

**Universitatea Babeș-Bolyai Cluj-Napoca**

**Facultatea de Biologie și Geologie**

**Catedra de Biologie Experimentală**

**Caracterizarea epitopilor antigenici de la  
nivelul membranei bazale folosind anticorpi  
specifci**

**Rezumatul tezei de doctorat**

**Conducător de doctorat:**

**Prof. Dr. Octavian Popescu**

**Doctorand:**

**Emilia Licărete**

**Cluj-Napoca**

**2012**

# Cuprins

Abrevieri.....	5
Cuvinte cheie.....	6
Generalități despre autoimunitate.....	7
Factorii de mediu.....	7
Agenții infecțioși.....	7
Vitamina D.....	9
Hormonii sexuali.....	9
Predispoziția genetică.....	10
Moleculele de adeziune de la nivelul pielii.....	12
Bolile buloase sub-epidermale autoimune.....	19
Epidermoliza buloasă dobândită.....	19
Pemfigoidul bulos(BP).....	21
Pemfigoidul mucos de membrană (MMP).....	24
Boala IgA liniară (LAD).....	25
Dermatita herpetiformă (DH).....	25
Pemfigoidul gestațional (PG).....	26
Lupusul sistemic eritematos bulos (BSLE).....	26
Mecanismele formării bulelor induse de autoanticorpi la pacienții cu BP și EBA.....	27
Activarea complementului.....	27
Distrușterea tisulară mediată de granulocite în bolile buloase.....	29
Obiectivele studiului.....	31
Materiale și metode.....	32
Seruri umane.....	32
Generarea anticorpilor policlonali de iepure specifici pentru un nou epitop la nivelul domeniului clivat al colagenului XVII uman.....	33
Caracterizarea anticorpilor anti-colagen XVII prin imunofluorescență și testul de fixare a complementului.....	33
Generarea și caracterizarea anticorpilor policlonali de iepure și oaie specifici pentru colagenul XVII murin.....	34
Izolarea leucocitelor din sângele donatorilor sănătoși.....	34
Inducerea separării dermo-epidermale ex vivo de către anticorpii patogenici.....	35
Evaluarea activității SOD exogene în granulocitele stimulate cu phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA).....	37
Generarea formelor recombinante ale colagenului VII uman.....	37
Exprimarea fragmentelor recombinante ale colagenului VII în celule de mamifer.....	38
Purificarea prin cromatografie de afinitate a proteinelor recombinante conjugate cu GST și HIS.....	38
Dezvoltarea testelor ELISA folosind domeniile recombinante necolagenoase ale colagenului VII.....	39
Anliza imunoblot a serurilor de pacienți.....	41
Modelul de transfer pasiv al BP.....	41
Analiza statistică.....	41
Rezultate.....	43
Anticorpii de iepure și oaie specifici pentru colagenul XVII murin s-au legat la nivelul joncțiunii dermo-epidermale și au fixat complementul murin.....	43
Anticorpii de la oaie au o reactivitate crescută în comparație cu cei de iepure.....	44
Anticorpii specifici pentru colagenul XVII recunosc formele recombinante ale proteinei în western blot.....	45
Anticorpii specifici pentru un epitop nou al colagenului XVII au fixat complementul și au indus separarea dermului de epiderm ex vivo.....	46

În ciuda capacității sale de înlăturare a superoxidului, SOD nu este capabilă să împiedice inducerea separării dermo-epidermale de către autoanticorpilor pacienților cu BP.....	48
Inhibarea mieloperoxidazei a rezultat într-o reducere a separării dermo-epidermale induse de granulocitele activate de anticorpilor patogenici .....	50
Generarea și purificarea formelor recombinat ale colagenului VII uman (hCVIINC1-NC2, hCVIINC1-H-NC2) .....	51
Autoanticorpilor EBA au reacționat cu ambele forme recombinat ale colagenului VII.....	53
Dezvoltarea testelor ELISA folosind colagenul VII recombinat.....	54
NC1-NC2.....	54
NC1- H- NC2.....	56
Testele ELISA folosind formele recombinat ale colagenului VII permit detecția sensibilă și specifică a autoanticorpilor specifici pentru antigen.....	58
Nivelul autoanticorpilor IgG detectați cu ELISA hCVII corelează cu reactivitatea IgG față de joncțiunea dermo-epidermală obținută prin microscopie de imunofluorescență.....	62
Nivelul autoanticorpilor specifici pentru colagenul VII nu corelează cu markerii de inflamație în boala intestinului inflammat .....	63
Discuție .....	64
Concluzii:.....	71
Bibliografie.....	72
Summary.....	84
Rezumat.....	85
Lista de publicații .....	86
Mulțumiri:.....	88

# Abrevieri

ABD - domeniul de legare al actinei

ADAM - A Disintegrin și Metalloproteinase

APC – celula prezentatoare de antigen

BM – membrana bazală

BP – pemfigoid bulos

BP180 – antigenul pemfigoidului bulos cu masa moleculară de 180 kDa

BP230 - antigenul pemfigoidului bulos cu masa moleculară de 230 kDa

BSLE – lupusul sistemic eritematos bulos

CMV – Cytomegalovirus

CD – boala Crohn

DEB – epidermoliza buloasă distrofică

DEJ – joncțiunea dermo-epidermală

DH – dermatita herpetiformă

DSC - desmocolina

DSG - desmogleina

EAE – encefalomielite experimentală autoimună

EBA – epidermoliza buloasă dobândită

EBV- virusul Epstein-Barr

EDTA – acidul tetraacetic etilendiaminic

ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay

HHV – virusul herpetic uman

HIV - virusul imunodeficienței umane

GST – glutation S-transferază

HSV - virus herpetic simplu

IBD – boala intestinului inflamat

IF – imunofluorescență

IPTG – isopropyl  $\beta$  D-thyogalactopyranoside

kDa – Kilodalton

LAD – boala IgA linear

LAD-1 – antigenul 1 al bolii IgA linear

LB – mediu Luria-Bertani

MHC - complexul major de histocompatibilitate

MMP – pemfigoidul bulos de membrană

MS – scleroza multiplă

PBS – tampon fosfat salin

PG - pemfigoidul de sarcină

PMSF – phenylmethysulfonyl fluoride

rpm – rotații pe minut

ROS – specii de oxigen reactiv

UC - colită ulcerativă

VZV - virusul Varicella zoster

## Cuvinte cheie

auto-anticorpi

colagen VII

colagen XVII

ELISA

epidermoliza buloasă dobândită

neo-epitopi

pemfigoid bulos

specii de oxigen reactiv

# Introducere

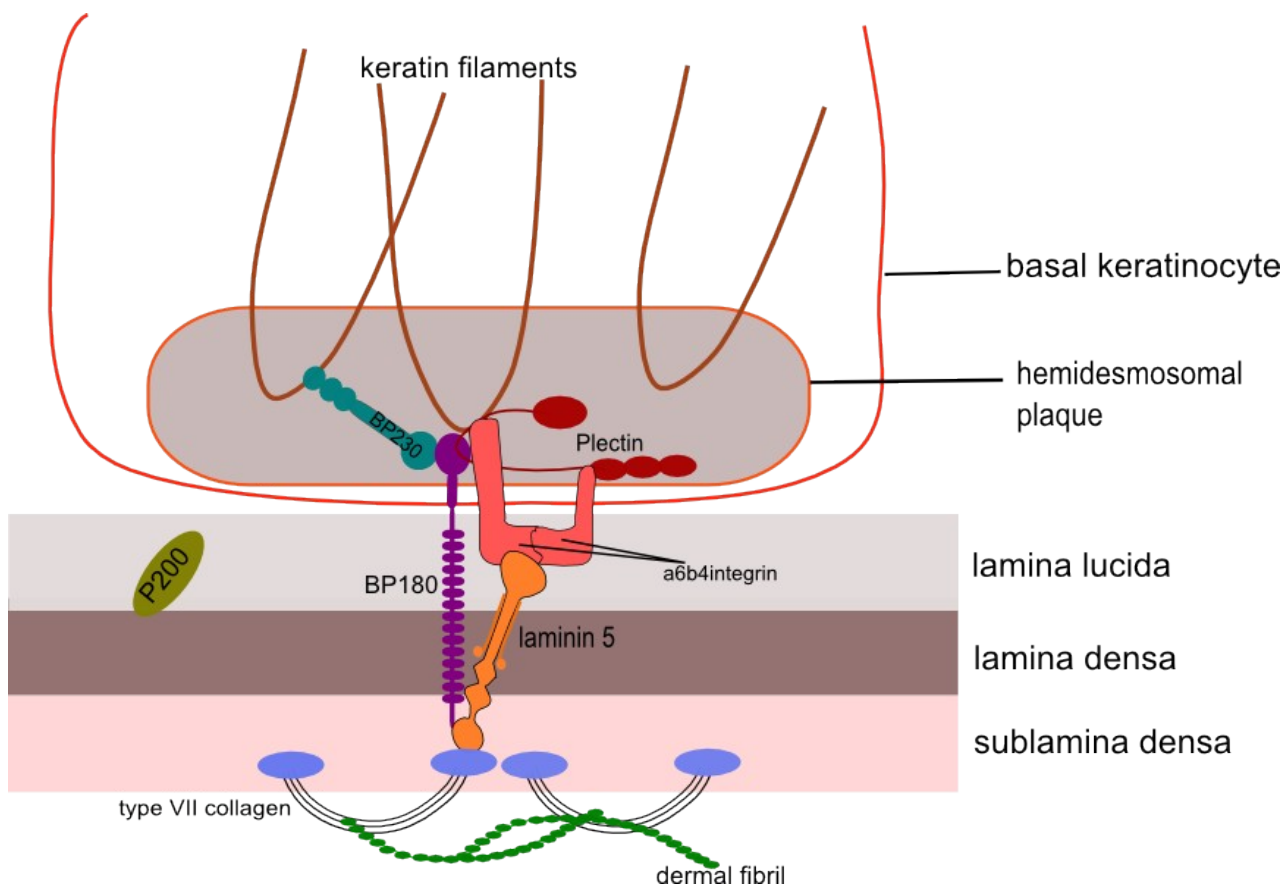
## Moleculele de adeziune de la nivelul pielii

Formarea țesuturilor la organismele multiceulare este posibilă datorită capacității celulelor de a se atașa de alte celule sau structuri non-celulare. Pielea are o structură complexă și integritatea sa are o importanță deosebită în îndeplinirea funcției de barieră fizică și protectoare.

Moleculele de adeziune asigură conexiunea dintre epiderm și stratul subiacent și anume membrana bazală. Importanța integrității pielii este sugerată de existența bolilor genetice și autoimune asociate cu lipsa sau pierderea moleculelor de adeziune (Chan, 1997; Moll și Moll, 1998).

Desmosomii sunt cele mai comune joncțiuni intercelulare de adeziune întâlnite la nivelul țesuturilor epiteliale având un rol important în menținerea structurii adecvate a pielii. Celulele epidermale sunt conectate între ele prin intermediul interacțiunii plăcii intracelulare desmosomale, alcătuită în principal din desmoplakine și plakoglobine, cu filamentele de keratină și proteinele transmembranare, desmogleine și desmocoline (Hertl și colab., 2006; Delva și colab., 2009).

*Membrana bazală din piele (BM)* este o structură de conexiune între epiderm și derm. Studiile de microscopie electronică au evidențiat patru regiuni distincte la nivelul membranei bazale: citoscheletul, hemidesmosomii și membrana plasmatică a keratinocitelor bazale, lamina lucida, lamina densa (membrana bazală propriu-zisă) și sublamina densa, situată în dermul papilar (Olasz și Yancey, 2008)(**Figura 1**).



**Figura 1. Cele mai comune proteine ale membranei bazale care au fost identificate ca autoantigene în bolile autoimune subepidermale.** Keratinocitele bazale sunt conectate cu dermul prin intermediul complexului de adeziune hemidesmosomal. Filamentele intermediare (filamentele de keratină) mediază conexiunea citoscheletului cu membrana plasmatică. BP 230 este o proteină intracelulară care interacționează cu filamentele de keratină și cu domeniul intracelular al BP180. BP180 este o proteină transmembranară care are un rol esențial în atașarea dermului de epiderm. Importanța sa este evidențiată de prezența bulelor și a separării dermului de epiderm la pacienții cu pemfigoid bulos care au anticorpi împotriva acestei proteine sau la pacienții care prezintă mutații la nivelul genei COL17A1. BP 180 interacționează cu plectina, laminina 5 și integrina  $\alpha6\beta4$ . Laminina 5 este un ligand de adeziune pentru integrina  $\alpha6\beta4$ , proteină transmembranară. P200, un autoantigen identificat recent la nivelul membranei bazale, este o proteina cu masa moleculară de 200 kDa localizată în regiunea laminei inferioare.

## Bolile buloase subepidermale autoimune

Bolile buloase autoimune care afectează pielea sunt boli organ-specifice asociate cu un răspuns imun generat față de proteinele de adeziune care asigură adeziune celulă-celulă sau celulă-matricea intercelulară în piele (Olasz și Yancey, 2008). Atât celule T autoreactive cât și autoanticorpii sunt întâlniți la pacienții cu astfel de boli, însă observațiile clinice și studiile

experimentale sugerează că formarea bulelor este mediată în special de anticorpi (Sitaru, 2007). Autoanticorpii de la pacienți au fost folosiți pentru a identifica autoantigenele țintă demonstrând că ele reprezintă proteine structurale cheie ale membranei bazale.

Pe baza criteriilor clinice, histopatologice și imunopatologice, bolile buloase autoimune sunt clasificate în patru grupuri mari: grupul pemfigusului, grupul pemfigoidului, epidermoliza buloasă dobândită și dermatita herpetiformă Dühring (Mihai și Sitaru, 2007a).

## **Epidermoliza buloasă dobândită**

Epidermoliza buloasă dobândită (EBA) este o boală buloasă subepidermală asociată cu anticorpi produși împotriva colagenului de tip VII, componenta cea mai importantă a fibrilelor de ancorare de la nivelul joncțiunii dermo-epidermale. Autoanticorpii EBA se leagă de partea dermală a pielii separate cu 1M NaCl în imunofluorescență indirectă (Woodley și Chen, 2004; Woodley și colab., 1984; Gammon și colab., 1984). La fel ca în cazul altor boli autoimune, etiologia EBA este încă necunoscută. Totuși, a fost sugerată o asociere cu prezența alelelor HLA –DR la pacienții cu EBA (Gammon și colab., 1988).

EBA este o boală rară, întâlnită preponderent la persoanele vârstnice însă au fost identificate și câteva cazuri la copii (Sitaru, 2007; Callot-Mellot și colab., 1997). Primele criterii de diagnostic incluzând un istoric personal și familial al bolilor buloase negativ, declanșarea erupției la vârstă adultă, prezența bulelor care apar spontan sau sunt induse de traume și care sunt asemănătoare cu cele întâlnite la pacienții cu epidermoliză buloasă distrofică, excluderea altor boli buloase, au fost definite de către Roenigk și colab., în urmă cu câteva decenii (Roenigk și colab., 1971).

