

L'autoantigene DNA topoisomerasi I (Scl-70)

R. Tozzoli, N. Bizzaro

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, Ospedale Civile, Latisana (Udine)

Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Civile, S. Donà di Piave (Venezia)

Generalità

La sclerodermia (sclerosi sistemica progressiva, SSP, SSc) è una malattia infiammatoria del tessuto connettivo, caratterizzata da una vasculopatia del microcircolo arterioso e da un'iperproduzione delle componenti della matrice connettivale, con conseguente fibrosi della cute e degli organi interni.

La diagnosi di SSc è essenzialmente clinica, dato che i criteri classificativi proposti dall'American College of Rheumatology (ARC, precedentemente American Rheumatism Association, ARA) risalgono al 1980 (1) e non tengono conto del frequente riscontro di autoanticorpi, caratteristicamente presenti in tutte le forme di malattia, la cui evidenziazione si affermata largamente nei laboratori clinici a partire dai primi anni '80.

La disponibilità di un substrato costituito da cellule HEp-2 nel metodo di immunofluorescenza indiretta (IFI) consente di identificare la presenza di anticorpi anti-nucleo (ANA) nella totalità dei pazienti affetti da SSc: attualmente il rilievo dell'assenza di ANA nel siero di pazienti con sintomi ascrivibili a SSc può essere considerato un criterio di esclusione della malattia (2). I pattern riconoscibili sono rappresentati dal quadro centromerico (25%), omogeneo (26%), granulare (fine: 21%, grossolano: 7%), granulare-nucleolare (14%), nucleolare (7%), citoplasmatico (3%) (3).

Gli autoanticorpi più frequentemente rilevabili nel siero di pazienti affetti da SSc sono distinguibili in 3 classi principali, gli anti-topoisomerasi I (anti-topo I o anti-Scl-70), gli anti-centromero (ACA) e gli anti-RNA polimerasi I,II,III: ciascuno è presente in circa il 25-30% dei pazienti ed è in genere mutuamente esclusivo (4).

Gli autoanticorpi anti-topoisomerasi I vengono rilevati esclusivamente nel siero di pazienti sclerodermici.

Una recente revisione/codifica della classificazione della SSc distingue 2 sottogruppi di malattia (5), localizzata e generalizzata (o sistemica), le cui caratteristiche sono da intendersi come i poli estremi di uno spettro continuo; la forma generalizzata, sulla base dell'interessamento cutaneo può essere distinta in limitata (lcSSc) o diffusa (dcSSc) (5,6): gli autoanticorpi anti-topoisomerasi I, pur non essendo esclusivi, sono più frequentemente associati alla forma diffusa.

Il ruolo del laboratorio di autoimmunologia è diventato quindi insostituibile nella diagnosi della sclerodermia e nella definizione dei sottogruppi della malattia e nella prognosi (7).

Struttura molecolare dell'autoantigene

Autoanticorpi diretti contro l'autoantigene Scl-70 sono stati inizialmente riconosciuti con metodo IFI, con un quadro fluoroscopico finemente granulare e nucleolare e precipitati con metodo di immunodiffusione doppia (DID) da Douvas et al. nel 1979 (8): il termine Scl-70 venne originariamente coniato a causa della specificità dell'antigene per la SSc e del suo apparente peso molecolare (70 kDa).

Nel 1986 l'antigene Scl-70 è stato caratterizzato ed identificato nell'enzima topoisomerasi I (topo-I) da Shero et al. (9): successivamente tale osservazione è stata ampiamente confermata da altri (9, 10).

La topoisomerasi I (topo-I) è un enzima (EC 5.99.1.2) altamente conservato, presente cioè nelle cellule eucariotiche e procariotiche (12) e appartenente alla famiglia delle topoisomerasi (di cui sono noti almeno 3 sottotipi: I, II, III): questi enzimi presentano in generale la funzione di modificare la superstruttura del DNA nativo, mediante una modificazione del numero di giri della doppia elica e la conseguente conversione delle molecole in diverse forme topologiche, senza alterazione della sequenza dell'acido nucleico (9, 13, 14).

Corrispondenza: dr. Renato Tozzoli
Laboratorio Analisi Chimico-cliniche e Microbiologia
Presidio Ospedaliero Via Sabbionera, 45 - Latisana (Ud)
Tel 0431 529318/9 - Fax 0431 520478

La topoisomerasi I è un polipeptide di 765 AA, peso molecolare di 90,650 kDa, codificato da un mRNA di 4.1 kb (13); frammenti di più basso peso molecolare (tra 60 e 90 kDa) conservano l'attività enzimatica (9,13-16): in particolare il frammento carbossiterminale di 67,7 kDa presenta il sito attivo (12), che è localizzato tra gli aminoacidi 344 e 483 (13, 15).

