

Od apoptozy do autoimmunizacji – nowe spojrzenie na patogenezę toczenia rumieniowatego układowego

From apoptosis to autoimmunization – a new view into the pathogenesis of systemic lupus erythematosus

Dorota Cieślak, Paweł Hrycaj

Zakład Reumatologii i Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, kierownik Zakładu dr hab. med. Paweł Hrycaj

Słowa kluczowe: patogenezę, apoptozę, toczeń, autoimmunizacja, usuwanie.

Key words: pathogenesis, apoptosis, lupus, autoimmunity, clearance.

Streszczenie

Apoptozę odgrywa fundamentalną rolę w utrzymaniu homeostazy układu immunologicznego. Liczne badania przeprowadzone w warunkach *in vitro* i *in vivo* wykazały, że u chorych na toczeń rumieniowaty układowy (TRU) występują zaburzenia usuwania produktów apoptozy, co prowadzi do przedłużonej ekspozycji układu odpornościowego na autoantygeny i rozwoju odpowiedzi autoimmunologicznej. Obecnie uważa się, że ten mechanizm pełni podstawową funkcję w patogenezę choroby. Postulowane czynniki, które mogą wpływać na zaburzenia usuwania produktów apoptozy w TRU, to m.in. niedobory dopełniacza, obniżony poziom białka MBL (*mannose binding lectin*) i DNAazy I, niskie stężenia białka C-reaktywnego (*C-reactive protein* – CRP) oraz niektóre autoprzeciwciała (przeciwciała przeciwko białkom ostrej fazy lub składowym dopełniacza).

Summary

Apoptosis plays a fundamental role in maintenance of homeostasis of the immune system. Many experiments *in vitro* and *in vivo* show that in systemic lupus erythematosus there are disturbances in the process of clearance of apoptotic cells. That leads to prolonged exposure of the immune system to autoantigens and to the development of autoimmunity. Nowadays this process is put forward as a core mechanism in the pathogenesis of this disease. Possible factors which may influence disturbances in the clearance of apoptotic cells are: deficiency of complement, decreased levels of MBL protein and DNAase, low levels of C reactive protein and some antibodies (antibodies against acute phase proteins and against the components of complement).

Wstęp

Toczeń rumieniowaty układowy (TRU) jest autoimmunologiczną chorobą tkanki łącznej o szerokim spektrum objawów klinicznych. Jest to choroba przewlekła, klinicznie heterogenna, charakteryzująca się dużą zmiennością stopnia zaawansowania, a także różną odpowiedzią na stosowane leczenie. W przypadku zajęcia ważnych narządów wewnętrznych może zagrażać życiu chorego, jednak częściej przebiega w sposób przewlekły postępujący, z naprzemiennie występującymi okresami zaostrzeń i remisji.

Patogeneza toczenia nie jest poznana do końca, aczkolwiek zrozumienie tego problemu pogłębiło się w ostatnich latach. Wiadomo, że do czynników ryzyka rozwoju toczenia rumieniowatego układowego należą czynniki genetyczne, środowiskowe, infekcyjne i zapalne. U chorych na TRU występują również zaburzenia usuwania produktów apoptozy, co prowadzi do przedłużonej ekspozycji układu odpornościowego na autoantygeny i rozwoju odpowiedzi autoimmunologicznej. Obecnie uważa się, że ten mechanizm odgrywa podstawową rolę w patogenezę choroby.

Adres do korespondencji:

lek. Dorota Cieślak, Zakład Reumatologii i Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, ul. Przybyszewskiego 39, 60-356 Poznań, tel. +48 603 05 77 65, e-mail: d.cieslak@interia.pl

Apoptoza w toczeniu rumieniowatym układowym

Apoptoza jest aktywnym, regulowanym i programowanym procesem komórkowym, który występuje zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych we wszystkich tkankach. Odgrywa główną rolę w utrzymaniu równowagi między starymi a nowymi komórkami [1, 2] oraz w dojrzewaniu i homeostazie układu immunologicznego. Podczas dojrzewania układu immunologicznego apoptoza autoreaktywnych limfocytów w centralnych narządach limfatycznych leży u podstaw rozwoju tolerancji immunologicznej. Aktywowane limfocyty są usuwane poprzez apoptozę, poprzedzając odpowiedź immunologiczną [3].

