

# Znaczenie przeciwciał antycentromerowych w diagnostyce chorób reumatycznych i nowotworowych

*The role of anticentromere antibodies in diagnosis of rheumatic and cancer diseases*

Joanna Pyka, Iwona Horbacz, Elwira Biernacka, Jakub Ząbek

Zakład Mikrobiologii i Serologii Instytutu Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher w Warszawie

**Słowa kluczowe:** przeciwciała przeciw centromerom, białka centromerowe, cykl podziału komórki.

**Key words:** anti-centromere antibodies, centromere proteins, cell division cycle.

## Streszczenie

Przeciwciała przeciwko białkom centromerowym (*centromere protein* – CENP) zostały po raz pierwszy opisane w 1980 r. u pacjentów z ograniczoną postacią twardziny układowej. Od tamtego czasu zidentyfikowano liczne białka centromerowe będące celem odpowiedzi immunologicznej w wielu chorobach reumatycznych i nowotworach (tab. I, ryc. 1). Główną techniką służącą do wykrywania tych przeciwciał jest immunofluorescencja pośrednia na komórkach HEp-2 (*human epithelial cells*). Przeciwciała przeciw CENP-A, CENP-B, CENP-C są względnie specyficznym markerem dla ograniczonej formy twardziny układowej (zespół CREST). W pracy zwrócono uwagę na aktualne doniesienia dotyczące przeciwciał przeciwko poszczególnym białkom centromerowym i ich asocjacji klinicznych: przeciwciał przeciw CENP-A i wczesnej postaci twardziny układowej, anti-CENP-D klasy IgM i toczenia rumieniowatego układowego z zespołem Sjögrena, anti-CENP-H (u pacjentów SSA/SSB-ujemnych) oraz anti-CENP-C i zespołu Sjögrena. Zupełnie inne znaczenie kliniczne mają przeciwciała przeciwko CENP-F, występujące głównie u osób z różnymi nowotworami.

## Wstęp

Rodzina białek centromerowych (*centromere protein* – CENP) obejmuje dosyć liczną grupę białek stale obecnych w komórce (tzw. białka konstytutywne): CENP-A, CENP-B, CENP-C, CENP-D, CENP-G i CENP-H oraz grupę białek przejściowych, ujawniających się w określonym stadium cyklu podziałowego komórki: CENP-E oraz CENP-F. Wykazują one wysoką niezmienność struktury pierwszorzędowej

## Summary

Autoantibodies to centromere proteins (CENPs) were first described in 1980 in limited cutaneous SSc (lcSSc) patients. Since that time a number of CENPs have been identified as autoantibody targets in many rheumatic and cancer diseases (Table I, Fig. 1). The general method for detection of anti-centromere antibodies (ACA) is indirect immunofluorescence using HEp-2 cell slides. Autoantibodies CENP-A, -B, -C are relatively specific biomarkers for lcSSc (CREST syndrome). This review focuses on updating information on CENP antibodies against particular autoantigens and their new clinical associations: anti-CENP-A with early Ssc, anti-CENP-D IgM with SLE + Sjögren syndrome, anti-CENP-H (in SSA/SSB negative patients) and anti-CENP-C with Sjögren syndrome. Anti-CENP-F antibodies have totally different clinical significance and occur mainly in cancer diseases.

białka. Ich funkcja polega na uczestniczeniu w podziale komórki, tzn. tworzeniu regionu centromerowego/kinetochoru, przemieszczaniu się chromosomów do biegunów wrzeciona kariokinetycznego i kontroli procesu podziału komórki [1]. Białka te są celem odpowiedzi immunologicznej w chorobach reumatycznych i nowotworowych.