L'enzima è stato localizzato nel nucleoplasma, nel nucleolo, in stretta correlazione con la RNA-polimerasi I (10) e nei cromosomi durante la mitosi (17).

Nella molecola sono stati identificati almeno 6 epitopi immunodominanti, 2 dei quali principali (18), riconosciuti dalla maggior parte degli autoanticorpi presenti nel siero dei pazienti; anche in questo caso, come in molti altri, la risposta autoimmune è oligoclonale; tale evidenziazione rappresenta un elemento di criticità nella messa a punto di metodi di laboratorio specifici e sensibili.

L'epitopo principale è localizzato in vicinanza del sito attivo (19, 20), compreso tra gli AA 209-276 (21) ed è considerato universale in quanto capace di legare autoanticorpi presenti nel siero di pazienti sclerodermici e non (22-24): tale vicinanza probabilmente spiega l'inibizione in vitro del test funzionale DNA topoisomerasi I, da parte di autoanticorpi anti-topo I (19, 20).

La topoisomerasi I standard impiegata inizialmente per la rilevazione degli specifici autoanticorpi era derivata da un estratto non purificato di timo di vitello (25); la separazione cromatografica dell'enzima su colonne di idrossipatite e Biorex 70 consente di ottenere un estratto purificato, che permette migliori performance (15): entrambe le modalità sono impiegate negli attuali metodi di dosaggio degli autoanticorpi anti-Scl-70.

La proteina può essere inoltre ottenuta mediante la tecnologia del DNA ricombinante: una proteina ricombinante è stata prodotta mediante l'introduzione del cDNA della DNA topoisomerasi isolato da d'Arpa et al. in cellule procariotiche (*E. coli*) (13, 26) o in cellule eucariotiche (*S. frugiperda*) (27, 28).

Gli autoanticorpi

Frequenza, significato, associazioni cliniche

Gli autoanticorpi anti-topoisomerasi I sono costituiti da IgG di tutte le sottoclassi (29), da IgA, meno frequentemente da IgM (30) e sono presenti in circa il 20-40% dei pazienti affetti da SSc, con frequenza molto maggiore nella forma diffusa, rispetto a quella limitata: l'ampia oscillazione nelle frequenze di positività, presente nelle casistiche in letteratura (3-75%) (31), è dipendente da fattori genetici e razziali, da diverse modalità di classificazione dei pazienti, ma soprattutto dai diversi metodi di laboratorio impiegati nel tempo per la loro rilevazione.

Gli autoanticorpi anti-topoisomerasi I nei pazienti

con SSc sono associati con alcuni alleli del sistema HLA, in particolare con l'allele HLA-DRB 1*1101 negli Stati Uniti, con l'allele DRB 1*1502 in Giappone, (32) e con l'allele HLA DRB 1*11 in Europa (UK) (33).

L'associazione tra dcSSc, presenza di anti-topo I e DRB 1*11 rappresenta un fattore di rischio elevato per l'impegno polmonare nella malattia (33).

Metodi di ricerca

Gli autoanticorpi anti-Scl-70 sono evidenziabili con il metodo di immunofluorescenza indiretta su cellule HEP-2: il quadro fluoroscopico, caratteristico, è costituito da una positività multipla finemente granulata (diffuse o discrete granular pattern) del nucleoplasma e dei nucleoli, sedi prevalenti di localizzazione dell'autoantigene DNA topoisomerasi I (10).

La positività del test IFI richiede l'identificazione della specificità anticorpale.

I metodi per il dosaggio degli anticorpi anti-topoisomerasi I sono stati per lungo tempo la doppia immunodiffusione (DID) e la contro-immunoelettroforesi (CIE), che utilizzavano estratti nucleari da timo di vitello.

La labilità dell'antigene topoisomerasi, soggetto a parziale proteolisi (da 100 kDa a 60-70 kDa) durante il processo di estrazione (34), comporta la necessità di particolari accorgimenti nella sua manipolazione e nell'esecuzione di queste metodiche, specialmente in condizioni non standardizzate (35): ne può conseguire una ridotta sensibilità nella rilevazione dei corrispondenti autoanticorpi.

Le tecniche immunoenzimatiche (ELISA) (36), le tecniche di immunoblot (37) e di immunodot (15) impiegano antigeni estrattivi (da timo di vitello o da cellule HeLa) o ricombinanti, da cellule procariotiche (*E. coli*) (13, 26) o eucariotiche (*S. frugiperda-baculovirus*) (27, 28, 38).

