

Diagnostické a terapeutické perspektivy analýzy DNA u psoriázy

Vašků V., Semrádová V.

1. dermatovenerologická klinika LF MU a FN U sv. Anny v Brně
přednosta doc. MUDr. Vladimír Vašků, CSc.

Souhrn

Diagnostické a terapeutické perspektivy analýzy DNA u psoriázy

Etiopatogeneze psoriázy zahrnuje čtyři charakteristické rysy: zánět, hyperproliferaci keratinocytů s jejich abnormální diferenciací, hyperproliferaci endotelií a inhibici apoptózy keratinocytů. Vzhledem k familiárnímu výskytu psoriázy je nutné předpokládat v etiopatogenezi psoriázy účast genetických faktorů. Na základě statistické analýzy distribuce genotypů ve vybraných genetických polymorfismech několika genů jsme v české populaci našli několik DNA markerů pro psoriázu, zejména genotypy AG a GG polymorfismu 2184 G/A RAGE (advanced glycation end products receptor, odds ratio = 2,25, P=0,00004) a heterozygotní genotyp A/AA v polymorfismu A39526AA v genu pro retinoidní receptor $X\alpha$ u žen s psoriázou oproti mužům s psoriázou (odds ratio=2,22, P=0,002). Jako rizikový pro psoriatické pacienty s pozitivní rodinnou anamnézou jsme určili také heterozygotní genotyp GA v polymorfismu -596 G/A v genu pro interleukin 6 (odds ratio=1,83, P=0,008). Všechny tyto rizikové genotypy mohou zakládat různou odpovídatost na terapii psoriázy.

Klíčová slova: psoriáza – polymorfismus – SNP-gen – DNA – marker

Summary

Diagnostic and Therapeutic Perspectives of DNA Analysis in Psoriasis

Etiopathogenesis of psoriasis includes four characteristic features – inflammation, hyperproliferation of keratinocytes with their abnormal differentiation, hyperproliferation of endothelia and inhibition of keratinocyte apoptosis. Because of familial occurrence of psoriasis, a contribution of genetic factors to etiopathogenesis must be considered. As a result of statistical analysis of genotyping of psoriatic patients as well as control subjects in selected gene polymorphisms, several DNA markers for psoriasis were proved in the Czech population. There are genotypes AG and GG in 2184 G/A RAGE (advanced glycation end products receptor, odds ratio = 2.25, P=0.00004) and the heterozygote genotype A/AA in A39526AA retinoid X receptor α polymorphism in women with psoriasis against the men with psoriasis (odds ratio=2.22, P=0.002). Further, the risk heterozygote genotype GA in polymorphism -596 G/A of interleukin 6 gene was found (odds ratio=1.83, P=0.008) for psoriatic patients with positive family history. All these risk genotypes can cause different responsiveness to psoriasis therapy.

Key words: psoriasis – polymorphism – SNP-gene – DNA-marker

ÚVOD

Psoriáza je nejnověji považována za chorobu způsobenou Th1 a Tc1 lymfocyty. Tyto lymfocyty produkují především interleukin 2 (IL-2), interferon- γ (IFN- γ) a TNF- β . T-lymfocyty během maturace exprimují nové proteiny buněčného povrchu (např. CLA – Cutaneous Lymphocyte Antigen nebo CTACK – Cutaneous T-cell Attracting Chemokine), které jim umožňují přesun z krevního řečiště do kůže.

Rozvoj psoriatického fenotypu začíná povoláním Th1 a Tc1 lymfocytů z dermální vaskulatury do dermis. Tyto T-lymfocyty spouštějí u psoriázy hyperproliferaci v epidermis. IL-8 produkovaný keratinocyty vede k chemotaxi neutrofilů z krevních cév do epidermis. Tyto neutrofilové poškozují následně zónu bazální membrány a spoje mezi keratinocyty (2, 11). V patogenezi lupénky nelze opomenout ani faktory neuroimunologické. V kůži psoriatiků byla popsána hyperproliferace kožních nervů, zvýšené hladiny neuropeptidů, jako substance P, peptidu ve vztahu ke genu kalcitonin-