Podczas apoptozy następuje aktywacja kaskady reakcji enzymatycznych, towarzyszy im morfologicznie kondensacja i fragmentacja komórek i jąder oraz wytwarzanie pęcherzyków na powierzchni błony komórkowej [4]. Ten łańcuch enzymatycznych reakcji prowadzi do aktywacji wielu wewnątrzkomórkowych proteaz i DNAaz, które w końcu degradują wewnątrzkomórkowy materiał. W błonie komórkowej komórek ulegających apoptozie dokonują się charakterystyczne zmiany w układzie fosfolipidów i polisacharydów. Błona komórkowa pozostaje nienaruszona w trakcie tego procesu, co zapobiega uwalnianiu wewnątrzkomórkowych komponentów [5]. W późniejszych stadiach apoptozy komórki tracą integralność – nazywają się wtedy wtórnymi komórkami nekrotycznymi – i uwalniają zawierające DNA nukleosomy razem z niebezpiecznymi, prozapalnymi sygnałami. Dlatego produkty apoptozy muszą być natychmiast wyeliminowane z organizmu, żeby zapobiec dalszemu uszkodzeniu tkanek [6]. Jeśli nie zostaną usunięte od razu, błona komórkowa traci integralność i dochodzi do uwolnienia dużych ilości zmodyfikowanego materiału cytoplazmatycznego i jądrowego [7]. W tym wypadku staje się możliwe zapalenie i indukcja reakcji immunologicznej.

Nieprawidłowości w jednym z wielu czynników odpowiedzialnych za regulację procesu apoptozy mogą zaburzyć równowagę panującą w układzie immunologicznym oraz predysponować do wystąpienia zjawiska autoimmunologicznego. Są dowody na istnienie zaburzeń usuwania komórek apoptotycznych w toczeniowych modelach u myszy oraz u ludzi [4]. Uszkodzone oczyszczanie może być powodem akumulacji komórek apoptotycznych w tkankach chorych na TRU. Zwiększona obecność produktów apoptozy u chorych na TRU może być również spowodowana zwiększonym poziomem aktywacji komórek mających ulec apoptozie. Apoptoza jako mechanizm fizjologiczny toczy się nieustannie i ulega jej bardzo duża liczba komórek, np. każdego dnia 2×10^9 /kg masy ciała neutrofilów ulegających apoptozie jest usuwana z krwi

[8]. Znany jest też fakt, że podczas procesu apoptozy antygeny są eksponowane na powierzchni błony komórkowej komórek ulegających apoptozie [9]. Odpowiednie usuwanie produktów apoptozy zapobiega więc nadmiernej ekspozycji układu odpornościowego na autoantygeny.

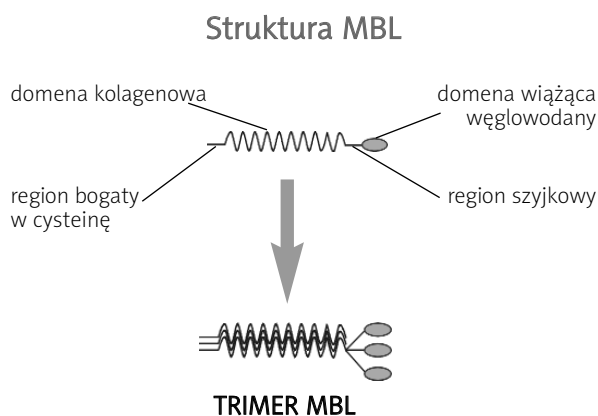
Czynniki wpływające na zaburzenia usuwania produktów apoptozy w toczeniu rumieniowatym układowym

Postulowane czynniki, które mogą wpływać na zaburzenia usuwania produktów apoptozy w TRU, to m.in. niedobory dopełniacza, obniżony poziom białka MBL i DNAazy I, małe stężenia CRP oraz niektóre auto-przeciwciała.

Białko MBL

Jest to białko ostrej fazy, syntetyzowane w wątrobie, odgrywające ogromną rolę we wrodzonej odporności [10]. Razem z surfaktantem SP A i SP D należy do rodziny kolektywnych, grupy mającej domenę wiążącą cukry i domenę kolagenową [11] (ryc. 1.).