Przeciwciała reagujące z regionem centromerowym zostały po raz pierwszy opisane w 1980 r. u pacjentów z ograniczoną postacią sklerodermy i zlokalizowane

---

### Adres do korespondencji:

mgr Joanna Pyka, Zakład Mikrobiologii i Serologii, Instytut Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher, ul. Spartańska 1, 02-637 Warszawa, tel. +48 22 844 30 67, e-mail: jnn.pyka@gmail.com

Praca wpłynęła: 22.11.2011 r.

w miejscu przewężenia chromosomów metafazalnych [2–4]. Od tamtego czasu zidentyfikowano liczne białka centromerowe będące autoantygenami, a także uzyskano na drodze inżynierii genetycznej białka rekombinantowe, takie jak białko B i białko A, służące do konstruowania testów immunoenzymatycznych, głównie typu ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) [5, 6]. Badania metodą immunoblottingu dowiodły, że przeciwciała przeciwcentromerowe (*anti-centromere antibodies* – ACA) są skierowane przede wszystkim przeciwko białkom A, B, C [7].

## Metody wykrywania

Główną metodą służącą do wykrywania przeciwciał przeciwcentromerowych jest immunofluorescencja pośrednia (*indirect immunofluorescence* – IIF) na skrawkach tkankowych i liniach komórkowych [8]. Obecnie najlepszym substratem są komórki HEP-2, wykazujące duży odsetek komórek w stadium metafazy, tym samym ułatwiając wykrywanie przeciwciał związanych z podziałem komórki. Badania dowiodły, że jedynie przeciwciała przeciwko centromerowemu białku B (CENP-B) dają typowy obraz fluorescencji na komórkach HEP-2 w postaci licznych, świecących, drobnych punktów na terenie całego jądra komórek interfazalnych, a w metafazie dające charakterystyczne pasmo w płaszczyźnie równikowej wrzeciona podziałowego (ryc. 1a) [1, 8, 9]. Wynik badania z takim typem świecenia nie wymaga potwierdzenia testami immunoenzymatycznymi, takimi jak test immunoblot, ELIA (*enzyme-linked immunofluoro assay*) czy ELISA.

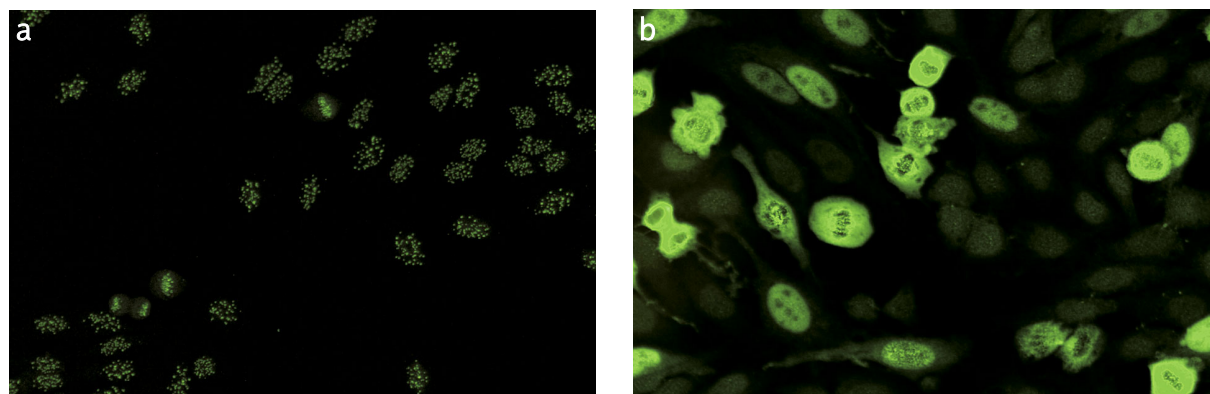
Odmienne typy świecenia dają przeciwciała dla białka F, zwane także przeciwciałami przeciw mitozynie, cyklinie II MSA-3 (*mitotic spindle antigen 3*) lub Nsp-II (*nuclear speckled II*) (ryc. 1b) [10, 11].