nu (Calcitonin Gene Related Peptide, CGRP), vazoaktivního intestinálního peptidu (VIP). Tyto látky indukují proliferaci keratinocytů a endotelových buněk, jsou chemotaktické pro neutrofile a degranulované mastocyty. Keratinocyty v postižené i nepostižené psoriatické kůži exprimují ve srovnání s kontrolními osobami vysoké hladiny NGF (Nerve Growth Factor). Tento faktor rovněž aktivuje T-lymfocyty, je mitogenní pro keratinocyty a zabráňuje jejich apoptózu, působí chemotakticky na neutrofile a indukuje expresi silného chemokinů RANTES (Regulated Upon Activation, Normal T-cell Expressed, and presumably Secreted). RANTES působí chemotakticky pro CD4+ paměťové T-lymfocyty a aktivuje je (6, 14). Na tyto děje navazuje hyperproliferace keratinocytů, základní buněčné populace v epidermis. Stimulované keratinocyty mohou iniciovat zánětlivé procesy sekrecí různých modulátorů schopných indukovat expresi adhezivních molekul na endotelích a přitahovat cirkulující imunocyty. Tento fenomén vede k interakci mezi keratinocyty a aktivovanými T-lymfocyty, která vyúsťuje ve zvýšenou proliferaci geneticky predisponovaných keratinocytů. Psoriáza získává svůj charakteristický klinický obraz a typickou histopatologii.

Otázkou zůstává proces spuštění aktivace T-lymfocytů, kde zřejmě významnou úlohu hrají superantigeny. Termín „superantigen“ přísluší skupině mikrobiálních antigenů – především u *Staphylococcus aureus* a streptokoků. Oproti klasickým antigenům se vážou na T-buněčný receptor jiným způsobem a jejich aktivační potenciál je mnohem větší. Takto aktivované lymfocyty se dělí, exprimují CLA a pronikají do kůže. Kromě toho mohou superantigeny vyvolat masivní uvolnění cytokinů a ovlivnit zánětlivé autoimunitní děje aktivací B-lymfocytů. Nejvýznamnější jsou v tomto směru stafylokokové enterotoxiny (SE), streptokokový pyrogenní exotoxin (SPE), streptokokový superantigen a streptokokový mitogenní faktor. Klinicky je nejvýznamnější efekt superantigenů u psoriasis guttata. Zde je SPE považován za zásadní spouštěcí faktor. U pacientů s psoriázou chronickou se uplatňují superantigeny stafylokoků, ale jsou zde jen jedním z možných patogenních faktorů (8, 12, 13).

Etiopatogeneze psoriázy zahrnuje tedy čtyři charakteristické rysy: imunopatologický proces – zánět, hyperproliferaci keratinocytů s jejich abnormální diferenciací, hyperproliferaci endotelů a inhibici apoptózy keratinocytů (1, 2). Vzhledem k familiárnímu výskytu psoriázy je nutné předpokládat v etiopatogenezi psoriázy účast genetických faktorů. Psoriáza se považuje za multigenní a zároveň multifaktoriální chorobu, k jejíž klinické manifestaci dochází aktivací mnoha genů. Tato aktivace je podmíněna přítomností iniciačních faktorů, jejichž akce je často vyvolána vlivy prostředí. Některé z těchto genů podmiňují vznik psoriázy („susceptibility“ genes), jiné mají pod kontrolou regulace zánětlivého procesu a imunitní odpovědi („severity genes“, geny závažnosti choroby).

Mnoho psoriázou nepostižených jedinců má jednu nebo více alel (= individuálních variant daného genu) pro rozvoj choroby, chybí jim však další genetické nebo environmentál-

ní faktory k její manifestaci, zejména traumata, stres a infekce. V různých rodinách může dojít k různým kombinacím těchto alel, což dává chorobě značnou klinickou i genetickou šíři. V psoriatických rodinách se přitom nepodařilo zachytit jednoduché vzory dominantní nebo recesivní dědičnosti. Za vznik a rozvoj onemocnění jsou tedy pravděpodobně odpovědné interakce v populaci četných, tzv. polymorfních alel několika genů ležících na několika různých místech genomu (3, 5). V populacích relativně malých a uzavřených (se všemi genetickými důsledky), jako např. na Faerských ostrovech, je pravděpodobnost manifestace psoriázy u příbuzných nemocných v první nebo druhé linii až 25%. Jiné evropské studie, např. švédská, uvádějí prevalenci u příbuzných 1. stupně 7,8 % a u 2. stupně 2,9 % (10, 16).

