

Udział interferonów w patogenezie toczenia rumieniowatego

The role of interferons in pathogenesis of lupus erythematosus

AGNIESZKA OSMOLA, JAKUB NAMYSŁ, JANUSZ PROKOP

Katedra i Klinika Dermatologii Akademii Medycznej w Poznaniu,
kierownik Katedry i Kliniki prof. dr hab. med. Wojciech Silny

Abstract

This paper reveals study results of interferon gamma and their receptor expression and serum concentrations in patients with various forms of lupus erythematosus. It also contains a short review of literature concerned with the role of interferons in lupus erythematosus pathogenesis.

Key words: lupus erythematosus, pathogenesis, cytokines, interferons.

Streszczenie

Praca przedstawia wyniki badań ekspresji interferonu gamma, jego receptora oraz poziomu białka w surowicy pacjentów z różnymi odmianami toczenia rumieniowatego. Oprócz oryginalnych wyników zawiera również krótkie omówienie aktualnych poglądów na temat roli interferonów w patogenezie toczenia.

Słowa kluczowe: toczeń rumieniowaty, patogeneza, cytokiny, interferony.

(*PDiA 2005; XXII, 6: 299–303*)

Wprowadzenie

Interferony i ich receptory

Interferony (IFN) stanowią grupę cytokin odkrytych przez Isaacs i Lindenmanna, odgrywających wiodącą rolę w odporności przeciwwirusowej. Wyróżnia się 5 podstawowych rodzajów interferonów: α , β , κ , ω , γ . Dawniej dzielono je na 2 typy: I i II. Interferony typu I (α , β , κ , ω) wytwarzane są przez traktowane wirusem komórki, tj. leukocyty, keratynocyty lub fibroblasty. Natomiast interferon typu II (γ), zwany immunologicznym, jest wytwarzany głównie przez limfocyty T pod wpływem antygenów, cytokin (IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21) czy mitogenów. Gen dla IFN γ znajduje się na chromosomie 12., zawiera 1 gen kodujący i 3 introny, składa się z 146 aminokwasów bez grup węglowodanowych. Receptory dla interferonów są heterodimerami, składającymi się z 2 różnych podjednostek. W odróżnieniu od IFN α , β , ω , które wiążą się z tym samym receptorem, IFN γ wiąże się z innym,

w skład którego wchodzi podjednostki IFNGR-1 i IFNGR-2. Receptor dla IFN γ aktywuje kinazę JAK1 oraz kinazę tyrozynową JAK2. W wyniku aktywacji fosforylują one 2 identyczne białka STAT1, łączące się następnie w czynnik transkrypcyjny. Geny odpowiadające na IFN γ zawierają sekwencję ISRE (*interferon stimulated response element*), a także sekwencje aktywacji przez IFN γ GAS (*gamma activated sequences*). Wśród kilkudziesięciu genów, których ekspresję stymulują IFN, są m.in. cząsteczki MHC I i II klasy, receptor dla fragmentu Fc IgG (Fc γ RI), chemokiny IP10, MIG, IRF-1, syntaza tlenu azotu (iNOS), kinaza białkowa R, białko Mx. IFN γ jest znacznie aktywniejszy, jeśli chodzi o działanie na układ odpornościowy. Jest najsilniejszym aktywatorem ekspresji MHC klasy I i II oraz wybitnie nasila prezentację antygenów limfocytom T. Poza tym aktywuje makrofagi, a także w kooperacji z innymi cytokinami uczestniczy w różnicowaniu komórek B w kierunku komórek uwalniających przeciwciała [1].