Le tecniche ELISA con antigene estrattivo purificato con cromatografia di affinità sono più sensibili della DID (con antigene estrattivo da timo di vitello) e specifiche quanto l'immunoblot (con antigene estrattivo da cellule HeLa) nella rilevazione degli anticorpi anti-topo I (39); analogamente le tecniche ELISA con antigene ricombinante (*S. Frugiperda-baculovirus*) presentano una superiore sensibilità rispetto alle tecniche ELISA con antigene estrattivo (25).

Un recente studio multicentrico condotto dal Gruppo di Studio in Autoimmunologia della SIMeL (40) ha evidenziato una sensibilità superiore dei metodi ELISA e IB rispetto al metodo CIE, con una specificità praticamente sovrapponibile nella rilevazione di questa classe di autoanticorpi.

Bibliografia

1. Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; 23:581-90
2. Lakomek HJ, Guldner HH, Bautz FA, Goerz G, Kind P, Mensing M, et al. Nuclear antibodies as serologic markers in progressive systemic scleroderma. *Hautarzt* 1987; 38:63-9
3. Bunn CC, Denton CP, Shi-Wen X, Knight C, Black CM. Anti-RNA polymerases and other autoantibody specificities in systemic sclerosis. *Br J Rheumatol* 1998; 37:15-20
4. Vazquez-Abad D, Rothfield NF. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Int Rev Immunol* 1995; 12:145-57
5. Le Roy EC, Krieg T, Black C, Medsger TA Jr, Fleischmajer R, Rowell N, et al. Scleroderma (Systemic Sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988; 15: 202-5
6. Humbel RL. Auto-immunité, auto-anticorps et maladie auto-immunes. In: Humbel RL, ed. *Autoanticorps et maladies autoimmunes*, Paris: Elsevier, 1997; p 71-3.
7. Weimer ES, Hildebrandt S, Senecal J, Daniels L, Noell S, Joyal F, et al. Prognostic significance of anticentromere antibodies and anti-topoisomerase I antibodies in Raynaud's disease. A prospective study. *Arthritis Rheum* 1991; 34:68-77
8. Douvas AS, Achten M, Tan EM. Identification of a nuclear protein (Scl-70) as a unique target of human antinuclear antibodies in scleroderma. *J Biol Chem* 1979; 254: 10514-22
9. Shero JH, Bordwell B, Rothfield NF, Earnshaw WC. High titers of autoantibodies to topoisomerase I (Scl-70) in sera from scleroderma patients. *Science* 1986; 231: 737-40
10. Guldner H, Szosteki C, Vosberg HP, Lakomek HS, Penner E, Bautz FA. Scl-70 autoantibodies from scleroderma patients recognize a 95 kDa protein as DNA topoisomerase I. *Chromosoma* 1986; 94:132-8
11. Maul GG, French BT, van Venrooij WJ, Jimenez SA. Topoisomerase I identified by scleroderma 70 antisera: enrichment of topoisomerase I at the centromere in mouse mitotic cells before anaphase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:5145-9
12. Gellert M. DNA topoisomerases. *Ann Rev Biochem* 1981; 50:879-910
13. D'Arpa P, Machlin PS, Ratrie H 3rd, Rothfield NF, Cleveland DW, Earnshaw WC. cDNA cloning of human topoisomerase I. Catalytic activity of a 67.7 kDa carboxyl-terminal fragment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 2543-7
14. Heck MM, Hittleman WR, Earnshaw WC. Differential expression of DNA topoisomerase I and II during the eukariotic cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:1086-90
15. Hildebrandt S, Weiner ES, Senecal JI, Noell GS, Earnshaw WC, Rothfield NF. Autoantibodies to topoisomerase I (Scl-70): analysis by gel diffusion, immunoblot, and enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Immunol Immunopathol* 1990; 57:399-410
16. Kosovskiy MJ, Soslau G. Immunological identification of human platelet mitochondrial DNA topoisomerase I. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1164:101-7
17. Ramirez-Santoyo R, Lopez-Swidorsky A, Avalor-Diaz E, Herrera-Esparza R. The expression and localization of Scl70/DNA topoisomerase I vary throughout the cell cycle. *Rev Rheum Engl Ed* 1998; 65:165-72
18. D'Arpa P, White-Cooper H, Cleveland DW, Rothfield NF, Earnshaw WC. Use of molecular cloning methods to map the distribution of epitopes on topoisomerase I (Scl-70) recognized by sera of scleroderma patients. *Arthritis Rheum* 1990; 33:1501-11
19. Piccinini G, Cardellini E, Reimer G, Arnett FC, Durban E. An antigenic region of topoisomerase I in DNA polymerase chain reaction-generated fragments recognized by autoantibodies of scleroderma patients. *Mol Immunol* 1991; 28:333-9
20. Seelig HP, Schroter H, Ehrfeld H, Renz M. Autoantibodies against topoisomerase I detected with the natural enzyme and overlapping recombinant peptides. *J Immunol Methods* 1993; 165:241-52
21. Kuwana M, Medsger TA Jr, Wright TM. Highly restricted TCR-alpha beta usage by reactive human T cell clones specific for DNA topoisomerase I: recognition of an immunodominant epitope. *J Immunol* 1997; 158:485-91
22. Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Tojo T, Homma M. Autoantigenic epitopes on DNA topoisomerase I. Clinical and immunogenetic associations in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1993; 36:1406-13
23. Kato T, Yamamoto K, Takeuchi H, Okubo M, Hara E, Nakada S, et al. Identification of a universal B cell epitope on DNA topoisomerase I, an autoantigen associated with scleroderma. *Arthritis Rheum* 1993; 36:1580-7
24. Cram DS, Fisicaro N, McNeilage LJ, Coppel RL, Harrison LC. Antibody specificities of Thai and Australian scleroderma sera with topoisomerase I recombinant fusion proteins. *J Immunol* 1993; 151:6872-81
25. Vazquez-Abad D, Rothfield NF. Topoisomerase I (Scl-70) autoantibodies. In: Peter JB, Schoenfeld Y, eds. *Autoantibodies*, Amsterdam: Elsevier; 1996. p 830-5
26. Verheijen R, de Jong BA, van Venrooij WJ. A recombinant topoisomerase I ELISA: screening for IgG, IgM and IgA anti-topo I autoantibodies in human sera. *Clin Exp Immunol* 1992; 89:456-60
27. Zhelkosky AM, Moore CL. Overexpression of human DNA topoisomerase I in insect cells using a baculovirus vector. *Protein Expr Purif* 1994; 5:364-70
28. Whyte J, Earnshaw WC, Champoux JJ, Parker LH, Stewart L, Hall ND, et al. Detection of anti-topoisomerase I antibodies using a full length human topoisomerase I recombinant protein purified from a baculovirus expression system. *Clin Exp Immunol* 1995; 100:214-8
29. Bona C, Rothfield N. Autoantibodies in scleroderma and tightskin mice. *Curr Opin Immunol* 1994; 6:931-7
30. Vazquez-Abad D, Russell CA, Cusick SM, Earnshaw WC, Rothfield NF. Longitudinal study of anticentromere and antitopoisomerase I isotypes. *Clin Immunol Immunopathol* 1995; 74:257-70
31. Spencer-Green G, Alter D, Welch HG. Test performance in systemic sclerosis: anti-centromere and anti-Scl-70 antibodies. *Am J Med* 1997; 103:242-8
32. Kuwana M, Kaburaki J, Arnett FC, Howard RF, Medsger TA Jr, Wright TM. Influence of ethnic back-