Dosud bylo identifikováno 9 genomických oblastí citlivých pro psoriázu (PSOR1-PSOR9, OMIM, McKusnick, 2004). I v genetických studiích se přitom odlišují 2 typy psoriázy – podle nástupu manifestace choroby – typ I s typickými antigeny v hlavním histokompatibilním komplexu (MHC), především markerem HLA Cw6, pozitivní rodinnou anamnézou a časným nástupem (do 40 let) a typ II vykazující pozdější nástup, často s negativní rodinnou anamnézou a jinými znaky v MHC.

I. dermatovenerologická klinika FN U sv. Anny v Brně se ve spolupráci s Laboratoří molekulární medicíny Ústavu patologické fyziologie LF MU (přednostka prof. MUDr. Anna Vašků, CSc.) již několik let zabývá systematickým pátráním po DNA markerech pro vznik a závažnost psoriázy. Metodicky jde o asociační studie, ve kterých hledáme statistickou asociaci konkrétních genotypů nebo alel polymorfismů vybraných kandidátních genů se vznikem, rozvojem, popř. dalšími charakteristikami psoriatického fenotypu. Genetické polymorfismy jsou definovány jako změny v sekvenci DNA s více než 1 variantou – alelou, s populační frekvencí méně než 1 % nad 1 %. Jsou podkladem individuální variability genomu. Z 90 % jsou polymorfismy typu SNP (= Single Nucleotide Polymorphism), které se dají charakterizovat záměnou jedné báze v řetězci DNA. Podle lokalizace v DNA rozlišujeme SNP *promotorové* (ovlivňují přepis genu), *exonové* (v kódujících sekvencích – přepisují se do bílkoviny kódované daným genem) a *intronové* – nepřepisují se do bílkoviny kódované daným genem, ale mohou kvalitativně i kvantitativně ovlivnit výsledný bílkovinný produkt. Při analýze polymorfismů u nemocných s psoriázou nás vede snaha najít statisticky rizikové genotypové varianty, asociované s nemocí nebo s jejím intermediálním fenotypem (= např. klinické a laboratorní charakteristiky nemoci, odpovídavost na terapii aj.).

METODY

Pacienti a kontrolní osoby

Do studie jsme zařadili 413 pacientů s psoriázou, léčebných na I. dermatovenerologické klinice LF MU ve FN

U sv. Anny v Brně a 211 kontrolních osob s negativní osobní i rodinnou anamnézou psoriázy a chronických dermatóz, s podobnou distribucí věku a pohlaví.

Demografické charakteristiky souboru nemocných uvádí tabulka 1.

Tab. 1. Demografické charakteristiky souboru nemocných psoriázou

Počet pacientů s psoriázou	413
Psoriasis vulgaris chronica	286
Psoriasis guttata	80
Ostatní typy psoriázy	47
Muži/ženy	228/185
Věk (medián, rozsah)	47 (18–86) let
Pozitivní rodinná anamnéza psoriázy	119/294
Psoriasis typ I / typII	268/145
První výsev psoriázy (věk, medián, rozsah)	23 (2–76) let

Genotypizace

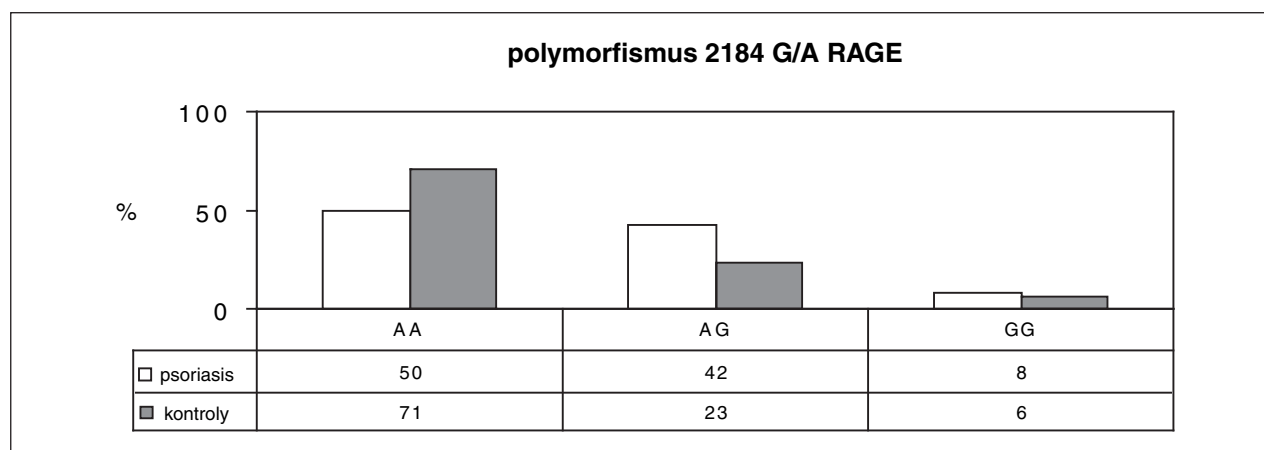
Na základě etiopatogenetických rysů jsme vybrali několik kandidátních genů. Po standardní izolaci DNA z periferní krve jsme genotypizovali pacienty na vybrané polymorfismy v kandidátních genech pomocí polymerá-