Komórki w stadium metafazy dają najbardziej charakterystyczny obraz świecenia w postaci dwóch rzędów drobnych ziarnistości otaczających materiał chromosomalny w obrębie płytki metafazalnej, układających się w strukturę przypominającą zamek błyskawiczny. Obszar wokół chromosomów daje również obraz świecenia drobnopłamistego. Dodatkowo można zaobserwować świecenie w postaci gęstych ziarnistości w obrębie kinetochoru nowo uformowanych chromosomów w stadium profazy, a w telofazie świecenie w obrębie pierścienia kurczliwego [1, 10, 11]. Przeciwciała te mogą być również wykrywane metodą immunoblottingu, ALBIA (*addressable laser bead assay*) oraz RIA (*radioimmunoassay*).

Obecnie nie ma niestety na rynku testów diagnostycznych, np. typu ELISA czy Western-blot, umożliwiających różnicowanie przeciwciał przeciwko różnym białkom centromerowym.

## Znaczenie kliniczne

Przeciwciała przeciw centromerom uznano za marker twardziny układowej, głównie jej ograniczonej postaci (zespołu CREST), w przypadku której częstość ich występowania waha się w granicach 20–40% [3, 4, 12, 13]. Pomimo swojej względnie wysokiej specyficzności (ok. 90%), przeciwciała te są również spotykane z mniejszą częstością w: zespole Sjögrena, pierwotnej żółciowej marskości wątroby, toczeniu rumieniowatym układowym (TRU), reumatoidalnym zapaleniu stawów, zespole Raynauda i innych chorobach reumatycznych [1, 3, 8, 9]. Szczególne zainteresowanie budzi fakt, że obecność przeciwciał przeciwko centromerom u pacjentów z TRU może być związana z zajęciem stawów (artropatia Jaccouda) ( $p = 0,0006$ ) i zespołem antyfosfolipidowym ( $p = 0,0157$ ) [3]. Obecność tych



**Ryc. 1.** Obraz świecenia przeciwciał przeciwko centromerom widziany w immunofluorescencji pośredniej na komórkach HEP-2 (pow. 400 ×): a) typ charakterystyczny dla centromerowego białka B (CENP-B); b) przeciwciała przeciw NspII (centromerowemu białku F).

**Fig. 1.** Indirect immunofluorescence anti-centromere pattern on HEP-2 cells (magnification 400 ×): a) typical centromere protein B IIF staining pattern; b) antibodies to NspII (centromere F protein).

przeciwciał w zespole Raynauda jest czynnikiem ryzyka późniejszego rozwinięcia układowej choroby tkanki łącznej [8, 13].

Miano przeciwciał przeciwcentromerowych, lub ich poziom mierzony zwykle metodami immunoenzymatycznymi, pozostaje względnie stałe w czasie trwania choroby [8]. Zaobserwowano różnice w spektrum objawów klinicznych między grupami pacjentów z pierwotnym zespołem Sjögrena ACA(+) i ACA(-). Wszyscy chorzy ACA(+) byli jednocześnie SSA/SSB(-), natomiast wśród chorych ACA(-) 77,1% chorych było SSA/SSB(+). W badaniu histopatologicznym małych gruczołów ślinowych wargi zaobserwowano słabsze nacieki komórkowe i większą ilość tkanki włóknistej w grupie ACA(+) niż w przypadku grupy ACA(-). Różnice te mogą wyjaśniać dużą częstość występowania objawów klinicznych charakterystycznych dla zespołu Raynauda w grupie pacjentów, u których wykryto przeciwciała przeciwcentromerowe. Zespół Raynauda występował u 61% pacjentów ACA(+) i tylko u 8,3% pacjentów ACA(-) [14].

Z ostatnich badań wynika, że częstość występowania przeciwciał przeciwko poszczególnym białkom centromerowym różni się w zależności od jednostki chorobowej (tab. I) [5, 6, 15–20]. Głównymi autoantygenami są białka: A, B, C, znacznie rzadziej białka: D, E, H. Badania przeprowadzone w grupie pacjentów z twardziną układową wykazały, że tworzenie przeciwciał przeciwko centromerowemu białku A może być indukowane przez epitopy homologiczne do histonu H3, a ich obecność może wyprzedzać pojawienie się przeciwciał przeciwko centromerowemu białku B. Mogą one zatem stanowić użytecz-

