l'ELISA anti-SS-A (Ro) de $0,072 \pm 0,012$. Finalment, en l'estudi de l'especificitat analítica no s'observà l'existència de reaccions creuades en cap dels dos assajos; i l'estudi d'interferència del factor reumatoide resultà negatiu també per ambdues ELISA.

6. BIBLIOGRAFIA

A

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Autotolerancia y autoinmunidad. A: Inmunología celular y molecular. Madrid: Editorial Interamericana-McGraw Hill; 1997: 454-473.

Adam SA, Nakagawa T, Swanson MS, Woodruff TK, Dreyfuss G. mRNA polyadenylate-binding protein: gene isolation and sequencing and identification of a ribonucleoprotein consensus sequence. Mol Cell Biol 1986; 6: 2932-2943.

Ali N, Siddiqui A. The La antigen binds the 5' non-coding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry in site-mediated translation. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 2249-2254.

Alspaugh MA, Maddison PJ. Resolution of the identity of certain antigen-antibody systems in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome: an interlaboratory collaboration. Arthritis Rheum 1979; 22: 796-798.

Alspaugh MA, Tan EM. Antibodies to cellular antigens in Sjögren's syndrome. J Clin Invest 1975; 55: 1067-1073.

Anderson JR, Gray KG, Beck JS. Precipitating autoantibodies in Sjögren's syndrome. Lancet 1961; 2: 456-460.

Aragona P, Magazzù G, Macchia G, Bartolone S, Di Pasquale G, Vitali C et al. Presence of antibodies against *Helicobacter pylori* and its heat-shock protein 60 in the serum of patients with Sjögren's syndrome. J Rheumatol 1999; 26: 1306-1311.

Atkinson JC, Travis WD, Slocum L, Ebbs WL, Fox PC. Serum anti-SS-B/La and IgA rheumatoid factor are markers of salivary gland disease activity in primary Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 1992; 35: 1368-1372.

Avrameas S. Natural autoantibodies: from *horror autotoxicus* to *gnothi seauton*. Immunol Today 1991; 12: 154-159.

B

Bachmann M, Pfeifer K, Schroder HC, Muller WE. Characterization of the autoantigen La as a nucleic acid-dependent ATPase/dATPase with melting properties. *Cell* 1990; 60: 85-93.

Ben-Chetrit E, Gandy BJ, Tan EM, Sullivan KF. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding the 60-kDa component of the human SS-A/Ro ribonucleoprotein. *J Clin Invest* 1989; 83: 1284-92.

Bepler G, O'Briant KC, Kim YC, Schreiber G, Pitterle DM. A 1.4-Mb high-resolution physical map and contig of chromosome segment 11p15.5 and genes in the LOH11A metastasis suppressor region. *Genomics* 1999; 55: 164-175.

Blange I, Ringertz NR, Pettersson I. Identification of antigenic regions of the human 52 kD Ro/SS-A protein recognized by patient sera. *J Autoimmun* 1994; 7: 263-274.

Boelens WC, Palacios I, Mattaj IW. Nuclear retention of RNA as a mechanism for localization. *RNA* 1995; 1: 273-283.

Bota, A. Obtenció d'adenosina-desaminasa humana a partir d'eritròcits. Preparació d'un material de referència europeu. Universitat Autònoma de Barcelona. Departament de bioquímica i biologia molecular, Unitat de Medicina, 2000 (Tesi doctoral).

Bouffard P, Laniel M-A, Boire G. Anti-Ro(SSA) antibodies: clinical significance and biological relevance. *J Rheumatol* 1996; 23: 1838-1841.

Boutjdir M, Chen L, Zhang ZH, Tseng CE, DiDonato F, Rashbaum W et al. Arrhythmogenicity of IgG and anti-52-kD SSA/Ro affinity-purified antibodies from mothers of children with congenital heart block. *Circulation Research* 1997; 80: 354-362.

Butler JE. Perspectives, configurations and principles. A: Butler JE, ed. *Immunochemistry of solid-phase immunoassay*. Boca Raton (Florida): CRC Press; 1991: 3-26.

Buyon JP. Autoantibodies reactive with Ro(SSA) and La(SSB) and pregnancy. *J Rheumatol* 1997; 24: 12-50.