zové řetězové reakce (PCR) s následnou restriční analýzou vhodným restričním enzymem, která umožní rozlišit v UV světle obě alely detekovaných polymorfismů v elektroforetickém gelu s ethidium bromidem. Pro každý polymorfismus jsme takto detekovali tři možné genotypy (dva homozygotní a jeden heterozygotní). Protože jsme vybrali takové SNP, jejichž podkladem jsou zárodečné mutace, vyšetřené genotypy budou stejné ve všech buňkách organismu a jen velmi nepravděpodobně se budou v průběhu života měnit tzv. somatickou mutací. V této práci jsme testovali asociaci tří polymorfismů s psoriázou: 2184 G/A RAGE (6. intron genu pro RAGE), A39526AA v genu pro retinoidní receptor X α (RXR α , 3 β oblast genu) a polymorfismu -596 G/A v genu pro interleukin 6 (IL-6)

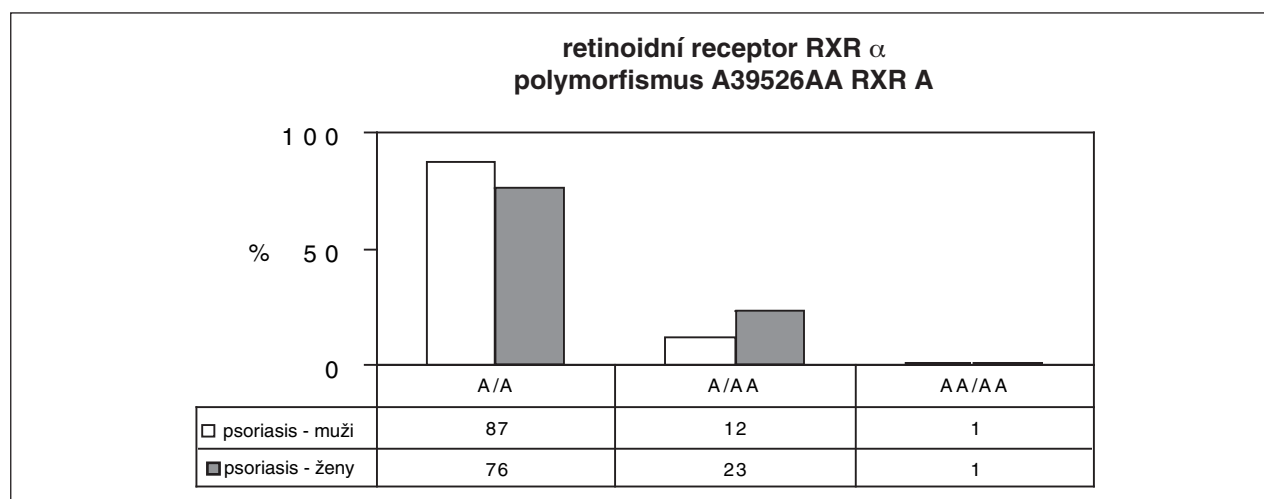
Statistické metody

Rozdíly v distribuci genotypů byly hodnoceny pomocí testu χ^2 . Rozdíly v alelických frekvencích jsme hodnotili pomocí testu Fischer-exact.

Rizikovost genotypů nebo alel byla hodnocena pomocí testu pro odds ratio (OR), signifikace rizikovosti jsme posuzovali pomocí testu Fischer-exact.



