

L'antigene Jo-1 (istidil-tRNA sintetasi)

N. Bizzaro^a, F. Polese^b, R. Tozzoli^c

^aLaboratorio di Patologia Clinica, Ospedale di S. Donà di Piave (VE)

^bServizio di Chimica-Clinica e Microbiologia, Ospedale di Mirano (VE)

^cDipartimento di Medicina di Laboratorio, Laboratorio Analisi Chimico-cliniche e Microbiologia, Ospedale di Latisana (UD)

L'antigene Jo-1 rappresenta il bersaglio cellulare di specifici anticorpi presenti nel siero di soggetti affetti da polimiosite (PM) e/o dermatomiosite (DM); il nome deriva dalle iniziali del primo paziente in cui fu identificato l'autoanticorpo.

E' tradizionalmente considerato appartenere alla categoria degli ENA (antigeni nucleari estraibili), anche se in realtà numerosi studi hanno dimostrato che tale antigene è presente prevalentemente, se non esclusivamente, nel citoplasma.

Struttura molecolare dell'antigene Jo-1

L'antigene Jo-1 (istidil-tRNA sintetasi) fa parte delle tRNA-sintetasi, una famiglia di enzimi in grado di catalizzare la formazione del complesso aminoacil-tRNA mediante l'unione di uno specifico aminoacido con il corrispondente tRNA. L'attacco di un aminoacido al suo tRNA attiva il gruppo carbossilico rendendo possibile la formazione del legame peptidico con un gruppo amminico di un altro aminoacido.

Nel citoplasma sono presenti 20 aminoacil-tRNA sintetasi, una per ogni aminoacido, molto diverse l'una dall'altra per dimensioni e struttura¹. La struttura base di ciascuna molecola enzimatica presenta una sostanziale identità di sequenza aminoacidica tra le specie eucarioti, ed è quindi ben conservata dal punto di vista evolutivo, ma vi sono poi sequenze aggiuntive alle estremità carbossilica e amminica che conferiscono ad ognuna delle sintetasi caratteristiche di unicità proprie di ciascuna specie². L'istidil-tRNA sintetasi è un omodimero costituito da due subunità identiche di circa 50 kDa, con la funzione di catalizzare l'associazione di residui istidinici al corrispondente tRNA nel citoplasma^{3,4}. Si ritiene ormai assodato che l'enzima sia localizzato esclusivamente in sede citoplasmatica, luogo ove avviene la sintesi proteica, come dimostrano la distribuzione della fluorescenza e la positività che si osserva in immunoblot solo negli estratti citoplasmatici e non in quelli nucleari^{5,6}. La parziale loca-

lizzazione nucleare descritta in alcuni studi sarebbe perciò dovuta alla contestuale presenza di altre specificità anticorpali⁷, anche se di recente, mediante tecniche di microscopia confocale, si è visto che piccole quantità di enzima, forse con funzioni diverse, si possono in realtà ritrovare anche nel nucleo⁸.

L' epitopo maggiore è situato nella porzione aminoterminale della molecola in una regione della proteina a struttura convoluta. Poichè peptidi ottenuti da tale porzione per proteolisi non risultano più reattivi con gli anticorpi anti-Jo-1, è assai probabile che l' epitopo abbia una configurazione di tipo conformazionale⁹⁻¹¹. Tuttavia, la struttura epitopica non risulta essere particolarmente complessa dato che la reattività viene mantenuta anche dopo trattamento con SDS-PAGE nei test di immunoblot⁷ e che la maggior parte dei sieri anti-Jo-1 positivi reagisce bene con antigeni ricombinanti¹².

Gli autoanticorpi

Le prime descrizioni degli anticorpi anti-Jo-1 risalgono ai primi anni 80 in cui tali anticorpi furono identificati nel siero di pazienti affetti da polimiosite^{13,14}. Successivamente, venne identificato anche il corrispondente antigene, l'enzima istidil-tRNA sintetasi³. Fino ad oggi sono stati descritti autoanticorpi contro cinque delle venti sintetasi presenti nel citoplasma^{15,16}; di tutti questi gli anti-Jo-1 sono quelli più frequenti e più importanti clinicamente, tanto che la loro presenza costituisce uno dei criteri per la diagnosi di PM/DM¹⁷.