Buyon JP, Slade SG, Reveille JD, Hamel JC, Chan EKL. Autoantibody responses to the "native" 52-kDa SS-A/Ro protein in neonatal lupus syndromes, systemic lupus erythematosus, and Sjögren's syndrome. *J Immunol* 1994; 152: 3675-3684.

C

Chambers JC, Kenan D, Martin BJ, Keene JD. Genomic structure and aminoacid sequence domains of the human La autoantigen. *J Biol Chem* 1988; 263: 18043-18051.

Chan EKL, Buyon JP. The SS-A/Ro antigen. A: van Venrooij WJ, Maini RN, eds. *Manual of Biological Markers of Disease*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 1994.

Chan EKL, Hamel JC, Buyon JP, Tan EM. Molecular definition and sequence motifs of the 52-kD component of human SS-A/Ro autoantigen. *J Clin Invest* 1991; 87: 68-76.

Chan EKL, Sullivan KF, Fox RI, Tan EM. Sjögren's syndrome nuclear antigen B (La): cDNA cloning, structural domains, and autoepitopes. *J Autoimmun* 1989a; 2: 321-327.

Chan EKL, Sullivan KF, Tan EM. Ribonucleoprotein SS-B/La belongs to a protein family with consensus sequences for RNA-binding. *Nucleic Acids Res* 1989b; 17: 2233-2244.

Chang YN, Kenan DJ, Martin BJ, Keene JD. Direct interactions between autoantigen La and human immunodeficiency virus leader RNA. *J Virol* 1994; 68: 7008-7020.

Charles PJ, Van Venrooij WJ, Maini RN. The consensus workshops for the detection of autoantibodies to intracellular antigens in rheumatic diseases: 1989-1992. *Clin Exp Rheumatol* 1992; 10: 507-511.

Chung CT, Niemela SL, Miller RH. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2172-2175.

Clark G, Reichlin M, Tomasi TB Jr. Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 1969; 102: 117-122.

Bibliografia

Cohen IR, Young DB. Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. *Immunol Today* 1991; 12: 105-110.

Cortés M, Alsina MJ, Salas A. Selección y evaluación de métodos analíticos. A: González Sastre F, ed. *Bioquímica clínica. Semiología y diagnóstico: interpretación de los datos de laboratorio*. Barcelona: Barcanova; 1994: 33-48.

Craig AWB, Svitkin YV, Lee HS, Belsham GJ, Sonenberg N. The La autoantigen contains a dimerization domain that is essential for enhancing translation. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 163-169.

D

Deng SX, Hanson E, Sanz I. *In vivo* cell penetration and intracellular transport of anti-Sm and anti-La autoantibodies. *Int Immunol* 2000; 12: 415-423.

Deutscher SL, Harley JB, Keene JD. Molecular analysis of the 60-kDa human Ro ribonucleoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 9479-9483.

Dörner T, Feist E, Wagenmann A, Kato T, Yamamoto K, Nishioka K et al. Anti-52 kDa Ro(SSA) autoantibodies in different autoimmune diseases preferentially recognize epitopes on the central region of the antigen. *J Rheumatol* 1996; 23: 462-468.

E

Fan H, Goodier JL, Chamberlain JR, Engelke DR, Maraia RJ. 5' processing of tRNA precursors can be modulated by the human La antigen phosphoprotein. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 3201-3211.

Fan H, Sakulich AL, Goodier JL, Zhang X, Qin J, Maraia RJ. Phosphorylation of the human La antigen on serine 366 can regulate recycling of RNA polymerase III transcription complexes. *Cell* 1997; 88: 707-715.

Ferragut R. Desenvolupament de mètodes per a la determinació d'anticossos anti-nuclears. Universitat Autònoma de Barcelona. Departament de bioquímica i biologia molecular, Unitat de Medicina, 1999 (Tesi doctoral).

Fessel WJ. Epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am* 1988; 14: 15-24.

Fish F, Ziff M. A sensitive solid phase microradioimmunoassay for anti-double stranded DNA antibodies. *Arthritis Rheum* 1981; 24: 534-543.

Frank MB. Characterization of DNA binding properties and sequence specificity of the human 52 kDa Ro/SS-A (Ro52) zinc finger protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 259: 665-670.

