

Attività Dnasica, apoptosi e produzione autoanticorpale nel LES

D. Villalta^a, E. Tonutti^b, R. Tozzoli^c, N. Bizzaro^d

^a *Immunologia Clinica e Virologia- DML- A.O. "S. Maria degli Angeli", Pordenone*

^b *Allergologia e Immunopatologia- DML- A.O- "S. Maria della Misericordia", Udine*

^c *Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, Ospedale Civile di Latisana (UD)*

^d *Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Civile di Tolmezzo (UD)*

Introduzione

Il lupus eritematoso sistemico (LES) è una malattia autoimmune caratterizzata dalla produzione di numerosi autoanticorpi, di cui il marcatore sierologico più caratteristico è rappresentato dagli anticorpi anti-DNA a doppia elica (dsDNA). L'evento iniziale capace di indurre la formazione degli anti-dsDNA è sempre stato uno dei punti più dibattuti dai ricercatori, dal momento che è raramente stata dimostrata la presenza di DNA in circolo nei pazienti con LES, e inoltre il DNA di per sé non sembra essere immunogenico. Dall'inizio degli anni '90 sono stati pubblicati una serie di studi dai quali emergerebbe come non il DNA, ma il complesso DNA-istoni (nucleosoma) funge da immunogeno e quindi capace di stimolare una risposta autoanticorpale^{1,2}. Solo secondariamente, per "spreading epitopico" verrebbe indotta la formazione degli anti-dsDNA. Una volta stabilito che l'autoantigene fondamentale nel LES è rappresentato dai nucleosomi, rimaneva da stabilire quale fosse il processo capace di portare alla rottura della tolleranza immunologica verso tale componente nucleare. Studi in modelli murini e alcune evidenze in pazienti con LES hanno messo in luce come una disregolazione della apoptosi poteva rivestire un importante ruolo patogenetico, da un lato portando ad un incremento autoantigenico in circolo, dall'altro ad una alterazione della tolleranza periferica.

Disregolazione della apoptosi nel LES

Con il termine apoptosi, coniato da Kerr³ nel 1972, si intende un processo di morte cellulare programmata sotto stretto controllo genico, il quale, all'interno di un organismo pluricellulare, ha lo scopo di garantire, assieme al processo di mitosi, il mantenimento dell'omeostasi numerica. Nel sistema immunitario, sia l'eliminazione selettiva delle cellule timi-

che autoreattive, sia lo spegnimento dei cloni alla fine di una risposta immunitaria si avvalgono dell'apoptosi. Inoltre, le cellule citotossiche agiscono inducendo le cellule bersaglio al suicidio cellulare, inserendovi un enzima (granzyme B) analogo alle caspasi, i tipici effettori dell'apoptosi, come di seguito descritto. L'apoptosi è quindi molto importante nel sistema immunitario, sia nell'ontogenesi, sia nell'omeostasi, sia nel meccanismo della immunità cellulo-mediata.

A differenza di quanto avviene nella necrosi cellulare, in cui ai fenomeni di cariolisi e rigonfiamento citoplasmatico segue il riversamento all'esterno del contenuto cellulare con successiva reazione infiammatoria, nell'apoptosi si ha un fenomeno di condensazione del citoplasma e della cromatina con successiva formazione di corpi apoptotici e frammentazione cellulare, ma la membrana plasmatica rimane integra, senza fuoriuscita del contenuto cellulare, e in condizione fisiologiche ciò determina una morte "pulita", senza infiammazione né danni all'organismo.