La fel ca epidermoliza buloasă distrofică, EBA este caracterizată din punct de vedere clinic de fragilitatea pielii, bule și eroziuni la nivelul părților corpului care sunt predispuse traumelor și leziuni care se vindecă lăsând cicatrici (Woodley și Chen, 2004). Pe baza manifestărilor clinice, au fost descrise cinci variante ale bolii: (1) prezentarea clasică; (2) pemfigoid bulos (BP)-like; (3) pemfigoid cicatricial (CP)- like; (4) reminiscență a pemfigoidului Brunsting-Perry cu leziuni localizate predominant la nivelul capului și gâtului ; (5) EBA asemănătoare cu dermatoza buloasă lineară IgA (LABD) sau boala buloasă cronică a copilăriei (Remington și colab., 2008).

Colagenul de tip VII este un homotrimer cu o structura helicală constând din trei lanțuri polipeptidice  $\alpha 1$  identice. Fiecare lanț este alcătuit dintr-un domeniu central colagenos, cu greutate



moleculară de 145kDa și caracterizat de repetiția unei secvențe de aminoacizi (GlyXY) care este întreruptă de câteva imperfecțiuni. Domeniul colagenos este flancat la capătul amino-terminal de un domeniu mare necolagenos (NC1), cu o greutate moleculară de 145kDa și de un domeniu necolagenos mai mic (NC2), de aproximativ 30kDa, la capătul C-terminal. (Uitto și colab., 1992; Christiano și colab., 1992). În spațiul extracelular, o parte din domeniul NC2 este îndepărtată proteolitic (Bruckner-Tuderman și colab., 1995).

Studiile de cartare a epitopilor au arătat că majoritatea epitopilor antigenici se găsesc la nivelul domeniului NC1 al colagenului de tip VII (Lapierre și colab., 1993). În 2001, Chen și colab., au descris un nou epitop antigenic la nivelul domeniului NC2 de la capătul C-terminal (Chen și colab., 2001a).

Susceptibilitatea genetică asociată cu alelele HLA-DR sugerează faptul că celulele T sunt implicate în procesul de declanșare a bolii. Observațiile experimentale au dovedit clar că EBA este o boală tipică mediată de autoanticorpi. Patogenitatea anticorpilor specifici pentru colagenul de tip VII a fost demonstrată prima dată folosind un model *ex vivo* al bolii (Sitaru și colab., 2002a). În acest model, autoanticorpii au indus separarea dermului de epiderm când au fost co-incubați cu pielea umană normală și granulocite izolate de la donatori sănătoși. Activarea și recrutarea leucocitelor la joncțiunea dermo-epidermală este dependentă de prezența fragmentului Fc al anticorpilor.

Anticorpii generați în urma imunizării iepurilor cu colagenul de tip VII uman sau murin sau anticorpii izolați din serul de la pacienții cu epidermoliză buloasă dobândită au indus bule în pielea șoarecilor cărora li s-au transferat pasiv acești anticorpi (Sitaru și colab., 2005; Woodley și colab., 2006; Woodley și colab., 2005). Mai mult, imunizarea șoarecilor din tulpini susceptibile cu o forma recombinată a colagenului VII murin a rezultat într-o boală buloasă care reproduce caracteristicile clinice, histopatologice și imunopatologice ale pacienților cu epidermoliză buloasă dobândită (Sitaru și colab., 2006). Recent, folosind acest model activ de inducere a bolii la animalele de experiență, Sitaru și colab., au demonstrat că celulele T sunt necesare pentru a putea induce boala la șoarecii imunizați cu colagenul VII autolog (Sitaru și colab., 2010).

Diagnosticarea pacienților cu EBA se bazează pe câteva teste de laborator care includ detectarea anticorpilor legați la nivelul țesuturilor prin imunofluorescență directă precum și demonstrarea capacității anticorpilor serici de a se lega de partea dermală a pielii separate cu 1M NaCl prin IF indirectă. Diagnosticul definitiv al EBA necesită însă caracterizarea specificității moleculare a autoanticorpilor (Mihai și Sitaru, 2007a). Autoanticorpii specifici pentru colagenul VII pot fi

detectați prin imunoblot și/sau ELISA folosind proteine recombinante (Mihai și Sitaru, 2007a). Pentru detecția specifică a autoanticorpilor specifici pentru colagenul VII, s-au stabilit diferite teste imunologice care folosesc forme recombinante al domeniului NC1 sau proteina întregă (Chen și colab., 1997; Pendaries și colab., 2010; Saleh și colab., 2011).

## **Pemfigoidul bulos (BP)**

Pemfigoidul bulos este o boală buloasă subepidermală care afectează în general persoanele vârstnice și mult mai rar se întâlnește la copii. Anticorpii circulanți și cei legați la nivelul țesuturilor recunosc două proteine hemidesmosomale și anume BP230 și BP 180 (Yancey, 2005).

BP230 denumit și antigenul 1 al BP a fost identificat ca autoantigen în BP de către Stanley și colab., în anul 1981 (Stanley și colab., 1981). Prin izolarea ADN-ului complementar și clonare, Sawamura și colab., a localizat gena pentru BP230 la nivelul brațului scurt al cromozomului al șaselea (Sawamura și colab., 1990).

BP 230 este o proteină intracelulară localizată la nivelul plăcii hemidesmosomale și care intermediază interacțiunea filamentelor de keratină cu placa hemidesmosomală (Borradori și Sonnenberg, 1999). Recrutarea BP230 la nivelul hemidesmosomilor depinde de interacțiunea acestei proteine cu BP180 și integrina  $\beta 4$ . În keratinocitele deficiente în BP180, BP230 nu poate fi integrat corespunzător în hemidesmosom chiar dacă atât integrina  $\beta 4$  cât și plectina sunt prezente, sugerând astfel că aceste două proteine nu sunt suficiente pentru asamblarea BP230 în hemidesmosom (Borradori și colab., 1998; Koster și colab., 2003). Funcția biologică a acestei proteine în organizarea filamentelor intermediare ale citoscheletului keratinocitelor este susținută de faptul că șoarecii deficienți în BP230 prezintă semne de fragilitate a pielii (Guo și colab., 1995). BP 230 este implicat în patogeneza pemfigoidului bulos, fapt sugerat de capacitatea anticorpilor specifici generați în iepuri împotriva unui fragment antigenic al BP230 murin de a induce boala la șoareci (Kiss și colab., 2005). Cu toate acestea, date recent obținute de grupul nostru contrazic această ipoteză arătând că anticorpii specifici pentru BP230 au mai degrabă proprietăți imunopatologice limitate în modelul experimental al BP (Feldrihan *et. al.*, observații nepublicate).

BP 180 este o proteină transmembranară hemidesmosomală care leagă keratinocitele bazale de membrana bazală. Este un homotrimer alcătuit din trei lanțuri identice  $\alpha 1$ , cu capătul N-terminal localizat intracelular, un scurt fragment transmembranar și domeniul COOH la exteriorul celulei. Domeniul extracelular este alcătuit din 15 subdomenii necolagenoase (COL1–COL15), caracterizate de secvențele repetitive colagenoase tipice-GXY, fiecare din cele 15 subdomenii fiind

mărginite de 16 domenii scurte ne-colagenoase (NC1–NC16A) (Franzke și colab., 2003). Domeniul extracelular al colagenului XVII este clivat constitutiv de la suprafața celulei *in vitro* (Franzke și colab., 2009; Hirako și colab., 1998; Schaecke și colab., 1998) de către enzime proteolitice din familia ADAM (A Disintegrin și Metalloproteinase) (Franzke și colab., 2009).

Deși prezența autoanticorpilor specifici atât pentru BP180 cât și pentru BP230 este o trăsătură caracteristică a pacienților cu BP, rolul antigenului BP 230 în patogeneză este încă neclară. Așa cum am menționat anterior, formarea bulelor subepidermale a putut fi indusă prin injectarea șoarecilor nou născuți cu anticorpi de iepure generați împotriva proteinei BP230 (Kiss și colab., 2005) rezultate care nu sunt susținute de studiile noastre recente. În schimb, patogenicitatea autoanticorpilor specifici pentru BP180 a fost demonstrată în câteva modele experimentale. Prima dovadă a patogenității anticorpilor specifici pentru colagenul XVII a fost obținută cu ajutorul modelul *ex vivo* al BP dezvoltat de Gammon și colaboratorii săi (Gammon și colab., 1981; Gammon și colab., 1980). În acest model, autorii au incubat criosecțiuni de piele umană normală cu ser de la pacienții cu BP și apoi au adăugat leucocite izolate de la donatori sănătoși. Ei au demonstrat că recrutarea leucocitelor la joncțiunea dermo-epidermală depinde de activarea sistemului complement. Într-un alt set de experimente au arătat că leucocitele atașate la nivelul membranei bazale a criosecțiunilor incubate cu ser de la pacienții cu BP au fost ulterior activate și au indus separarea dermului de epiderm (Gammon și colab., 1982). Mai recent, folosind același model experimental Sitaru și colab., au demonstrat că serurile de pacienți pre-adsorbite față de fragmentul al 16-lea necolagenos recombinat al colagenului XVII au pierdut capacitatea de a induce separarea dermo-epidermală. Spre deosebire de aceasta, autoanticorpii IgG din serurile pacienților cu BP purificați pe bază de afinitate față de forma recombinată a BP180 (NC16A) au indus separarea dermului de epiderm sugerând astfel patogenicitatea domeniului NC16A (Sitaru și colab., 2002b)

În anul 1993, Liu și colab., au demonstrat patogenicitatea autoanticorpilor specifici pentru BP 180 *in vivo*. Transferul pasiv al anticorpilor de iepure dezvoltați împotriva colagenului de tip XVII murin la șoarecii nou născuți a indus manifestări clinice, histologice și imunopatologice similare aceloră întâlnite la pacienții cu pemfigoid bulos (Liu și colab., 1993). Folosind acest model animal, s-a dovedit că activarea complementului prin calea clasică, prezența neutrofilelor, mastocitelor și a macrofagelor sunt fenomene esențiale pentru a induce boala la animale de experiență (Chen și colab., 2001b; Chen și colab., 2002a; Nelson și colab., 2006; Liu și colab., 2000; Liu și colab., 1995). Încercările de a induce fenotipul BP la șoareci prin transferul pasiv al anticorpilor patogenici de la pacienți nu au dus la nici un rezultat. Acest eșec se poate datora

diferențelor dintre secvența de aminoacizi a colagenului XVII uman și murin (Anhalt și Diaz, 1987). Pentru a îndepărta această neconcordanță, Olasz și colab., au generat șoareci transgenici care să exprime colagenul XVII uman sub controlul promotorului keratină 14. Șoarecii sălbatici transplantați cu piele prelevată de la șoarecii transgenici au dezvoltat anticorpi împotriva colagenului XVII precum și un răspuns imun inflamator care a constat în infiltrarea neutrofilelor la nivelul epidermului, depunerea de IgG și C3 la nivelul membranei bazale a pielii transplantate ducând la formarea bulelor subepidermale asemănătoare cu cele ale pacienților cu BP (Olasz și colab., 2007). Șoarecii nou născuți, transgenici pentru colagenul XVII uman injectați cu IgG de la pacienții cu BP prezentau detașarea epidermului prin frecarea fină a pielii după 48 de ore de la injectare. Acest model animal a reprodus fenotipul BP demonstrând astfel pentru prima dată patogenicitatea anticorpilor pentru colagen XVII *in vivo* (Nishie și colab., 2007).

## Obiectivele studiului

În ciuda progreselor importante care s-au făcut pentru a înțelege patogeniza bolii, pemfigoidul bulos rămâne o boală care pune viața în pericol. Cunoștințele pe care le avem acum despre BP sunt datorate modelării bolii în șoareci nou născuți. Modelele actuale se bazează pe transferul pasiv al anticorpilor patogenici generați în iepuri, la șoareci de tip sălbatic sau, mai recent, al anticorpilor de la pacienți la șoareci modificați genetic. Principalul neajuns al modelelor animale existente îl reprezintă faptul că boala nu apare spontan iar perioada de observație este limitată la câteva zile împiedicând evaluarea cu acuratețe a evoluției patogenezei și a posibilelor metode terapeutice. Astfel, primul obiectiv al studiului de față a fost :

1. Obținerea și caracterizarea anticorpilor policlonali generați prin imunizarea a trei iepuri și a unei oi cu diferite fragmente ale epitopilor de la nivelul colagenului XVII, anticorpi care au fost folosiți pentru a transfera BP la șoareci adulți.
2. Studiarea patogenității anticorpilor specifici pentru un nou epitop al colagenului XVII uman folosind modelul *ex vivo* al pemfigoidului bulos.
3. Investigarea efectului superoxid dismutazei bovine precum și al inhibării mieloperoxidazei asupra separării dermo-epidermale induse de anticorpii patogenici ai pacienților cu pemfigoid bulos.
4. Dezvoltarea unui nou test ELISA pentru detectarea anticorpilor specifici colagenului de tip VII uman întâlniți la pacienții cu epidermoliză buloasă dobândită și boala intestinului inflamat.

# **Materiale și metode**

## **Seruri umane**

Serurile folosite în studiul de față au fost obținute de la pacienți cu EBA (n=50), boala Crohn (CD; n=50), colită ulcerativă (UC; n=50), pemfigoid bulos (BP; n=76), și pemfigus vulgar (PV; n=42) înainte de începerea tratamentului și donatori sănătoși (n=245). Studiul a fost aprobat de Comitetul etic al Facultății de Medicină a Universității din Freiburg, Germania (Institutional Board Projects no 318/07, 425/08 și 278/11). Am obținut consințământul scris de la pacienții al căror material a fost folosit în acest studiu, în concordanță cu Principiile de la Helsinki.

## **Izolarea leucocitelor din sângele donatorilor sănătoși**

Leucocitele au fost izolate prin metoda sedimentării cu dextran. Sângele obținut de la donatori sănătoși a fost amestecat în proporție 1:1 cu dextran 3% (Roth) preparat în soluție de NaCl 0.9%. După 30 de minute majoritatea eritrocitelor s-au depus în partea inferioară a tubului, supernatantul a fost centrifugat și celulele au fost colectate. Pentru a elimina eritrocitele rămase, celulele au fost re-suspendate în 20ml soluție de NaCl 0.2% timp de 30 de secunde după care liza hipotonică a fost oprită prin adăugarea unui volum de 20 ml soluție de NaCl 1.6%. Celulele au fost din nou colectate prin centrifugare la 1200rpm timp de 7 minute la temperatura camerei, spălate cu 20 ml mediu de cultură DMEM (Lonza) și resuspendate într-un volum de mediu corespunzător pentru a obține o densitate de  $3 \times 10^7$  celule/ml. Viabilitatea celulelor a fost testată cu trypan blue și în experimente au fost folosite preparate celulare cu o viabilitate >95%. Celulele au fost păstrate pe gheață până la utilizare.

## **Inducerea separării dermo-epidermale *ex vivo* de către anticorpi patogenici**

Pentru a testa patogenicitatea anticorpilor de iepure generați față de formele recombinante ale collagenului XVII uman, am folosit modelul *ex vivo* al pemfigoidului bulos dezvoltate de Sitaru și colab. (Sitaru și colab., 2002b). Pe scurt, serurile de iepure au fost incubate timp de 3 ore cu criosecțiuni de piele umană normală într-o cameră cu umiditate. După spălare cu PBS secțiunile au fost incubate cu 300μl din suspensia de leucocite pentru încă alte 3 ore la 37°C într-un

incubator umidificat . La finalul acestui interval, secțiunile de piele au fost spălate cu PBS, fixate în formalină și colorate cu hematoxină și eozină.

