

Pregledni prispevek/Review article

## NOVEJŠI BIOOZNAČEVALCI IN SPREMLJANJE ZNOTRAJCELIČNIH SIGNALNIH POTI PRI AVTOIMUNSKIH BOLEZNIH

NEW BIOMARKERS AND MONITORING INTRACELLULAR SIGNALING  
PATHWAYS IN AUTOIMMUNE DISEASES

Aleš Goropevšek,<sup>1,3</sup> Eugenija Homšak,<sup>2,3</sup> Maksimiljan Gorenjak,<sup>2,3</sup> Ivan Malešič,<sup>2</sup>  
Ivan Krajnc,<sup>1,4</sup> Avrelija Čencič<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Oddelek za biokemijo, Medicinska fakulteta Univerze v Mariboru, Slomškov trg 15, 2000 Maribor

<sup>2</sup> Klinična biokemija, Medicinska fakulteta Univerze v Mariboru, Slomškov trg 15, 2000 Maribor

<sup>3</sup> Oddelek za laboratorijsko diagnostiko, Univerzitetni klinični center Maribor, Ljubljanska 5,  
2000 Maribor

<sup>4</sup> Oddelek za revmatologijo, Univerzitetni klinični center Maribor, Ljubljanska 5, 2000 Maribor

---

### Izvleček

#### Izhodišča

*Autoimunske in kronične vnetne bolezni se še vedno pogosto zdravijo le z nespecifično imunosupresijo, ki ne prinaša ozdravitve.*

*Spoznanje, da so citokini TNF in IFN-alfa bistveni v patogenezi bolezni, kot sta revmatoidni artritis in sistemski lupus eritematosus, pomeni napredek v razumevanju avtoimunskih bolezni. Znotrajcelične signalne poti, ki se aktivirajo kot odgovor na te klinično pomembne citokine, prenašajo signale s kinazno fosforilacijo proteinov in so bistvene za delovanje celic imunskega sistema. Malo je znanega o spremembah teh signalnih poti pri avtoimunskih boleznih.*

*Nedavne klinične raziskave so pokazale, da se spoznanja iz živalskih modelov ne morejo neposredno prenesti na človeka. Za spremljanje aktivnosti bolezni in napoved odziva na novejšo zdravljenje je potrebno razviti nova orodja za spremljanje humanega imunskega odziva. Obetajoče orodje v prihodnosti so novo odkriti biomarkerji. Še več si obetamo od pristopov, ki temeljijo na spremljanju signalnih poti na celični ravni.*

#### Zaključki

*Razviti so bili biokemični analizni sistemi, ki temeljijo na pretočni citometriji in omogočajo profiliranje kinaz in fosfoproteinov na ravni posameznih celic. To bo omogočilo študije signalnih poti pri avtoimunskih in kroničnih vnetnih boleznih, saj so analizni sistemi prilagojeni prav celicam imunskega sistema, npr. v periferni krvi. Prvi rezultati kažejo značilne fosfo-signature citokinov (interferonov) v imunskih celicah bolnikov s SLE.*

*Možnost spremljanja signalnih poti na celični ravni lahko prinese razvoj novih diagnostičnih možnosti, predvsem za spremljanje aktivnosti bolezni in vodenja zdravljenja. Rezultati študij pa lahko nakažejo tudi nove tarče, bolj specifičnega in manj toksičnega, zdravljenja z inhibitorji kinaz.*

**Ključne besede** SLE; pretočna citometrija; citokinske signalne poti; IFN-alfa

---

### Abstract

#### Background

*Almost all current therapeutic concepts in many autoimmune and chronic inflammatory diseases are based on the systemic suppression of immune functions and are not curative. Identification of cytokines TNF and IFN-alpha as major factors in the pathogenesis of*

---

### Avtor za dopisovanje / Corresponding author:

Aleš Goropevšek, dr. med., Oddelek za laboratorijsko diagnostiko, Univerzitetni klinični center Maribor, Ljubljanska 5, 2000 Maribor, e-mail: ales.goropevsek@ukc-mb.si

---

diseases such as rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus (SLE) represent a substantial improvement in understanding of autoimmune diseases. Intracellular signaling pathways that are activated in response to those clinically relevant cytokines, mediate signals through kinase phosphorylation of proteins and are at the core of immune cell function. However, little is known about their changes in autoimmune disease states. Recent trials emphasized the importance of directly assessing the human immune responses, and that not all of what we learn for example in the mouse can be directly translated to humans. Thus, there is a need for the development of tools and assays to directly assess the human immune system, and to predict its responses to novel therapeutic entities. Newly discovered biomarkers represent promising tools. Even more promising are approaches, that are based on monitoring immune signaling on the single cell level.

## Conclusions

A series of assay systems for flow cytometric-based biochemical analysis at the single-cell level for kinase and phosphoprotein profiling have been developed. This will give us opportunity to study signal pathways also in autoimmune and chronic inflammatory diseases, as the analysing systems are adapted to immunocytes for example in peripheral blood. First results show characteristic phospho-signature of cytokines (interferons) in immune cells from SLE patients.

Monitoring signaling pathways on the single cell level can lead to developments in new diagnostic tools, especially in monitoring of disease activity. Results can also identify new targets of more specific and less toxic therapy with kinase inhibitors.