È ora noto che il programma apoptotico si avvale di molecole specifiche, i cui geni sono altamente conservati e capaci di veicolare segnali pro-apoptotici (Fas/APO1/CD95, TNF, TRAIL, etc.) o anti-apoptotici (HSP, Bcl2, etc). Quando una molecola di membrana a funzione pro-apoptotica si lega al suo ligando o a un anticorpo agonista, si ha una modifica conformazionale della stessa che porta ad una alterazione del dominio intracellulare denominato DD ("Death Domain") che favorisce così l'assemblaggio di un complesso formato da uno o più adattatori e da una pro-caspasi iniziatrice, come la pro-caspasi 8 che a sua volta attiva delle proteasi endocellulari denominate caspasi 3, 6, 7, che tagliano i loro bersagli a valle di una breve sequenza di quattro aminoacidi, l'ultimo dei quali è un residuo di acido aspartico. Uno dei più importanti bersagli delle caspasi è ICAD, l'inibitore di CAD (Caspase Activated Dnase), una endonucleasi specifica dell'apoptosi, la qua-

le determina la frammentazione internucleosomica della cromatina. Nel corso del processo apoptotico, inoltre, una delle prime modifiche della cellula coinvolge i fosfolipidi della membrana plasmatica: la fosfatidilserina (PS), localizzata di norma nello strato citosolico, viene trasferita nello strato esterno con un meccanismo "a flip-flop". Alla PS si associano anche altre molecole quali la beta2-glicoproteina I, l'annexina I e V. Tutto ciò invia ai macrofagi un segnale di appetibilità ("eat-me"), i quali, tramite recettori di superficie per PS e/o trombospondina, avviano un processo di fagocitosi.

Evidenze sperimentali dimostrerebbero come sia nel topo che nei pazienti con LES ci siano alterazioni quali-quantitative del processo apoptotico. Se da un lato sembra esserci un incremento della apoptosi, ipoteticamente determinato da possibili stimoli scatenanti il processo autoimmune (virus, radiazioni, UV, farmaci, attivazione di cellule citotossiche o NK), con conseguente incremento dei nucleosomi in circolo, dall'altro ci può essere un decremento selettivo dell'apoptosi a livello dei linfociti B e di alcune popolazioni T. Nei topi *lpr* e *gld* una aberrante trascrizione del gene Fas⁴ e una mutazione del codificante per il Fas ligando⁵, rispettivamente, sono state messe in relazione con una diminuita apoptosi delle cellule T, successiva a uno stimolo antigenico, suggerendo che l'autoimmunità in modelli murini derivi da una alterazione della tolleranza periferica. Ciò, in associazione con una diminuita apoptosi antigene-indotta delle cellule B, indurrebbe la elevata produzione autoanticorpale presente nel LES. Nell'uomo, non ci sono evidenze di difetti nella espressione o funzione dell'antigene Fas, ma sono stati dimostrati elevati livelli di Fas solubile, il che potrebbe portare a una alterazione dell'apoptosi con conseguenze analoghe a quelle viste nei modelli murini.

Se l'alterazione della apoptosi, quindi, sembra di primaria importanza nella patogenesi del LES, recenti studi dimostrerebbero come senza la concomitante presenza di una alterazione dei meccanismi di fagocitosi e di clearance antigenica non ci sarebbe lo sviluppo di una condizione autoimmune. Per quanto riguarda gli effettori della clearance antigenica un ruolo importante è svolto dalle proteine del Complemento, in particolare il C1q, dalla componente P dell'amiloide (SAP), dalle IgM e dalla Dnasi I. Deficit genetici o fattori sierici o autoanticorpali capaci di bloccare l'attività di tali molecole sembrano condizioni strettamente associate alla patogenesi del LES e all'incremento delle concentrazioni autoanticorpali sieriche.

Dnase I

La Deossiribonucleasi 1 (Dnasi 1; EC 3.1.21.1) è un enzima implicato nella digestione del DNA e dei complessi DNA-nucleoproteina. Un'ansa definita da