Obr. 1. Rozdíl v distribuci genotypů polymorfismu 2184 G/A RAGE mezi psoriatickými a kontrolními osobami.



Obr. 2. Rozdíl v distribuci genotypů polymorfismu A36526AA RXR α mezi muži a ženami s psoriázou.

VÝSLEDKY

Prokázali jsme statisticky signifikantní rozdíl v distribuci genotypů ($P_g=0,002$) i frekvenci alel ($P_a=0,002$) mezi psoriatickými a kontrolními osobami v polymorfismu 2184 G/A RAGE. Tento polymorfismus proto považujeme za citlivý pro psoriázu, s rizikovými variantami AG+GG pro vznik psoriázy ($OR=2,25$, $P=0,00004$, obr. 1).

Dále jsme prokázali rozdíl v distribuci genotypů ($P_g=0,01$) a frekvenci alel ($P_a=0,005$) mezi muži a ženami s psoriázou v polymorfismu A39526AA v genu pro RXR α . Heterozygotní genotyp A/AA nese u žen vyšší riziko pro vznik psoriázy ($OR=2,22$, $P=0,002$, obr. 2).

Prokázali jsme také hraničně signifikantní rozdíl v distribuci genotypů ($P_g=0,02$) i frekvenci alel ($P_a=0,02$) polymorfismu A39526AA RXR α mezi psoriatiky s pozitivní a negativní rodinnou anamnézou tohoto onemocnění.

Dále jsme pozorovali hraničně signifikantní rozdíl v distribuci genotypů mezi pacienty s pozitivní a negativ-

ní anamnézou psoriázy v polymorfismu -596 G/A v genu pro IL-6. Rizikovým faktorem pro psoriatiku s pozitivní rodinnou anamnézou je heterozygotní genotyp GA ($OR=1,83$, $P=0,008$, obr. 3).

Při srovnání distribucí genotypů a alelických frekvencí jsme ani u jednoho z vyšetřovaných polymorfismů nenašli rozdíly mezi jednotlivými typy psoriázy.

Uvedené výsledky sumarizuje tab. 2.

DISKUSE

Všechny tři uvedené polymorfismy asociované s psoriázou nebo jejími intermediálními fenotypy byly nově identifikovány v Ústavu patologické fyziologie LF MU a v literatuře nejsou srovnatelné výsledky asociačních studií s psoriázou z jiných pracovišť.

Asociace polymorfismů v promotoru genu pro RAGE (Receptor of Advanced Glycation End-products) s psoriázou již byly publikovány na menším souboru pacientů

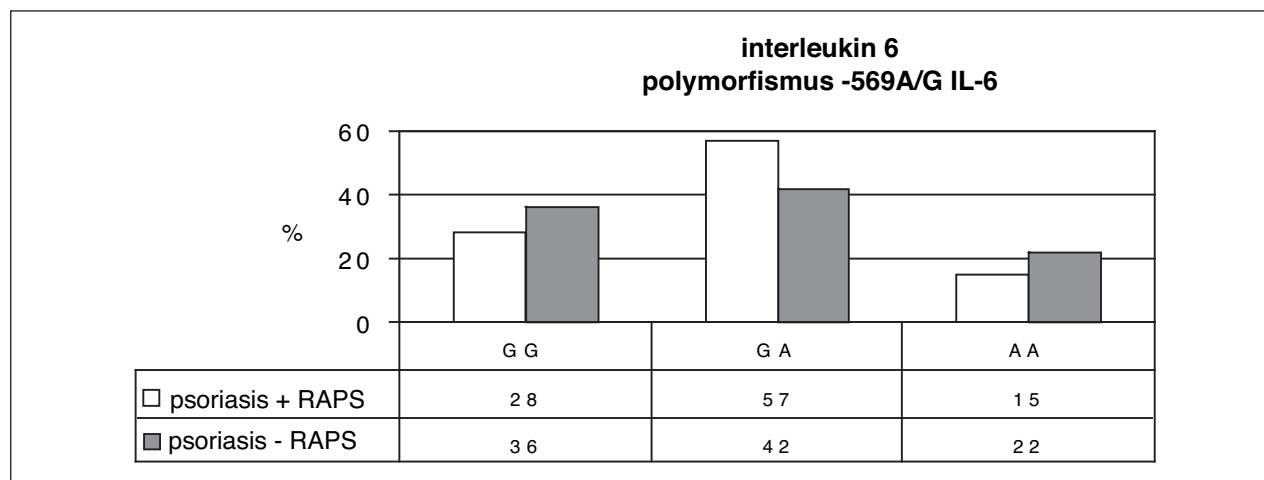
Tab. 2. Rozdíl v distribuci genotypů a frekvenci alel vyšetřených polymorfismů mezi nemocnými s psoriázou a kontrolami, mezi pacienty s pozitivní (+RAPS) a negativní (-RAPS) rodinnou anamnézou psoriázy a mezi muži a ženami s psoriázou