## Key words

SLE; flow cytometry; cytokine signalling; IFN-alpha

## Uvod

Kronične vnetne bolezni so eno glavnih zdravstvenih bremen človeštva. Njihovo zdravljenje, posebej sistemskih vezivno-tkivnih bolezni, pa še vedno temelji na nespecifični sistemski imunosupresiji (kortikosteroidi, citostatiki), ki s seboj prinaša številne stranske učinke in resne zaplete. Poleg tega pogosto nimajo zanesljivih kazalcev aktivnosti bolezni, ki bi jih lahko uporabili pri vodenju toksičnega zdravljenja.<sup>1</sup>

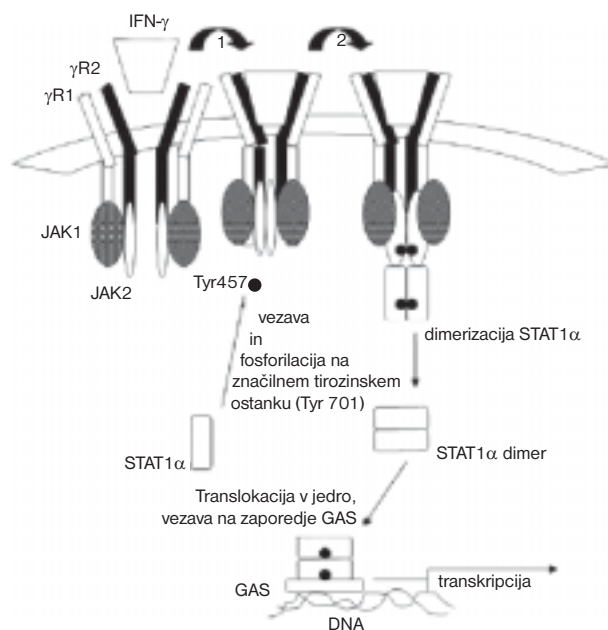
Z razvojem na področju imunologije in s spoznanjem, da so citokini, kot posredniki med imunskimi celicami, bistveni v razvoju avtoimunskih bolezni, se je začelo novo obdobje v zdravljenju teh bolezni. Citokin TNF-alfa je bistven dejavnik v patogenezi revmatoidnega artritisa. Nedavna uvedba blokatorjev-TNF alfa (protiteles in receptorjev) v zdravljenje je pomenila bolj specifično ciljano zaviranje revmatičnega vnetja.<sup>2</sup>

Za napredek v zdravljenju avtoimunskih bolezni pa bo, razen blokade izločenih molekul, potrebno boljše poznavanje mehanizmov delovanja celic, ki omejene mediatorje izločajo in se na njih odzivajo.

Neravnotežja med regulacijskimi T celicami, Th1, Th2 in Th17 odgovorom, povezana z B-celičnimi nepravilnostmi, najdemo v etiologiji večine avtoimunskih bolezni.<sup>3-5</sup> Vzrok disfunkcij teh imunskih celic pa leži v celičnih signalnih sistemih, ki so osnova za njihovo delovanje.

V zadnjih dveh desetletjih so raziskave na tem področju nakazale pomembnost številnih znotrajceličnih signalnih poti, ki vodijo od površinskih receptorjev do genskega uravnavanja.<sup>6</sup> Večina teh poti posreduje signale preko fosforilacije in defosforilacije proteinov z encimi-kinazami oz. fosfatazami.

Med številnimi signalnimi potmi, pomembnimi za imunsko delovanje, so poti Jak-Stat bistvene v cito-



Sl. 1. Model prenosa znotrajceličnega signala po stimulaciji IFN-gama (prirejeno po Darnell et al., 1994; Kotenko et al., 1995). Simboli in okrajšave pomenijo:  $\gamma R1$  – IFN- $\gamma$  receptor-ekstracelularna domena,  $\gamma R2$  – IFN- $\gamma$  receptor-transmembranska domena, JAK1 – Janus Kinaza 1, JAK2 – Janus Kinaza 2, STAT1 $\alpha$  – Signal Transducer and Activator of Transcription.

Figure 1. A model of signal transduction cascade after IFN-gamma stimulation (modified from Darnell et al., 1994; Kotenko et al., 1995). Symbols and abbreviations represent:  $\gamma R1$  – IFN-g receptor extracellular domain,  $\gamma R2$  – IFN-g receptor transmembrane domain, JAK1 – Janus Kinase 1, JAK2 – Janus Kinase 2, STAT1 $\alpha$  – Signal Transducer and Activator of Transcription.

kinskem delovanju. Primer signalne poti Jak-Stat je vezava interferona gama (IFN-gama) na njegov receptor, kar sproži dimerizacijo receptorja, aktiviranje na receptor vezanih kinaz Jak1 in Jak2 in posledično fosforilacijo proteina Stat1 na značilnem tirozinskem (tyr 701) ostanku (Sl. 1).

Proteini STAT so hkrati signalne molekule in transkripcijski faktorji. Po fosforilaciji proteini Stat1 dimerizirajo, sledi prenos-translokacija v jedro, kjer se z vezavo na ustrezno mesto (gama interferon activation site – GAS) aktivira prepisovanje – transkripcija IFN-reguliranih genov, kot je npr. IRF-1 (IFN regulatory factor-1) (Sl. 1).

## Pomen neposrednega spremljanja imunskega odziva pri človeku

Živalski modeli, predvsem eksperimenti z genetsko modificiranimi miškami, so v zadnjih desetletjih prinesli bistven napredek v razumevanju kompleksnih funkcij imunskega sistema.

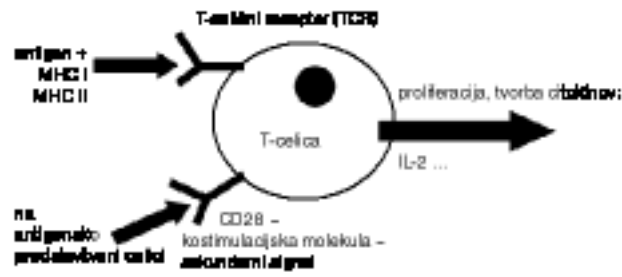
Kljub temu pa je še vedno, razen vakcinacij, zelo malo ciljanih imunoloških opcij zdravljenja imunsko pogojenih bolezni. Izjema so, poleg uporabe omenjenih TNF-alfa antagonistov, anti-CD20 monoklonska protitelesa, ki se uporabljajo pri zdravljenju B-celičnih limfomov in v zadnjem času tudi nekaterih avtoimunskih bolezni.