Adres do korespondencji: dr hab. med. Janusz Prokop, Katedra i Klinika Dermatologii, Akademia Medyczna, ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań, e-mail: janusz.prokop@wp.pl

Interferony w toczeniu rumieniowatym

Cytokiny pełnią ważną rolę w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej zarówno przeciw antygenom zewnętrznym, jak i własnym, jak ma to miejsce w chorobach autoimmunizacyjnych. Mediatory te zostały podzielone w zależności od źródła i funkcji efektorowych na 2 grupy. Cytokiny wydzielane przez subpopulację limfocytów Th1 (IL-2 stymulująca cytotoxyczność limfocytów i IFN γ aktywujący makrofagi) mają wybitny udział we wspomaganiu odpowiedzi typu komórkowego, natomiast cytokiny wydzielane przez limfocyty Th2 (IL-4, 5, 10, 13), będące czynnikami wzrostu i różnicowania limfocytów B, wspomagają głównie odpowiedź humoralną. Podobnie ze względu na mechanizmy efektorowe podzielono choroby autoimmunizacyjne na te z dominującą odpowiedzią komórkową, jak np. cukrzyca insulinozależna, oraz takie, gdzie dominuje odpowiedź humoralna z wytwarzaniem patogenych autoprzeciwciał, jak np. toczeń rumieniowaty.

Wiele cytokin wydzielanych zarówno przez limfocyty Th1, jak i Th2 bierze udział w regulowaniu aktywności choroby czy zajęciu poszczególnych organów wewnętrznych w toczeniu rumieniowatym (TNF α , TGF β , IFN α , IFN γ , IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-16) [2].

Pierwszą opisywaną cytokiną w toczeniu rumieniowatym był IFN α . Kilka badań wykazało podwyższony poziom tej cytokiny w surowicach pacjentów z SLE, jednakże źródło i czynniki stymulujące jej produkcję nie są jeszcze dokładnie poznane. Wzmaga on aktywację makrofagów, a także polaryzuje odpowiedź w kierunku Th1, a zatem produkcję IL-2 i IFN γ . Inne badania wykazały, że również poziom IFN γ w surowicach pacjentów z SLE jest podwyższony, a produkcja tej cytokiny przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (PBMCs) koreluje z aktywnością choroby w skali (*systemic lupus activity measurement* – SLAM). Wiele badań przemawia za tym, że IFN γ jest jedną z ważniejszych molekuł efektorowych w toczeniu rumieniowatym [3]. Może on wpływać na poliklonalną aktywację limfocytów B, a także na zjawisko *przełączania klas* (*class switching*) z IgG1 spotykanych częściej w SCLE na IgG2 i 3 charakterystyczne dla SLE z zajęciem narządów wewnętrznych. Szczególnym rodzajem badań są badania na modelach zwierzęcych. O wadze IFN γ w patogenezie toczenia jako pierwsze świadczyły doświadczenia Jacoba i wsp. na myszach New Zeland Black NZB x New Zeland White NZWF1 (BxW). Wykazały one indukcję choroby u osobników otrzymujących IFN, podczas gdy u osobników otrzymujących przeciwciała anti-IFN γ początek choroby był znacząco późniejszy. Poszerzeniem tych badań były badania Ozmena i wsp., którzy dodatkowo podawali myszom rozpuszczalny receptor sIFN γ R, uzyskując dłuższe przeżycie. Definitywnie przekonujące do roli IFN γ w patogenezie toczenia są badania na modelach mysich MRL-Faslpr,

w których dokonano delecji genów IFN γ lub jego receptora, w których wykazano redukcję objawów histologicznych, serologicznych oraz znaczne wydłużenie przeżycia.

Opisano również polimorfizm genu dla receptora IFN γ . Okazało się, że kombinacja polimorfizmów IFNR1 (Val14Met) i IFNR2 (Gln64/Gln64) stwarza największe ryzyko rozwinięcia się SLE [4].