## **Generarea formelor recombinante ale colagenului VII uman**

Secvențele de ADN complementar corespunzătoare ambelor domenii necolagenoase ale colagenului VII uman (NC1, NC2) au fost obținute prin amplificare PCR folosind ca și matriță secvența completă a colagenului VII (primit de la Anja Fritsch), marcat cu 8xHis la capătul N-terminal, clonat anterior în vectorul procariot pcDNA3.1 Zeo(-), Invitrogen (Fritsch și colab., 2009). Amorsele pentru reacția în lanț polimerazei (PCR) au fost sintetizate de către Eurofins MWG (Ebersberg, Germany). Siturile de restricție pentru enzimele EcoRI și HindIII au fost introduse prin amorse. Pe scurt, vectorul pcDNA3.1hcol7 conținând secvența întregă a colagenului VII uman a fost digerat cu enzimele de restricție EcoRI și AgeI. Vectorul rezultat în urma acestei digestii conținând secvența de nucleotide corespunzătoare aminoacizilor 1-443 a fost ligat cu fragmentul PCR care se suprapune cu situsul de restricție pentru AgeI la nivelul secvenței colagenului VII rezultând vectorul recombinat pcDNA3.1hCol7NC1 conținând întreaga secvență a domeniului NC1 corespunzător aminoacizilor 1-1278 din secvența colagenului VII. Produsul de PCR corespunzător fragmentului NC2 a fost digerat cu enzimele de restricție EcoRI și HindIII și ligat în vectorul pcDNA3.1hCol7NC1 digerat cu aceleași enzime rezultând vectorul recombinat pcDNA3.1hCol7NC1-NC2 având secvența de nucleotide corespunzătoare aminoacizilor 1-1278 și 2776-2944. Ulterior, fragmentul recombinat (NC1-NC2) a fost subclonat în vectorul pcDNA5FRT cu ajutorul enzimelor de restricție NheI și HindIII obținându-se vectorul recombinat pcDNA5FRThcol7NC1-NC2. Pentru a obține proteina recombinată care să conțină domeniile NC1, regiunea balama și NC2 ale colagenului VII uman, secvența de nucleotide care codifică regiunea balama și domeniul NC2, mărginite de situsurile de restricție pentru EcoRI și Hind III, au fost sintetizate de GenScript în vectorul pUC57. Secvența a fost apoi tăiată din vectorul pUC57 cu enzimele EcoRI și HindIII și ligată în vectorul pcDNA5FRT NC1-NC2 digerat cu aceleași enzime obținându-se astfel vectorul recombinat pcDNA5FRThcol7NC1-H-NC2 conținând secvența corespunzătoare aminoacizilor 1-1278, 1940-1979 și 2776-2944. Corectitudinea secvențelor ADN a fost confirmată prin secvențializare directă.

## **Exprimarea fragmentelor recombinante ale colagenului VII în celule Hek293**

Celulele Flp-in Hek293 T au fost transfectate cu 5 $\mu$ g vector pcDNA5FRThCol7NC1-NC2/pcDNA5FRThCol7NC1-H-NC2 și 2.5 $\mu$ g vector pOG44 în lipofectamină2000 (Invitrogen). Celulele transfectate exprimând proteinele de interes au fost selectate cu 200 $\mu$ g/ml higromicină (Roth). Proteinele au fost precipitate din mediul cultură cu sulfat de amoniu 50% timp de 4 ore la 4°C și au fost colectate prin centrifugare timp de 45 minute la 27200 rcf, 4°C. Proteinele au fost resuspendate în PBS rece, dializate peste noapte împotriva PBS și purificate apoi prin cromatografie de afinitate folosind nichel-acid nitrilotriacetic cuplat cu agaroză (Ni-NTA, Qiagen, Germany). Proteinele purificate au fost separate prin SDS PAGE pe geluri de 8% sub formă redusă și transferate pe membrană de nitroceluloză. Benzile obținute după tăierea membranei au fost incubate cu un anticorp monoclonal specific pentru colagenul VII uman, diluat de 1000 de ori (clona LH 7.2; Chemicon International, Germany) și reactivitatea a fost detectată cu un anticorp secundar de capră generat împotriva IgG de la șoarece și conjugat cu peroxidază de la hrean (Abcam).

### **Analiza statistică**

Curba ROC (Receiver Operating Characteristic) permite explorarea relației dintre sensibilitatea și specificitatea testului ELISA la diferite valori prag, permițând astfel determinarea unei valori prag optime pentru pozitivitate. Astfel, pentru a determina valoarea prag pentru ELISA folosind două forme recombinante ale colagenului de tip VII uman, am făcut analiza ROC prin reprezentarea grafică pe axa X a 1- Specificitatea (rata fals pozitivă) iar pe axa Y sensibilitatea (rata adevărat pozitivă). Analizele statistice au fost realizate cu ajutorul pachetului statistic GraphPad Prism (v5; GraphPad Software, San Diego, CA). Pentru a calcula semnificația statistică am folosit testul U Mann-Whitney;  $p < 0.05$  a fost considerat semnificativ.

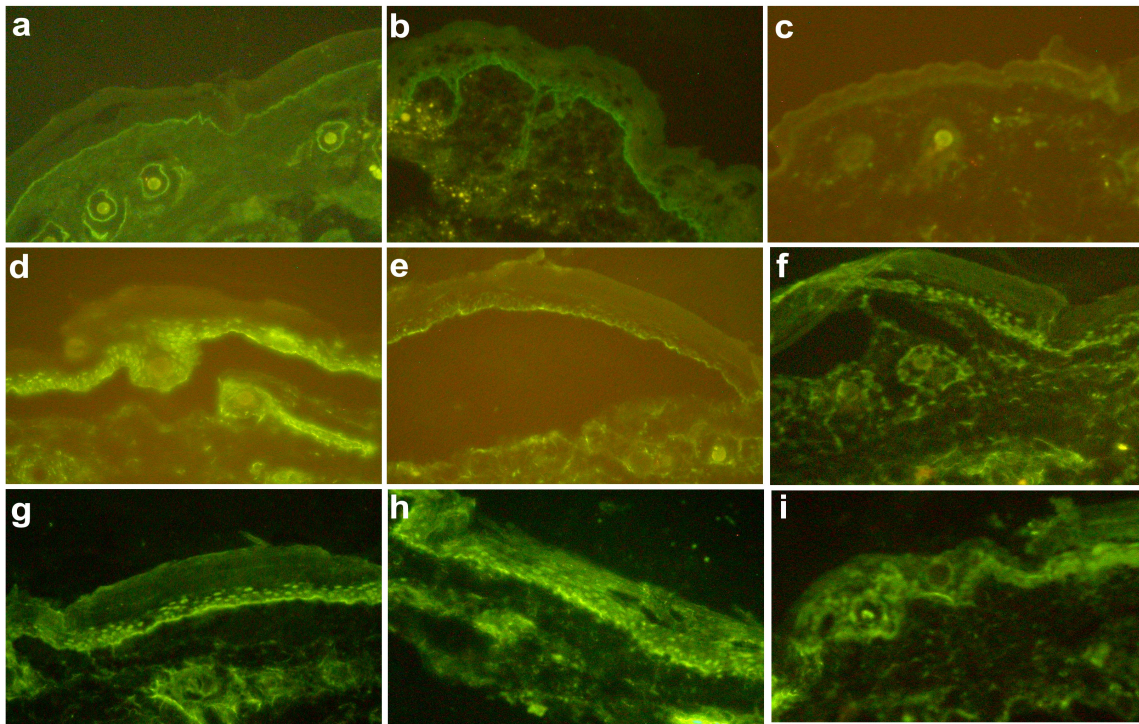
# Rezultate

## **Anticorpzii de iepure și oaie generați împotriva colagenului XVII uman s-au legat la nivelul joncțiunii dermo-epidermale a pielii de șoarece și au fixat complementul murin**

Anticorpzii circulanți obținuți la diferite intervale de timp de la animalele imunizate cu fragmentele recombinante ale colagenului XVII murin au fost testați pentru capacitatea lor de a recunoaște proteina *in situ*. Atât anticorpzii de la oaie cât și cei de la iepure au produs o colorare liniară la membrana bazală așa cum a fost demonstrat prin microscopie de imunofluorescență (**Figura 2a, 2b**).

În contrast, anticorpzii obținuți înainte de prima imunizare nu s-au legat la nivelul joncțiunii dermo-epidermale (**Figura 2c**). Când au fost incubați cu piele de șoarece separată artificial cu 1M NaCl, anticorpzii de la animalele imunizate s-au legat la partea epidermală a substratului (**Figura 2d și 2e**). Anticorpzii purificați din serul pre-imun nu s-au legat la nivelul pielii (**Figura 2f**). Mai mult, serurile de la animalele imunizate (**Figura 2g și 2h**), dar nu cele recoltate înainte de imunizare (**Figura 2i**) au indus depunerea proteinei C3 a sistemului complement la nivelul joncțiunii dermo-epidermale așa cum a fost demonstrat prin testul de fixare al complementului folosind piele de șoarece ca și substrat.

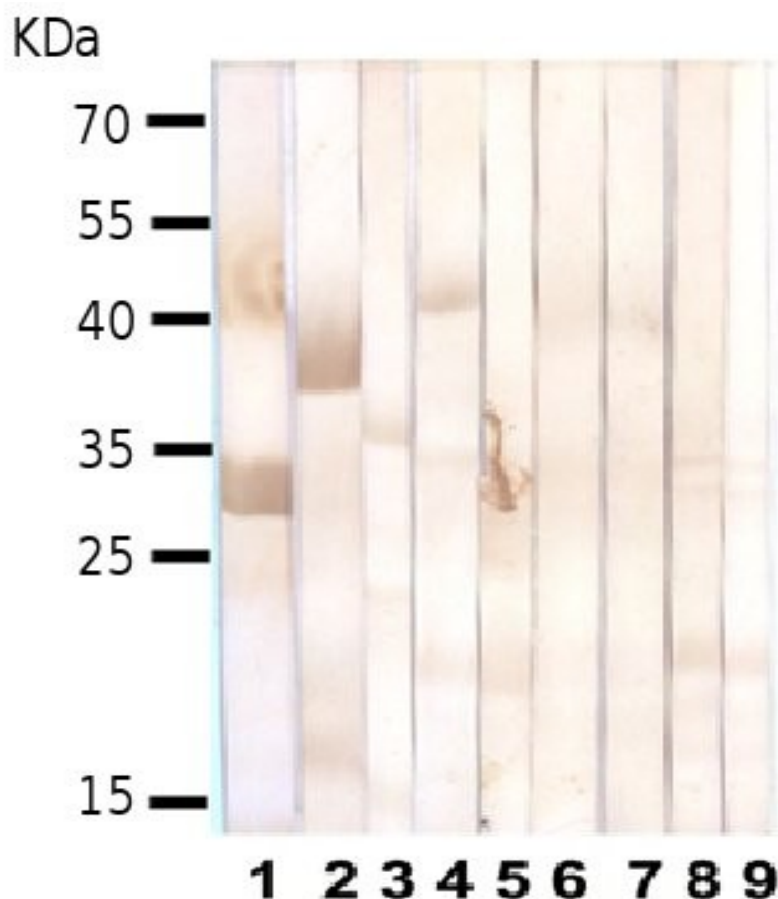




**Figura 2. Anticorprii de la animalele imunizate recunosc collagenul XVII murin și activează complementul *ex vivo*.** Serul a fost obținut de la animale înainte și după imunizare, la diferite intervale. Serul de iepure (a) și cel de la oaie (b) prelevat după imunizare s-au legat la nivelul membranei bazale a pielii de șoarece. În contrast, anticorprii obținuți de la un iepure înainte de a fi imunizat (c) nu au recunoscut antigenul *in situ*. Când au fost incubați cu piele de șoarece separată artificial cu NaCl, anticorprii de la iepure (d) și oaie (e) s-au legat la partea epidermală a bulei artificiale spre deosebire de anticorprii obținuți din ser pre-imun care nu s-au atașat de piele (f) (magnificație 200x). Anticorprii de la animalele imunizate, iepure (g) și oaie (h), au activat complementul murin când au fost incubați cu criosecțiuni de piele murină. În schimb, anticorprii pre-immuni (i) atât de la iepure cât și de la oaie nu au avut capacitatea de a fixa complementul.

## **Anticorprii specifici pentru collagenul XVII recunosc formele recombinante ale proteinei în western blotting**

Proteinele recombinante folosite pentru a imuniza animalele au fost separate prin SDS-PAGE și transferate apoi pe membrană de nitroceluloză. În imunoblot, anticorprii din serul imun, spre deosebire de cel pre-imun sau normal, au recunoscut formele recombinante ale collagenului de tip XVII (**Figura 3**). Cea mai mare reactivitate a fost detectată împotriva fragmentului EC1 (banda 2).

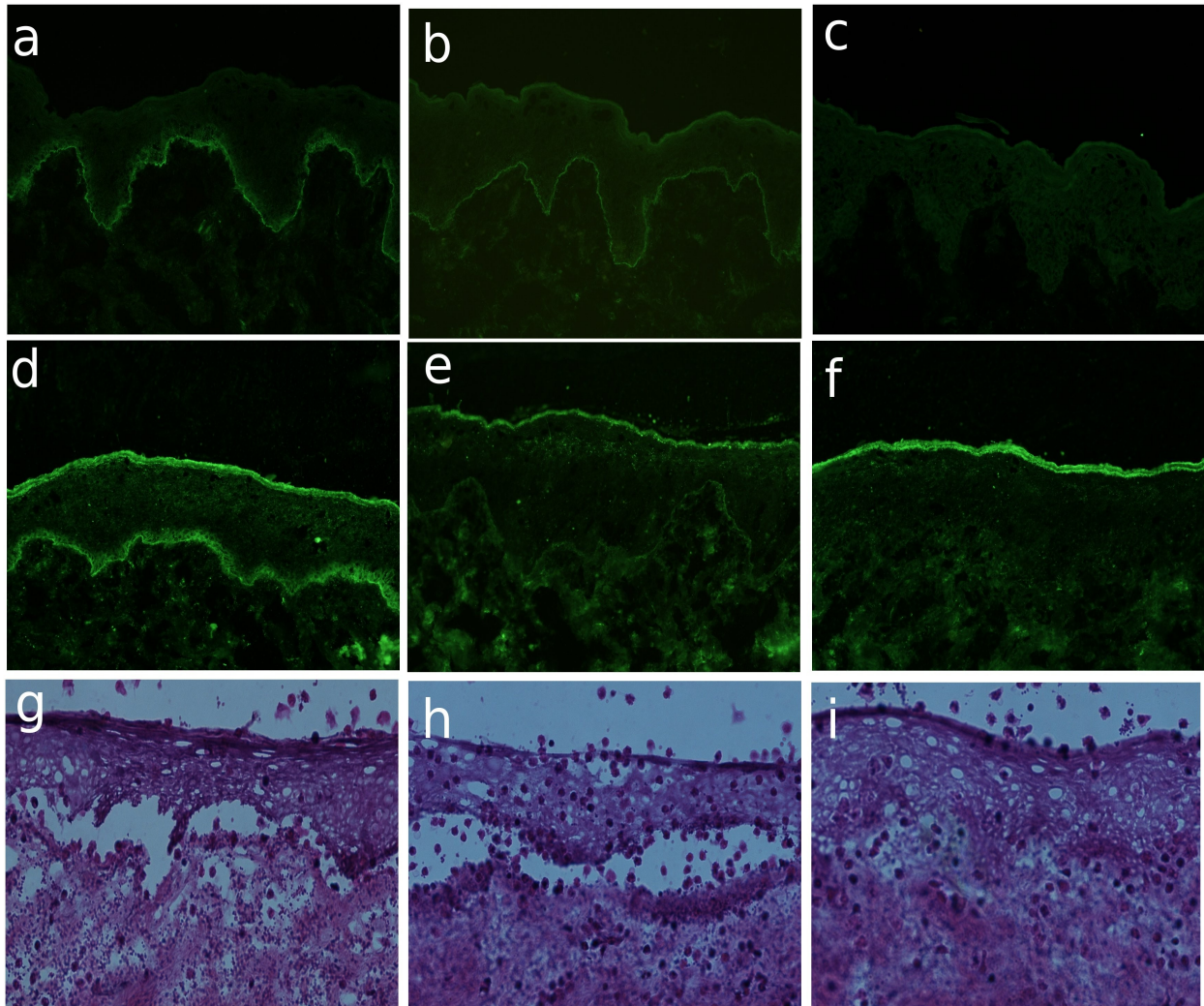


**Figura 3. Anticorpilor patogenici au recunoscut formele recombinante ale collagenului XVII în imunoblot;** de la dreapta la stanga: marker molecular, banda 1 GST, benzile 2-5 reprezintă: GST-mCXVII-EC1, GST-mCXVII-EC3, GST-mCXVII-EC7 și respectiv GST-mCXVII-IC2 au fost incubate cu ser imun. Benzile 6-9 corespund la GST-mCXVII-EC1, GST-mCXVII-EC3, GST-mCXVII-EC7 și GST-mCXVII-IC2 și au fost incubate cu ser de control.