Nedavne klinične raziskave so jasno pokazale, da se spoznanja iz mišjih modelov ne morejo neposredno prenesti na človeka in da je pri razvoju novega imunološkega zdravljenja potrebno ocenjevati in spremljati človeški imunski odziv.<sup>7</sup>

Mišji modeli pogosto ne zagotavljajo učinkovitosti in varnosti pri prenosu spoznanj bazičnih raziskav v medicino. To se je najbolj jasno pokazalo pri nedavni tragediji v prvi fazi kliničnega testiranja t. i. CD28 superagonistov, anti-CD28 monoklonskih protiteles. Po aplikaciji anti-CD28 protiteles je pri vseh prostovoljcih v omenjenem testiranju nastal hiter sistemski vnetni odgovor, ki je pripeljal do večorganske odpovedi.<sup>7</sup>

CD28 je glavna kostimulacijska molekula, izražena na limfocitih T. V sodobnem razumevanju T-celične aktivacije sta za popolno aktivacijo mirujočih – naivnih limfocitov T, potrebna vsaj dva znotrajcelična signala, ki pripeljeta npr. do proliferacije teh celic in izločanja citokinov. Primarni signal vodi od T-celičnega receptorja (TCR) po prepoznavi antigen/MHC-kompleksov na površini antigensko predstavitevnih celic. Ta signal pa sam po sebi ni dovolj za popolno aktivacijo limfocitov T, dopolniti ga mora sekundarni signal, ki vodi od t. i. kostimulacijskih molekul, kot je CD28 (Sl. 2). Omenjena anti-CD28 protitelesa, ki so usmerjena proti zunajceličnemu epitopu na kostimulacijski molekuli – CD28, pa lahko aktivirajo limfocite T tudi brez zasedenosti TCR/CD3-kompleksa. Tako so jih poimenovali mitogena protitelesa CD28 ali superagonisti CD28. Predhodne raziskave na mišjih in tudi podganah so kazale celo na to, da omenjeni superagonisti CD28 povzročijo proliferacijo in ekspanzijo predvsem t. i. regulacijskih limfocitov T. Slednji so po zadnjih

spoznanjih bistveni v uravnavanju, namreč zaviranju avtoimunosti. Rezultati raziskav na glodalcih so tako nakazovali tudi možnost, da je superagoniste CD28 možno uporabiti tudi pri zdravljenju avtoimunskih bolezni, kot je eksperimentalni avtoimuni encefalomyelitis in adjuvantni artritis.<sup>8</sup>



Sl. 2. Shema T-celične aktivacije: za popolno aktivacijo sta potrebna vsaj 2 signala: preko T-celičnega receptorja (TCR) in kostimulacijske molekule (CD28).

Figure 2. T cell activation: at least 2 signals are needed to fully activate T cells: through T cell receptor (TCR) and costimulation molecules (CD28).

Pri ljudeh v omenjeni raziskavi pa je aplikacija superagonista CD28 pripeljala do izrazitega sistema vnetnega odgovora s tvorbo provnetnih citokinov v t. i. citokinskem viharju (cytokine storm). Šele kasnejše in vitro raziskave na človeških limfocitih T so pokazale, da so znotrajcelične signalne poti, ki se aktivirajo po vezavi superagonista CD28 bistveno drugačne kot pri mišjih ali podganah. Še več, bistvene razlike so tudi v odzivih človeških in limfocitov T primatov, v človeku najbolj sorodnih modelih imunskega sistema.<sup>9</sup>

Za spremljanje aktivnosti imunsko pogojenih bolezni, kot tudi za napoved odziva na novejša zdravljenja, je potrebno razviti nova orodja in teste pri oceni in spremljanju humanega imunskega odziva. Novo odkriti biooznačevalci lahko predstavljajo obetajoče orodje v prihodnosti.

## Biooznačevalci

Biooznačevalce lahko definiramo kot celične, biokemične, molekularne ali genetske dejavnike, s katerimi lahko normalne ali patološke biološke procese prepoznavamo in/ali spremljamo in imajo diagnostično ali prognostično vrednost. Čeprav se izraz zgodovinsko nanaša na analite v bioloških vzorcih (raziskave so še vedno osredotočene na najbolj dostopne vzorce, kot so kri, slina, urin), lahko vsako meritev, ki korelira z bolezenskim stanjem osebe ali odgovorom na zdravljenje, imenujemo biooznačevalec. Biooznačevalci so se razvili od enostavnih, posameznih laboratorijskih parametrov, v multioznačevalske genomske/proteomske profile. Postgenomsko obdobje označuje porast hitrih tehnologij, kot so genski in proteinski čipi. Danes je večji problem od identifikacije številnih novih biooznačevalcev opredelitev njihovega pravega biološkega pomena.

## Sistemi lupus eritematozus (SLE)

Sistemi lupus eritematozus (SLE) je prototip sistemske avtoimunske bolezni, pri kateri odlaganje imunskih kompleksov pripelje do vnetja in okvare številnih različnih tkiv in organov. Označuje ga izguba B-celične tolerance in tvorba protiteles proti različnim jedrnim komponentam (histoni, nukleosomi, dsDNK).<sup>5</sup> Za bolezen so značilne številne spremembe v imunskem sistemu, v patogenezi bolezni pa so pomembni vplivi okolja in genetski dejavniki.