Polymorfismus	Psoriasis/kontroly	Rodinná anamnéza psoriázy	Psoriasis M/Ž
2184 G/A RAGE (14q32)	$P_g=0,002$ $P_a=0,002$ OR pro genotypy AG + GG pro psoriázu je 2,25, $P=0,00004$		
A36526AA RXR (9q34.3)		$P_g=0,02$ $P_a=0,02$	$P_g=0,01$ $P_a=0,005$ OR pro genotyp A/AA u žen s psoriázou =2,22, $P=0,002$
-596 G/A IL-6 (7p21)		$P_g=0,04$ OR pro GA pro psoriázu + RAPS =1,83, $P=0,008$	

P_g =pravděpodobnost rozdílu v distribucích genotypů

P_a =pravděpodobnost rozdílu ve frekvencích alel

OR= odds ratio



Obr. 3. Rozdíl v distribuci genotypů polymorfismu -596 G/A IL-6 mezi pacienty s pozitivní (+RAPS) a negativní (-RAPS) rodinnou anamnézou psoriázy.

(17). V této souvislosti je zajímavý vztah mezi proteiny S100, které regulují intracelulární procesy, jako je buněčný růst a motilita, regulace buněčného cyklu, transkripce a diferenciaci, a RAGE. Někteří zástupci této rodiny jsou totiž secernováni buňkami, které vykazují extracelulární aktivity cytokinového typu právě prostřednictvím povrchového RAGE. Tyto buňky parakrinně působí na neurony a ovlivňují jejich přežívání během vývoje nebo po poškození. Geny pro tyto proteiny jsou umístěny na chromosomu 1q21. V této oblasti dochází často k chromosomálním aberacím, které vedou k poruše regulace exprese některých S100 proteinů a ke vzniku kardiomyopatií, neurodegenerativních nemocí a neoplazií (9). S100A12 (EN-RAGE) je secernován aktivovanými granulocyty a váže se na RAGE, což vede k aktivaci endotelu závislé na nukleárním faktoru κ B (NF κ B). Zvýšená exprese proteinu S100A12 byla prokázána v zanícené synovii pacientů s artritidou, zejména psoriatickou. Vysoké sérové koncentrace tohoto proteinu korelují s aktivitou artritidy a jsou považovány za její biochemický marker (7).

Retinoidy se úspěšně užívají v léčbě psoriázy od 80. let 20. století. Bexarotene, nový syntetický retinoid selektivní pro RXR má prokazatelně antiproliferační a apoptózu stimulující efekt u kožních T-lymfomů. U pacientů s psoriázou, léčených bexarotinem, byly po 12 týdnech léčby pozorovány signifikantní změny v mnoha charakteristikách psoriatického procesu (redukce Ki-67, keratinu 16, transglutaminázy, dermálního CD4, epidermálního CD8, zánětlivého skóre v kombinaci se signifikantním nárůstem keratinu 10) (15). Počet pacientů v této studii byl příliš malý pro zhodnocení případných rozdílů v účinnosti léčby mezi muži a ženami s psoriázou.

Některé prozánětlivé cytokiny, mezi něž patří interleukin 6 a onkostatín M, zvyšují v kultuře normálních lidských epidermálních keratinocytů a primárních lidských dermálních fibroblastů expresi tzv. Multidrug Resistance-associated Proteins (MRP1, 3, 4, 5). V psoriatických lézích byla přitom prokázána zvýšená exprese těchto proteinů (4).

Uvedené výsledky korespondují s představou, že individuální variabilita ve vyšetřených genech s psoriázou může podstatně ovlivnit odpověď jednotlivých pacientů na terapii psoriázy ve velmi širokém záběru. Na uvedené výsledky proto navážeme prospektivní studii, která bude mít za cíl zhodnotit vztah rizikových genotypů nebo alel uvedených polymorfismů a odpovědi na terapii psoriázy v klinické praxi.