Interferon a zmiany skórne

IFN odgrywa także ważną rolę w patologii zmian skórnych w przebiegu toczenia. Około 1/3 pacjentów z SLE manifestuje zmiany skórne o charakterystycznym kształcie motyla i lokalizacji zależnej od ekspozycji na UV. Badaniu poddano wycinki skórne pacjentów z różnymi manifestacjami skórnymi poszczególnych odmian toczenia i wykazano w większości obecność mRNA dla IL 5 i IFN γ . W normalnej skórze również wykazano mRNA dla IFN γ , ale bez obecności funkcjonalnego białka. Na tej podstawie spekuluje się udział w patogenezie zmian skórnych cytokin Th2 wraz z lokalną produkcją IFN γ , które mogą zarówno indukować, jak i nasilać chorobę [5].

Cel pracy

Celem badań było określenie ekspresji genu dla IFN γ oraz jego receptora w PBMCs pacjentów z różnymi odmianami toczenia rumieniowatego oraz poziomu tej cytokiny w surowicy w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych.

Materiał i metody

Grupę badaną stanowili pacjenci Katedry i Kliniki Dermatologii z różnymi odmianami toczenia rumieniowatego (w tym 14 pacjentów z DLE, 7 z SCLE oraz 7 z SLE) oraz 10 osób zdrowych. Materiałem użytym do badań były PBMCs oraz surowice. Na badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (6 lutego 2003 r.). Oznaczenia poziomu ekspresji genu dla IFN γ i jego receptora dokonano za pomocą analizy jakościowej metodą RT-PCR przy użyciu LightCyclera, po wyizolowaniu PBMCs z krwi obwodowej metodą wirowania w gradiencie gęstości Ficollu oraz izolacji mRNA metodą fenolowo-chloroformową Chomczyńskiego i Sacchi. Zaprojektowane primery, których użyto, przedstawiono w tab. 1.

Pomiary stężeń IFN γ w surowicach wykonano metodą ELISA (Quantikine R&D Systems, Human IFN γ Immunoassay). Wyniki opracowano statystycznie za pomocą programu CSS Statistica V.

Wyniki

Wyniki badania przedstawiono w tab. 3.–5.

Omówienie wyników

Średnie wartości IFN γ w grupie chorych na SLE wynosiły 2,29 pg/ml, w grupie DLE 22,95 pg/ml, SCLE 72,29 pg/ml i w grupie kontrolnej osób zdrowych 2,00 pg/ml. W literaturze doszukano się różnych doniesień, zarówno tych – opisujących podwyższony poziom IFN γ w surowicy chorych z SLE, który dodatkowo korelował z aktywnością choroby SLAM [6], ale również takich, w których stwierdzano podwyższony poziom bez korelacji [7] czy brak wzrostu poziomu tej cytokiny [8]. Analiza wyników nie wykazała statystycznie istotnych różnic w stężeniu IFN γ w poszczególnych grupach (test Kruskala-Wallisa). W kolejnych pracach opisano wpływ leczenia kortykosteroidami na znaczny spadek stężenia IFN γ w surowicy [9]. Również badani pacjenci z SLE w 100% byli leczeni glikokortykosteroidami doustnymi w dawkach podtrzymujących, 14,29% było leczonych w grupie DLE i 71,43% z SCLE i stwierdzono statystycznie istotny wpływ leczenia

na obniżenie poziomu IFN γ , p=0,04. Ekspresję genu dla IFN stwierdzono u wszystkich chorych na SLE, jednakże w niskim i wyrównanym poziomie średnio 3767 kopii. W grupie pacjentów z DLE u 93% dochodziło do ekspresji genu na wysokim poziomie średnio 514 749 kopii, u chorych z SCLE 71% wykazywało ekspresję genu na średnim poziomie 40 163 kopii w porównaniu z grupą kontrolną, gdzie 40% również wykazało ekspresję genu na średnim poziomie 516 kopii. W piśmiennictwie doszukano się pojedynczych prac, sugerujących znaczący wzrost ekspresji tego genu, jednakże nie ustosunkowano się co do ewentualnego wcześniejszego leczenia mogącego wpływać na ten proces [10]. Ciekawe wyniki otrzymano również dla ekspresji receptora IFN γ . W grupie osób zdrowych nie dochodzi do jego ekspresji, podczas gdy 100% chorych z SLE wykazuje ekspresję na poziomie średnio 8 311 kopii. W grupie pacjentów z DLE 64% wykazywało ekspresję na średnim poziomie 8 256 kopii, a u chorych z SCLE odpowiednio 29% i 133 kopii.