La patogenicità degli autoanticorpi anti-Jo-1 nella PM/DM è controversa: non si esclude che in vivo possano interferire con la sintesi proteica compromettendo la funzionalità cellulare ed essere perciò causa diretta del danno muscolare⁵. Tuttavia, essi potrebbero rappresentare anche un evento semplicemente associato alla miosite dato che anticorpi anti-Jo-1 sono stati riscontrati anche in soggetti con miosite secondaria a trattamento con penicillamina in

corso di artrite reumatoide e che caratteristicamente scompaiono dopo la sospensione del farmaco e il risolversi del quadro miositico¹⁸.

L'attività di questi anticorpi è enzima-specifica, non essendo stata dimostrata alcuna reattività crociata verso componenti antigeniche delle altre sintetasi e specie-specifica, dato che l'anticorpo umano riconosce molto bene l'antigene di origine umana e solo parzialmente quelli di altre specie eucarioti².

Frequenza, significato e associazioni cliniche

Gli anticorpi anti-Jo-1 si ritrovano quasi esclusivamente nel siero di pazienti con miosite: nel 33% dei casi di polimiosite primitiva, nel 25% dei casi di dermatomiosite primitiva e nel 15% dei casi di polimiosite associata ad altre connettivopatie (sindromi overlap)^{2,19}. Complessivamente rappresentano oltre il 60% degli anticorpi anti-sintetasi presenti nel siero di pazienti con queste patologie. La loro positività in presenza di un quadro clinico compatibile costituisce perciò un valido criterio per la diagnosi di PM/DM e, in alcuni casi, consente di evitare il ricorso alla biopsia muscolare²⁰. Come in molte altre connettiviti sistemiche, fattori di predisposizione genetica rivestono un ruolo determinante nella genesi immuno-autoanticorpale: esiste infatti una stretta correlazione tra la positività anticorpale anti-Jo-1 e la presenza di antigeni MHC di classe II HLA-DR3²¹ e DRw52²².

Di regola, gli anticorpi anti-Jo-1 sono presenti fin dall'inizio del quadro clinico e rimangono evidenziabili per tutto il decorso della malattia; a tutt'oggi non è ancora stato descritto nessun caso in cui gli anticorpi siano comparsi dopo il manifestarsi della miosite²⁰; al contrario, in molti casi la comparsa dell'anticorpo precede le manifestazioni cliniche. Anche queste osservazioni sembrano indicare che gli anticorpi anti-Jo-1 non sono secondari alla malattia ma sono in stretto rapporto con fattori etiologici e/o patogenetici.

L'importanza prognostica degli anti-Jo-1 è considerevole: la loro presenza comporta un più rapido sviluppo della malattia, un decorso più grave, un maggior numero di recidive e una più elevata mortalità²³. La presenza dell'anticorpo si associa infatti allo sviluppo di fibrosi interstiziale polmonare, la più importante complicanza della PM/DM²⁴. A differenza della miosite, il ruolo patogenetico degli anticorpi anti-Jo-1 nella genesi della malattia polmonare è invece dimostrato ed è dovuto al deposito di immunocomplessi sulle membrane alveolari²⁵; in molti casi, gli anticorpi possono essere evidenziati nel siero prima del manifestarsi della patologia polmonare^{26,27}. Per questo motivo, anche in presenza di una diagnosi consolidata di PM/DM, la ricerca degli anti-Jo-1 va comunque sempre eseguita per un corretto inquadramento clinico della malattia²⁰.

La contestuale presenza di miosite, fibrosi polmonare, artrite e/o fenomeno di Raynaud, è conosciuta come sindrome da anticorpi anti-Jo-1 o sindrome anti-sintetasi^{28,29}. L'associazione tra anticorpi anti-Jo-1 e malattia polmonare fu descritta per la prima volta in pazienti giapponesi dove fu rilevata nel 100% dei casi di PM con positività per anti-Jo-1²⁶; tali dati sono stati confermati successivamente anche su pazienti di altre aree geografiche dove la pneumopatia è stata descritta tra il 50-75% dei casi anti-Jo-1 positivi^{14,29}.

Tuttavia, se la presenza di anticorpi anti-Jo-1 è un segno caratteristico della polimiosite associata a fibrosi polmonare, la fibrosi polmonare di per sé non si associa alla presenza di tale anticorpo, come dimostrato nei pazienti con fibrosi polmonare idiopatica o associata a sclerosi sistemica o ad artrite reumatoide³⁰.

Come per gli altri anticorpi anti-nucleari, anche per gli anti-Jo-1 vi sono sporadiche segnalazioni che il titolo anticorpale segua l'andamento clinico, aumentando durante le fasi di ripresa della malattia e attenuandosi o scomparendo nei pazienti trattati e in remissione²; tuttavia il dato è controverso, per cui non viene attualmente raccomandata la periodica ripetizione del test nel monitoraggio della malattia.