Frank MB, Itoh Y, Fujisaku A, Pontarotti P, Neas BR. The mapping of the 52 kd Ro/SSA autoantigen gene to human chromosome 11 and its polymorphisms. *Amer J Human Genet* 1993; 52: 183-191.

Frank MB, Mattei M-G. Mapping of the human 60,000 Mr Ro/SSA locus: the genes for three Ro/SSA autoantigens are located on separate chromosomes. *Immunogenetics* 1994; 39: 428-431.

Fuentes X. Diccionari d'especialitat: bioquímica clínica. Vic (Barcelona): EUMO editorial; 1999.

Fuentes X. Detectabilidad, límite de detección y sensibilidad analítica. *Ed Cont Quim Clin* 1990; 3: 1-6.

Furukawa F, Kaslinhara-Sawami M, Lyons MB, Norris DA. Binding of antibodies to the extractable nuclear antigens SS-A/Ro and SS-B/La is induced on the surface of human keratinocytes by ultraviolet (UVL): implications for the pathogenesis of photosensitive cutaneous lupus. *J Invest Dermatol* 1990; 94: 77-85.

G

García-Carrasco M, Ramos M, Cervera R. Síndrome de Sjögren. A: Rojas-Rodríguez J, García-Carrasco M, Cervera R, Font J, eds. *Enfermedades autoinmunes sistémicas y reumáticas*. Barcelona: Editorial Doyma; 1997: 99-105.

Gella FJ. *Metrología en el laboratorio clínico*. Barcelona: Biosystems; 2000.

Bibliografía

Gibbs J. Effective blocking procedures. A: ELISA techniques bulletin, núm. 3. Kennebunk (ME): Corning Costar Corp; 1996a.

Gibbs J. Selecting the detection system: colorimetric, fluorescent, luminiscent. A: ELISA techniques bulletin, núm. 5. Kennebunk (ME): Corning Costar Corp; 1996b.

González de Buitrago JM, González C. Autotolerancia y autoinmunidad. A: González de Buitrago JM, González C, dir. Enfermedades autoinmunitarias y autoanticuerpos. Comité de Publicaciones de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular; 2000: 33-46.

Gottlieb E, Steitz JA. Function of the mammalian La protein: evidence for its action in transcription terminated by RNA polymerase III. EMBO J 1989; 8: 851-861.

Grimm C, Lund E, Dahlberg JE. *In vivo* selection of RNAs that localize in the nucleus. EMBO J 1997; 16: 793-806.

Guma M, Keil LB. Autoantibodies to cellular antigens in systemic autoimmune diseases. J Clin Immunoassay 1994; 17: 98-107.

H

Harley JB. Autoantibodies in Sjögren's syndrome patients. J Autoimmun 1989; 2: 283-394.

Hannig G, Makrides SC. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. Trends Biotechnol, 1998, 16: 54-60.

Hermanson GT, Krishna-Mallia A, Smith PK. Peptide antigens, antibodies and immunoglobulin binding proteins. A: Hermanson GT, Krishna-Mallia A, Smith PK, eds. Immobilized affinity ligand techniques. Londres: Academic Press Limited; 1992: 210-251.

Horsfall AC, Rose LM, Maini RN. Autoantibody synthesis in salivary glands of Sjögren's syndrome patients. J Autoimmun 1989; 2: 559-568.

Horsfall AC, Venables PJ, Taylor PV, Maini RN. Ro and La antigens and maternal anti-La idiotype on the surface of myocardial fibres in congenital heart block. J Autoimmun 1991; 4: 165-176.

I

Imboden JB. T lymphocytes and natural killer cells. A: Stites DP, Terr AI, Parslow TG, eds. Basic and Clinical Immunology. 8a ed. East Norwalk (Connecticut): Appleton & Lange; 1994: 94-104.

Itoh K, Itoh Y, Frank MB. Protein heterogeneity in the human Ro/SSA ribonucleoproteins. The 52- and 60-kD Ro/SSA autoantigens are encoded by separate genes. J Clin Invest 1991; 87: 177-186.

K

Kausman D, Allen ME, Snaith ML, Isenberg DA. Autoimmunity and the clinical spectrum of Sjögren's syndrome. A: Isenberg DA, Horsfall AC, eds. Autoimmune diseases: focus on Sjögren's syndrome. BIOS Scientific Publishers Limited; 1994: 1-24.