6 aminoacidi (73-78, Arg-Asn-Ser-Tyr-Lys-Glu) si lega attraverso interazioni elettrostatiche al DNA e per l'azione litica sono necessari ioni $Ca^{2+}/Mg^{2+}/Mn^{2+}$. È attiva a pH neutro e quindi anche in circolo. Precedenti studi hanno dimostrato che nei pazienti con LES, come pure nei topi LES-proni NZB/NZW, c'è una diminuita attività sierica e urinaria della Dnasi. In topi Dnasi deficienti è stata descritta la comparsa dei sintomi clinici di LES, associata all'incremento degli autoanticorpi anti-nucleo/cromatina e alla presenza di glomerulonefrite⁶. Mutazioni del gene codificante per la Dnasi sono state descritte anche in alcuni pazienti con LES⁷, sebbene ciò sembra essere presente in una minoranza dei casi. Quindi altri fattori sembrano implicati nella diminuzione della attività Dnasica, fra cui la presenza di inibitori sierici (actina) o autoanticorpi anti-Dnasi⁸.

Al fine di confermare la ridotta attività Dnasica nel LES e di verificare se ciò potesse correlare con il livello autoanticorpale anti-dsDNA o anti-nucleosoma, nonché con l'attività di malattia e l'interessamento renale, abbiamo studiato 101 pazienti con LES, ognuno dei quali prelevati in 3 diversi momenti, nell'arco di 2 anni. Come popolazione di controllo sono stati studiati 30 pazienti con sindrome di Sjögren (SS), 30 con artrite reumatoide (AR), 30 con sclerodermia (SSc), 30 con tireopatie autoimmuni (AITD), 50 con neoplasia solida (SN) e 120 soggetti normali. Il dosaggio della attività Dnasica è stato condotto con un metodo ELISA di recente introduzione (Orgentec Diagnostika, Germania), il quale utilizza micropiastre con legato un substrato per la Dnasi. Dopo incubazione con il siero del paziente e successivo lavaggio, viene aggiunto un coniugato capace di legarsi al substrato per la Dnasi residua. La colorazione del pozzetto, in seguito alla aggiunta del cromogeno, è direttamente proporzionale al substrato residuo nella micropiastre e quindi inversamente proporzionale alla attività Dnasica del siero. I risultati sono espressi in percentuale di riduzione della attività Dnasica (%AR). Più alto è il valore di %AR più bassa è l'attività Dnasica nel siero.

La %AR nei pazienti con LES (56.1 ± 16.9) è risultata statisticamente più elevata che nei controlli sani (48.2 ± 13.7 ; $P < 0.005$), nei pazienti con SS (43.5 ± 12.2 ; $P < 0.005$), con AR (28.6 ± 13.3 ; $P < 0.001$), SSc (43.0 ± 7.0 ; $P < 0.005$), con AITD (38 ± 14.1 ; $P < 0.005$) e NS (44.7 ± 14.0 ; $p < 0.005$). Non è stata invece dimostrata alcuna correlazione tra attività Dnasica e concentrazione autoanticorpale anti-nucleosomi (Inova Diagnostics, San Diego, CA) e anti-dsDNA (Shield, Dundee, Scozia), nonché tra attività Dnasica ed ECLAM score e interessamento renale. I nostri dati, quindi, ottenuti valutando una ampia casistica di pazienti con LES, confermano la ridotta attività Dnasica in accordo con quanto già in precedenza descritto da altri autori, evidenziando come ciò possa avere un ruolo patogenetico legato alla diminuita clearance dei complessi DNA-nucleoproteine,

conseguente ad un incremento della apoptosi, la cui permanenza in circolo diventa uno stimolo antigenico capace di innescare una risposta autoanticorpale specifica.