- ground on clinical and serological features in patients with systemic sclerosis and anti-DNA topoisomerase I antibody. *Arthritis Rheum* 1999; 42:465-74
33. Fanning GC, Welsh KI, Bunn C, Du Bois A, Black CM. HLA association in three mutually exclusive autoantibody subgroups in UK systemic sclerosis patients. *Br J Rheumatol* 1998; 37:201-7
 34. Liu LF, Müller KG. Eukaryotic DNA topoisomerase: two forms of type I topoisomerases from HeLa cell nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78:3487-91
 35. Catoggio LJ, Bernstein RM, Black CM, Hughes GRV, Maddison PJ. Serological markers in progressive systemic sclerosis: clinical correlation. *Ann Rheum Dis* 1983; 42:23-27
 36. Geisler C, Hoier-Madsen M. An enzyme-linked immunosorbent assay for the autoantibodies against the nuclear antigen Scl-70. *J Immunol Methods* 1985; 80:211-9
 37. Fonong T, Evans SM, Homburger HA. Development and comparative evaluation of immunoblot assays for detecting autoantibodies to Scl 70 and Jo 1 antigens in serum. *Clin Chem* 1990; 36:2053-6
 38. Kuwana M, Medsger TA, Wright TM. Detection of anti-DNA topoisomerase I by an enzyme-linked immunosorbent assay using overlapping recombinant polypeptides. *Clin Immunol Immunopathol* 1995; 76:266-78
 39. Tsay GJ, Fann RH, Hwang J. Specificity of anti-Scl-70 antibodies in scleroderma: increased sensitivity of detection using purified DNA topoisomerase I from calf thymus. *J Rheumatol* 1990; 17:1314-9
 40. Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Manoni F, Bassetti D, et al. Evaluation of commercial ELISA, CIE and IB assays for the detection of anti-topoisomerase I antibodies: results of a multicentric study. *Clin Chem* 1999; 45(S):A152