### **Anticorpilor specifici pentru un nou epitop al collagenului XVII au fixat complementul și au indus separare dermo – epidermală *ex vivo***

O caracteristică majoră a anticorpilor IgG întâlniți la pacienții cu pemfigoid bulos o reprezintă capacitatea lor de a activa sistemul complement (Sitaru și colab., 2002b). Pentru a testa capacitatea anticorpilor IgG generați prin imunizarea iepurilor cu diferite forme ale collagenului XVII uman de a lega complementul, am realizat testul de fixare a complementului *in vitro* folosind anticorpi de iepure specifici pentru domeniul NC16A (p-Ab-NC16A) al collagenului XVII uman și Ab 83457, un

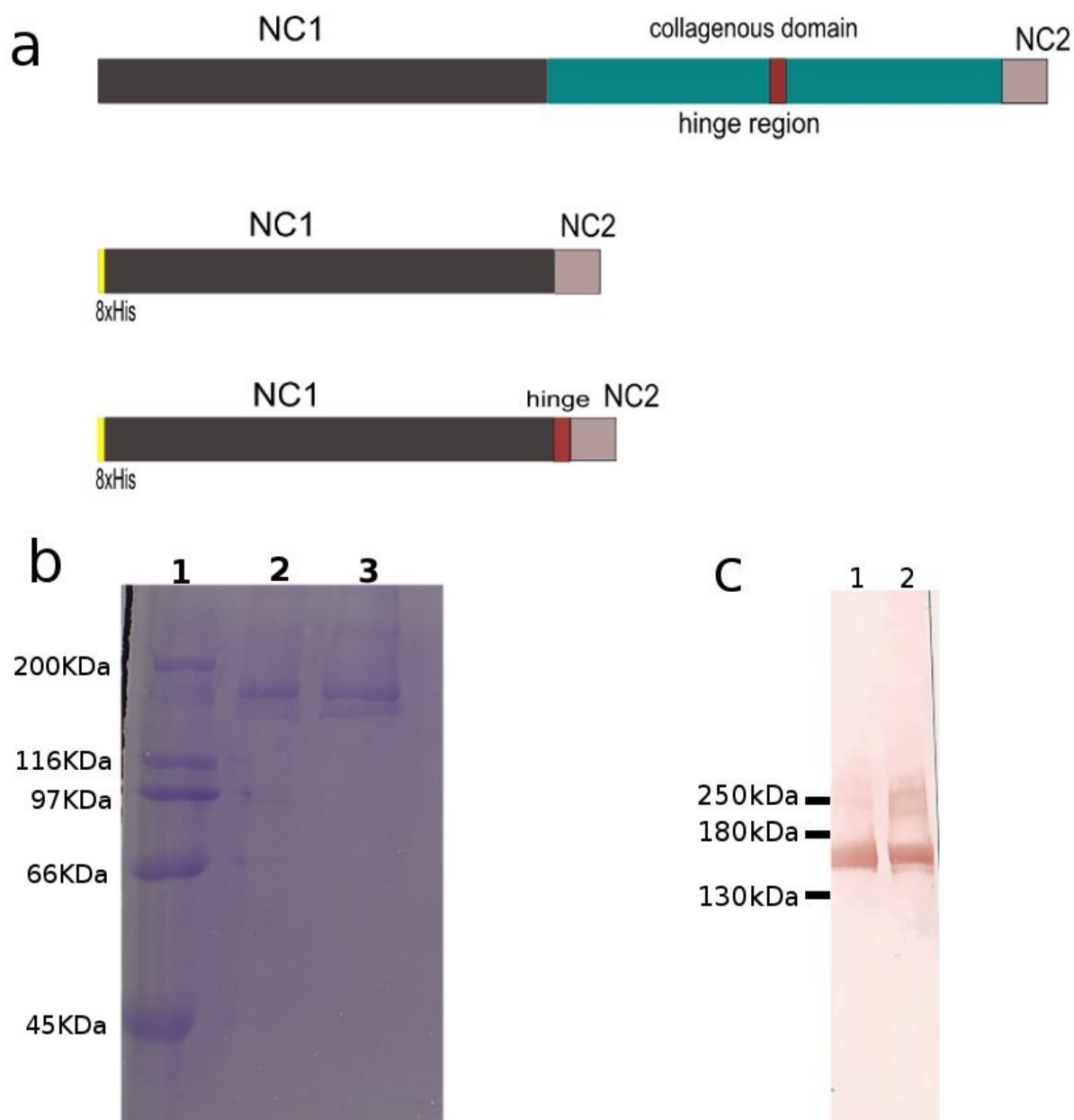
anticorp specific pentru un epitop nou descoperit al colagenului XVII (**Figura 4a, 4b, 4d, 4e**). În contrast, fracțiunea IgG purificată din serul obținut de la un iepure înainte de a fi imunizat nu s-a legat la nivelul joncțiunii dermo-epidermale și nu a avut capacitatea de a fixa complementul (**Figure 4c, 4f**). Câteva linii de evidență indică faptul că recrutarea și activarea granulocitelor de către anticorpi după legarea acestora la membrana bazală reprezintă o condiție obligatorie pentru formarea bulelor în bolile pemfigoidale (Sitaru și colab., 2002b; Sitaru și colab., 2004). Astfel, pentru a caracteriza capacitatea anticorpilor specifici pentru un neo-epitop al colagenului XVII de a activa granulocitele, am folosit modelul *ex vivo* al BP în care separarea dermului de epiderm în criosecțiuni de piele normală este indusă de anticorpii patogenici în prezența granulocitelor. Incubarea criosecțiunilor cu Ab-NC16A (**Figure 4g**) și Ab 83457 (**Figure 4h**) dar nu cu IgG de control (**Figure 4i**), a dus la formarea bulei subepidermale când au fost co-incubate cu leucocite de la donatori sănătoși.



**Figura 4. Anticorpul 83457 specific pentru un epitop nou al domeniului extracelular al colagenului XVII uman fixează complementul și induce separare dermo-epidermală în criosecțiunile de piele umană normală.** IgG de la iepuri imunizați cu întregul domeniu NC16A (pAb-NC16A) al colagenului XVII uman, anticorpul Ab 83457 și serul de iepure preimun au fost incubati cu criosecțiuni de piele umană. IgG specifici pentru NC16A (a) și Ab 83457 (b), dar nu serul preimun (c) s-au legat la joncțiunea dermo-epidermală. Când s-a adăugat ser uman proaspăt ca și sursă de complement, atât pAb-NC16A (d) cât și Ab 83457 (e) au fixat proteina C3 a complementului la membrana bazală. În contrast, serul preimmun (f) nu a fixat complementul. Incubarea ulterioară cu leucocite normale a indus separarea dermului de epiderm în secțiunile tratate cu anticorpul pAb-NC16A (g) și Ab 83457 (h), dar nu cu anticorpi izolați din ser preimun (i).

## **Generarea și purificarea formelor recombinante ale colagenului VII uman (hCVIINC1-NC2, hCVIINC1-H-NC2)**

Proteinele recombinante au fost exprimate în celule de mamifere și purificate prin cromatografie de afinitate. Când au fost separate prin SDS-PAGE, formele recombinante ale colagenului VII conținând domeniul NC1 fuzionat cu domeniul NC2 (His-hCVII-NC1-NC2) precum și regiunea balama (His-hCVII-NC1-H-NC2), au migrat conform greutateii lor moleculare calculate de 153 kDa (**Figura 5b, banda 2**) și respectiv 158 kDa (**Figura 5b, banda 3**). Un anticorp monoclonal specific pentru domeniul NC1 a recunoscut ambele forme recombinante în imunoblot (**Figura 5c, benzile 1 și 2**).

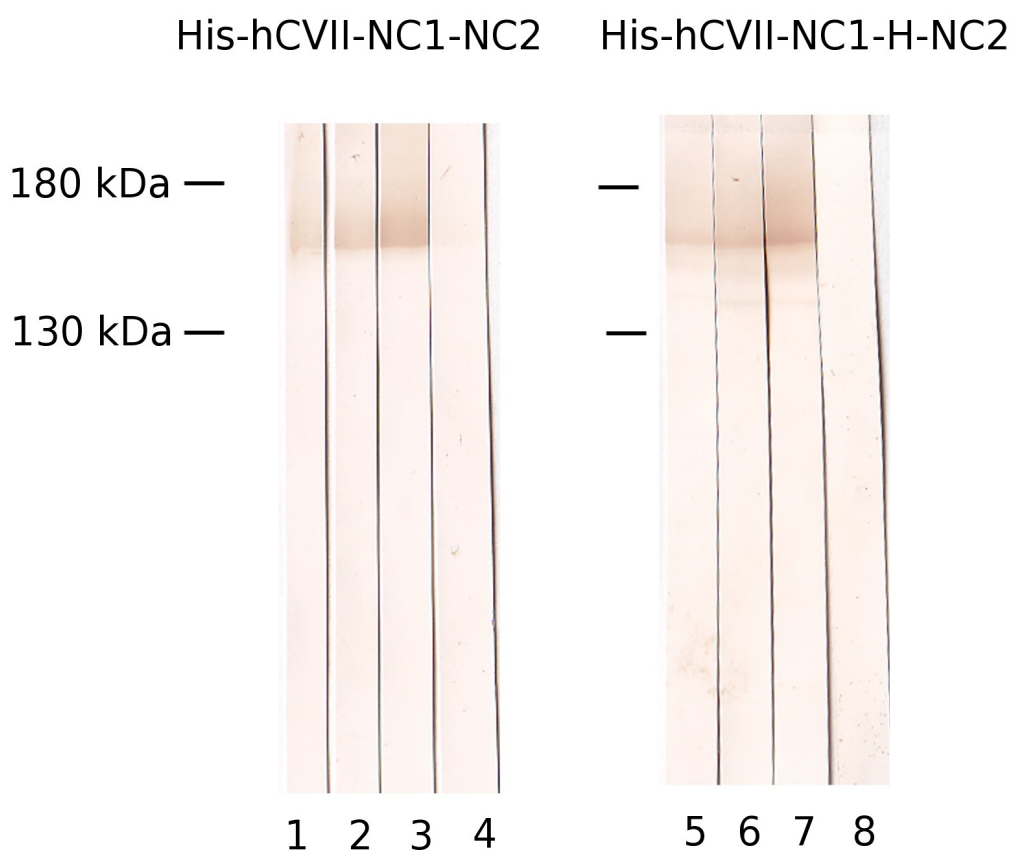


**Figura 5. Formele recombinante ale colagenului VII folosite în acest studiu. (a)** Reprezentarea schematică a colagenului VII uman. Colagenul VII este alcătuit dintr-un domeniu colagenos central, mărginit la capătul N-terminal de un domeniu necolagenos mare, de 145kDa și de un domeniu necolagenos mai mic, de aproximativ 30 kDa, la capătul C-terminal. Domeniul colagenos este întrerupt de o regiune necolagenoasă de 39 de aminoacizi numită regiune balama. Formele recombinante ale colagenului VII generate în acest studiu sunt 2 proteine himerice, marcate cu o secvență de 8 histidine la capătul N-terminal, denumite His-hCVII-NC1-NC2 și His-hCVII-NC1-H-NC2, corespunzând domeniilor NC1 și NC2 fuzionate (aa 1-1278, 2776-2944) și respectiv domeniilor NC1, regiunea balama și NC2 (1-1278, 1940-1979, 2776-2944) la fel, fuzionate. **(b)** În urma electroforezei pe gel SDS a proteinelor recombinante purificate His-hCVII-NC1-NC2 și His-

hCVII-NC1-H-NC2 se observă migrarea acestora la aproximativ 153 (banda 2) și respectiv 158 kDa (banda 3). Markerii pentru greutatea moleculară de 250, 150, 100, 75 și 50 kDa sunt reprezentați în banda 1. (c) Analiza imunoblot a celor două proteine recombinante His-hCVII-NC1-NC2 (banda 2) și His-hCVII-NC1-H-NC2 (banda 3) folosind un anticorp monoclonal specific pentru domeniul NC1 al colagenului VII (clona LH7.2).

## Autoanticorpul de la pacienții EBA au reacționat cu ambele forme recombinante ale colagenului VII

Imunoreactivitatea noilor forme himerice recombinante ale colagenului VII au fost analizate în imunoblot folosind seruri de referință de la pacienți cu EBA și de la donatori sănătoși. Exemple reprezentative sunt arătate în **Figura 6**. Autoanticorpul IgG din serul pacienților cu EBA (n=5) au recunoscut formele recombinante His-hCVII-NC1-NC2 (**Figura 6, benzile 1-3**) și His-hCVII-NC1-H-NC2 (**Figura 6, benzile 5-7**) ale colagenului VII. Nici unul din serurile de control (n=2) nu au reacționat cu aceste forme recombinante ale colagenului VII (**Figura 6, benzile 4 și 8**).



