

OPŠTI PREGLED

GENERAL REVIEWS



Uloga anti-DNA antitela u sistemskom eritemskom lupusu (SEL): dometi i perspektive

The role of anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus (SLE): ranges and perspectives

Mirjana Pavlovic, Florida Atlantic University, Boca Raton, FL, 33431, USA

APSTRAKT

Svrha ovog pregleda je da da osnovne podatke o strukturi, funkciji, patogenosti, regulaciji sekrecije, kao i mogućoj ulozi anti-DNA antitela u autoimunim oboljenjima sa posebnim akcentom na Sistemskom Eritemskom Lupusu (LES). Anti ds-DNA antitela su prihvaćena među kliničarima kao „pečatni znak“ lupusa. Stoga su diskutovane razlike i sličnosti između antids-DNA i antiss-DNA antitela, kao i modaliteti njihove aktivnosti: prepoznavanje DNA, vezivanje za nju, i njihova hidrolitička i citotoksična aktivnost. Sugerisani su i mehanizmi koji doprinosе ovim funkcijama. Diskutovane su moguće lokalizacije aktivnih mesta ovih interesantnih aktivnosti pomenutih antitela. Naznačena je patogena uloga u održanju i očuvanju mehanizma „začaranog kruga“ aktivnošću ovih antitela i diskutovana u kontrastu sa antitelima koja nemaju te funkcionalne osobine nađenim u normalnih, klinički zdravih osoba. Najaktuelniji podaci iz sfere anti-DNA antitela diskutovani su u svetlosti novih podataka dobijenih na osnovu istraživanja citirane grupe autora. Pomenuta je moguća asocijacija izmedju infekcije Parvovirusom B19 i pojave lupusnih antiss-DNA antitela. Razmotrena je i moguća uloga idiotipskih antitela u spravljanju vakcina punitjem dendritičnih ćelija ovim antitelima.

ABSTRACT

The purpose of this review is to provide an insight into the structure, function, pathogenicity, regulation of secretion, and possible role of anti-DNA autoantibodies in autoimmune diseases with an emphasis on systemic lupus erythematosus (SLE). Among clinicians anti-dsDNA antibodies are considered the hallmark of this disease. Differences and similarities between antids DNA and antiss DNA autoantibodies are discussed, as well as the modalities of their actions, such as recognition, binding, hydrolytic, and cytotoxic activities. The underlying mechanisms for functional features of anti-DNA autoantibodies are suggested. The possible localizations of the active sites of their enzymatic and cytotoxic activities are discussed. The pathogenic role in perpetuation and maintenance of the „vicious cycle“ of disease resulting from these harmful antibodies is suggested and discussed in contrast to normal anti-DNA antibodies found in sera of individuals without clinical signs of the disease. The most recent data on functional importance of these antibodies are interpreted in the light of the author's results. The molecular association with parvovirus B19 infection and SLE based upon relationship with antiss-DNA is suggested. The possible use of idiotypic anti-DNA autoantibodies in designing lupus vaccines is considered.

Ključne reči:

Autoimuna oboljenja, Anti-DNA antitela, Detekcija, SLE, hidrolitična i citotoksična anti-DNA antitela, vakcina za lupus

Key words:

Autoimmune disease, anti-DNA autoantibodies, Detection, SLE, hydrolytic and cytotoxic anti-DNA autoantibodies, lupus vaccine

Sistemski eritemski lupus, *Lupus Erythematosus Systemic* (LES) je oboljenje svrstano u autoimuna oboljenja (nepoznatog uzroka), čije brojne manifestacije uglavnom potiču od nekad šireg a nekad užeg spektra antitela stvorenih na sopstvene antigene datog organizma(1). Brojne teorije o imunološkoj podlozi lupusa mogu se obuhvatiti nimalo jednostavnim imunološkim scenarijem koji podrazumeva lom u toleranciji i hiperaktivaciju B i T limfocita sa snažnom poliklonalnom ekspanzijom B-ćelija koja spektrom izlučenih antitela izaziva sindrom karakterističan za svaku pojedinu osobu i stoga zavređuje naziv „bolesti sa hiljadu lica“ (1). Već ovo ukazuje na visoku kompleksnost imunološkog poremećaja i na neophodnost precizne dijagnoze i individualne terapije. Rasne varijacije u pojavi LES-a za sada je teško protumačiti, iako su genetska istraživanja ukazala na postojanje gena koji povećavaju osetljivost na ispoljavanje simptomatologije lupusa (1). Budući da je to oboljenje koje se javlja u 1:10 000 slučajeva, napada čak i decu, (1) a posebno populaciju žena u srednjim godinama (M: Ž odnos 1: 9), značaj utvrđivanja uzroka i kauzalnog terapijskog pristupa, a naročito prevencije je neprocenjiv (1–5).