MBL łączy się z różnymi drobnoustrojami przez domenę wiążącą cukry i wzmacnia efekt opsonizacji. Budowa multimeryczna pozwala temu białku wiązać różne mikroorganizmy, np. bakterie Gram (+) i Gram (-), mikobakterie, wirusy i grzyby [12]. Wiązanie MBL prowadzi do aglutynacji tych mikroorganizmów i pomaga w ich usuwaniu przez fagocyty. Dodatkowo, MBL aktywuje drogę lektynową dopełniacza przez związane z MBL proteazy serynowe (MASPs). Dlatego jest ważnym obrońcą organizmu przed chorobami, przede wszystkim w dzieciństwie, kiedy to nabyta odporność nie jest w pełni roz-



Ryc. 1. Budowa białka MBL.

Fig. 1. Structure of MBL protein.

winięta. Osoby mające niskie poziomy tego białka mogą cierpieć na poważne incydenty zakażeń bakteryjnych, grzybiczych oraz wirusowych we wczesnym dzieciństwie [13, 14]. MBL odgrywa również ważną rolę w sytuacjach, w których układ odpornościowy człowieka jest w supresji, np. w trakcie terapii immunosupresyjnej, chemioterapii lub po przeszczepie szpiku kostnego [15].

W licznych badaniach wykazano, iż małe stężenia białka MBL w surowicy, spowodowane obecnością polimorfizmów jego genu, są związane z rozwojem TRU u tych chorych [16]. Metaanaliza 8 badań wykazała, że ryzyko rozwoju TRU u chorych z allelem mniejszościowym jest 1,6 razy większe niż u chorych bez tych polimorfizmów [16]. Garred i wsp. dowiedli, że czas od pojawienia się pierwszych objawów choroby do zdiagnozowania TRU jest krótszy u osób mających przynajmniej jeden allel mniejszościowy niż u pacjentów homozygotycznych AA [16].

Istnieją dwa możliwe wytłumaczenia dla istnienia związku między niskim stężeniem MBL a zachorowaniem na TRU. Po pierwsze, MBL może się wiązać do komórek wchodzących w fazę apoptozy i inicjować ich wychwyty przez makrofagi [17], i przez to u osób z niedoborem MBL pojawi się akumulacja produktów apoptozy, które posłużą jako źródło autoantygenów. Zgodnie z tą hipotezą, Seleen i wsp. [18] wykazali, iż przeciwciała antykardioliipinowe i anty-C1q występują znacząco częściej u pacjentów z TRU z obecnością alleli mniejszościowych niż u chorych bez tych alleli oraz że obecność tych przeciwciał jest związana z niskim stężeniem białka MBL w surowicy. Wiadomo także, że MBL może wiązać DNA i może odgrywać rolę w usuwaniu DNA [19].

Po drugie, ponieważ MBL uczestniczy we wrodzonej odporności, osoby z niskim stężeniem MBL mogą być bardziej narażone na zakażenie patogenami, które mogą odgrywać rolę w patogenezie TRU. Nie ma jednak wystarczających dowodów potwierdzających tę hipotezę.

Duże podobieństwo między strukturą oraz funkcją MBL i C1q, a także duże wahania stężeń MBL u chorych z takim samym genotypem genu dla MBL skłoniły badaczy do poszukiwania przeciwciał przeciw MBL. Jeśli są one obecne, to mogą wiązać MBL i obniżyć jego poziom w surowicy. Również anty-MBL mogą wiązać MBL już odłożony w tkankach i nasilać uszkodzenie tej tkanki [12].

Seleen i wsp. dowiedli, że anty-MBL są obecne w surowicach chorych na TRU [20]. Dodatkowo udowodnili, że anty-MBL krąży w kompleksach z MBL i dlatego istnieje zależność odwrotnie proporcjonalna między mianem przeciwciał anty-MBL a aktywnością MBL.