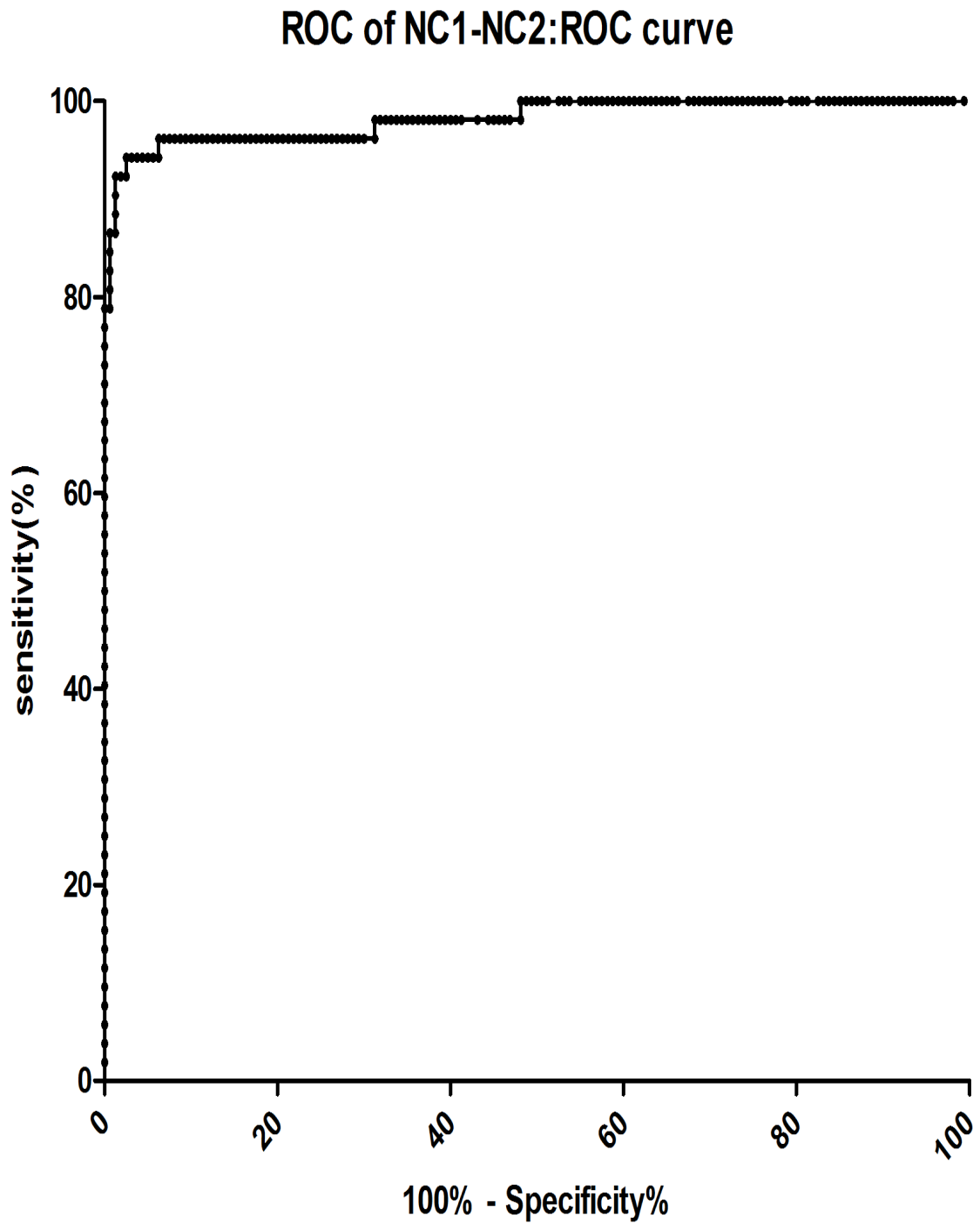
**Figura 6.** Imunoreactivitatea autoanticorpilor EBA cu formele recombinante ale colagenului VII., Proteina recombinată His-hCVII-NC1-NC2 purificată (**benzile 1-4**) și His-hCVII-NC1-H-NC2 (**benzile 5-8**) au fost separate prin electroforeză SDS-PAGE pe geluri de 8%, transferate pe membrană de nitroceluloză și incubate cu seruri de la pacienți cu EBA (**benzile 1-3 și 5-7**) și seruri de la donatori sănătoși (NHS) (**benzile 4 și 8**).

## **Dezvoltarea testelor ELISA folosind formele recombinante ale colagenului VII**

### **NC1-NC2**

În scopul dezvoltării unui nou test ELISA pentru detecția specifică a anticorpilor pentru colagenul VII am folosit celulele HEK293 pentru a produce o proteină recombinată conținând ambele domenii neolagenoase ale colagenului VII. În vederea stabilirii condițiilor de lucru, incalzând cantitatea de proteină necesară pentru un godeu, diluția serurilor și a anticorpilor secundari am realizat o titrare chessboard (date neprezentate). Pentru a determina valoarea prag de pozitivitate a testului nou stabilit, am realizat analiza ROC a valorilor obținute după citirea absorbației obținute la finalul testului pentru 50 de seruri de la pacienții cu EBA și 160 de la donatori sănătoși. Valoarea prag a testului nou stabilit a fost fixată la 0.42 unități de citire a densității optice cu o sensibilitate calculată de 92% și specificitate de 97.5% (**Figura 7**).

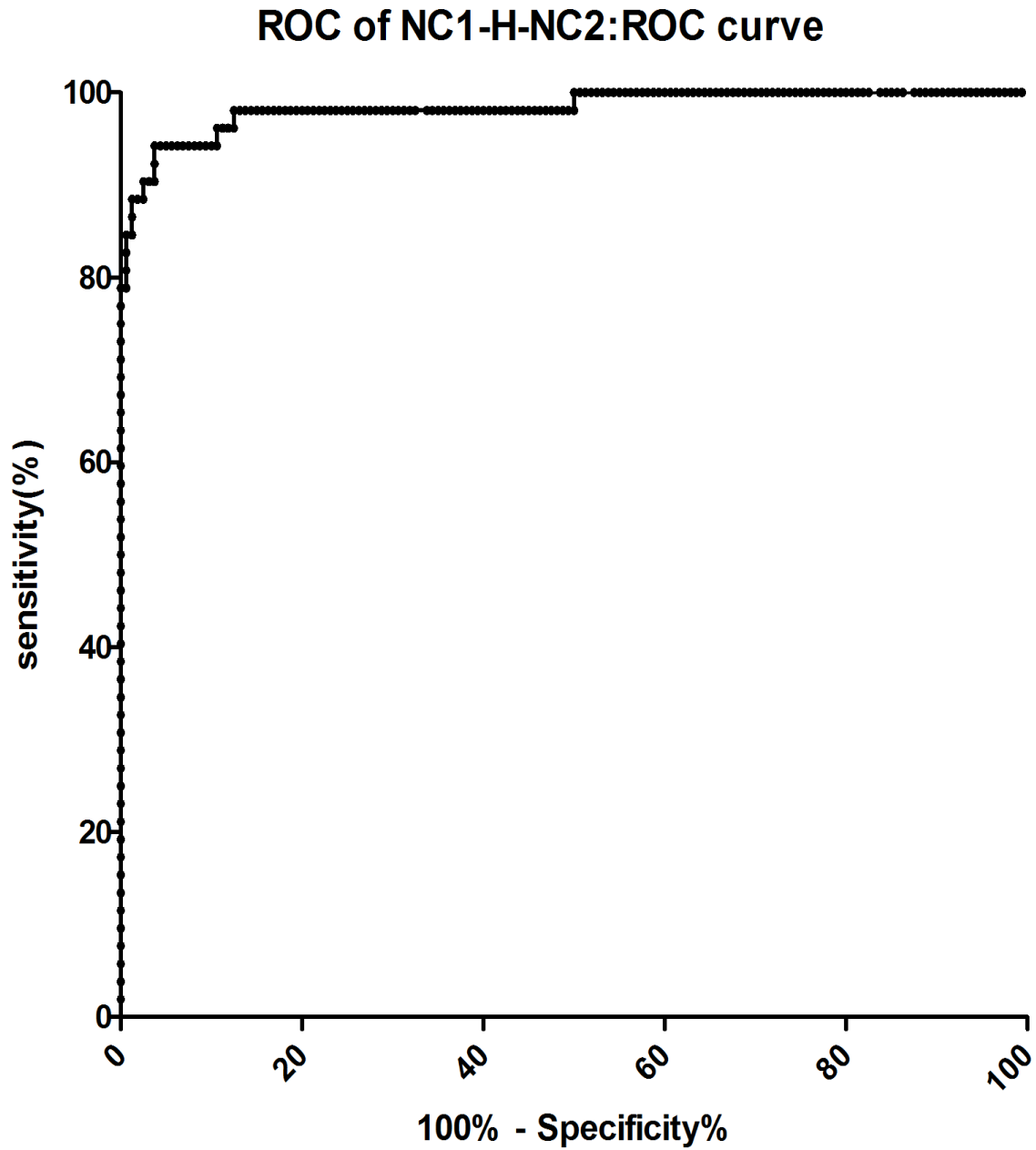




**Figura 7. Curba ROC (Receiver-operating-characteristic).** AUC, area under the curve. Testul a fost realizat cu seruri de la pacienți cu epidermoliză buloasă dobândită (n=50) și donatori sănătoși (NHS=160).

## NC1- H- NC2

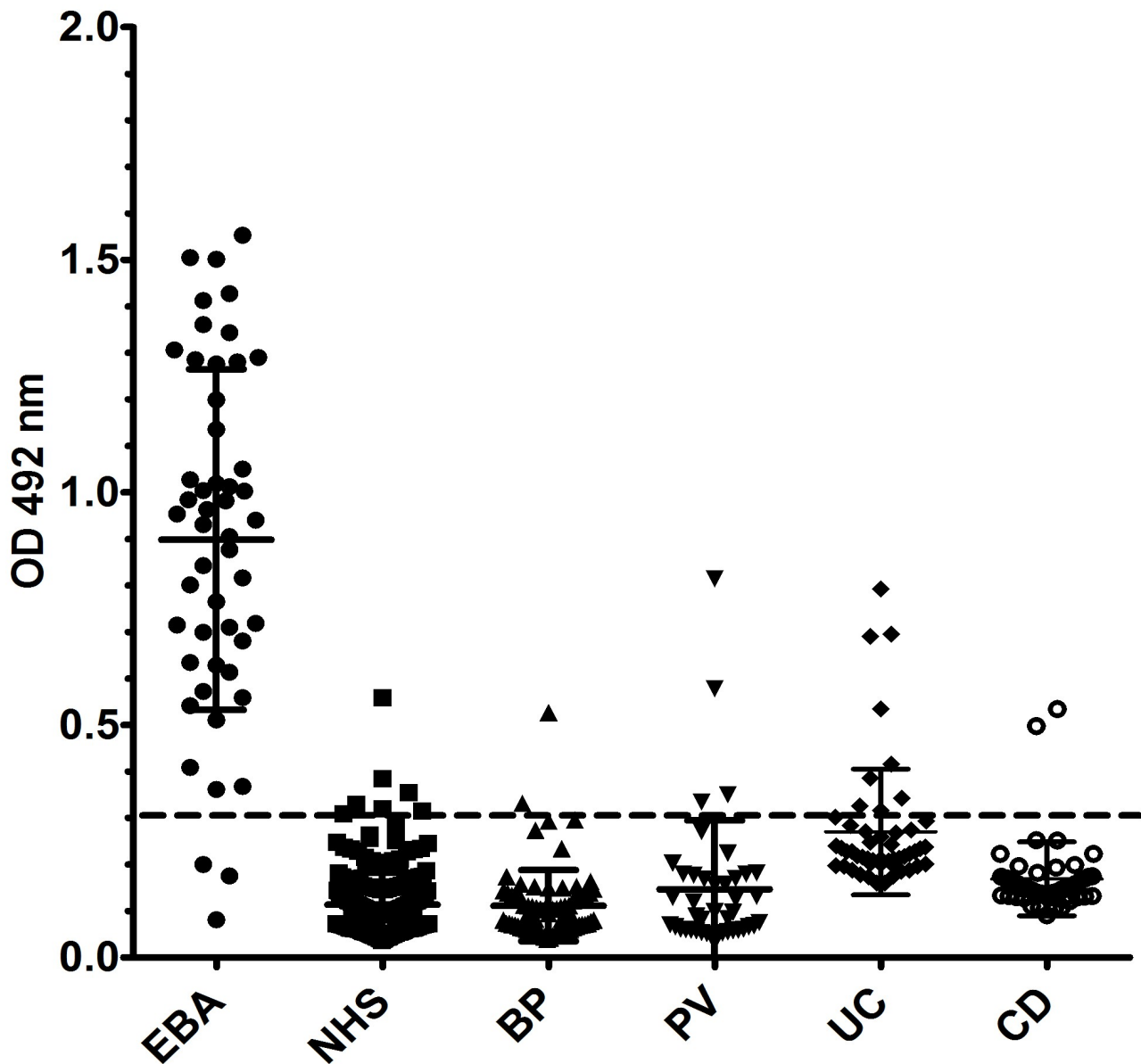
Studii recente au demonstrat existența unor seruri EBA care reacționează cu domeniul colagenos triplu helical al colagenului VII. Pe baza acestor observații, am dezvoltat un alt test ELISA folosind o proteină recombinată care conține pe lângă cele două domenii necolagenoase și regiunea balama a colagenului VII, care este o regiune necolagenoasă de 39 de aminoacizi care întrerupe domeniul colagenos. Acest test imunologic a fost apoi folosit pentru a caracteriza prevalența autoanticorpilor specifici pentru colagenul VII și subclasa caracteristică a acestora în loturi mari de pacienți cu boala intestinului inflammat (IBD), pemfigus și pemfigoid bulos precum și în serul donatorilor sănătoși. Analiza ROC a valorilor ELISA cu aceleași seruri de EBA și de control folosite pentru testul cu NC1-NC2 ne-a permis să fixăm valoarea prag a acestui test nou stabilit. Pe baza unei specificități calculate de 97.5% și a unei sensibilități de 94%, valoarea prag pentru pozitivitate a tesului a fost stabilită la 0.32 unități ale densității optice (**Figura 8**).



**Figura 8. Curba ROC (Receiver-operating-characteristic).** AUC, area under the curve. Testul a fost realizat cu seruri de la pacienți cu epideromiliză buloasă dobândită (n=50) și seruri control (NHS=160).

## **ELISA folosind formele recombinante NC1-NC2 și NC1-hinge-NC2 ale colagenului VII permit detecția sensibilă și specifică a autoanticorpilor antigen-specifici**

Aplicarea valorii prag de 0.322 definită în urma analizei ROC pentru testul nou stabilit a arătat că 47 de pacienți cu EBA (94%; 95% CI: 87%-100%; n=50), 2 cu CD (4%; 95% CI: 0%-9.43%; n=50), 8 cu UC (16%; 95% CI: 5.8%-26%; n=50), 2 cu BP (2.63%; 95% CI: 0%-6.23%; n=76), 4 cu PV (9.52%; 95% CI: 0%-18.4%; n=42) și 4 dintre donatorii sănătoși (1.63%; 95% CI: 0%-3.21%; n=245) au avut anticorpi IgG care au reacționat cu proteina himerică NC1-hinge-NC2-hCVII (**Figura 9; Tabelul 1**). Astfel, o sensibilitate și specificitate de 94% (95% CI: 83.4%-98.75%) și respectiv 97.50 % (95% CI: 94%-100%) au fost calculate pentru testul ELISA care detectează autoanticorpii IgG specifici pentru colagenul VII la pacienți cu EBA. AUC (area under the curve) a fost 0.984 (95% CI.: 96.3%-100%) indicând o excelentă capacitate de discriminare.