Keech CL, McCluskey J, Gordon TP. SS-B (La) autoantibodies. A: Peter JB, Shoenfeld Y, eds. Autoantibodies. Amsterdam: Elsevier Science B.V.; 1996: 789-797.

Keil LB, DeBari VA, Needle MA. KB cells for antinuclear antibody determination: Comparison with Hep-2 cells and the *Crithidia luciliae* assay. Diagn Immunol 1984; 2: 213-218.

Kurata N, Tan EM. Identification of antibodies to nuclear acidic antigens by counterimmunoelectrophoresis. Arthritis Rheum 1976; 19: 574-580.

Kurilla MG, Cabradilla CD, Holloway BP, Keene JD. Nucleotide sequence and host La protein interactions of rabies virus leader RNA. J Virol 1984; 50: 773-778.

Kurilla MG, Keene JD. The leader RNA of vesicular stomatitis virus is bound by a cellular protein reactive with anti-La lupus antibodies. Cell 1983; 34: 837.

L

Lawley W, Doherty A, Denniss S, Chauhan D, Pruijn G, Van Venrooij WJ et al. Rapid lupus autoantigen relocalization and reactive oxygen species accumulation following ultraviolet irradiation of human keratinocytes. Rheumatol 2000; 39: 253-261.

Bibliografia

Levinson SS. Organ specific autoimmune disease. J Clin Immunoassay 1994; 17: 92-97.

Lin-Marq N, Clarkson SG. Efficient synthesis, termination and release of RNA polymerase III transcripts in *Xenopus* extracts depleted of La protein. EMBO J 1998; 17: 2033-2041.

M

Maraia RJ. Transcription termination factor La is also an initiation factor for RNA polymerase III. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 3383-3387.

McCauliffe DP, Yin H, Wang L, Lucas L. Autoimmune sera react with multiple epitopes on recombinant 52 and 60 kDa Ro(SSA) proteins. J Rheumatol 1994; 21: 1073-1080.

McLaren RS, Caruccio N, Ross J. Human La protein: a stabilizer of histone mRNA. Mol Cell Biol 1997; 17: 3028-3036.

McNeilage LJ, Umaphysivam K, Macmillan E, Guidolin A, Whittingham S, Gordon T. Definition of a discontinuous immunodominant epitope at the NH2 terminus of the La /SS-B ribonucleoprotein autoantigen. J Clin Invest 1992; 89: 1652-1656.

Meerovitch K, Svitkin YV, Lee HS, Leibkowitz F, Kenan D, Chan EKL et al. La autoantigen enhances and corrects aberrant translation of poliovirus RNA in reticulocyte lysate. J Virol 1993; 67: 3798-3807.

Moretti DE, Saini H, Abner S, et al.. The development of a membrane-based screening method to detect antibodies to intermediate filament proteins. J Int Fed Clin Chem 1990; 2: 232-237.

Motulsky H. Intuitive biostatistics. New York: Oxford University Press; 1995.

Moutsopoulos HM, Tzioufas AG, Youinou P. Sjögren's syndrome. A: Maddison PJ, Isenberg DA, Woo P, Glass DN, eds. Oxford Textbook of Rheumatology. Oxford: Oxford University Press; 1993: 829-841.

N

Nakamura RM, Bylund DJ, Tan EM. Current status of available standards for quality improvement of assays for detection of autoantibodies to nuclear and intracellular antigens. *J Clin Lab Anal* 1994; 8: 360-368.

O

O'Brien CA, Wolin SL. Possible role for the 60-kD Ro autoantigen in a discard pathway for defective 5S rRNA precursors. *Genes Dev* 1994; 8: 2891-2903.

P

Park YW, Katze, MG. Translation control by influenza virus *J Biol Chem* 1995; 270: 28433-28439.

Parslow TG. Immunoglobulin genes, B cells, and the humoral immune response. A: Stites DP, Terr AI, Parslow TG, eds. *Basic and Clinical Immunology*. 8a ed. East Norwalk (Connecticut): Appleton & Lange; 1994: 80-93.

Phillips TM. Immune complex assays: diagnostic and clinical application. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1989; 27: 237-264.