Danas se smatra da se u lupusu čitav imunološki sistem aktivira u pravcu stimulacije sinteze antitela, uključujući u to komplement, T i B limfocite s ko-stimulatornim molekulima (CD40-CD40L i CD3-CD28 sistemi), aktivaciju pretežno plazmocitoidnih dendritičnih ćelija (izlučivanje interferona α) i makrofaga s elementima urođenog imuniteta (1, 4, 5). Na molekularnom nivou, to su prvenstveno „Toll-like“ receptori, koji detektuju „strani“ antigen i transmisijom signala dovode do aktivacije Nf- κ B ili nekog drugog transkripcionog faktora (stimulatora sinteze antitela), vezivanjem za DNA i genskom stimulacijom kodiranja za sintezu ovih proteina do njihovog konačnog izlučivanja iz hiperaktiviranih ćelija B-serije. Stoga, pored klasičnog tretmana imunosupresorima, jedan od najuspešnijih za sada je deplecija B-ćelija iz kojih se neposredno izlučuju antitela. U te svrhe koristi se himera mišeg i humanog antitela usmerenog na CD20 „cluster destination antigen“ (CD), lek poznat u prodaji kao Rituxan ili Rituximab. Nepovoljnost tretmana ovim antitelom leži u činjenici da ono praktično lišava organizam svih B ćelija i ostavlja ga stoga bez prirodne imunološke zaštite-imunoglobulina. Stoga se uz ovo antitelo obično daje i odgovarajuća zaštitna doza imunoglobulina dok imuni sistem ne počne ponovo da proizvodi sopstvene IgG i ostala potrebna antitela humane vrste. Remisije izazvane primenom ovog „leka“ su individualnog perioda trajanja, (1) kao i sami pojedinačni odgovori, jer ne uklanjaju uzrok već posledicu. Perzistencija još uvek nepoznatog nam uzroka dovodi do relapsa poznatog kao „flare“ i „začarani krug“ se nastavlja. Stoga je ideja istraživača na ovom polju da uđe u „začarani krug“ i razumevanjem nje-

govog nastanka otkloni mehanizam odgovoran za nastanak lupusa. Nažalost, to nije nimalo lako.

Odmaklja istraživanja ukazuju na to da autoimuno oboljenje nastaje u ljudi iz tzv. nepostojećeg humorarnog imuniteta kroz fazu „benignog autoimunog stanja“ pre no što počnu sa stvaranjem „patogenih“ autoantitela (uglavnom IgG i IgM tipa). Ovo je u skladu s takozvanim modelom „autoimmune progresije“, prema kome većina bolesnika ima povišen nivo autoantitela usmerenih naročito protiv nuklearnih komponenti: nukleozoma, DNA i histona (1–5). Generalno je prihvaćeno da bar neka od njih imaju direktnu patogenu ulogu, ili precipitirajući kao imuni kompleksi u ciljnim organima (ispod endotela, na bazalnim mebranama obično krvnih sudova) ili reagujući ukršteno sa drugim relevantnim funkcionalnim antigenima. Prisustvo i perzistencija ovih antitela ukazuju na abnormalnu toleranciju, koja je rezultat kombinacije abnormalnog rukovanja autoantigenima sledeći apoptozu i funkcionalni deranžman T i B limfocita. Model autoimune progresije dat je u **Shemi 1**. Precizni mehanizmi koji vode produkciji anti DNA antitela su nepoznati. Štaviše, mehanizmi patogenosti anti DNA antitela i imunih kompleksa još uvek su diskutabilni. Moguće je da se deo patogenosti odnosi na direktnu hidrolitičnu i citotoksičnu aktivnost anti DNA antitela na ćelije različitih tkiva i organa afektiranih bolešću. Patogena anti-DNA antitela mogu da interreaguju sa različitim ćelijskim površinskim proteinima (kao što je miozin 1), koji im omogućuju penetraciju u ćeliju. Nakon ulaska u ćeliju, dolazi do translokacije u nukleus sa vezivanjem za DNA i posledičnom hidrolizom. (1, 2, 3) Ćelijski蛋白 in različitim organima i peptid-mimicirajući antigeni: α -aktinin u glomerulima bubrega, endotelijalnih i mezangijalnih ćelija, receptori za glutamat u nervnim celijama i čitav spektar ćelijskih površinskih proteinima u rasponu veličina od 30–120 KD, sugerisu da je vezivanje vrlo moguć fenomen ukrštene reakcije koji sam po sebi može usloviti patogenost još uvek nepoznatog molekularnog mehanizma(1).