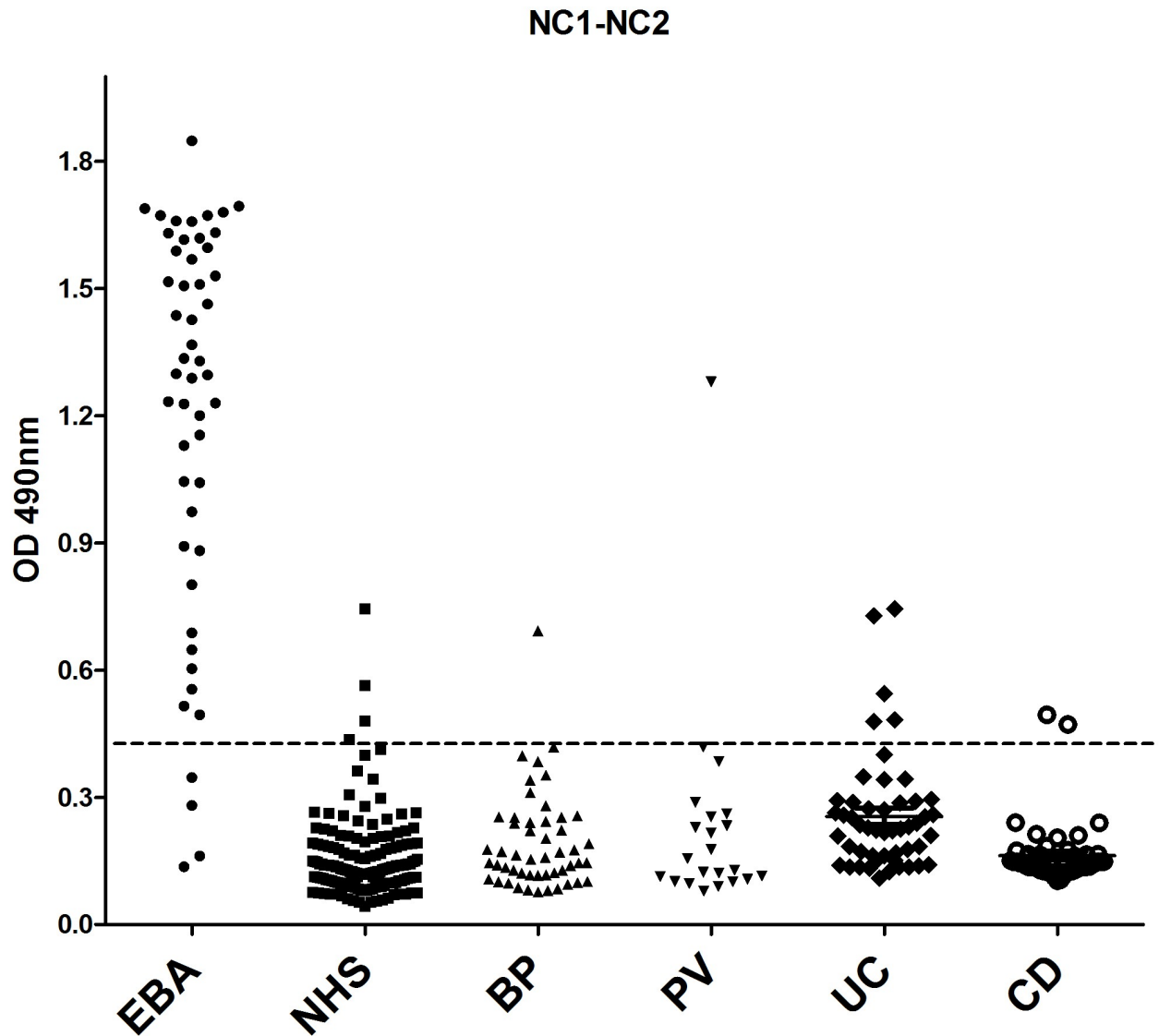


**Figura 9. Reactivitatea ELISA a serurilor de la pacienții cu epidermoliză buloasă dobândită (EBA) și a celor de control cu forma recombinată NC1-H-NC2 a colagenului VII. Punctele de pe grafic reprezintă valorile densității optice ale reactivității serurilor de la pacienții cu EBA, BP, PV, UC, CD și donatori sănătoși cu proteina His-hCVII-NC1-H-NC2 purificată. Valoarea prag a testului este reprezentată de linia punctată.**

**Tabel 1. Sensibilitatea și specificitatea testului ELISA cu NC1-H- NC2, forma recombinată a colagenului VII**

Seruri	Pozitive/Total	Sensibilitatea (95% CI)	Specificitatea (95%CI)
EBA	47/50 (94%)	94% (87%-100%)	98.4% (94.90%-100%)
BP	2/76 (2.63%)	2.63% (0.0%-6.23%)	98.4% (94.90%-100%)
PV	4/42 (9.52%)	9.52% (0.0%-18.4%)	98.4% (94.90%-100%)
CD	2/50 (4%)	4% (0.0%-9.4%)	98.4% (94.90%-100%)
UC	8/50 (16%)	16% (5.8%-26%)	98.4% (94.90%-100%)
NHS	4/245 (1.63%)	1.63% (0.0%-3.21%)	98.4% (94.90%-100%)

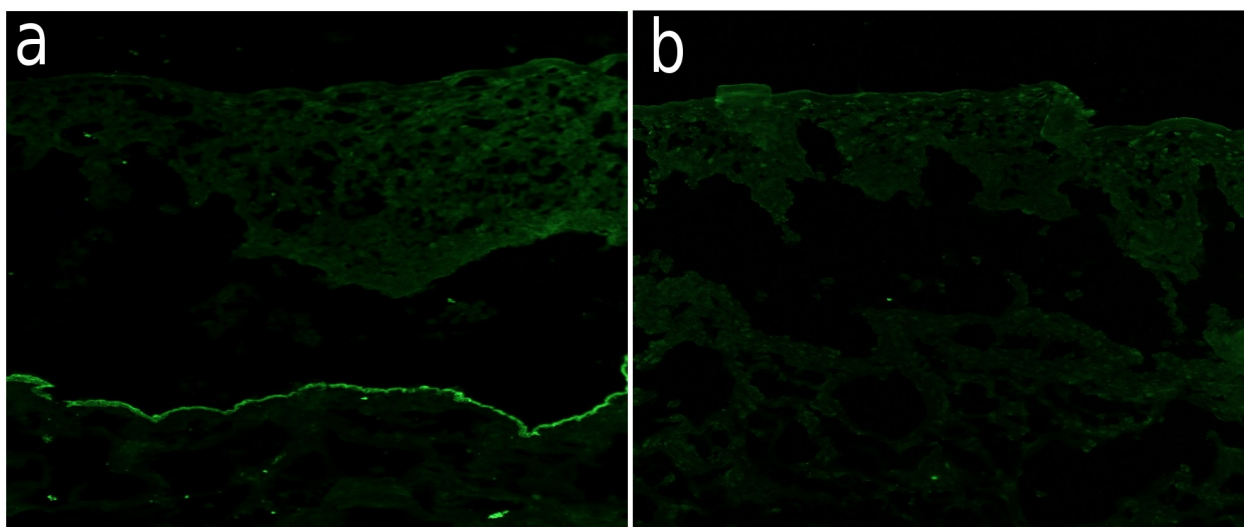
Acuratețea testului ELISA pentru care s-a folosit proteina recombinată conținând doar cele două domenii neolagenoase NC1-NC2 ale colagenului VII a fost doar cu puțin mai scăzută așa cum este indicat de sensibilitatea de 92% (95% CI: 80.7%-97.7%) și specificitatea de 97.50% (95% CI: 93.7%-99.3%) cu o valoare AUC de 0.980 (**Figura 10**). Există o corelație bună între cele 2 teste în ceea ce privește capacitatea lor de a detecta autoanticorpii specifici ( $r=0.95$ ;  $p<0.0001$ ).



**Figura 10** . Reactivitatea ELISA a serurilor de la pacienții cu epidermoliză buloasă dobândită (EBA) și a celor de control cu forma recombinată NC1-NC2 a collagenului VII. Punctele de pe grafic reprezintă valorile densității optice ale reactivității serurilor de la pacienții cu EBA, BP, PV, UC, CD și donatori sănătoși cu proteina His-hCVII-NC1-NC2 purificată. Valoarea prag a testului este reprezentată de linia punctată.

## **Nivelul IgG din serurile pacienților cu EBA determinat prin testul ELISA hCVIINC1-H-NC2 corelează cu reactivitatea IgG împotriva joncțiunii dermo-epidermale în imunofluorescență indirectă**

Imunofluorescența indirectă pe piele separată artificial cu clorură de sodiu este un test standard pentru diagnostic și monitorizare în bolile buloase autoimune. Pentru a investiga mai departe dacă testul ELISA dezvoltat de noi este potrivit pentru diagnosticarea bolilor asociate cu autoimunitatea față de colagenul VII, am corelat nivelul IgG măsurat în ELISA cu titrul serurilor de la pacienții cu EBA (n=9) obținut în urma testării lor în imunofluorescență indirectă pe piele separată artificial. Majoritatea serurilor care au fost pozitive în ELISA au fost pozitive și în imunofluorescență indirectă (Figura 11 a), însă au fost și câteva care au fost negative (Figura 11b) Când nivelul anticorpilor IgG specifici pentru colagen VII a fost reprezentat grafic versus titrul obținut prin imunofluorescență indirectă, s-a obținut o corelație pozitivă ( $r=0.73$ ;  $p<0.05$ ). Interesant, toate serurile pacienților cu BP (n=2), PV (n=4), CD (n=2) și UC (n=8) precum și cele de la donatori sănătoși (n=4), care au avut nivele mai scăzute de anticorpi IgG împotriva colagenului de tip VII în ELISA, nu s-au legat la nivelul părții epidermale în imunofluorescență indirectă realizată pe piele separată cu clorură de sodiu.



**Figura 11. Imunofluorescență indirectă a serurilor EBA (diluție 1:10) pe piele separată cu NaCl. Serurile de EBA care au fost pozitive în ELISA au fost diluate serial și incubate cu piele umană pentru a li se determina titrul anticorpilor specifici pentru membrana bazală.**



## **Nivelul autoanticorpilor generați împotriva colagenului de tip VII nu corelează cu markerii pentru inflamație la pacienții cu boala intestinului inflamat**

Proteina C-reactivă (CRP) este un marker folosit în mod obișnuit pentru aprecierea activității bolii la pacienții cu intestin inflamat, în special la cei cu boala Crohn. Pentru a investiga dacă autoanticorpilor specifici pentru colagenul VII au un rol direct în patogeneza bolii intestinului inflamat, nivelul autoanticorpilor serici detectat în ELISA a fost corelat cu valorile CRP ale pacienților măsurate la data colectării serului. Coeficienții de corelație calculați au fost  $r=0.135$  ( $p=0.356$ ) și  $r=-0.174$  ( $p=0.231$ ) pentru pacienții cu colită ulcerativă și respectiv cu boala Crohn.

# Discuții

Capacitatea sistemului imun de a deosebi antigenele proprii de cele străine este crucială pentru apărarea împotriva microorganismelor patogene. Când sistemul imun pierde toleranța față de unul sau mai multe antigene proprii se produce un răspuns autoimun. Cauzele și mecanismele care duc la declanșarea reacției autoimune sunt încă puțin cunoscute.

Bolile autoimune sunt în general boli rare, dar care sunt cronice, dificil de tratat și care pun viața în pericol. Deși s-a avansat destul de mult în ceea ce privește patogeniza acestor boli, terapiile disponibile la ora actuală sunt încă bazate pe administrarea de corticosteroizi sistemici și/sau alți agenți cu acțiune imunosupresoare care au eficiență scăzută, în parte datorită numeroaselor efecte secundare pe care le induc.

Pentru câteva boli autoimune s-au stabilit modele experimentale *ex vivo* sau/și *in vivo* care au contribuit substanțial la o mai bună înțelegere a patogenizei bolii constituind mijloace deosebit de utile pentru disecarea fenomenului autoimn și pentru dezvoltarea de noi strategii terapeutice.

Cea mai directă metodă de reproducere a bolilor autoimune induse de autoanticorpi *in vivo* a fost aceea de a injecta ser de la pacienți sau anticorpi purificați specifici pentru un anumit antigen la indivizi sănătoși. Această metodă a fost folosită pentru prima dată de către Harrington și colaboratorii în anii '50 ai secolului trecut. Ei și-au transferat ser de la pacienți cu trombocitopenie idiopatică (Harrington și colab., 1951) reproducând simptomatologia bolii. De atunci, alte câteva boli autoimune incluzând myasthenia gravis (Naito și colab., 1984), pemphigus vulgaris (Anhalt și colab., 1982) și pemphigus foliaceus (Roscoe și colab., 1985) au fost reproduse cu succes la animale de experiență prin transferul anticorpilor patogenici de la indivizi bolnavi.

Încercările anterioare de a reproduce pemfigoidul bulos prin acest transfer "clasic" al bolii prin anticorpi de la pacienți la animalele de experiență au fost fără succes (Anhalt și Diaz, 1987; Anhalt și colab., 1981; Sams și Gleich, 1971; Gammon și colab., 2002). Acest eșec a fost explicat prin nivelul scăzut de reactivitate încrucișată între anticorpii specifici pentru colagenul de tip XVII și pielea de șoarece datorită gradului scăzut de omologie între colagenul XVII uman și murin (Liu și colab., 1993; Nishie și colab., 2007; Yamamoto și colab., 2002; Nishie și colab., 2009; Liu și colab., 2008). Un alt motiv al non-patogenicității autoanticorpilor de la pacienții cu pemfigoid bulos la șoareci poate fi reprezentat și de capacitatea lor slabă de a activa componentele sistemului imun înăscut murin în comparație cu sistemul complement și granulocitele umane (Sesarman *et. al.*, *submitted*). Astfel, în studiul de față anticorpii specifici pentru colagenul XVII murin au fost

generați în iepuri și oaie, anticorpi care pot fi transferați ulterior la șoareci. Această strategie a fost folosită pentru prima dată de către Liu și colaboratorii săi pentru a induce pemfigoidul bulos la șoareci nou-născuți (Liu și colab., 1993) și a fost folosită de atunci cu succes pentru a dezvolta modele *in vivo* pentru alte câteva boli autoimune cum sunt pemfigusul vulgar (Memar și colab., 1996), pemfigoidul cicatricial anti-epiligrină (Lazarova și colab., 1996) și epidermoliza buloasă dobândită (Sitaru și colab., 2005). Imunizarea unei oi pentru producerea de anticorpi s-a dovedit a fi o alternativă bună pentru iepure. Astfel, de la oaie am obținut volume relativ mari de ser per recoltare și serurile imune au avut un titru mai mare în imunofluorescență indirectă pe secțiuni de piele murină. De vreme ce serul provenit de la o singură oaie poate fi echivalentul celui colectat de la opt până la zece iepuri, folosirea anticorpilor generați în oaie poate fi o alternativă pentru anticorpilor de iepure.