Anche se appare assolutamente inusuale che un paziente, in precedenza negativo, sviluppi anticorpi anti-Jo-1, la ripetizione del test può essere indicata sia per la sua valenza prognostica, che per confermare l'accuratezza dei test precedenti.

Anche in un paziente già risultato positivo, può essere utile ripetere il test dopo la sospensione del trattamento immunosoppressivo o citostatico, visto il significato prognostico sfavorevole della permanenza dell'anticorpo²⁰.

Mentre di regola i pazienti con PM/DM sono positivi solo per uno dei diversi anticorpi anti-sintetasi, altri autoanticorpi possono essere presenti anche senza che vi sia necessariamente associata un'altra connettivite: anticorpi anti-Ro/SSA (in particolare anti-Ro52) si ritrovano fino al 60% dei casi in cui è presente anche l'anti-Jo-1^{31,32} e anticorpi anti-La/SSB sono evidenziabili in rari casi e sempre in associazione agli anti-Ro/SSA; viceversa, anticorpi anti-U1RNP sono caratteristicamente presenti nel 5-10% dei pazienti con PM in cui sono assenti gli anti-Jo-1 ma sono presenti altri anticorpi anti-sintetasi²³.

Dati ottenuti nell'ambito di un recente studio collaborativo europeo condotto su 332 soggetti con PM e/o DM³³, hanno evidenziato la contemporanea presenza nel siero di due diverse specificità autoanticorpali riconosciute dai sieri anti-Jo-1 positivi: una diretta contro l'enzima e una contro il corrispondente tRNA; mentre il titolo degli anticorpi anti-istidil sintetasi non si modificava nel tempo in rapporto alla evoluzione della malattia e alla terapia, gli anti-tRNA erano presenti solo nelle fasi iniziali di malattia e scomparivano durante il trattamento (WJ van

Venrooij, comunicazione personale). E' dunque possibile che molte delle discrepanze evidenziate in letteratura relativamente alle fluttuazioni del titolo degli anticorpi anti-Jo-1 siano ascrivibili alla diversa presenza e concentrazione, in uno stesso siero, di anticorpi diretti contro il tRNA o contro l'enzima istidil sintetasi.

Metodi di ricerca

Gli anticorpi anti-Jo-1 nel test ANA in immunofluorescenza indiretta (IFI) su cellule HEp-2, producono un pattern citoplasmatico di tipo granulare, a fini granulazioni disposte soprattutto attorno al nucleo e più rade verso la periferia cellulare. Tuttavia, a causa della esigua concentrazione delle sintetasi cellulari, la presenza di anti-Jo-1 si manifesta per lo più con quadri fluoroscopici sfumati e a basso titolo, raramente superiori a 1:40³⁰, non sempre perciò facilmente individuabili. Ne consegue che in tutti i casi in cui vi sia il sospetto di miosite, anche con un test ANA negativo in IFI, è necessario comunque procedere con un esame di secondo livello per anti-ENA. Il metodo migliore per sensibilità e specificità attualmente disponibile è l'immunoprecipitazione del tRNA dopo separazione cromatografica su proteina A di estratti ottenuti da cellule umane in coltura⁷ che però è riservato alla ricerca e non è disponibile nei Laboratori clinici. I metodi comunemente impiegati in laboratorio per la ricerca della specificità anti-Jo-1 sono la controimmunolettroforesi (CIE) che utilizza in genere estratti di timo di coniglio o di vitello, e l'ELISA, l'immunodot e l'immunoblot che impiegano invece antigeni purificati, estrattivi o ricombinanti. I metodi ELISA sono quelli dotati di maggior sensibilità^{34,35}, sia che si utilizzino antigeni naturali^{19,36} o ricombinanti¹², mentre la specificità è largamente dipendente dalla purezza dei preparati antigenici⁷.

Recenti verifiche esterne di qualità hanno comunque evidenziato una sostanziale difficoltà nell'identificazione di anticorpi anti-Jo-1, con significative differenze tra i diversi metodi e, nell'ambito di uno stesso metodo, anche tra i diversi reagenti. Le esperienze condotte dall'European Consensus Workshop nel 1991 e dal gruppo di Studio in Autoimmunologia della SIMeL nel 1997, hanno riscontrato una sensibilità media dei diversi metodi pari al 67-70%^{37,38}. Per la ricerca degli anti-Jo-1 è quindi sempre consigliabile l'utilizzo di almeno due metodi anti-ENA diversi^{37,39}.