Alternativni mehanizam kojim anti-DNA antitelo može da vodi autoimunom oboljenju jeste kroz interakciju sa receptorima ćelijske smrti, inicijacijom pro-apoptočnog signala, što bi vodilo makar smrti tumorskih ćelijskih linija *in vitro* i lupusnih B-ćelija *in vivo*. (1–2). Iako je fenomen delimično posledica aktivacije kaspaze 3, (1–2) moguća veza između DNA hidrolize i programske smrti ćelije, kao podloga mehanizma u LES-u nisu jasno shvaćeni.

Pečat lupusne bolesti (znak pepoznavanja) je lučenje anti-DNA antitela, koja se sreću u ovom (kao i u nekim drugim autoimunim oboljenjima) kao antids-DNA i kao antiss-DNA. Kliničari smatraju većinom da su anti ss-DNA antitela nespecifična za ovo oboljenje i ne pridaju im veći značaj, dok se antids-DNA antitela smatra-

ju pravim znakom bolesti, specifična su za nju prema kliničkim kanonima i javljaju se u nekih 70%-90% slučajeva u bolesnika s ovom bolešću (1, 2). Bazična istraživanja su pokušala da daju odgovor na to zašto se ipak antiss-DNA antitela javljaju u određenom procentu slučajeva (30–60%) i da li su možda patogena po svojoj prirodi. (1, 2). Kriterijumi za procenu razlika i sličnosti s rezultatima fundamentalnih istraživanja na ovom planu dati su u **Tabeli 1.** Strukturne i funkcionalne osobine anti DNA antitela (vezivanje za neke proteine, kao i njihove osobine hidrolize DNA i citotoksičnosti tumorских ćelija nakon translokacije kroz ćelijsku membranu u jedro) ukazuju na to da i antiss-DNA antitela mogu biti patogena. Sporadične rezultate fundamentalnih istraživanja naročito su upotpunile tri longitudinalne kliničke studije koje su ukazale na neposredni znacaj antiss-DNA antitela u patogenezi lupusa. (1, 2). Pored vezivanja za tzv „planted antigen“ (proteine iz ćelije, recimo bubrežnog endotela) *in vitro* ova antitela mogu da se vežu i za DNA, iako cela DNA ne može biti prezentovana antigen prezentujućom ćelijom (APC) B limfocitu u kontekstu MHC molekule, pošto je proporcija veličina besmisleno nesrazmerna. Šta se onda prezentuje, pitanje je sad? Verovalno samo CpG motiv, moguce ne-metilovan (2).

Nedavno je (1) metodom difrakcije X-zraka (kristalografijom) pokazano (*Tanner 2001*) da mišje monoklonalsko antiss-DNA antitelo posle prepoznavanja timidinskog pentamera u DNA lancu argininom iz Fab fragmenta antitela, vezuje trimer koji se uvlači u hidrofobni džep nastao izmedju triptofana i tirozina u Fab fragmentu IgG antitela, MW 150 kDa (u nekim slučajevima i IgM, MW 900 kDa). Prerekvizit za prepoznavanje je dakle timidinski pentamer a prerekvizit za vezivanje trimer koji ulazi u aminokiselinsku „kopču“. Vezivanje je preduslov za hidrolizu DNA, tipa endonukleaza i napada C-G veze dok ordinarna DNA-zna aktivnost (30 kDa MW) napada A-T veze i po tome se takođe razlikuje od antitela. Ovaj tip antitela, s enzimatskom aktivnošću, prema *Linusu Paulingu* (1944) je nazvan „abzyme“. Istraživanja sa antids-DNA ukazuju da ona preferiraju glikozidne veze u fosfodiestarskoj kičmi lanca DNA i po tome se potpuno razlikuju od antiss-DNA(1). Dakle, ukoliko su tipovi vezivanja različiti onda je verovatno da se i hidroliza drugacije odvija, ali njena konačna neminovnost nakon vezivanja, je ipak, cependanje DNA. Ćelija se radi toga dezintegriše, membrana otvara i nudi poremećenom imunom sistemu ponovo čitav spektar antigena koje sistem ne prepoznaje te ponovo na njih stvara antitela i tako obnavlja „začaranu krug“. Ovo bi dakle, mogao biti mehanizam odgovoran za perpetuum i očuvanje začaranog kruga u lupusu. (1–2) Druga, izuzetno važna osobina anti DNA antitela je njihova citotoksičnost. Ruska škola je pokazala da u lupusu i limfoproliferativnim oboljenjima mešavina anitds-DNA