Tab. 1. Sekwencje primerów

Sekwencja bazowa	Sekwencje primerów	Długość
IFN γ	A: 5'- TGCATCGTTTTGGGTTCTCT -3' B: 5'- TCCGCTACATCTGAATGACCT -3'	104 pz
IFN γ R	A: 5'- CCAGGGTTGGACAAAAAGAA -3' B: 5'- TCTCCTCCTTCTGTATCCAGTT -3'	105 pz
GAPDH	A: 5'- CTGCACCACCAACTGCTTAG -3' B: 5'- TTCTGGGTGGCAGTGATG -3'	105 pz

Tab. 2. Grupa pacjentów z DLE

Dg.	Leczenie prednizon (mg)	IFN γ stężenie (pg/ml)	IFN γ ekspresja liczba kopii/GADPH	IFN γ R ekspresja liczba kopii/GADPH
DLE1	-	0	0	0
DLE2	-	0	459 187	0
DLE3	40	0	5 957 955	0
DLE4	-	30,579	12 635	0
DLE5	60	69	712 465	0
DLE6	-	65,842	3567	21 292
DLE7	-	8,474	3462	17 785
DLE8	-	113,211	11 938	22 801
DLE9	-	0	21 282	31
DLE10	-	34,263	10 780	30 428
DLE11	-	0	2560	42
DLE12	-	0	2772	73
DLE13	-	0	5761	13 033
DLE14	-	0	2126	10 106

Otrzymane wyniki nie są jednoznaczne, podobnie jak doniesienia literaturowe. Badana grupa nie była jednorodna i mało liczebna. Wyniki nie zaprzeczają jednak ważnej roli IFN γ w patogenezie toczenia rumieniowatego nie tylko układowego, a także wskazują na znaczący wpływ leczenia immunosupresyjnego.

Dyskusja

Ponad 40 lat temu interferony były pierwszą odkrytą rodziną cytokin. Po początkowym entuzjazmie, jaki

towarzyszył odkryciu, że odgrywają kluczową rolę w procesie autoimmunizacji i możliwości ich zastosowania w leczeniu, nastąpiły lata zapomnienia, aż do chwili obecnej. Po zsekwencjonowaniu genomu człowieka wiadomo, że *locus* IFN typu I mieści się na chromosomie *9p21* i zawiera 13 izoform IFN-alfa oraz pojedynczy gen IFN-beta. Zidentyfikowano również IFN-omega, kappa i tau. Przy zastosowaniu techniki mikrochip odkryto wiele genów związanych z IFN typu I i II. Przykładowo badania analizy mRNA wykazały, że we wczesnym stadium SLE dochodzi do in-

Tab. 3. Grupa pacjentów z SCLE

Dg.	Leczenie prednizon (mg)	IFN γ stężenie (pg/ml)	IFN γ ekspresja liczba kopii/GADPH	IFN γ R ekspresja liczba kopii/GADPH
SCLE1	10	0	3074	0
SCLE2	5	40	36 818	0
SCLE3	40	116	0	0
SCLE4	5+I	170	0	0
SCLE5	30	181	239 508	0
SCLE6	–	0	3291	23 217
SCLE7	–	0	264	880