Zaradi pomanjkanja specifičnega zdravljenja za SLE si revmatologi želijo biooznačevalce, ki bi korelirali z aktivnostjo bolezni in bi jih bilo možno uporabiti pri vodenju zdravljenja.

Bolniki pa bodo v prihodnosti od svojih zdravnikov morda želeli interpretacijo izvidov genetskih biooznačevalcev, s pomočjo katerih bi lahko ocenili tveganje za razvoj SLE pri njihovih potomcih.

## Genetski biooznačevalci pri SLE: nagnjenost k bolezni

Čeprav različne mutacije posameznih genov lahko pripeljejo do lupusa podobnih fenotipov pri eksperimentalnih živalskih modelih, je humani SLE poligenetska bolezen.

Z zaključkom projekta človeškega genoma je znano zaporedje nukleotidov v človeškem genomu. Nedavni tehnološki napredek pa je prinesel še možnost hitre analize milijonov različic – polimorfizmov posameznih nukleotidov (single-nucleotide polymorfism-SNP) v genomu med posamezniki. Uporaba teh tehnologij omogoča odkritje vedno večjega števila genetskih variant, povezanih z nagnjenostjo k avtoimunskim boleznim. Nedavno so bile zaključene tudi asociacijske študije celotnega genoma (genomewide association studies) pri bolnikih s SLE.<sup>10,11</sup> V teh mednarodnih projektih so milijone genetskih polimorfizmov testirali pri tisočih bolnikov s SLE in še več zdravih preiskovancih. Rezultati teh študij kažejo na vpletenost številnih komponent imunskega sistema v patogenezo SLE (Razpr. 1).

Razpr. 1. *Nove in potrjene genetske variante, povezane s pomembnim tveganjem za razvoj SLE v dveh asociacijskih študijah celotnega genoma.*

Table 1. *New and confirmed genetic variants conferring a significant risk of SLE in two genomewide association studies.*

Gen	Opisana funkcija	Celična lokacija
IRF5	Produkcija interferona alfa (IFN-alfa)	(plazmacitoidne) dendritične celice
KIAA1542	Povezava z IRF7 – produkcija IFN-alfa	(plazmacitoidne) dendritične celice
STAT4	Signalna pot v odgovoru na citokine	T in NK celice
	Aktivacija odgovora na IFN-alfa	makrofagi
PTPN22	Inhibicija limfocitne aktivacije	T limfociti
BLK	Aktivacija – signalna pot v celici	B limfociti
FCGR2A	Odstranjevanje imunskih kompleksov	makrofagi
ITGAM	Adhezija levkocitov na endotel	(nevtrofilni) levkociti
HLA	Prezentacija antigena	antigensko predstavitevne celice
PXK	Neznan učinek serin-treonin kinaze	

Kažejo tudi na veliko variabilnost v genih, ki kodirajo mediatorje naravne in antigensko specifične imunosti, vključno s komponentami signalnih poti, ki uravnavajo limfocitno aktivacijo. Šele kombinacija neugodnih različic – polimorfizmov v teh poteh v različnih celicah imunskega sistema lahko pripelje do bolezni, kot je SLE.

Učinek omenjenih polimorfizmov v fenotipu bolezni je v primerjavi z genetskimi učinki pri monogenetskih boleznih, ki se dedujejo po Mendlovih zakonih, minimalen.

Kljub temu pa je v porastu število podjetij, ki tudi preko spleta ponujajo vpogled v vaš genom in številne variante, ki so bile v dosedanjih raziskavah povezane z nagnjenostjo k boleznim. Na osnovi takšnega vpogleda pa vam v "izvidu" podajo tudi podatek, kolikokrat bolj ste od povprečnega človeka nagnjeni k določenim avtoimunskim boleznim. Z interpretacijo podobnih "izvidov" se bodo verjetno v prihodnosti soočili tudi zdravniki.

Iskanje genetskih asociacij je seveda potrebno razumeti kot prvi korak v opredeljevanju zapletenih molekularnih poti, ki prispevajo k bolezni. Asociacijske študije celotnega genoma pri bolnikih s SLE kažejo na pomen T- in B-limfocitnih signalnih poti in poti, ki uravnavajo produkcijo in odziv na citokine (predvsem interferon alfa), v patogenezi bolezni (Razpr. 1). Šele razumevanje teh (signalnih) poti na proteinski in celični ravni lahko pripelje do novejšega zdravljenja in uporabne diagnostike za vse bolnike s SLE.

## Opredeljevanje mehanizmov bolezni – patogenih signalnih poti v celicah

Znotrajcelične signalne poti so osnova vsakega celičnega procesa, od proliferacije, distribucije v celičnem ciklu do programirane celične smrti – apoptoze. Znotrajcelični signali se prenašajo v kompleksnem procesu proteinsko-proteinskih interakcij, posttranslacijskih modifikacij (npr. acetilacije in fosforilacije) in proteinskih translokacij. Fosforilacijo proteinov, ki jo katalizirajo encimi – kinaze in zavirajo fosfataze, najdemo v večini signalnih poti. Proteinske kinaze tako sodelujejo pri prenosu in procesiranju signalov – informacij o dogodkih v notranjosti celice (npr. poškodba DNK) ali dejavnikih iz okolja (npr. interakcije z drugimi celicami, citokini ali rastni faktorji). Kinaze igrajo tako bistveno vlogo pri številnih celičnih in fizioloških procesih: v metabolizmu, proliferaciji in diferenciaciji celic, homeostazi, komunikaciji med celicami in s tem v delovanju imunskega sistema. Kinaze lahko zato predstavljajo odlično izhodiščno točko v iskanju novih biooznačevalcev in profilov oz. signatur bolezni, ki hkrati daje vpogled v biološke mehanizme bolezni.