i antiss-DNA antitela u određenoj koncentraciji (od 10^7 M do 10^{10} M) uzrokuje toksično oštećenje tumorskih ćelijskih linija praćeno fenomenom „laddering“-a što ukazuje na mehanizam sasvim drugaćiji od hidrolize. I zaista, nedavno je utvrđeno da je u ovaj mehanizam delimično uključena aktivnost kaspaze 3, (1–2) enzima odgovornog za injiciranje mehanizama programske ćelijske smrti (apoptoze). Zašto, da li i kada se to događa u lupusu, veoma su značajna pitanja koja traže precizne odgovore. Ovim mehanizmom mogla bi se objasniti i nefrotoksicnost pojedinih slučajeva lupusnog sindroma a možda čak i encefalomijelitis lupusnog tipa.

Sasvim nedavno, antiss-DNA lupusna antitela i antitela normalnih osoba izolovana su originalnom metodom magnetnih perlica prevučenih oligodT probom kao specifičnim supstratom za vezivanje (1), a originalnom fluorescentnom metodom sa obeleženom antiss-DNA probom pokazalo se da antitela bolesnika hidrolizuju dok antitela normalnih osoba ne hidrolizuju obeleženu ssDNA probu (2, 3, 5). Koliko nam je poznato, ovo je prvi dokaz da su antiss-DNA izolovana u veoma prečišćenom stanju (100%) prema Agilent-Lab on chip metodi za utvrđivanje čistoće preparata i prvi dokaz o hidroliticnoj aktivnosti humanog antiss-DNA poliklonalnog IgG antitela.

Na generalno pitanje: zašto se anti DNA antitela uopšte stvaraju, postoji nekoliko potencijalnih odgovora:

1) Moguće je da predstavljaju odbrambeni mehanizam protiv virusnog ili bakterijskog agensa (javljaju se u mleku zdravih majki koje doje).

2) Nastaju u odgovoru imunog mehanizma koji ne prepozna sopstveni antigen.

3) Dva humana virusa iz grupe Parvoviridae (Parvovirus B19 i adeno-asocirani virus 2) (1, 2) su ss DNA virusi i mogli bi se smatrati kandidatima za uzročnike bar jedne uske frakcije u spektru lupusnog sindroma, a stvaranje antitela na njih kao odraz borbe imunog sistema za odstranjivanje tog uzročnika. (1–2).

Ova predpostavka je utoliko značajnija pošto je poznato da parvovirus B19 izaziva „bolest ošamarenog obraza“ u dece, simptomatologijom veoma sličnu lupusu, pritaci se u organizmu i povremeno re-aktivira u sinovijama izazivajući artralgiju. Do nekih 60 godina života 75% populacije je inficirano ovim virusom (2). Takođe je pokazana i asocijacija lupusa sa EB virusom koji je dsDNA po svojoj strukturi. (2). Ovo orijentiše teoriju o lupusnom uzročniku na infekciju kombinovanu s mehanizmima koji nam još nisu poznati (**Shema. 2**) i anulira raniji postulat o konformaciono, dakle fizicko-hemijski izmenjenom prirodnom antigenu domaćina nepoznatog uzroka (1). No, granice između mehanizama često nisu tako striktne, pa je moguće da će budući rad pokazati da je uklapanje više teorija u kauzalnost lupusa neophodno, a mehanizmi nastanka oboljenja ne tako generalni.