Białko C-reaktywne

Białko C-reaktywne (CRP) jest glikoproteiną złożoną z 10 podjednostek ułożonych w dwa identyczne penta-

mery cykliczne i ich wiązanie się z ligandami jest zależne od wapnia. Kiedy CRP wiąże się z komórką ulegającą apoptozie, rozpoczyna indukcję aktywacji dopełniacza drogą klasyczną. Komórki zostają zopsonizowane i uwalnia się wiele cząsteczek chemotaktycznych. CRP działa również jako opsonina, ponieważ reaguje z receptorem Fc na komórkach fagocytujących. To wzmacnia fagocytozę komórek ulegających apoptozie [21]. U chorych na TRU poziomy CRP są niskie [22], co może przyczynić się do zaburzeń usuwania produktów apoptozy. CRP ma zdolność wiązania się z błonami i wieloma składnikami jądra komórkowego komórek nekrotycznych, takich jak histony i małe jądrowe nukleoproteiny.

Przeciwciała antyfosfolipidowe

We wczesnym stadium apoptozy zmienia się budowa błony komórkowej, np. dochodzi do eksternalizacji fosfatydyloseryny na zewnętrznym listku błony komórkowej. Zmiana układu fosfolipidów błony komórkowej i eksternalizacja fosfatydyloseryny jest sygnałem dla fagocytów do rozpoznania komórek ulegających apoptozie. Fosfatydyloseryna na powierzchni błony komórkowej staje się również sygnałem do produkcji przeciwciał antyfosfolipidowych [23, 24]. W następstwie tych procesów dochodzi do tworzenia się immunogennych fosfolipidowo-białkowych kompleksów na powierzchni komórek ulegających apoptozie, np. do wiązania i opsonizacji komórek ulegających apoptozie poprzez wiązanie się przeciwciał antyfosfolipidowych z β_2 -glikoproteiną [24, 25]. Brak receptorów na makrofagach dla przeciwciał antyfosfolipidowych powoduje zakłócenie procesu usuwania produktów apoptozy związanych z tymi przeciwciałami [26, 27].

DNAaza

DNAaza I ma znaczenie w degradacji materiału jądrowego, uwolnionego np. przez komórki, które przeszły w fazę wtórnej nekrozy. U ludzi DNAaza razem ze składową C1q dopełniacza skutecznie degradują chromatynę, pochodzącą z komórek ulegających martwicy [28]. U chorych na TRU i RZS występuje obniżenie stężenia DNAazy w porównaniu z osobami zdrowymi, chociaż tylko surowice chorych na TRU wykazywały obniżoną zdolność degradacji chromatyny pochodzącej z komórek martwiczych [21].

Składowe dopełniacza

Dotychczas udowodniono, że C1q, C3, C4 odgrywają rolę w procesie usuwania produktów apoptozy [29, 30]. Wiązanie dopełniacza jest wczesnym wydarzeniem w procesie martwicy i późnym w przypadku apoptozy. Komponenty dopełniacza działają jak mechanizm

usuwający komórki apoptotyczne, zanim wejdą w niebezpieczne stadium wtórnej martwicy [31]. Dziedziczny niedobór składowej C1q dopełniacza występuje u chorych na TRU i jest dowodem na znaczenie tej składowej dopełniacza w patogenezie autoimmunizacji przeciwko strukturom jądra komórkowego [32].

Podsumowanie

Toczeń rumieniowaty układowy jest chorobą o bardzo zróżnicowanym obrazie klinicznym i nieznaną patogenezie. W ostatnich latach intensywnie badano rolę zaburzeń usuwania produktów apoptozy w rozwoju tego schorzenia. Zrozumienie tego procesu pozwoli w przyszłości skuteczniej wpływać terapeutycznie na układ immunologiczny, dzięki czemu możliwe stanie się zmniejszenie śmiertelności oraz poprawi się komfort życia chorych na toczeń rumieniowaty układowy.