## Pomen fosfosignalnih poti pri boleznih

Zaradi pomembne vloge kinaz v normalni fiziologiji najdemo aberantno kinazno aktivnost v patogenezi

številnih boleznih. Večina boleznih, kot so malignomi, nevrološke in imunsko pogojene bolezni, je povezana s kinazno disfunkcijo.<sup>12-18</sup> Aktivnost kinaze pri boleznih je lahko zmanjšana ali povečana. Pomanjkanje tirozinske kinaze JAK3 povzroča npr. imunsko pomanjkljivost – SCID (severe combined immunodeficiency), povečano konstitutivno kinazno aktivnost fuzijskega produkta Bcr-Abl pa najdemo v patogenezi kronične mieloične levkemije – KML.<sup>16</sup>

Skladno z udeležbo kinaz v patogenezi številnih boleznih je tudi zanimanje za razvoj in terapevtsko aplikacijo farmakoloških aktivatorjev in inhibitorjev kinaz. Številni kinazni inhibitorji se razvijajo in tudi že klinično uporabljajo. Kinaze so tako postale druga največja skupina farmacevtskih tarč. Morda najbolj znan primer tarčne terapije kinaz je imatinib mesilat (Gleevec), ki specifično deluje na omenjeni protein bcr-abl, ki nastane z značilno translokacijo pri večini bolnikov s KML. Gleevec, ki ga je FDA odobrila za klinično uporabo leta 2001, je prvi primer uspešne tarčne terapije kinaze in osnova za razvoj novega ciljanega molekularnega zdravljenja.<sup>18</sup>

Raziskave kinaznih signalnih poti in njihovih sprememb, povezanih z določenimi boleznimi tako ne pripeljejo le do novih biooznačevalcev patogeneze, napredovanja bolezni in odpornosti na zdravljenje. Dajejo vpogled v bistvene mehanizme bolezni in lahko nakažejo nove tarče bolj učinkovitega in manj toksičnega zdravljenja.

## Primeri kinazne signalne disfunkcije pri avtoimunskih boleznih

Avtoimunske bolezni, kot sta revmatoidni artritis (RA) in sistemski lupus eritematozus (SLE), označujejo izrazite spremembe ravnotežja Th1 in Th2, čezmerna tvorba avtoprotiteles, deregulacija tvorbe citokinov in neustrezna odzivnost T- in B-limfocitov v splošnem. Znotrajcelične signalne poti pa določajo tudi T- in B-celično funkcijo.

Večina udeleženih signalnih poti uporablja fosfoproteine kot signalne mediatorje. Tako lahko pričakujemo, da bodo ravnotežja fosfoproteinov porušena v B- in T-limfocitih med napredovanjem bolezni. Primeri kinaznih sprememb v limfocitih B med avtoimunsko progresijo vključujejo nenormalne signalne poti iz B-celičnega receptorja (BcR) preko kinaze Lyn in tirozinske fosfataze CD45.<sup>19</sup> Pri SLE je v T-celicah ekspresija zeta verige T-celičnega receptorja zmanjšana, vendar povzroči kostimulacija teh celic nenavadno povečano globalno fosforilacijo.<sup>20</sup> Pri 80 % bolnikov s SLE so našli v limfocitih močno znižanje podenote RI $\beta$  proteinske kinaze A.<sup>21</sup>

Tako obstajajo številni primeri kinazne modulacije med avtoimuno disfunkcijo.

Specifični citokinski profili so prav tako povezani s patogenimi imunskimi odzivi.<sup>22</sup> Takšni citokinski profili bi imeli še večjo diagnostično oz. napovedno vrednost, če bi jih lahko korelirali s profili aktiviranja njihovih tarčnih kinaz (npr. sistema JAK-STAT) v celicah.

## Celični biooznačevalci pri SLE: pomen citokinov – interferonov

Pretočna citometrija omogoča določanje podvrst limfocitov T, B in drugih celic imunskega sistema z imunofenotipizacijo, tj. določanjem površinskih označevalcev celic. Opredelevitev podvrst imunskih celic s pretočno citometrijo je pomembna za razumevanje avtoimunskih boleznih in za razvoj njihove diagnostike. Možno je slediti populacijam celic, ki so bistvene v patogenezi bolezni. Taki celični parametri so pogosto boljši kazalci aktivnosti bolezni kot obstoječi klinični in laboratorijski kazalci. Skupaj z novimi parametri humoralne imunosti, npr. profili avtoprotiteles in citokinov, jih uvrščajo med najbolj obetavne biooznačevalce aktivnosti bolezni.<sup>1</sup>

Bolniki s SLE imajo pogosto limfopenijo, ki zajema tako T- kot B-celični kompartment. Posebej izrazite so spremembe v B-celični homeostazi. Zmanjšana je frekvenca in absolutno število tako naivnih kot spominskih limfocitov B v periferni krvi. Nasprotno pa je močno zvišana frekvenca neobičajnih subpopulacij limfocitov B, ki jih pri zdravih preiskovancih praktično ne najdemo.<sup>23, 24</sup> Pri SLE npr. v obdobjih aktivne bolezni naraste število t. i. plazmablastov, opredeljenih s površinskimi označevalci kot celice CD19+CD20-CD27++CD38++. Plazmablasti so predhodniki plazmatk, ki tvorijo avtoprotitelesa pri SLE. V remisiji bolezni se število plazmablastov v periferni krvi normalizira. Kot že omenjeno so takšni celični parametri pogosto boljši kazalci aktivnosti bolezni kot obstoječi laboratorijski in klinični kazalci.<sup>24</sup>