Tab. 4. Grupa pacjentów z SLE

Dg.	Leczenie prednizon (mg)	IFN γ stężenie (pg/ml)	IFN γ ekspresja liczba kopii/GADPH	IFN γ R ekspresja liczba kopii/GADPH
SLE1	20	0	3617	15 275
SLE2	7,5	0	1151	5038
SLE3	10	0,402	1602	2155
SLE4	10	8,572	3437	28 349
SLE5	5	4,903	2027	6082
SLE6	40+I	2,171	1230	2609
SLE7	10	0	5925	47

Tab. 5. Grupa kontrolna – osoby zdrowe

	Leczenie	IFN γ stężenie (pg/ml)	IFN γ ekspresja liczba kopii/GADPH	IFN γ R ekspresja liczba kopii/GADPH
C1	–	0	1613	0
C2	–	0,943	650	0
C3	–	0,137	0	0
C4	–	1,81	942	0
C5	–	2,472	5056	0
C6	–	3,627	21 305	0
C7	–	4,1	6544	0
C8	–	6,84	0	0
C9	–	0	0	0
C10	–	0,101	6800	0

dukcji IFN-alfa, transkrypcja genów zależnych od IFN-alfa wzrasta wraz z aktywnością choroby, a maleje pod wpływem leczenia glikokortykosteroidami [11].

Funkcja IFN typu I nie jest jeszcze całkowicie jasna, wydaje się, że działają one za pomocą tego samego receptora, a jego blokada w modelach mysich zabezpiecza przed rozwojem SLE. Istnieje natomiast jeden rodzaj IFN typu II – IFN-gamma wraz z jego unikalnym receptorem. Ten typ również odgrywa znaczącą rolę prozapalną i charakteryzuje prozapalne limfocyty T CD4. Wydaje się, że IFN typu I *uwrażliwia* limfocyty T na działanie IFN typu II. Analizy mikrochipowe preparatów z krwi czy tkanek od chorych z SLE, czy modeli mysich wykazują, że najbardziej rozregulowane geny to te zależne od stymulacji IFN I czy II typu. Jednakże blokada receptorów może prowadzić do nieoczekiwanych skutków, związanych z utratą fizjologicznych funkcji (obrona przeciwwirusowa, rola w utrzymywaniu ciąży i prawdopodobnie w licznych interakcjach między komórkami) [12].

SLE jest uważany za klasyczny przykład choroby autoimmunologicznej z przewagą odpowiedzi typu 2, gdzie dochodzi do aktywacji komórek B i produkcji autoprzeciwciał. Theofilopoulos postuluje znacznie większą rolę komórek typu 1, a szczególności IFN-gamma. Następujące obserwacje są tego dowodem:

- 1) zwiększony poziom IFN-gamma i IL-12 na poziomie mRNA i białka stwierdzono na modelach mysich,
- 2) myszy z nadekspresją IFN-gamma w skórze rozwijają zespół objawów SLE skórnych i obecność anty-dsDNA,
- 3) poziomy IFN-gamma i IL-12 w surowicy pacjentów z SLE są podwyższone, szczególnie u tych z aktywną chorobą i zajęciem nerek,
- 4) analiza mikrochipowa wykazuje zwiększoną ekspresję genów regulowanych przez IFN-gamma,
- 5) podawanie pacjentom z chorobami autoimmunologicznymi lub limfoproliferacyjnymi IFN-gamma prowadziło do rozwinięcia się SLE,
- 6) podawanie IFN-gamma myszom powodowało zaostření choroby,
- 7) podawanie antagonistów receptora lub przeciwciał anty-IFN-gamma wydłużało przeżycie,
- 8) delecja genu IFN-gamma lub jego receptora zapobiegała rozwojowi choroby.

Redukcja 50% ilości produkowanego IFN była wystarczająca dla zapobieżenia rozwojowi SLE u myszy. Skonstruowano cząsteczkę IFN receptora sprzężonego z regionem stałym IgG1, by nadać dłuższy okres półtrwania (ok. 40 godz.). Myszy, u których profilaktycznie podawano niewirusowy wektor o cechach inhibitora IFN-gamma, nie rozwijały choroby. Dobry efekt uzyskano też u zwierząt z już rozwiniętą chorobą. Nie jest jednak możliwe wskazanie dokładnie jednego procesu, na który wpływ ma IFN (Ag prezentacja, ekspresja MHC), a odgrywającego spustową rolę w rozwoju SLE [13–16].