ZAKLJUČAK:

Iz izloženog se može naslutiti vizija prevencije lupusa vakcinacijom protiv datog uzročnika: ili imunoterapija vakcinom proizvedenom korišćenjem dendritičnih ćelija „napunjениh“ prečišćenim anti-idiotipskim antitelom, ili čak samo prečišćenim antitetom, što se pokazalo izvodljivo.

Vim u nekim eksperimentalnim mišjim modelima (1). U tom smislu ostaje da se vidi koje dendritične ćelije koristiti (plazmocitoidne ili mijeloidne) i kako aplicirati adjuvans. Rad na ovom izuzetno interesantnom, često fatalnom oboljenju pomoći će da se shvate i mnoge druge bolesti a razluče molekularni mehanizmi koji ih kreiraju.

TABELE I SHEME

Shema 1. Model autoimmune progresije

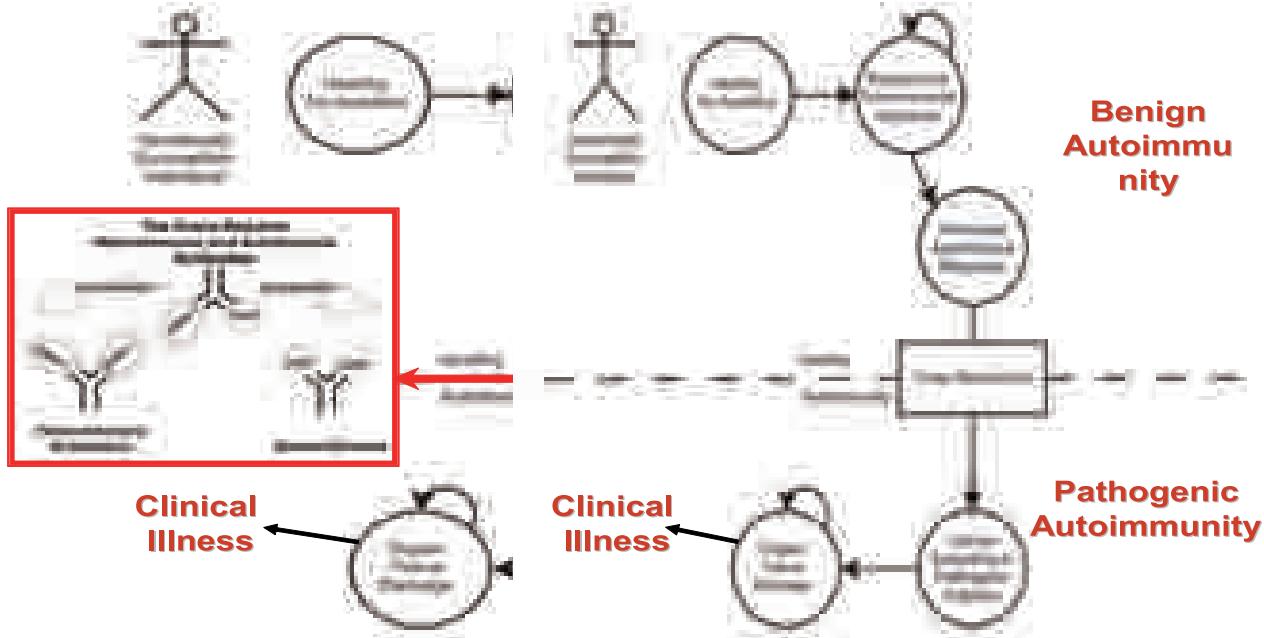
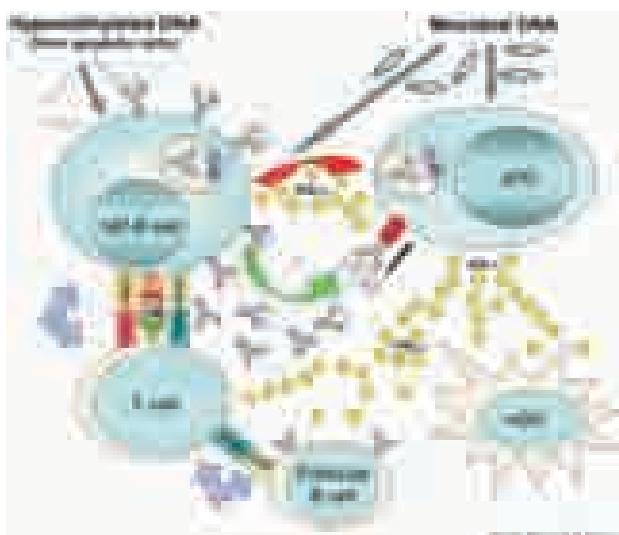