Bibliografia

1. Stryer L. Biochimica. Bologna: Zanichelli. p 838-40.
2. Miller FW, Twitty SA, Biswas T, Plotz PH. Origin and regulation of a disease-specific autoantibody response. Antigenic epitopes, spectrotypic stability, and isotype restriction of anti-Jo-1 autoantibodies. J Clin Investigation 1990; 85:468-75.
3. Mathews MB, Bernstein RM. Myositis autoantibody inhibits histidyl-tRNA synthetase: a model for autoimmunity. Nature 1983; 304:177-9.
4. Rosa MD, Hendrick JP, Lerner MR, Steitz JA, Reichlin M. A mammalian t-RNA his-containing antigen is recognized by the polymyositis specific antibody anti-Jo-1. Nucleic Acids Res 1983; 11:853-70.
5. Shi MH, Tsui FWL, Rubin LA. Cellular localization of the target structures recognized by the anti Jo-1 antibody: immunofluorescence studies on cultured human myoblasts. J Rheum 1991; 18:252-8.
6. Dang CV, LaDuca FM, Bell WR. Histidyl-tRNA synthetase, the myositis Jo-1 antigen, is cytoplasmic and unassociated with the cytoskeletal framework. Exp Cell Res 1986; 164:261-6.
7. Plotz P, Targoff I. Myositis-associated antigens. Aminoacyl-tRNA synthetases Jo-1, PL-7, PL-12, EJ, and OJ. In: WJ van Venrooij and RN Maini, eds. Manual of biological markers of disease. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1994. B6.1:1-18.
8. Vázquez-Abad D, Carson JH, Rothfield N. Localization of histidyl-tRNA synthetase (Jo-1) in human laryngeal epithelial carcinoma cell line (HEp-2 cells). Cell Tissue Res 1996; 286:487-91.
9. Miller FW, Waite KA, Biswas T, Plotz PH. The role of an autoantigen, histidyl-tRNA synthetase, in the induction and maintenance of autoimmunity. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87:9933-7.
10. Waite KA, Miller FW, Plotz PH. Anti-Jo-1 antibodies are directed at an evolutionary-conserved conformational site on human histidyl-tRNA synthetase. Sitzungsberichte Heidelberger Akad Wissenschaften Mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse 1989; 4:100-1.
11. Cook L. New method for detection of anti-nuclear antibodies. Clin Immunol Immunopathol 1998; 88:211-20.
12. Raben N, Nichols R, Dohlman J, McPhie P, Sridhar V, Hyde C, et al. A motif in human histidyl-tRNA synthetase which is shared among several aminoacyl-tRNA synthetases is a coiled-coil that is essential for enzymatic activity and contains the major autoantigen epitope. J Biol Chem 1994; 269:24277-83.
13. Nishikai M, Reichlin M. Heterogeneity of precipitating antibodies in polymyositis and dermatomyositis. Arthritis Rheum 1980; 23:881-8.
14. Bernstein RM, Morgan SH, Chapman J, Bunn CC, Mathews MB, Turner-Warwick M, et al. Anti-Jo-1 antibody: a marker for myositis with interstitial lung disease. Br Med J 1984; 289:151-2.
15. Reichlin M, Arnett FC. Multiplicity of antibodies in myositis sera. Arthritis Rheum 1984; 27:1150-6.
16. Targoff IN. Autoantibodies in polymyositis. Rheum Dis Clin N Am 1992; 18:455-82.
17. Tanimoto K, Nakano K, Kano S. Classification criteria for polymyositis and dermatomyositis. J Rheumatol 1995; 22:668-74.
18. Jenkins EA, Hull RG, Thomas AL. D-penicillamine and polymyositis: the significance of the anti-Jo-1 antibody. Br J Rheumatol 1993; 32:1109-10.
19. Biswas T, Miller FW, Takagaki Y, Plotz PH. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection and quantitation of anti-Jo-1 antibody in human serum. J Immunol Methods 1987; 98:243-8.