Pisetsky DS, Peters DV. A simple enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to native DNA. *J Immunol Methods* 1981; 41: 187-200.

Pogue GP, Hofmann J, Duncan R, Best JM, Etherington J, Sontheimer RD et al. Autoantigens interact with cis-acting elements of rubella virus. *J Virol* 1996; 70: 6269-6277.

Pourmand N, Pettersson I. The Zn²⁺ binding domain of the human Ro 52 kDa protein is a target for conformation-dependent autoantibodies. *J Autoimmun* 1998; 11: 11-17.

Pruijn GJM, Simons FHM, Van Venrooij WJ. Intracellular localization and nucleocytoplasmic transport of Ro RNP components. *Eur J Cell Biol* 1997; 74: 123-132.

Bibliografía

Pruijn, GJM. The La (SS-B) Antigen. A: Van Venrooij WJ, Maini RN, eds. Manual of Biological Markers of Disease. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 1994.

Pujol R. Autoinmunidad. A: Celada A, dir. Inmunología básica. Barcelona: Editorial Labor S.A.; 1994: 567-597.

Pujol R, Santamaría M. Tolerancia y regulación de la respuesta inmune. A: Peña Martínez J, dir. Inmunología. Ediciones Pirámide S.A.; 1994: 377-395.

Q

Queraltó JM. Interpretación de los resultados de laboratorio. A: González Sastre F, ed. Bioquímica clínica. Semiología y diagnóstico: interpretación de los datos de laboratorio. Barcelona: Barcanova; 1994: 69-81.

R

Reddy BA, Etkin LD, Freemont PS. A novel zinc finger coiled-coil domain in a family of nuclear protein. Trends Biochem Sci 1992; 17: 844-845.

Reichlin M, Scofield RH. SS-A (Ro) autoantibodies. A: Peter JB, Shoenfeld Y, eds. Autoantibodies. Amsterdam: Elsevier Science B.V.; 1996: 783-788.

Ricchiuti V, Pruijn GJM, Thijssen JPH, Van Venrooij WJ, Muller S. Accessibility of epitopes on the 52-kD Ro/SSA protein (Ro52) and on the RoRNP associated Ro52 protein as determined by anti-peptide antibodies. J Autoimmun 1997; 10: 181-191.

S

Saitta MR, Arnett FC, Keene JD. 60-kDa protein autoepitopes identified using recombinant polypeptides. J Immunol 1994; 152: 4192-4202.

Sakane T, Sternberg AD, Green I. Failure of the autologous mixed lymphocyte reaction between T and non-T cells in patients with systemic lupus erythematosus. Proc Natl Acad Sci USA 1978; 75: 3464-3468.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. 2a ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

Sánchez, M. *Certificación de la concentración de masa de la isoenzima 2 de la creatina-quinasa del material de referencia BCR 608*. Universitat Autònoma de Barcelona. Departament de bioquímica i biologia molecular, Unitat de Medicina, 2000 (Tesi doctoral).

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1977; 74: 441.

Saurin AJ, Borden KLB, Boddy MN, Freemont PS. Does this have a familiar RING? *TIBS* 1996; 21: 208-214.

Shi H, O'Brien CA, Vanhorn DJ, Wolin SL. A misfolded form of 5S rRNA is complexed with the Ro and La autoantigens. *RNA* 1996; 2: 769-784.

Shillitoe EJ, Daniels TE, Whitcher JP, Strand DV, Talal N, Greenspan JS. Antibody to cytomegalovirus in patients with Sjögren's syndrome as detected by enzyme linked immunosorbent assay. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 260-265.

Slobbe RL, Pluk W, Van Venrooij WJ, Pruijn GJM. Ro ribonucleoprotein assembly in vitro. Identification of RNA-protein and protein-protein interactions. *J Mol Biol* 1992; 227: 361-366.

Smolen JS, Butcher B, Fritzler MJ, Gordon T, Hardin J, Kalden JR et al. Reference sera for antinuclear antibodies. II. Further definition of antibody specificities in international antinuclear antibody reference sera by immunofluorescence and western blotting. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 413-418.

St. Clair EW, Talal N, Moutsopoulos HM, Ballester A, Zerva L, Keene JD, et al. Epitope specificity of anti-La antibodies from patients with Sjögren's syndrome. *J Autoimmun* 1989; 2: 335-344.