Spremembe v T-celični vrsti so prav tako za določene avtoimune bolezni značilne in korelirajo z aktivnostjo bolezni. SLE označuje zvišano število CD8 limfocitov T z efektorskim fenotipom.<sup>25</sup>

Med najbolj obetavne biooznačevalce aktivnosti SLE se uvršča tudi določanje citokinov, posebej interferona alfa (IFN-*alfa*).<sup>1</sup>

Na povezavo med interferonom alfa in humanim SLE so najprej kazala klinična opažanja: razvoj SLE med zdravljenjem z IFN-*alfa* in ugotovitev zvišanih serumskih vrednosti IFN-ov tipa 1 pri mnogih bolnikih s SLE.<sup>26</sup> Na neposredno vpletenost IFN-*alfa* v patogenezo SLE kaže raziskava Blanca s sod.,<sup>27</sup> ki je pokazala, da serum SLE pospeši diferenciacijo monocitov v dendritične celice (DC) na način, odvisen od IFN-*alfa*. Nezrele dendritične celice (DC), ki nosijo lastne antigene, so bistvene za vzdrževanje periferne tolerance, saj lastne antigene prezentirajo celicam T brez ustrezne kostimulacije, kar pripelje do T-celične anergije/deplecije. IFN-*alfa* bi bil lahko odgovoren za nenadzorovano aktivacijo takih DC, ki nosijo lastne antigene apoptotičnih celic in posledično za izgubo tolerance pri bolnikih z dedno nagnjenostjo k avtoimunosti. Dendritične celice, ki v glavnem tvorijo interferon alfa, imenujemo plazmacitoidne dendritične celice (pDC/IPC). Slednje morda aktivirajo imunski kompleksi, ki vsebujejo protitelesa anti-DNK in DNK iz apoptotičnih celic.<sup>28</sup> Tako se lahko vzpostavi začaran krog produkcije IFN-*alfa* in njenih posledic pri SLE. S povečanim nastajanjem interferona se lahko pojasni tudi poslabšanja bolezni ob (predvsem virusnih) in-

fekcijah. Analize ekspresije genov v krvnih mononuklearnih celicah so pokazale, da je pri veliki večini bolnikov s SLE izražena t. i. interferonska (IFN) signatura.<sup>29, 30</sup>

## Fosfosignalne signature citokinov in interferonov pri avtoimunskih boleznih

Odkritje, da so citokini (TNF) in interferoni (IFN-alfa) bistveni v patogenezi bolezni, kot sta revmatoidni artritis in sistemski lupus eritematozus (SLE), je prineslo napredek v razumevanju avtoimunskih bolezni. Še vedno pa je malo znanega o znotrajceličnih signalnih poteh, ki se aktivirajo kot odgovor na te klinično pomembne citokine. Še manj je znanega o spremembah teh signalnih poti pri avtoimunskih boleznih.

Ker do nedavnega ni bilo možno spremljati signalnih poti na ravni posameznih celic, je zelo malo raziskav, ki bi opisovale aktivacijske profile subpopulacij imunskih celic v odgovoru na interferone in citokine. Raziskave signalnih dogodkov v celicah so bile omejene na analize celičnih linij in na metode, ki temeljijo na liziranem materialu velikega števila, tudi funkcionalno, različnih celic. Take analize ne dajejo jasnega vpogleda v fosforilacijo proteinov na celični ravni, posebej ne v subpopulacijah limfocitov in dendritičnih celic, ki so bistvene v imunskem odzivu. Tako tudi ni bilo možno spremljati in razumeti celične signalne dis-

funkcije med bolezenskimi procesi v vzorcih bolnikov. Zato smo z novo razvito multiparametrično tehniko na osnovi pretočne citometrije pričeli s preučevanjem aktivacije proteinov STAT v subpopulacijah celic imunskega sistema.<sup>31</sup> S pristopom, ki omogoča analizo polne krvi (brez separacije celic), smo odkrili konstitutivno fosforilacijo STAT5 v subpopulaciji limfocitov T pri testiranih bolnikih s SLE. Pri bolnikih s SLE ista subpopulacija kaže tudi največji odziv na interferon-alfa s fosforilacijo proteina STAT-1.<sup>32</sup> Celice v periferni krvi bolnikov SLE nosijo tako podpis oz. signaturo citokinov interferonov, ki so jim med sistemskim vnetnim odgovorom izpostavljene. Taka signatura in odziv celice na citokin, ki je bistven v patogenezi bolezni, lahko predstavlja idealen kazalec aktivnosti bolezni. Interferoni tipa 1 so po zadnjih dognanjih bistveni dejavniki v patogenezi SLE in drugih avtoimunskih bolezni (tudi diabetesa-tip I). Dosedanje raziskave so kazale na večjo tvorbo IFN-alfa pri SLE. V levkocitih bolnikov s SLE je spremenjen (višji) tudi odziv na IFN-alfa (Sl. 3), kar verjetno še dodatno prispeva k začaranemu krogu te bolezni in zagonom ob npr. virusnih okužbah. Boljše razumevanje vplivov interferonov tipa I na celice imunskega sistema lahko pripelje do bolj specifične terapije SLE in drugih avtoimunskih bolezni. Spremljanje znotrajceličnih signalnih poti v celicah imunskega sistema pa lahko da tudi nova, bolj uporabna orodja v diagnostiki in vodenju bolezni.