ne narzędzie do wczesnego wykrywania twardziny [1, 16, 17, 21]. U tych chorych czułość testów ELISA do oznaczenia przeciwciał reagujących z peptydem A i białkiem B jest prawie taka sama (36,6% i 37,4%), jednak nieco wyższą swoistość (97%) wykazują testy dla peptydu A w porównaniu z białkiem B (94,8%) [1, 5]. U pacjentów z zespołem Sjögrena stwierdza się obecność przeciwciał reagujących z centromerowym białkiem C (70%), inaczej niż w twardzinie układowej, gdzie występują one tylko u 6% chorych ( $p = 0,003$ ) [22]. Pojawienie się przeciwciał przeciw centromerowemu białku D wyłącznie w klasie IgM jest charakterystyczne dla nakładania się TRU i zespołu Sjögrena. Okresowa synteza tych przeciwciał może wyjaśniać ich rzadkie wykrywanie w badanych grupach chorych [16]. Opisano również przeciwciała przeciw białku H, występujące w zespole Sjögrena, które są wykrywane u ok. 27% chorych. Obecność tych przeciwciał koreluje z brakiem przeciwciał anty-SSA oraz anty-SSB i niższą częstością występowania czynnika reumatoidalnego u chorych z zespołem Sjögrena [15].

Odmienną grupę przeciwciał stanowią przeciwciała przeciw centromerowemu białku F, które występują u pacjentów z nowotworami. Gen kodujący centromerowe białko F znajduje się na chromosomie 1 (1q32-41) w obrębie regionu, którego nieprawidłowości strukturalne prowadzą do rozwoju różnego typu nowotworów (rak płuca, rak sutka), a także zespołu van der Woude [23]. Badania przeprowadzone w grupie pacjentów z obecnością przeciwciał przeciwko mitozynie wykazały, że aż 61% chorych miało nowotwór: raka sutka (40% przypadków) lub raka płuca (21%). Opisano również pojedyncze

**Tabela I.** Charakterystyka przeciwciał reagujących z poszczególnymi białkami centromerowymi  
*Table I. Characteristics of particular antibodies to centromeres*

Przeciwciało dla antygeny	Masa cząsteczkowa antygeny (kDA)	Asocjacje kliniczne	Dodatkowe informacje	Dane źródłowe
CENP-A	17	lcSSc, CREST	sekwencja antygeny homologiczna do histonu H3	[5, 6]
CENP-B	80	lcSSc, CREST	główny antygen do oznaczania przeciwciał centromerowych	[5, 6]
CENP-C	140	lcSSc, CREST, SS	antygen jest homodimerem	[5, 6]
CENP-D	50	lcSSc, CREST	przeciwciała klasy IgM	[16]
CENP-E	312	lcSSc, CREST	w 43% przeciwciała obecne w surowicach ACA(+)	[17]
CENP-F	330	nowotwory	wykrywanie metodą IIF, ALBIA	[18, 19]
CENP-H	28	SS	występowanie przy braku markerów SSA, SSB	[15]
CENP-O	33	lcSSc	rzadko spotykane (> 4%) w surowicach ACA(+)	[20]

*lcSSc (limited cutaneous systemic sclerosis) – twardzina układowa ograniczona; CREST (calcinosis) – ogniskowe zwapnienia tkanek miękkich; R (Raynaud syndrome) – zespół Raynauda; E (esophageal dysmotility) – zaburzenia motoryki przełyku; S (sclerodactylia) – stwardnienie opuszek palców; T (teleangiectasia) – poszerzenie drobnych naczyń krwionośnych; SS (Sjögren syndrome) – zespół Sjögrena*