20. Targoff IN, Plotz PH. The autoantibody system: anti-aminoacyl-tRNA synthetase antibodies. In: WJ van Venrooij and RN Maini, eds. *Manual of biological markers of disease*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1996. C6.1:1-12.
21. Arnett FC, Hirsch TJ, Bias WB, Nishikai M, Reichlin M. The Jo-1 antibody system in myositis: relationships to clinical features and HLA. *J Rheum* 1981; 8:925-30.
22. Goldstein R, Duvic M, Targoff IN, Reichlin M, McMenemy AM, Reveille JD, et al. HLA-D region genes associated with autoantibody responses to histidyl-transfer RNA synthetase (Jo-1) and other translation-related factors in myositis. *Arthritis Rheum* 1990; 33:1240-8.
23. Love LA, Leff RL, Fraser DD, Targoff IN, Dalakas M, Plotz PH, et al. A new approach to the classification of idiopathic inflammatory myopathy: myositis-specific autoantibodies define useful homogeneous patient groups. *Medicine* 1991; 70:360-74.
24. Brundin A. Pulmonary fibrosis in scleroderma and dermatomyositis. *Scand J Resp Dis* 1970; 51:160-70.
25. Lambie PB, Quismorio FP. Interstitial lung disease and cryoglobulinemia in polymyositis. *J Rheumatol* 1991; 18:468-9.
26. Yoshida S, Azikuki M, Mimori T, Yamagata H, Inada S, Homma M. The precipitating antibody to an acidic nuclear protein antigen, the Jo-1, in connective tissue diseases. A marker for a subset of polymyositis with interstitial pulmonary fibrosis. *Arthritis Rheum* 1983; 26:604-11.
27. Friedman AW, Targoff IN, Arnett FC. Interstitial lung disease with autoantibodies against aminoacyl-tRNA synthetases in the absence of clinically apparent myositis. *Semin Arthr Rheum* 1996; 26:459-67.
28. Marguerie C, Bunn CC, Beynon HLC, Bernstein RM, Hughes JM, So AK, et al. Polymyositis, pulmonary fibrosis and autoantibodies to aminoacyl-tRNA synthetase enzymes. *Q J Med* 1990; 77:1019-38.
29. Ray DW, Bridger J, Hawnaur J, Waldek S, Bernstein RM, Dornan TL. Transverse myelitis as the presentation of Jo-1 antibody syndrome (myositis and fibrosing alveolitis) in long-standing ulcerative colitis. *Br J Rheumatol* 1993; 32:1105-8.
30. Saito E, Yoshimoto Y, Oshima H, Yoshida H, Kinoshita M. Fluorescent antibodies in polymyositis using cultured human skin fibroblasts: Granular perinuclear cytoplasmic staining pattern by sera from patients with polymyositis and pulmonary fibrosis. *J Rheumatol* 1989; 16:47-54.
31. Rutjes SA, Vree Egberts WTM, Jongen P, van den Hoogen F, Pruijn GJM, van Venrooij WJ. Anti-Ro52 antibodies frequently co-occur with anti-Jo-1 antibodies in sera from patients with idiopathic inflammatory myopathy. *Clin Exp Immunol* 1997; 109:32-40.
32. Venables PJW. Antibodies to Jo-1 and Ro-52: why they go together? *Clin Exp Immunol* 1997; 109:403-5.
33. Hengstman GJ, van Venrooij WJ, Vencovsky J, Moutsopoulos HM, van Engelen BG. The relative prevalence of dermatomyositis and polymyositis in Europe exhibits a latitudinal gradient. *Ann Rheum Dis* 2000; 59:141-2.
34. Maddison PJ. Aminoacyl-tRNA histidyl (Jo-1) synthetase autoantibodies. In: Peter JB, Shoenfeld Y, eds. *Autoantibodies*. Amsterdam: Elsevier Science BV; 1996. p. 31-5.
35. Tan EM, Smolen JS, McDougal JS, Butcher BT, Conn D, Dawkins R, et al. A critical evaluation of enzyme immunoassay for detection of antinuclear autoantibodies of defined specificities. I. Precision, Sensitivity, and Specificity. *Arthritis Rheum* 1999; 42:455-64.
36. Targoff IN, Reichlin M. Measurement of antibody to Jo-1 by ELISA and comparison to enzyme inhibitory activity. *J Immunol* 1987; 138:2874-82.
37. van Venrooij WJ, Charles P, Maini RN. The consensus workshop for the detection of autoantibodies to intracellular antigens in rheumatic diseases. *J Immunol Methods* 1991; 140:181-9.
38. Bizzaro N, Tozzoli R, Tonutti E, Villalta D, Manoni F, Bassetti D, et al. Variabilità analitica nella determinazione degli autoanticorpi anti-ENA. Risultati preliminari di un'esperienza di VEQ. *Med Lab* 1998; 6:161-5.
39. Tozzoli R, Bizzaro N, Bassetti D, Manoni F, Piazza A, Pradella M, et al. Linee guida per la diagnosi e il monitoraggio delle malattie reumatiche autoimmuni. *Med Lab* 1999; 7:124-32.