## Zaključki

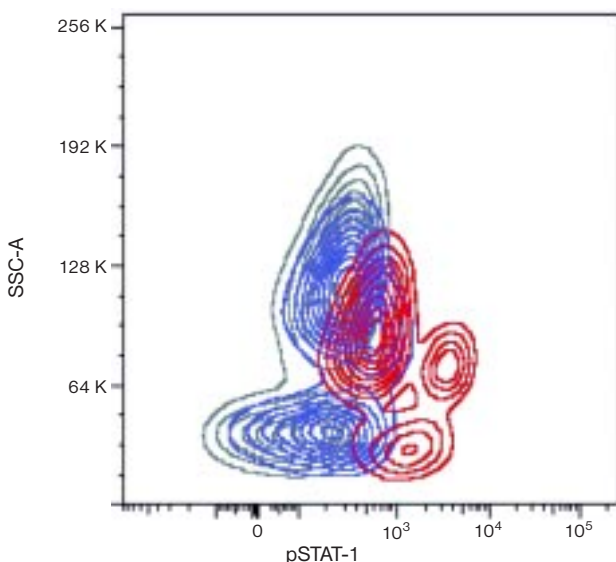
Avtoimunske bolezni, kot je SLE, so izredno heterogene, tako klinično kot serološko. Ob odkritju bolezni ni možno napovedati, kateri bolniki bodo imeli težji potek bolezni ali življenje ogrožujoče pojave. Podobno tudi ni jasno, zakaj se npr. SLE pojavi v različnih obdobjih življenja bolnika, zakaj pride do remisije, relapsa in agresivnega poteka bolezni.

Prav tako še vedno ni možno napovedati, kateri bolniki bodo odgovorili na različna zdravila in pri katerih se bodo pojavili stranski učinki obstoječega zdravljenja.

Z novimi genomskimi in proteomskimi tehnologijami odkriti biomarkerji so lahko kliniku v pomoč. Mora pa se pri tem zavedati, da odkrivanje novih bioznačevalcev bolezni pogosto temelji le na iskanju statističnih razlik med skupinami bolnikov, ki npr. na določeno zdravilo odgovorijo, in tistih, ki ne.

Če lahko npr. polimorfizem enega nukleotida (SNP) in statistika loči med slednjima skupinama, pa o biološkem pomenu bioznačevalca ne odloča statistično orodje, uporabljeno v raziskavi. Bistveno je razumevanje, kako nek bioznačevalec zrcali mehanizme v patogenezi bolezni in zavedanje, da zdravimo bolnike, ne bioznačevalcev.

Danes je možno s pristopi, ki jih imenujejo proteomika na celični ravni in so bili nedavno prvič uporabljene na univerzi Stanford, spremljati kinazne signalne poti v redkih podvrstah imunskih celic, bistvenih v imunskih odzivih.<sup>33, 34</sup> Kljub nedavnemu razvoju so se novi pristopi v dosedanjih kliničnih raziskavah že iz-



Sl. 3. Močnejša fosforilacija STAT1 v odgovoru na IFN-alfa v levkocitih SLE: ravni pSTAT1 po *ex vivo* stimulaciji z IFN-alfa v levkocitih bolnice SLE (prikazano rdeče) in zdravem preiskovancu (prikazano temno modro).

Figure 3. Higher STAT1 phosphorylation in response to IFN-alpha in SLE leukocytes: pSTAT1 levels after *ex vivo* IFN-alpha stimulation in leukocytes from SLE patient (shown in red) and healthy control (shown in dark blue).

kazali v primerih, kjer koncept (klasičnih) biooznačevalcev odpove.<sup>35-37</sup>

Avtoimunske bolezni se kažejo na ravni proteoma in so povezane z nepravilnostmi v kinaznih poteh, citokinski ekspresiji in tvorbi avtoprotiteles. Kinazne poti imajo bistveno vlogo v imunskem reguliranju. Dosedanje raziskave so skušale opredeliti vlogo samo nekaj kinaz pri SLE in še to s pomočjo starejših metod.

Možnost globalnega spremljanja kinaznih signalnih poti, npr. v imunskih celicah periferne krvi<sup>31,32</sup> bolnikov, bo poleg odkritja novih biooznačevalcev dala vpogled v mehanizme bolezni, kar bo prispevalo k boljši diagnostiki kot tudi morebitnim novim oblikam zdravljenja avtoimunskih bolezni.