przypadki obecności tych przeciwciał u pacjentów z nowotworem w obrębie głowy i szyi, żołądka, jajników, wątroby oraz u chorych z makroglobulinemią Waldenströma IgM [24]. Obecność przeciwciał przeciwko mitozynie stwierdzono również u ok. 8% osób z chłoniakiem nieziarniczym [25]. Badania nad znaczeniem klinicznym przeciwciał przeciw centromerowemu białku F dają niejednoznaczne wyniki, ponieważ w grupie pacjentów ze zdiagnozowaną chorobą nowotworową przeciwciała te są spotykane stosunkowo rzadko (< 10%), natomiast w grupie pacjentów seropozytywnych dla białka F odsetek rozpoznań choroby nowotworowej jest wysoki (> 50%). Zgromadzone dotąd dane literaturowe na temat znaczenia klinicznego przeciwciał przeciw białku F wskazują, iż ich obecność jest najprawdopodobniej związana z szybką proliferacją komórkową, wysoką ekspresją centromerowego białka F oraz obecnością guza nowotworowego. Fenomen ten znajduje potwierdzenie w przypadku nowotworów, takich jak: rak płuc, rak piersi, rak jamy nosowo-gardłowej, oponiak mózgu [26].

### Predyspozycje genetyczne

Nie stwierdza się obecności przeciwciał przeciwko centromerom u krewnych pierwszego stopnia. Nie ma również bezpośrednich dowodów na udział tych przeciwciał w patogenezie chorób z autoimmunizacją. Obserwuje się jednak wzrost chromosomalnych nieprawidłowości, aneuploidii i mikrojąder w limfocytach pacjentów z ograniczoną postacią twardziny, u których występują te przeciwciała. Liczne badania wskazują na związek między występowaniem przeciwciał przeciwko centromerom i alleli MHC klasy II HLA-DRB1\*01, DRB1\*04, DBQB1\*05 [9]. W przeprowadzonych badaniach stwierdzono różnice etniczne i rasowe, ze zwiększoną predyspozycją do ich występowania u rasy białej i prawie 10-krotnie mniejszą częstością ich występowania u Afroamerykanów. Przeciwnie zjawisko dotyczy przeciwciał przeciw topoizomerazie I (Scl-70), które występują częściej u przedstawicieli rasy czarnej w porównaniu z rasą białą [27–29].

Wraz z odkryciem białek centromerowych (potencjalnych autoantygenów) dostępne stały się dodatkowe testy diagnostyczne mające zastosowanie zarówno w medycynie, jak i w biologii komórki. Zastosowanie ludzkich autoprzeciwciał przeciwko centromerom umożliwiło poznanie budowy i funkcji komórkowej tych białek. Dalsze badania nad znaczeniem klinicznym przeciwciał reagujących z poszczególnymi białkami centromerowymi mogą się stać pomocne w precyzyjnej diagnostyce różnicowej układowych chorób tkanki łącznej i chorób nowotworowych.

\*\*\*

Praca częściowo sfinansowana z grantu PBZ-KBN-119/PO/05/2005.