În concordanță cu titrul lor mai mare în imunofluorescență indirectă și datorită capacității lor de a activa mai puternic sistemul complement, anticorpilor de oaie au indus boala mai repede și cu un fenotip mai sever când au fost transferați pasiv la șoareci (Chiriac *et. al.*, submitted). Aceste rezultate obținute recent în cadrul grupului nostru ar putea ușura munca de elucidare a fenomenelor care se petrec în timpul instalării bolii putând fi de folos astfel la dezvoltarea de noi strategii terapeutice.

BP180 este o proteină transmembranară a filamentelor de ancorare hemidesmosomale alcătuită din trei lanțuri  $\alpha 1$  identice cu capătul N-terminal localizat intracelular, un fragment transmembranar scurt și un domeniu extracelular la capătul COOH. Domeniul extracelular al colagenului XVII este clivat constitutiv de la suprafața celulei *in vitro* (Franzke și colab., 2009; Hirako și colab., 1998; Schaecke și colab., 1998) de către proteaze din familia ADAM astfel luând naștere o proteină extracelulară cu masa de 120KDa cunoscută sub numele de Linear IgA disease antigen (LAD)-1 (Franzke și colab., 2009). Tăierea post-traducere a proteinelor poate crea epitopi noi, adică situsuri antigenice nou apărute la nivelul fragmentelor proteice tăiate, care nu sunt întâlnite în precursorii lor nativi (Mort și Buttle, 1999). Faptul că în BP și LAD, autoanticorpilor aparținând subclaselor IgG sau IgA reacționează preferențial cu domeniul extracelular clivat al colagenului XVII (Zone *et al.*, 1998; Schuman și colab., 2000; Marinkovich și colab., 1996) sugerează că prin clivarea colagenului XVII sunt generați epitopi noi care pot fi implicați în patogeneza bolilor autoimune subepidermale. Proteazele din familia ADAM nu necesită o secvență specifică de clivare, ci ele taie substratele lor transmembranare la o distanță definită față de suprafața celulei (Franzke și colab., 2004; Zhao și colab., 2001). Astfel, este foarte

probabil ca situsul de tăiere cel mai important a colagenului XVII să fie localizat în regiunea Leu524-Gly526.

Un alt scop al studiului de față a fost studierea patogenicității unui anticorp generat împotriva unui epitop nou de la nivelul domeniului extracelular clivat al colagenului XVII (Nishie și colab., 2010) prin testarea capacității lui de a induce separarea dermului de epiderm *in vitro*. Autoanticorpii de la pacienții cu pemfigoid bulos sau epidermoliză buloasă dobândită au capacitatea de a activa complementul și leucocitele, caracteristici ce care par a fi cei mai importanți determinanți ai patogenicității lor (Sitaru și colab., 2002b; Shimanovich și colab., 2004). Astfel, am testat aceste două caracteristici patogenetice majore ale anticorpului 83457 (Ab 83457) specific pentru noul epitop identificat. Activarea complementului a fost măsurată printr-un test de microscopie de imunofluorescență, test care evaluează activarea căii clasice. Capacitatea de a activa granulocitele a fost evaluată în modelul *ex vivo* de inducere a separării dermo-epidermale dependente de granulocite în criosecțiuni de piele umană incubată cu anticorpul în prezența granulocitelor. Aceste experimente au demonstrat că, în analogie cu autoanticorpii umani în pemfigoidul bulos, anticorpul 83457 neo-epitop specific poate fixa complementul uman și induce activarea granulocitelor *ex vivo*.

În ultimele decenii, un număr important de studii s-au concentrat pe studierea rolului pe care îl au modificările post-traducere ale proteinelor în bolile autoimune. Au fost propuse câteva mecanisme prin care aceste modificări pot iniția un răspuns autoimun. Astfel, spontane sau mediate de enzime specifice, modificările post-traducere ale antigenelor pot genera complexe peptide-MHC noi care pot activa celule T care au receptori cu o afinitate mai mare. Un exemplu în acest sens îl reprezintă colagenul de tip II, autoantigen în artrita reumatoidă. Există date experimentale care demonstrează faptul că în modelul artritei reumatoide induse de colagen II, antigenul glicozilat este mult mai artritogenic decât forma neglicozilată (Michaëlsson și colab., 1994).

Domeniul extracelular al colagenului de tip XVII este fosforilat în condiții fiziologice de către enzima ecto-cazein kinaza 2, statusul fosforilării fiind implicat în reglarea procesului de clivare. (Zimina și colab., 2007). A fost demonstrat de asemenea că anticorpii circulanți din serul pacienților cu pemfigoid bulos recunosc în mod preferențial epitopii fosforilați sugerând astfel că fosforilarea post-traducere poate fi implicată în patogenza pemfigoidului bulos (Zimina și colab., 2008). În concordanță cu aceste descoperiri, în studiul de față am demonstrat că procesul de clivare al domeniului extracelular al colagenului XVII, un eveniment care are loc după traducere, generează un epitop nou care este foarte probabil implicat în patogenza bolilor subepidermale buloase autoimune cum sunt BP sau LAD.

Epidermoliza buloasă dobândită este o boală autoimună organ-specifică care afectează pielea și membranele mucoase fiind caracterizată de prezența anticorpilor față de colagenul VII (Mihai și Sitaru, 2007b). Capacitatea autoanticorpilor generați împotriva colagenului de tip VII de a induce formarea bulelor la nivelul pielii a fost demonstrată atât în modele *ex vivo* cât și în modele animale (Sitaru și colab., 2007). Autoimunitatea față de colagenul VII a fost descrisă și în boala intestinului inflammat, care poate fi asociată clinic cu epidermoliza buloasă dobândită. Este interesant faptul că deși pacienții cu boala intestinului inflammat au anticorpi circulanți specifici pentru colagenul de tip VII nu prezintă însă bule la nivelul pielii (Hundorfean și colab., 2010). În studiul de față ne-am propus de asemenea să analizăm prezența autoanticorpilor specifici pentru colagenul VII, în grupuri mai mari de donatori sănătoși, pacienți cu EBA sau alte boli autoimune.

Reactivitatea serului la nivelul joncțiunii dermo-epidermale precum și caracteristicile clinice și histologice ale EBA sunt cele mai folosite metode de diagnostic. Cu toate acestea, prin testarea serului în imunofluorescență indirectă pe piele separată artificial nu se poate exclude reactivitatea cu alte antigene ale membranei bazale cum este de exemplu proteina P200. Analiza imunoblot folosind colagenul VII nativ sau forme recombinante s-a dovedit a fi mai puțin sensibilă decât testul ELISA (Chen și colab., 1997; Saleh și colab., 2011). O posibilă explicație pentru sensibilitatea mai crescută a testului ELISA față de imunoblot are fi aceea că în imunoblot proteina este denaturată și nu poate identifica epitopii conformaționali.

Pentru detecția specifică a anticorpilor serici specifici pentru colagenul VII, au fost stabilite teste de ELISA și imunoblot (Chen și colab., 1997; Pendaries și colab., 2010; Saleh și colab., 2011).

Pentru a îmbunătăți metodele de detecție a autoanticorpilor specifici pentru colagenul VII, în studiul de față am generat o proteină recombinată care conține în principiu toți autoepitopii care au fost descriși până acum prin studii de cartare a epitopilor la pacienți.

Studiile de cartare a epitopilor precum și analiza *in silico* făcută de noi au arătat că epitopii recunoscuți de autoanticorpi sunt localizați la nivelul celor două domenii necolagenoase (NC1, NC2) și cel mai probabil și în regiunea balama a colagenului VII. Astfel, pentru a măsura anticorpii față de colagenul VII, am generat o proteină himeră care conține practic toți epitopii presupuși, incluzând cele două domenii necolagenoase precum și regiunea balama. Proteina recombinată, care a fost produsă într-o linie celulară umană pentru a permite modificări post-traducere, este mai stabilă decât proteina nativă și conține toți epitopii într-o singură copie per moleculă. În acest fel, folosirea acestei proteine ca și substrat asigură o concentrație echimolară a

regiunilor NC1, NC2 și balama.

Reactivitatea față de regiunea balama a fost identificată până acum doar la 3 copii cu epidemoliză buloasă dobândită (Tanaka și colab., 1997) și a fost prezentă aparent în lotul nostru de pacienți adulți doar la un pacient, având ca rezultat o specificitate ușor mai scăzută a testului ELISA în care s-a folosit proteina recombinată conținând doar cele două domenii necolagenoase comparativ cu cea care conține în plus și regiunea balama. Întrucât numărul pacienților cu EBA cu autoanticorpi care recunosc doar epitopi situați în afara domeniilor NC1 și NC2 este necunoscut, dar cu siguranță foarte mic, testul ELISA dezvoltat de noi folosind ca antigen forma recombinată a colagenului VII uman conținând domeniile NC1, balama și NC2, va ajuta semnificativ la detecția anticorpilor specifici la acești pacienți.

Folosind testul ELISA cu proteina recombinată hCVIINC1-hinge-NC2, am detectat autoanticorpi specifici pentru colagenul de tip VII în 4% și 18% din pacienții cu boala Crohn și respectiv colită ulcerativă. Rezultatele noastre cu privire la prezența anticorpilor față de colagenul VII la pacienții cu boala intestinului inflammat sunt în concordanță cu rezultatele studiilor anterioare care indică, în urma analizei imunoblot, prezența anticorpilor față de colagenul VII la 5.8% din pacienții cu CD și 5.8% din pacienții cu UC, spre deosebire de mai mult de 60% din pacienții cu CD cum a fost inițial raportat (Chen și colab., 2002b; Oostingh și colab., 2005). În studiul de față am detectat prezența anticorpilor față de colagenul VII într-o proporție mai mare la pacienții cu colită ulcerativă față de 5.8% și 12.9%, cât a fost raportat în studii anterioare (Oostingh și colab., 2005; Chen și colab., 2002c). Cauza acestei discrepante nu este cunoscută și studii viitoare în care să se folosească loturi mai mari de pacienți vor ajuta la definirea prevalenței anticorpilor față de colagenul VII la acești pacienți. Deși au fost propuse câteva ipoteze, inducerea răspunsului imun împotriva colagenului VII și relevanța patogenică a acestor anticorpi specifici în boala intestinului inflammat sunt încă neelucidate.

## Concluzii:

În studiul de față am reușit să arătăm că imunizarea iepurilor și a unei oi cu diferite fragmente al colagenului XVII murin a indus producerea de anticorpi policlonali cu titru mare, care s-au legat la nivelul părții epidermale a pielii de șoarece separată artificial și au fixat complementul. Recunoașterea antigenului *in situ* și activarea complementului reprezintă o condiție obligatorie pentru patogenicitatea anticorpilor.

Clivarea domeniului extracelular al colagenului XVII duce la formarea de noi epitopi la nivelul peptidelor rezultate care pot fi recunoscute ca și antigene străine de către sistemul imun adaptativ. Am demonstrat aici că anticorpii de iepure generați împotriva unui astfel de epitop nou al colagenului XVII uman a indus separare dermo-epidermală la nivelul secțiunilor de piele umană când au fost co-incubați cu granulocite, demonstrând în acest fel că procesul de clivare al domeniului extracelular al colagenului XVII poate da naștere la epitopi patogenici.

Superoxid dismutaza nu a inhibat capacitatea autoanticorpilor de a induce separare dermo-epidermală în ciuda faptului că poate transforma mai mult de 85% din cantitatea de anionul superoxid produs de granulocitele activate. În contrast, inhibarea specifică a mieloperoxidazei a blocat separarea dermului de epiderm mediată de granulocitele activate de anticorpi.

Folosind o proteină recombinată alcătuită din regiunile colagenului VII uman care conțin toți posibili epitopi, am dezvoltat un nou test pentru detecția specifică și sensibilă a anticorpilor specifici pentru colagenul VII la pacienții cu epidermoliză buloasă dobândită și boala intestinului inflamat. Acest test imunologic va fi foarte util pentru detecția sensibilă și specifică a anticorpilor specifici pentru colagenul VII în epidermoliza buloasă dobândită și în alte boli asociate cu autoimunitatea față de colagenul VII.

## Bibliografie selectivă

Chan, L.S. (1997). Human skin basement membrane in health și in autoimmune diseases. *Front. Biosci.* 2, d343-52.

Moll, R. și Moll, I. (1998). Epidermal adhesion molecules și basement membrane components as target structures of autoimmunity. *Virchows Arch.* 432, 487-504.

Hertl, M., Eming, R. și Veldman, C. (2006). T cell control in autoimmune bullous skin disorders. *J. Clin. Invest.* 116, 1159-1166.

Delva, E., Tucker, DK. și Kowalczyk, AP. (2009). The desmosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a002543.

Olasz, EB. și Yancey, KB. (2008). Bullous pemphigoid și related subepidermal autoimmune blistering diseases. *Curr. Dir. Autoimmun.* 10, 141-166.

Sitaru, C. (2007). Experimental models of epidermolysis bullosa acquisita. *Exp. Dermatol.* 16, 520-531.

Mihai, S. și Sitaru, C. (2007a). Immunopathology și molecular diagnosis of autoimmune bullous diseases. *J. Cell. Mol. Med.* 11, 462-481.

Woodley, DT. și Chen, M. (2004). Epidermolysis bullosa: then și now. *J. Am. Acad. Dermatol.* 51, S55-7.

Woodley, DT., Briggaman, RA., O'Keefe, EJ. și colab. (1984). Identification of the skin basement-membrane autoantigen in epidermolysis bullosa acquisita. *N. Engl. J. Med.* 310, 1007-1013.

Gammon, WR., Briggaman, RA., Inman, AO3. și colab. (1984). Differentiating anti-lamina lucida și anti-sublamina densa anti-BMZ antibodies by indirect immunofluorescence on 1.0 M sodium chloride-separated skin. *J. Invest. Dermatol.* 82, 139-144.

Gammon, WR., Heise, ER., Burke, WA. și colab. (1988). Increased frequency of HLA-DR2 in patients with autoantibodies to epidermolysis bullosa acquisita antigen: evidence that the expression of autoimmunity to type VII collagen is HLA class II allele associated. *J. Invest. Dermatol.* 91, 228-232.

Callot-Mellot, C., Bodemer, C., Caux, F. și colab. (1997). Epidermolysis bullosa acquisita in childhood. *Arch Dermatol* 133, 1122-1126.

Roenigk, HHJ., Ryan, JG. și Bergfeld, WF. (1971). Epidermolysis bullosa acquisita. Report of three cases și review of all published cases. *Arch Dermatol* 103, 1-10.

Remington, J., Chen, M., Burnett, J. și colab. (2008). Autoimmunity to type VII collagen: epidermolysis bullosa acquisita. *Curr. Dir. Autoimmun.* 10, 195-205.

Uitto, J., Chung-Honet, LC. și Christiano, AM. (1992). Molecular biology și pathology of type VII collagen. *Exp. Dermatol.* 1, 2-11.

Christiano, AM., Rosenbaum, LM., Chung-Honet, LC. și colab. (1992). The large non-collagenous domain (NC-1) of type VII collagen is amino-terminal și chimeric. Homology to cartilage matrix protein, the type III domains of fibronectin și the A domains of von Willebrand factor. *Hum. Mol. Genet.* 1, 475-481.

Bruckner-Tuderman, L., Nilssen, O., Zimmermann, DR. și colab. (1995). Immunohistochemical și mutation analyses demonstrate that procollagen VII is processed to collagen VII through removal of the NC-2 domain. *J. Cell Biol.* 131, 551-559.