Da quanto emerso dai nostri dati, quindi, la attività Dnastica nei pazienti con LES non sembra avere importanza diagnostica e prognostica, ma oltre ad essere utile per lo studio dei meccanismi patogenetici, potrebbe avere un ruolo nella condotta terapeutica dei pazienti con LES. Già nel 1967, infatti, furono condotti i primi tentativi di trattare con Dnasi bovina i pazienti con LES resistenti al trattamento con steroidi e con sovrainfezioni da ceppi di stafilococchi penicillino-resistenti⁹. I risultati furono incoraggianti in quanto 4/7 pazienti presentarono un significativo miglioramento clinico, 5/7 una riduzione della VES e 3/5 una diminuzione del titolo autoanticorpale. Tali tentativi terapeutici non furono più ripetuti fino al 1990, quando la Dnasi ricombinante fu introdotta nel trattamento della fibrosi cistica¹⁰. In seguito sono stati condotti studi nei topi con LES e attualmente sono in corso dei trial clinici allo stadio Ib nell'uomo con risultati incoraggianti, anche se non ancora definitivi. Tutto ciò, associato alla possibilità di avere a disposizione Dnasi ricombinante non inattivabile dall'actina sierica, fa presupporre che tale terapia biologica, del tutto non tossica, possa avere uno sviluppo futuro. La determinazione della attività Dnastica potrà quindi diventare di fondamentale importanza nella selezione dei pazienti deputati a tale forma di terapia biologica. Un altro suo possibile utilizzo, infine, potrebbe trovare riscontro nei familiari di pazienti con LES, dove una riduzione della Dnasi è stata associata a un incremento del rischio relativo di sviluppare LES.

Conclusioni

Il LES è caratterizzato dalla presenza di autoanticorpi circolanti di cui i più caratteristici sono gli autoanticorpi anti-dsDNA e anti-nucleosoma. Alla base del meccanismo patogenetico che porta allo sviluppo di tali autoanticorpi sembra esserci una disregolazione dei meccanismi apoptotici, che da un lato portano ad un rilascio di autoantigeni riconosciuti dalle cellule immunocompetenti e dall'altro ad una alterazione della tolleranza periferica. La sola alterazione dei meccanismi apoptotici, però, non sarebbe sufficiente a portare alla produzione autoanticorpale, se nel contempo non ci fossero alterazioni dei meccanismi di fagocitosi e clearance antigenica. Fra

quest'ultimi riveste un ruolo importante la Dnasi I, la quale scinde il materiale nucleare rilasciato dalle cellule apoptotiche, bloccando un possibile stimolo autoantigenico. La diminuzione della attività Dnastica, su base genetica o acquisita, sembra rivestire, quindi, un ruolo importante nei meccanismi patogenetici del LES. Nel nostro studio, su una ampia casistica, abbiamo confermato come l'attività Dnastica sia diminuita nei pazienti con LES rispetto ai controlli sani, ai pazienti con altre malattie reumatiche autoimmuni e ai pazienti con AITD e neoplasie solide, e tale dato potrebbe in futuro acquisire importanti risvolti terapeutici, come evidenziato dai primi dati dei trial clinici in corso con il trattamento con Dnasi ricombinante dei pazienti con LES.

Bibliografia

1. Burlingame RW, Boey ML, Starkebaum G, Rubin RL. The central role of chromatin in autoimmune responses to histones and DNA in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1994; 94:184-92.
2. Amoura Z, Piette JC, Bach JF, Koutouzov S. The key role of nucleosomes in lupus. *Arthritis Rheum* 1999; 42:833-43.
3. Kerr JF, Willie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26:239-57.
4. Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorders in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 1992; 356:314-17.
5. Takahashi T, Tanaka M, Brannan CI, Jenkins NA, Copeland NG, Suda T, et al. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 1994; 76:969-76.
6. Napirei M, Karsunky H, Zevnik B, Stephan H, Mannherz HG, Möröy T. Features of systemic lupus erythematosus in Dnase 1-deficient mice. *Nat Genet* 2000; 25:177-8.
7. Yasutomo K, Horiuchi T, Kagami S, Tsukamoto H, Hashimura C, Urushihara M, et al. Mutation of DNA-SE 1 in people with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 2001; 28:313-4.
8. Yeh TM, Chang HC, Liang CC, Wu JC, Liu MF. Deoxyribonuclease-inhibitory antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Sci* 2003; 10:544-51.
9. Lachmann PJ. Allergic reactions, connective tissue and disease. *Sci Basis Med A Rev* 1967; 36-58.
10. Shak S, Capon DJ, Hollmiss R, Marsters SA, Baker CL. Recombinant human Dnase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:9188-92.s