Stefano JE. Purified lupus antigen La recognizes an oligouridylate stretch common to the 3' termini of RNA polymerase III transcripts. *Cell* 1984; 36: 45-154.

Struckmann J, Manthorpe R, Bendixen G. Anti-ENA antibody in serum determined by ELISA technique. Description of method and recommended procedure. *Allergy* 1981; 36: 397-403.

I

Talal N. Sjögren's syndrome. A: Rose NR, Mackay IR, eds. The autoimmune diseases. Orlando (Florida): Academic Press, Inc.; 1985: 145-159.

Talal N, Dauphinec MJ, Dany M, Alexander SS, Hart DJ, Garry RF. Detection of serum antibodies to retroviral proteins in patients with primary Sjögren's syndrome (autoimmune exocrinopathy). *Arthritis Rheum* 1990; 33: 774-81.

Tan EM. Autoantibodies in pathology and cell biology. *Cell* 1991; 67: 841-842.

Tan EM. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): their immunology and medicine. *Adv Immunol* 1982; 33: 167-240.

Tan EM, Fritzler MJ, McDougal JS, McDuffie FC, Nakamura RM, Reichlin M et al. Reference sera for antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1003-1005.

Tarcha PJ. The chemical properties of solid-phases and their interaction with proteins. A: Butler JE, ed. *Immunochemistry of solid-phase immunoassay*. Boca Raton (Florida): CRC Press; 1991: 27-46.

V

Van Venrooij WJ, Charles P, Maini RN. The consensus workshops for the detection of autoantibodies to intracellular antigens in rheumatic diseases. *J Immunol Methods* 1991; 140: 181-189.

Van Venrooij WJ, Maini RN. *Manual of Biological Markers of Disease*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 1994-1996.

Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM, Balestrieri G, Bencivelli W, Bernstein RM et al. Preliminary criteria for the classification of Sjögren's syndrome. Results of a prospective concerted action supported by the European Community. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 340-347.

Vogt RF Jr, Phillips DL, Henderson LO, Whitfield W, Spierto FW. Quantitative differences among various proteins as blocking agents for ELISA microtiter plates. *J Immunol Methods* 1987; 101: 43-50.

W

Wahren M, Rudén U, Andersson B, Ringertz NR, Pettersson I. Identification of antigenic regions of the human Ro 60 kDa protein using recombinant antigen and synthetic peptides. *J Autoimmun* 1992; 5: 319-322.

Wahren-Herlenius M, Muller S, Isenberg D. Analysis of B-cell epitopes of the Ro/SS-A autoantigen. *Immunol Today* 1999; 20: 234-240.

Weir DM, Elson CJ. Antitissue antibodies and immunological tolerance to self. *Arthritis Rheum* 1969; 12: 254-260.

Westgeest AA, Bons JC, Van den Brink HG, Aarden LA, Smeenk RJ. An improved incubation apparatus for Western blots used for the detection of antinuclear antibodies. *J Immunol Methods* 1986; 95: 283-288.

Whittingham S. A solid phase radioimmunoassay for detection of antibodies to extractable nuclear antigens. *J Immunol Methods* 1983; 61: 73-81.

Whittingham S, Naselli G, McNeilage LJ, Coppel RL, Sturgess AD. Serological diagnosis of primary Sjögren's syndrome by means of human recombinant La (SS-B) as nuclear antigen. *Lancet* 1987; ii: 1-3.

Wilkin T. Autoimmunity: attack, or defence? (The case for a primary lesion theory). *Autoimmunity*, 1989, 3: 57-73.

Wolf H, Haus M, Wilmes E. Persistence of Epstein-Barr virus in the parotid gland. *J Virol* 1984; 51: 795-798.

Y

Yoo CJ, Wolin SL. The yeast La protein is required for the 3' endonucleolytic cleavage that matures tRNA precursors. *Cell* 1997; 89: 393-402.

Young RA, Davis RW. Efficient isolation of genes by using antibody probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 1194-1198.

Z

Zieve G, Fury M, Jansen EJR. Analysis of autoimmune sera by immunoprecipitation of cellular RNPs. A: Van Venrooij WJ, Maini RN, eds. *Manual of Biological Markers of Disease*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 1993.