Lapiere, JC., Woodley, DT., Parente, MG. și colab. (1993). Epitope mapping of type VII collagen. Identification of discrete peptide sequences recognized by sera from patients with acquired epidermolysis bullosa. *J. Clin. Invest.* 92, 1831-1839.

Chen, M., Keene, DR., Costa, FK. și colab. (2001a). The carboxyl terminus of type VII collagen mediates antiparallel dimer formation și constitutes a new antigenic epitope for epidermolysis



Bullosa acquisita autoantibodies. *J. Biol. Chem.* 276, 21649-21655.

Sitaru, C., Kromminga, A., Hashimoto, T. și colab. (2002a). Autoantibodies to type VII collagen mediate Fcγ-dependent neutrophil activation și induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. *Am. J. Pathol.* 161, 301-311.

Sitaru, C., Mihai, S., Otto, C. și colab. (2005). Induction of dermal-epidermal separation in mice by passive transfer of antibodies specific to type VII collagen. *J. Clin. Invest.* 115, 870-878.

Woodley, DT., Ram, R., Doostan, A. și colab. (2006). Induction of epidermolysis bullosa acquisita in mice by passive transfer of autoantibodies from patients. *J. Invest. Dermatol.* 126, 1323-1330.

Woodley, DT., Chang, C., Saadat, P. și colab. (2005). Evidence that anti-type VII collagen antibodies are pathogenic și responsible for the clinical, histological, și immunological features of epidermolysis bullosa acquisita. *J. Invest. Dermatol.* 124, 958-964.

Sitaru, C., Chiriac, MT., Mihai, S. și colab. (2006). Induction of complement-fixing autoantibodies against type VII collagen results in subepidermal blistering in mice. *J. Immunol.* 177, 3461-3468.

Sitaru, AG., Sesarman, A., Mihai, S. și colab. (2010). T cells are required for the production of blister-inducing autoantibodies in experimental epidermolysis bullosa acquisita. *J. Immunol.* 184, 1596-1603.

Chen, M., Chan, LS., Cai, X. și colab. (1997). Development of an ELISA for rapid detection of anti-type VII collagen autoantibodies in epidermolysis bullosa acquisita. *J. Invest. Dermatol.* 108, 68-72.

Pendaries, V., Gasc, G., Titeux, M. și colab. (2010). Immune reactivity to type VII collagen: implications for gene therapy of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Gene Ther.* 17, 930-937.

Saleh, MA., Ishii, K., Kim, Y. și colab. (2011). Development of NC1 și NC2 domains of type VII collagen ELISA for the diagnosis și analysis of the time course of epidermolysis bullosa acquisita patients. *J. Dermatol. Sci.* 62, 169-175.

Yancey, KB. (2005). The pathophysiology of autoimmune blistering diseases. *J. Clin. Invest.* 115, 825-828.

Stanley, JR., Hawley-Nelson, P., Yuspa, SH. și colab. (1981). Characterization of bullous pemphigoid antigen: a unique basement membrane protein of stratified squamous epithelia. *Cell* 24, 897-903.

Sawamura, D., Nomura, K., Sugita, Y. și colab. (1990). Bullous pemphigoid antigen (BPAG1): cDNA cloning și mapping of the gene to the short arm of human chromosome 6. *Genomics* 8, 722-726.

Borradori, L. și Sonnenberg, A. (1999). Structure și function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. *J. Invest. Dermatol.* 112, 411-418.

Borradori, L., Chavanas, S., Schaapveld, RQ. și colab. (1998). Role of the bullous pemphigoid antigen 180 (BP180) in the assembly of hemidesmosomes și cell adhesion--reexpression of BP180 in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa keratinocytes. *Exp. Cell Res.* 239, 463-476.

Koster, J., Geerts, D., Favre, B. și colab. (2003). Analysis of the interactions between BP180, BP230, plectin și the integrin α6β4 important for hemidesmosome assembly. *J. Cell. Sci.* 116, 387-399.

Guo, L., Degenstein, L., Dowling, J. și colab. (1995). Gene targeting of BPAG1: abnormalities in mechanical strength și cell migration in stratified epithelia și neurologic degeneration. *Cell* 81, 233-243.

Kiss, M., Husz, S., Jánossy, T. și colab. (2005). Experimental bullous pemphigoid generated in mice with an antigenic epitope of the human hemidesmosomal protein BP230. *J. Autoimmun.* 24, 1-10.

Franzke, C., Tasanen, K., Schumann, H. și colab. (2003). Collagenous transmembrane proteins:

collagen {XVII} as a prototype.. *Matrix Biol.* 22, 299-309.

Franzke, C., Bruckner-Tuderman, L. și Blobel, CP. (2009). Shedding of collagen XVII/BP180 in skin depends on both ADAM10 și ADAM9. *J. Biol. Chem.* 284, 23386-23396.

Hirako, Y., Usukura, J., Uematsu, J. și colab. (1998). Cleavage of {BP}180, a 180-k{D}a bullous pemphigoid antigen, yields a 120-k{D}a collagenous extracellular polypeptide.. *J. Biol. Chem.* 273, 9711-9717.

Schlacke, H., Schumann, H., Hammami-Hauasli, N. și colab. (1998). Two forms of collagen {XVII} in keratinocytes. {A} full-length transmembrane protein și a soluble ectodomain.. *J. Biol. Chem.* 273, 25937-25943.

Gammon, WR., Merritt, CC., Lewis, DM. și colab. (1981). Leukocyte chemotaxis to the dermal-epidermal junction of human skin mediated by pemphigoid antibody și complement: mechanism of cell attachment in the in vitro leukocyte attachment method. *J. Invest. Dermatol.* 76, 514-522.

Gammon, WR., Lewis, DM., Carlo, JR. și colab. (1980). Pemphigoid antibody mediated attachment of peripheral blood leukocytes at the dermal-epidermal junction of human skin. *J. Invest. Dermatol.* 75, 334-339.

Gammon, WR., Merritt, CC., Lewis, DM. și colab. (1982). An in vitro model of immune complex-mediated basement membrane zone separation caused by pemphigoid antibodies, leukocytes, și complement. *J. Invest. Dermatol.* 78, 285-290.

Sitaru, C., Schmidt, E., Petermann, S. și colab. (2002b). Autoantibodies to bullous pemphigoid antigen 180 induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. *J. Invest. Dermatol.* 118, 664-671.

Liu, Z., Diaz, LA., Troy, JL. și colab. (1993). A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. *J. Clin. Invest.* 92, 2480-2488.

Chen, R., Ning, G., Zhao, ML. și colab. (2001b). Mast cells play a key role in neutrophil recruitment in experimental bullous pemphigoid. *J. Clin. Invest.* 108, 1151-1158.

Chen, R., Fairley, JA., Zhao, M. și colab. (2002a). Macrophages, but not T și B lymphocytes, are critical for subepidermal blister formation in experimental bullous pemphigoid: macrophage-mediated neutrophil infiltration depends on mast cell activation. *J. Immunol.* 169, 3987-3992.

Nelson, KC., Zhao, M., Schroeder, PR. și colab. (2006). Role of different pathways of the complement cascade in experimental bullous pemphigoid. *J. Clin. Invest.* 116, 2892-2900.

Liu, Z., Shapiro, SD., Zhou, X. și colab. (2000). A critical role for neutrophil elastase in experimental bullous pemphigoid. *J. Clin. Invest.* 105, 113-123.

Liu, Z., Giudice, GJ., Swartz, SJ. și colab. (1995). The role of complement in experimental bullous pemphigoid. *J. Clin. Invest.* 95, 1539-1544.

Anhalt, GJ. și Diaz, LA. (1987). Animal models for bullous pemphigoid. *Clin. Dermatol.* 5, 117-125.

Olasz, EB., Roh, J., Yee, CL. și colab. (2007). Human bullous pemphigoid antigen 2 transgenic skin elicits specific IgG in wild-type mice. *J. Invest. Dermatol.* 127, 2807-2817.

Nishie, W., Sawamura, D., Goto, M. și colab. (2007). Humanization of autoantigen. *Nat. Med.* 13, 378-383.

Fritsch, A., Spasov, S., Elfert, S. și colab. (2009). Dominant-negative effects of COL7A1 mutations can be rescued by controlled overexpression of normal collagen VII. *J. Biol. Chem.* 284, 30248-30256.

Sitaru, C., Powell, J., Messer, G. și colab. (2004). Immunoblotting și enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of pemphigoid gestationis. *Obstet Gynecol* 103, 757-763.

HARRINGTON WJ, MINNICH V, HOLLINGSWORTH JW, MOORE CV (1951). Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. *J Lab Clin Med* 38, 1-10.

Naito K, Morioka S, Ikeda S, Ogawa H (1984). Experimental bullous pemphigoid in guinea pigs:

the role of pemphigoid antibodies, complement, și migrating cells. *J Invest Dermatol* 82, 227-230.

Anhalt, GJ., Labib, RS., Voorhees, JJ. și colab. (1982). Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. *N. Engl. J. Med.* 306, 1189-1196.

Roscoe JT, Diaz L, Sampaio SA, Castro RM, Labib RS și colab. (1985). Brazilian pemphigus foliaceus autoantibodies are pathogenic to BALB/c mice by passive transfer. *J Invest Dermatol* 85, 538-541.

Anhalt GJ, Bahn CF, Labib RS, Voorhees JJ, Sugar A și colab. (1981). Pathogenic effects of bullous pemphigoid autoantibodies on rabbit corneal epithelium. *J Clin Invest* 68, 1097-1101.

Sams WMJ, Gleich GJ (1971). Failure to transfer bullous pemphigoid with serum from patients. *Proc Soc Exp Biol Med* 136, 1027-1031.

Gammon WR, Briggaman RA (1988). Absence of specific histologic changes in guinea pig skin treated with bullous pemphigoid antibodies. *J Invest Dermatol* 90, 495-500.

Yamamoto, K., Inoue, N., Masuda, R. și colab. (2002). Cloning of hamster type XVII collagen cDNA, și pathogenesis of anti-type XVII collagen antibody și complement in hamster bullous pemphigoid. *J. Invest. Dermatol.* 118, 485-492.

Nishie, W., Sawamura, D., Natsuga, K. și colab. (2009). A novel humanized neonatal autoimmune blistering skin disease model induced by maternally transferred antibodies. *J. Immunol.* 183, 4088-4093.

Liu, Z., Sui, W., Zhao, M. și colab. (2008). Subepidermal blistering induced by human autoantibodies to BP180 requires innate immune players in a humanized bullous pemphigoid mouse model. *J. Autoimmun.* , .

Memar, OM., Rajaraman, S., Thotakura, R. și colab. (1996). Recombinant desmoglein 3 has the necessary epitopes to adsorb și induce blister-causing antibodies. *J. Invest. Dermatol.* 106, 261-268.

Lazarova, Z., Yee, C., Darling, T. și colab. (1996). Passive transfer of anti-laminin 5 antibodies induces subepidermal blisters in neonatal mice. *J. Clin. Invest.* 98, 1509-1518.

Mort JS, Buttle DJ (1999). The use of cleavage site specific antibodies to delineate protein processing și breakdown pathways. *Mol Pathol* 52, 11-18.

Zone JJ, Taylor TB, Meyer LJ, Petersen MJ (1998). The 97 kDa linear IgA bullous disease antigen is identical to a portion of the extracellular domain of the 180 kDa bullous pemphigoid antigen, BPAg2. *J Invest Dermatol* 110, 207-210.

Schumann H, Baetge J, Tasanen K, Wojnarowska F, Schäcke H și colab. (2000). The shed ectodomain of collagen XVII/BP180 is targeted by autoantibodies in different blistering skin diseases. *Am J Pathol* 156, 685-695.

Marinkovich, MP., Taylor, TB., Keene, DR. și colab. (1996). LAD-1, the linear IgA bullous dermatosis autoantigen, is a novel 120-kDa anchoring filament protein synthesized by epidermal cells. *J. Invest. Dermatol.* 106, 734-738.

Franzke, C., Tasanen, K., Borradori, L. și colab. (2004). Shedding of collagen {XVII}/ {BP}180: structural motifs influence cleavage from cell surface.. *J. Biol. Chem.* 279, 24521-24529.

Zhao L, Shey M, Farnsworth M, Dailey MO (2001). Regulation of membrane metalloproteolytic cleavage of L-selectin (CD62L) by the epidermal growth factor domain. *J Biol Chem* 276, 30631-30640.

Nishie, W., Lamer, S., Schlosser, A. și colab. (2010). Ectodomain shedding generates Neopeptides on collagen XVII, the major autoantigen for bullous pemphigoid. *J. Immunol.* 185, 4938-4947.

Shimanovich, I., Mihai, S., Oostingh, GJ. și colab. (2004). Granulocyte-derived elastase și gelatinase B are required for dermal-epidermal separation induced by autoantibodies from patients with epidermolysis bullosa acquisita și bullous pemphigoid. *J. Pathol.* 204, 519-527.

Michaëlsson E, Malmström V, Reis S, Engström A, Burkhardt H și colab. (1994). T cell

recognition of carbohydrates on type II collagen. *J Exp Med* 180, 745-749.

Zimina EP, Fritsch A, Schermer B, Bakulina AY, Bashkurov M și colab. (2007). Extracellular phosphorylation of collagen XVII by ecto-casein kinase 2 inhibits ectodomain shedding. *J Biol Chem* 282, 22737-22746.

Zimina, EP., Hofmann, SC., Fritsch, A. și colab. (2008). Bullous pemphigoid autoantibodies preferentially recognize phosphoepitopes in collagen XVII. *J. Invest. Dermatol.* 128, 2736-2739.

Mihai, S. și Sitaru, C. (2007b). Immunopathology și molecular diagnosis of autoimmune bullous diseases. *J. Cell. Mol. Med.* 11, 462-481.

Sitaru, C., Dährnich, C., Probst, C. și colab. (2007). Enzyme-linked immunosorbent assay using multimers of the 16th non-collagenous domain of the BP180 antigen for sensitive și specific detection of pemphigoid autoantibodies. *Exp. Dermatol.* 16, 770-777.

Hundorfean G, Neurath MF, Sitaru C (2010). Autoimmunity against type VII collagen in inflammatory bowel disease. *J Cell Mol Med* 14, 2393-2403.

Tanaka H, Ishida-Yamamoto A, Hashimoto T, Hiramoto K, Harada T și colab. (1997). A novel variant of acquired epidermolysis bullosa with autoantibodies against the central triple-helical domain of type VII collagen. *Lab Invest* 77, 623-632.

Chen, M., O'Toole, EA., Sanghavi, J. și colab. (2002b). The epidermolysis bullosa acquisita antigen (type VII collagen) is present in human colon și patients with Crohn's disease have autoantibodies to type VII collagen. *J. Invest. Dermatol.* 118, 1059-1064.

Oostingh, GJ., Sitaru, C., Zillikens, D. și colab. (2005). Subclass distribution of type VII collagen-specific autoantibodies in patients with inflammatory bowel disease. *J. Dermatol. Sci.* 37, 182-184.

Chen, M., O'Toole, EA., Sanghavi, J. și colab. (2002c). The epidermolysis bullosa acquisita antigen (type {VII} collagen) is present in human colon și patients with {C}rohn's disease have autoantibodies to type {VII} collagen. *J. Invest. Dermatol.* 118, 1059-64..