## Literatura

- Illei GG, Tackey E, Lapteva L, Lipsky PE. Biomarkers in systemic lupus erythematosus. II. Markers of disease activity. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 2048-65.
- Singh R, Robinson DB, El-Gabalawy HS. Emerging biologic therapies in rheumatoid arthritis: cell targets and cytokines. *Curr Opin Rheumatol* 2005; 17: 274-9.
- Gutcher I, Becher B. APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *J Clin Invest* 2007; 117: 1119-27.
- Kotzin BL. The role of B cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2005; 32 Suppl 73: 14-8.
- Shlomchik MJ, Craft JE, Mamula MJ. From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 2001; 1: 147-53.
- Hunter T. Signaling-2000 and beyond. *Cell* 2000; 100: 113-27.
- Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, Brett SJ, Castello-Cortes A, Brunner MD, et al. Storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med* 2006; 355: 1018-28.
- Rodríguez-Palmero M, Franch A, Castell M, Pelegri C, Perez-Cano FJ, Kleinschnitz C, et al. Effective treatment of adjuvant arthritis with a stimulatory CD28-specific monoclonal antibody. *J Rheumatol* 2006; 33: 110-8.
- Müller N, van den Brandt J, Odoardi F, Tischner D, Herath J, Flügel A, Reichardt HM. A CD28 superagonistic antibody elicits 2 functionally distinct waves of T cell activation in rats. *J Clin Invest* 2008; 118: 1405-16.
- Hom G, Graham RR, Modrek B, Taylor KE, Ortmann W, Garnier S, et al. Association of systemic lupus erythematosus with C8orf13-BLK and ITGAM-ITGAX. *N Engl J Med* 2008; 358: 900-9.
- International Consortium for Systemic Lupus Erythematosus Genetics (SLEGEN). Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PXX, KIAA1542 and other loci. *Nat Genet* 2008; 40: 204-10.
- O'Shea JJ, Husa M, Li D, Hofmann SR, Watford W, Roberts JL, et al. Jak3 and the pathogenesis of severe combined immunodeficiency. *Mol Immunol* 2004; 41: 727-37.
- James C, Ugo V, Casadevall N, Constantinescu SN, Vainchenker W. A JAK2 mutation in myeloproliferative disorders: pathogenesis and therapeutic and scientific prospects. *Trends Mol Med* 2005; 11(12): 546-54.
- Tao J, Van Esch H, Hagedorn-Greife M, Hoffmann K, Moser B, Raynaud M, et al. Mutations in the X-linked cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5/STK9) gene are associated with severe neurodevelopmental retardation. *Am J Hum Genet* 2004; 75: 1149-54.
- Playford MP, Schaller MD. The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene* 2004; 23: 7928-46.
- Wong S, Witte ON. The BCR-ABL story: bench to bedside and back. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 247-306.
- Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 2001; 411: 355-65.
- Druker BJ. STI571 (Gleevec) as a paradigm for cancer therapy. *Trends Mol Med* 2002; 8 Suppl 4: 14-8.
- Liou SS, Solomou EE, Dimopoulos MA, Panayiotidis P, Mavrikakis MM, Sfikakis PP. B-cell kinase lyn deficiency in patients with systemic lupus erythematosus. *J Invest Med* 2001; 49: 157-65.
- Liou SS, Ding XZ, Dennis GJ, Tsokos GC. Altered pattern of TCR/CD3-mediated protein-tyrosyl phosphorylation in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. Deficient expression of the T cell receptor zeta chain. *J Clin Invest* 1998; 101: 1448-57.
- Khan IU, Laxminarayana D, Kammer GM. Protein kinase A RI beta subunit deficiency in lupus T lymphocytes: bypassing a block in RI beta translation reconstitutes protein kinase A activity and augments IL-2 production. *J Immunol* 2001; 166: 7600-5.
- Utz PJ. Protein arrays for studying blood cells and their secreted products. *Immunol Rev* 2005; 204: 264-82.
- Arce E, Jackson DG, Gill MA, Bennett LB, Banchereau J, Pascual V. Increased frequency of pre-germinal center B cells and plasma cell precursors in the blood of children with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2001; 167: 2361-9.
- Jacobi AM, Odendahl M, Reiter K, Bruns A, Burmester GR, Radbruch A, et al. Correlation between circulating CD27 high plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 1332-42.
- Blanco P, Pitard V, Viallard JF, Taupin JL, Pellegrin JL, Moreau JF. Increase in activated CD8+ T lymphocytes expressing perforin and granzyme B correlates with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 201-11.
- Ronnblom LE, Alm GV, Oberg KE. Autoimmunity after alpha-interferon therapy for malignant carcinoid tumors. *Ann Intern Med* 1991; 115: 178-83.
- Blanco P, Palucka AK, Gill M, Pascual V, Banchereau J. Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. *Science* 2000; 294: 1540-3.
- Bave U, Vallin H, Alm GV, Ronnblom L. Activation of natural interferon-alpha producing cells by apoptotic U937 cells combined with lupus IgG and its regulation by cytokines. *J Autoimmun* 2001; 17: 71-80.
- Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 2610-15.
- Bennett L, Palucka AK, Arce E, Cantrell V, Borvak J, Banchereau J, et al. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med* 2003; 197: 711-23.
- Goropevšek A, Gradišnik L, Gorenjak M, Krajnc I, Cencič A. Monitoring intracellular signalling pathways in subsets of immune cells from whole blood in autoimmune diseases. In: Poklar Ulrih N, Abram V, Cigić B, eds. 7. srečanje Slovenskega biokemijskega društva z mednarodno udeležbo, 26.-29. september 2007. Zbornik povzetkov. Ljubljana: Slovensko biokemijsko društvo; 2007.
- Goropevšek A, Homšak E, Gorenjak M, Krajnc I, Cencič A. Monitoring anti-apoptotic cytokine signalling in subsets of SLE T cells. In: 15<sup>th</sup> Euroconference on Apoptosis and 4<sup>th</sup> Training course on Concepts and methods in programmed cell death, Portoroz, Slovenia, October 26-31, 2007. Programme and book of abstracts. European cell death organization. Ljubljana: »Jožef Stefan« Institute, 2007.
- Perez OD, Nolan GP. Simultaneous measurement of multiple active kinase states using polychromatic flow cytometry. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 155-62.
- Irish JM, Kotecha N, Nolan GP. Mapping normal and cancer cell signalling networks: towards single-cell proteomics. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(2): 146-55.
- Yael Gernez Y, Tirouvanziam R, Nguyen KD, Herzenberg LA, Krensky AM, Nadeau KC. Altered phosphorylated signal transducer and activator of transcription profile of CD4+CD161+ T cells in asthma: Modulation by allergic status and oral corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 1441-8.

36. West M, Koons A, Crandall M, Skinner R, Worley M, Shapiro MB. Whole blood leukocyte mitogen activated protein kinases activation differentiates intensive care unit patients with systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *J Trauma* 2007; 62: 805-11.
37. Irish JM, Hovland R, Krutzik PR, Perez OD, Bruserud Ø, Gjertsen BT, Nolan GP. Single cell profiling of potentiated phospho-protein networks in cancer cells. *Cell* 2004; 118: 217-28.

---

Prispelo 2008-05-09, sprejeto 2008-09-12

---