### Piśmiennictwo

1. Fritzler MJ, Rattner JB, Luft LM, et al. Historical perspectives on the discovery and elucidation of autoantibodies to centromere proteins (CENP) and the emerging importance of antibodies to CENP-F. *Autoimmun Rev* 2011; 10: 194-200.
2. Fritzler MJ, Kinsella TD. The CREST syndrome: a distinct serologic entity with anticentromere antibodies. *Am J Med* 1980; 69: 520-526.
3. Moroi Y, Peebles CL, Fritzler MJ, et al. Autoantibody to centromere (kinetochore) in scleroderma sera. *Proc Natl Acad U S A* 1980; 77: 1627-1631.
4. Tan EM, Rodnan GP, Garcia I, et al. Diversity of antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis. Anti-centromere antibody and its relationship to CREST syndrome. *Arthritis Rheum* 1980; 23: 617-625.
5. Mahler M, Fritzler MJ. Epitope specificity and significance in systemic autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1183: 267-287.
6. Earnshaw WC, Machlin PS, Bordwell BJ, et al. Analysis of anti-centromere autoantibodies using cloned autoantigen CENP-B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 4979-4983.
7. Earnshaw W, Bordwell B, Marino C, et al. Three human chromosomal autoantigens are recognized by sera from patients with anti-centromere antibodies. *J Clin Invest* 1986; 77: 426-430.
8. McHugh NJ. Centromere autoantibodies. In: *Autoantibodies*. Shoenfeld Y, Gershwin ME, Meroni PL (eds.). Elsevier Science, Amsterdam 2007; 20: 151-157.
9. Mahler M, Maes L, Blockmans D, et al. Clinical and serological evaluation of novel CENP-A peptide based ELISA. *Arthritis Res Ther* 2010; 12: R99.
10. Blüthner M, Charles PJ, Hamann D, et al. European Consensus Finding Study (EFCs). Autoantibodies in Rheumatic Diseases. The Hep-2 cell glossary 2010/2011.
11. Casiano CA. Autoantibodies to the Proliferation-Associated Nuclear Protein CENP-F in Cancer. In: *Cancer and Autoimmunity*. Shoenfeld Y, Gershwin ME. Elsevier Science, Amsterdam 2000; 175-180.
12. Nakamura RM, Peebles CL, Molden CP, et al. Advances in laboratory tests for autoantibodies to nuclear antigens in systemic rheumatic diseases. *Lab Med* 1984; 15: 190-198.
13. Jacobsen S, Halberg P, Ullman S, et al. Clinical features and serum antinuclear antibodies in 230 Danish patients with systemic sclerosis. *Br J Rheumatol* 1998; 37: 39-45.
14. Nakamura H, Kawakami A, Hayashi T, et al. Anti-centromere antibody-seropositive Sjögren's syndrome differs from conventional subgroup in clinical and pathological study. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2010; 11: 140.
15. Hsu TC, Chang CH, Lin MC, et al. Anti-CENP-H antibodies in patients with Sjögren's syndrome. *Rheumatol Int* 2006; 26: 298-303.
16. Ford AL, Kurien BT, Harley JB, et al. Anti-centromere autoantibody in a patient evolving from a lupus/Sjögren's overlap to the CREST variant of scleroderma. *J Rheumatol* 1998; 25: 1419-1424.
17. Rattner JB, Rees J, Arnett FC, et al. The centromere kinesin-like protein, CENP-E an autoantigen in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1355-1361.
18. Casiano CA, Humbel RL, Peebles C, et al. Autoimmunity to the cell cycle-dependent centromere protein p330d/CENP-F in disorders associated with cell proliferation. *J Autoimmun* 1995; 85: 75-86.

19. Rattner RB, Rees J, Whitehead CM, et al. High frequency of neoplasia in patients with autoantibodies to centromere protein CENP-F. *Clin Invest Med* 1997; 20: 308-319.
20. Saito A, Muro Y, Sugiura K, et al. CENP-O, a protein localized at the centromere throughout the cell cycle, is a novel target antigen in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2009; 36: 781-786.
21. Mahler M, Mierau R, Genth E, et al. Development of a CENP-A/CENP-B – specific immune response in a patient with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 1866-1872.
22. Gelber AC, Pillemer SR, Baum BJ, et al. Distinct recognition of antibodies to centromere proteins in primary Sjögren's syndrome compared with limited scleroderma. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 1028-1032.
23. Von Mühlen CA, Tan EM. Autoantibodies in diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 1995; 24: 323-358.
24. Darnell RB. Onconeural antigens and the paraneoplastic neurologic disorders: in the intersection of cancer, immunity and the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 4529-4536.
25. Akbarali Y, Matousek-Ronck J, Hunt L, et al. Fine specificity mapping of autoantigens targeted by anti-centromere autoantibodies. *J Autoimmun* 2006; 27: 272-280.
26. Cao JY, Liu L, Chen SP, et al. Prognostic significance and therapeutic implications of centromere protein F expression in human nasopharyngeal carcinoma. *Mol Cancer* 2010; 9: 237.
27. Reveille JD, Durban E, Goldstein R, et al. Racial differences in the frequencies of scleroderma-related autoantibodies. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 216-218.
28. Picillo U, Migliaresi S, Vatti M, et al. Demographic differences in the frequencies of scleroderma-related autoantibodies. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 1332-1333.
29. Reveille JD, Arnett FC. Frequencies of scleroderma-related autoantibodies in patients meeting the American College of Rheumatology criteria for systemic sclerosis: replay. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 1333-1334.