Skróty używane w pracy: IFN γ – interferon gamma, IFN γ R – receptor interferonu gamma, PBMCs – komórki jednojądrzaste krwi obwodowej, DLE – postać ogniskowa toczenia rumieniowatego, SCLE – postać podostra skórna toczenia rumieniowatego, SLE – układowy toczeń rumieniowaty.

Piśmiennictwo

1. Gołąb J, Jakóbskiak M, Zagożdżon R i wsp.: Cytokiny. W: Immunologia. Gołąb J, Jakóbskiak M, Lasek W (eds). Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2002: 198-248.
2. Theofilopoulos AN, Koundouris S, Kono DH, et al.: The role of IFN- γ in systemic lupus erythematosus: a challenge to the Th1/Th2 paradigm in autoimmunity. *Arthritis Res* 2001; 3: 136-41.
3. Dean GS, Tyrrell-Price J, Crawley E, et al.: Cytokines and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2000; 59: 243-51.
4. Nakashima H, Inoue H, Akahoshi M, et al.: The combination of polymorphisms within interferon- γ receptor 1 and receptor 2 associated with the risk of systemic lupus erythematosus. *FEBS Letters* 1999; 453: 187-90.
5. Stein LF, Saed GM, Fiveston DP: T-cell cytokine network in cutaneous lupus erythematosus. *J Am Acad Dermatol* 1997; 36: 191-6.
6. Robak E, Smolewski P, Woźniacka A, et al.: Relationship between peripheral blood dendritic cells and cytokines involved in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Eur Cytokine Netw* 2004; 15: 222-30.
7. Kim T, Kanayama Y, Negoro N, et al.: Serum levels of interferons in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 1987; 70: 562-9.
8. Lacki JK, Leszczyński P, Kelemen J, et al.: Cytokine concentration in serum of lupus erythematosus patients: the effect on acute phase response. *J Med* 1997; 28: 99-107.
9. Xie HF, Li J, Shi W: Effect of corticosteroids on the balance of Th cytokines in patients with systemic lupus erythematosus. *Human Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2002; 28; 27: 533-5.
10. Csiszar A, Nagy G, Gergely P, et al.: Increased interferon-gamma, IL-10 and decreased IL-4 mRNA expression in PBMC from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 2000; 122: 464-70.
11. Kirou KA, Lee CY, George SS, et al.: Interferon-induced target gene expression in SLE represents predominant effects of rather than gamma interferon. SLE-Human Etiology and Pathogenesis: Dendritic cells and Antigen. Program and abstracts of the American College of Rheumatology 67th Annual Scientific Meeting; October 23-28, 2003; Orlando, Florida. Abstracts S557.
12. Horowitz DA, Wang H, Gray JD. Cytokine gene profile in circulating blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus: increased interleukin-2 but not interleukin-4 mRNA. *Lupus* 1994; 3: 423-8.
13. Theofilopoulos A. Targeting interferon in SLE. Program and abstracts of the 90th Meeting of the American Association of Immunologists; May 6-10, 2003; Denver, Colorado.
14. Theofilopoulos AN, Kondouris S, Kono DH, et al.: The role of IFN gamma in SLE: a challenge to the Th1/Th2 paradigm in autoimmunity. *Arthritis Res* 2001; 3: 136-41.
15. Santiago-Raber ML, Baccala R, Haraldson KM, et al.: Type-I interferon receptor deficiency reduces lupus-like disease in NZB mice. *J Exp Med* 2003; 197: 177-78.
16. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, et al.: Interferon inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 2610-5.