LITERATURA

1. BARKER, JN. Immune pathogenesis of psoriasis. *Dermatology Today and Tomorrow*, 1992, 27, p. 8–11.
2. BOS, JD., DE RIE, MA. The pathogenesis of psoriasis: immunological facts and speculations. *Immunology Today*, 1999, 20, p. 40–46.
3. BURDEN, AD., JAVED, S., BAILEY, M., HODGINS, M., CONNOR, M., TILLMAN, D. Genetics of psoriasis: pater-

nal inheritance and a locus on chromosome 6p. *J Invest Dermatol*, 1998, 110, p. 958–960.

4. DREUW, A., HERMANN, HM., HEISE, R., JOUSSEN, S., RODRIGUEZ, F., MARQUARDT, Y., JUGERT, F., MERK, HF., HEINRICH, PC., BARON, JM. Interleukin-6-type cytokines upregulate expression of multidrug resistance-associated proteins in NHEK and dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol*, 2005, 124, p. 28–37.
5. ELDER, JT., NAIR, RP., HENSELER, T., JENISCH, S., START, P., CHIA, N., CHRISTOPHERS, E., VOORHEES, JJ. The Genetics of Psoriasis 2001, The Odyssey Continues. *Arch Dermatol*, 2001, 137, p. 1447–1454.
6. FARBER, EM., RAYCHAUDHURI, SB. Is psoriasis a neuroimmunologic disease? *Int J Dermatol*, 1999, 38(1), p. 12–15
7. FOELL, D., KANE, D., BRESNIHAN, B., VOGL, T., NACKEN, W., SORG, C., FITZGERALD, O., ROTH, J. Expression of the pro-inflammatory protein S100A12 (EN-RAGE) in rheumatoid and psoriatic arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 2003, 42, p. 1383–1389.
8. FRASER, J., ARCUS, V., KONG, P., BAKER, E., PROFT, T. Superantigens – powerful modifiers of the immune system. *Mol Med Today*, 2000, 6, p. 126–132.
9. HEIZMANN, CW., FRITZ, G., SCHAFFER, BW. S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci*, 2002, 7, p. 1356–1368.
10. HENSELER, T. The genetics of psoriasis. *Supplement to J Am Acad Dermatol*, 1997, 37, p. 1–17.
11. KRUEGER, JG. The immunologic basis for treatment of psoriasis with new biologic agents. *J Am Acad Dermatol*, 2002, 46, p. 1–23.
12. LEUNG, DYM., NORRIS, DA. The Role of Bacterial Superantigens in Psoriasis and Atopic Dermatitis. *Dermatol Found*, 1997, 31, p. 1–14.
13. MANDERS, SM. Toxin mediated streptococcal and staphylococcal disease. *J Am Acad Dermatol*, 1998, 39, p. 383–398.
14. ROENIGK, HH. *Skin Manifestations of Psoriasis in Psoriasis*. Ed. by Roenigk, HH. and Maibach, HI., Marcel Dekker, Inc., 1991: 3–7.
15. SMIT, JV., DE JONG, EM., VAN HOOIJDONK, CA., OTERO, ME., BOEZEMAN, JB., VAN DE KERKHOFF, PC. Systemic treatment of psoriatic patients with bexarotene decreases epidermal proliferation and parameters for inflammation, and improves differentiation in lesional skin. *J Am Acad Dermatol*, 2004, 51, p. 257–264.
16. SWANBECK, G., INEROT, A., MARTINSSON, T., WAHLSTROM J. A population genetic study of psoriasis. *Brit J Derm*, 1994, 131, p. 32–39.
17. VASKU, V., KANKOVA, K., VASKU, A., MUZIK, J., IZAKOVICOVA HOLLA, L., SEMRADOVA, V., VACHA, J. Gene polymorphisms (G82S, 1704G/T, 2184A/G and 2245G/A) of the receptor of advanced glycation end products (RAGE) in plaque psoriasis. *Arch Dermatol Res*, 2002, 294, p. 127–130.

Došlo do redakce 4. 2. 2005

Doc. MUDr. Vladimír Vašků, CSc.

1. dermatovenerologická klinika FN U sv. Anny, LF MU
Pekařská 53
656 91 Brno

E-mail: vladimir.vasku@fnusa.cz