Tabela 1. Sličnosti i razlike između antidsDNA i anti ssDNA antitela

dsDNA antibodies	ssDNA antibodies
Ig CLASS: IgG & IgM	Ig CLASS: IgG & IgM
IgG SUBCLASS: IgG ₃	IgG SUBCLASS: IgG ₁ & IgG ₃
PATHOGENICITY: based upon binding criteria o Some forms of lupus nephritis o CNS involvement o Correlates with disease activity	PATHOGENICITY: based upon binding criteria o Non-pathogenic? o Pathogenic & nephrogenic in human & murine models o Predictors of lupus flares and anti-dsDNA increase in humans
ABZYMES & DNA-HYDROLYTIC ACTIVITY Human and mouse mono and polyclonal	ABZYMES & DNA-HYDROLYTIC ACTIVITY Mouse monoclonal. Human?
CYTOTOXIC ACTIVITY Human polyclonal	CYTOTOXIC ACTIVITY Undetermined...For now

Shema 2. Model urođenog imuniteta o patogenezi lupusa



LITERATURA:

1. **Pavlovic M**, R. Chen, A. Kats, M. Cavallo, S. Saccoccio, P. Keating and J.X. Hartmann: Highly specific novel method for isolation and purification of lupus anti -DNA antibody via oligo- (dT) magnetic beads, 2007. (*ID Annals-1381-002*, Vol. title: The Science of Autoimmunity : Cutting Edge: Advances in Basic Sciences). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007, **1108**: 203–217
2. **Pavlovic M**, Kats AM, Cavallo Michele and JXHartmann „REAL TIME FLUORESCENT NOVEL DEVELOPED METHOD FOR DETECTION AND MONITORING OF HYDROLYTIC ACTIVITIES OF LUPUS ANTI-DNA ANTIBODIES“. 6th International Congress on Autoimmunity , Porto, Portugal, September 10–14, 2008 A-103-0005-0045, oral presentation
3. Kats A, **Pavlovic M**, Cavallo Michele, Frank Mari and JXHartmann: „SUBCLASS DETERMINATION OF LUPUS ANTI-DNA ANTIBODIES OBTAINED BY TWO DIFFERENT PURIFICATION METHODS“ 6th International Congress on Autoimmunity , Porto, Portugal, September 10–14, 2008 A-103-0005-00450 poster presentation
4. **Pavlovic, M**, Cavallo M, Kats A M, Chen R, Mari F and JX Hartmann. Differences between kinetic parameters of hydrolytic activity between DNase 1 and lupus anti-DNA antibody using novel approach. Accepted for poster discussion on the 8th International meeting on lupus, Shangai, China, 2007, 23–27May. Abstract code # PO037
5. Kats A, **Pavlovic, M**, Cavallo, M, Chen, R Mari F and J. X. Hartmann. : Subclass determination and functional features of anti-DNA antibodies obtained by two different purification methods Presented at Forum poster discussion on the 8th International meeting on lupus, Shangai, China, 2007, 23–27May. Abstract code # PO038
6. **Pavlovic, M. , Chen, R. , Kats, A. M. , Cavallo, M. F. , Saccoccio, S Keating, P. , and Hartmann, J. X** Highly specific novel method for purification of Lupus anti-DNA antibody via oligo(dT) magnetic beads. Poster and oral presentation. Presented on 5th International Meeting on Autoimmunity, Sorento, Italy, November 29-December 3rd, 2006 # : 4. AUTO06. 000264
7. Kats, A. , M. , Cavallo, M. , F. , Chen, R. , **Pavlovic, M. , Saccoccio, S. , Keating, P. and Hartmann J. X.** : Dramatic differences in electrophoretic patterns between normal donor and lupus patient anti-DNA antibodies isolated via novel oligo-(dT) magnetic beads method. *Poster presented on 5th International Meeting on Autoimmunity, Sorento, Italy, November29-December 3rd, 2006 # :* 4. AUTO06. 000265

Rad je primljen 12. 11. 2008.