Piśmiennictwo

1. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; 146: 3-15.
2. Skulachev VP. Programmed death phenomena: from organelle to organism. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 959: 214-237.
3. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281: 1305-1308.
4. Bijl M, Limburg PC, Kahlenberg CGM. New insights into the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE): the role of apoptosis. *Neth J Med* 2001; 59: 66-75.
5. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today* 1993; 959: 126-130.
6. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 2000; 407: 784-788.
7. Sheriff A, Gaipal US, Voll RE, et al. Apoptosis and systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am* 2004; 30: 505-527.
8. Cohen JJ, Duke RC, Fadok VA, Sellins KS. Apoptosis and programmed cell death and immunity. *Annu Rev Immunol* 1992; 10: 267-293.
9. Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med* 1994; 179: 1317-1330.
10. Tin SK, Lee LY, Thumboo J. PCR-RFLP genotyping for exon 1 and promoter region mutations of the human Mannose Binding Lectin (MBL-2) gene. *J Immunol Methods* 2005; 303: 148-151.
11. Holmskov U, Malhotra R, Sim RB, Jensenius JC. Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system. *Immunol Today* 1994; 15: 67-74.
12. Tsutsumi A, Takahashi R, Sumida T. Mannose binding lectin: genetics and autoimmune disease. *Autoimmun Rev* 2005; 4: 364-372.
13. Koch A, Melbye M, Sørensen P, et al. Acute respiratory tract infections and mannose-binding lectin insufficiency during early childhood. *JAMA* 2001; 285: 1316-1321.
14. Summerfield JA, Sumiya M, Levin M, Turner MW. Association of mutations in mannose binding protein gene with childhood infection in consecutive hospital series. *BMJ* 1997; 314: 1229-1232.
15. Mullighan CG, Bardy PG. Mannose-binding lectin and infection following allogeneic hemopoietic stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma* 2004; 45: 247-256.
16. Garred P, Voss A, Madsen HO, Junker P. Association of mannose-binding lectin gene variation with disease severity and infections in a population-based cohort of systemic lupus erythematosus patients. *Genes Immun* 2001; 2: 442-450.
17. Oqden CA, deCathelineau A, Hoffmann PR, et al. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med* 2001; 194: 781-795.
18. Seelen MA, van der Bijl EA, Trouw LA, et al. A role for mannose binding lectin dysfunction in generation of autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2005; 44: 111-119.
19. Palaniyar N, Nadesalingam J, Clark H, et al. Nucleic acid is a novel ligand for innate, immune pattern recognition collectins surfactant proteins A and D and mannose-binding lectin. *J Biol Chem* 2004; 279: 32728-32736.
20. Seelen MA, Trouw LA, van der Hoorn JW, et al. Autoantibodies against mannose-binding lectin in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 2004; 136: 585-590.
21. Munoz LE, Gaipal US, Franz S, et al. SLE – a disease of clearance deficiency? *Rheumatology (Oxford)* 2005; 44: 1101-1107.
22. Pereira Da Silva JA, Elkon KB, Hughes GR, et al. C-reactive protein levels in systemic lupus erythematosus – a classification criterion? *Arthritis Rheum* 1980; 23: 770-771.
23. Casciola-Rosen L, Rosen A, Petri M, Schliessel M. Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity: implications for coagulation events and antigenic spread in systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 1624-1629.
24. Manfredi AA, Rovere P, Galati, et al. Apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus: I. Opsonization by antiphospholipid antibodies. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 205-214.
25. Manfredi AA, Rovere P, Heltai S, et al. Apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus: II. Role of beta2-glycoprotein I. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 215-223.
26. Kim SJ, Gershov D, Ma X, Brot N, Elkon KB. Opsonization of apoptotic cells and its effect on macrophage and T cell immune responses. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 987: 68-78.
27. Mevorach D. Opsonization of apoptotic cells. Implications for uptake and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 926: 226-235.
28. Utz PJ, Hottelet M, Schur PH, Anderson P. Proteins phosphorylated during stress-induced apoptosis are common targets for autoantibody production in patients with systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 1997; 185: 843-854.
29. Licht R, van Bruggen M, Oppers-Walgreen B, et al. Plasma levels of nucleosomes and nucleosome-autoantibody complexes in murine lupus: effects of disease progression and lipopolysaccharide administration. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1320-1330.
30. Bickerstaff MC, Botto M, Hutchinson WL, et al. Serum amyloid P component controls chromatin degradation and prevents antinuclear autoimmunity. *Nat Med* 1999; 5: 694-697.
31. Botto M, Dell'Agnola C, Bygrave AE, et al. Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. *Nat Gene* 1998; 19: 56-59.
32. Napirei M, Karsunky H, Zevnik B, et al. Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice. *Nat Genet* 2000; 25: 177-181.