

ULOGA PROTEINA PORODICE BCL-2 U PSORIJAZI

THE ROLE OF BCL-2 FAMILY PROTEINS IN PSORIASIS

MARIJA KAŠTELAN, LARISA PRPIĆ MASSARI, INES BRAJAC*

Deskriptori: Psorijaza – etiologija, metabolizam, patologija; Keratinociti – fiziologija, metabolizam; Apoptoza – fiziologija; Proto-onkogeni proteini C-Bcl-2 – fiziologija, metabolizam

Sažetak. Apoptoza je fiziološki proces programirane smrti stanica odgovoran za održavanje homeostaze u organizmu. U koži se procesom apoptoze nadzire proliferacija i diferencijacija keratinocita te tako održava homeostaza unutar epidermisa. Proces programirane stanične smrti nadziru proteini porodice Bcl-2 uključujući više proapoptotskih (Bax, Bak, Bad) i protuapoptotskih molekula (Bcl-2, Bcl-x_l). Danas se smatra da poremećaj procesa apoptoze ima važnu ulogu u razvoju mnogih kožnih bolesti. Psorijaza je kroničnorecidivirajuća upalna bolest kože obilježena poremećajem diferencijacije i proliferacije keratinocita te sniženom apoptozom keratinocita unutar epidermisa. Na temelju dosadašnjih spoznaja o ulozi programirane stanične smrti u nastanku psorijaze, čini se da apoptoza ima važnu ulogu u razvoju epidermalne hiperproliferacije psorijatične lezije. Budući da proteini porodice Bcl-2 nadziru proces apoptoze, važno je razjasniti njihovu ulogu u patogenezi psorijaze. Naime, uočena povećana ekspresija protuapoptotskih, a sniženo izražavanje proapoptotskih molekula porodice Bcl-2 u psorijatičnoj koži upućuju na njihovu važnost u razvoju bolesti.

Descriptors: Psoriasis – etiology, metabolism, pathology; Keratinocytes – physiology, metabolism; Apoptosis – physiology; Proto-oncogene proteins C-Bcl-2 – physiology, metabolism

Summary. Apoptosis is a physiological process of programmed cell death responsible for homeostasis in the body. In skin, apoptotic process regulates keratinocyte proliferation and differentiation in that way maintaining homeostasis of epidermal compartment. The process of apoptosis is controlled by proteins of the Bcl-2 family, several proapoptotic (Bax, Bak, Bad) and antiapoptotic (Bcl-2, Bcl-x_l) proteins. Nowadays, it seems that dysfunctional apoptosis has an important role in the pathogenesis of several skin diseases. Psoriasis is a chronic hyperproliferative inflammatory skin disease characterized by abnormal keratinocyte hyperproliferation and differentiation as well as by decreased keratinocyte apoptosis. Based on recent studies, it is likely that apoptosis has an important role in epidermal hyperproliferation of psoriatic lesion. Having in mind the significance of Bcl-2 family proteins in apoptosis, it is important to elucidate their role in psoriasis pathogenesis. Observed upregulation of antiapoptotic and downregulation of proapoptotic Bcl-2 family molecules in psoriatic skin implies their significance in psoriasis development.

Liječ Vjesn 2010;132:31–33

Apoptoza je fiziološki proces programirane smrti stanica odgovoran za održavanje homeostaze u organizmu.¹ Riječ je o aktivnom procesu morfološki karakteriziranom pojavom skvrčavanja stanice, kondenzacijom jezgre, fragmentacijom stanice i konačno fagocitozom nastalih apoptotskih tjelešaca. U koži se procesom apoptoze nadziru proliferacija i diferencijacija keratinocita te tako održava homeostaza unutar epidermisa.² Noviji radovi upućuju na to da je terminalna diferencijacija keratinocita u stvari specifičan oblik programirane stanične smrti.³

Apoptoza keratinocita posredovana je različitim mehanizmima. Prvi uključuje vezanje Fas-liganda odnosno čimbenika nekroze tumora (TNF, od engl. tumor necrosis factor) za specifične smrtonosne domene na ciljnim stanicama, što dovodi do kaskadne aktivacije različitih kaspaza.⁴ Osnovna uloga kaskade kaspaza je cijepanje različitih smrtonosnih supstrata uključujući proteine citosola i jezgrine proteine koji sudjeluju u replikaciji i popravku DNA, cijepanju i staničnoj diobi RNA, što na kraju dovodi do apoptoze. Drugi mehanizam uključuje otpuštanje različitih proapoptotskih čimbenika iz mitohondrija te završava aktivacijom efektorske kaspaze-3.⁵ Oba mehanizma u konačnici završavaju aktivacijom kaspaze 3 koja može sama cijepati stanične proteine i proteine jezgre ili pak osloboditi enzim DNAazu

nazvanu CAD (od engl. caspase activated DNase). CAD potom dovodi do cijepanja kromosomske DNA, što je jedno od osnovnih obilježja apoptoze.⁶

Proces apoptoze nadziru proteini porodice Bcl-2 koji uključuju različite proapoptotske (Bax, Bak, Bad) i protuapoptotske molekule (Bcl-2, Bcl-x_l).⁷ Tako Bcl-2 i Bcl-x_l-proteini mogu spriječiti aktivaciju kaspaza te time i apoptozu inaktivacijom Apaf-1-molekule ili stabilizacijom mitohondrijske membrane, čime se sprječava otpuštanje citokroma c. S druge strane, molekule Bax, Bak i Bad potiču stanično ubijanje stvaranjem pora u vanjskoj membrani mitohondrija kroz koje se otpušta apoptogeni čimbenik citokrom c u citosol.⁸

Danas se smatra da poremećaj procesa apoptoze ima važnu ulogu u razvoju mnogih kožnih bolesti.^{9,10} Neke su, poput alopecije areate i lihena planusa, obilježene pove-

* **Klinika za kožne i spolne bolesti Medicinskog fakulteta u Rijeci, KBC Rijeka** (prof. dr. sc. Marija Kaštelan, dr. med.; doc. dr. sc. Larisa Prpić Massari, dr. med.; prof. dr. sc. Ines Brajac, dr. med.)

Adresa za dopisivanje: Prof. dr. sc. M. Kaštelan, Klinika za kožne i spolne bolesti Medicinskog fakulteta u Rijeci, KBC Rijeka, Krešimirova 42, 51000 Rijeka, e-mail: marijakastelan@yahoo.com

Primljeno 13. veljače 2009., prihvaćeno 1. srpnja 2009.

ćanom apoptozom keratinocita, dok je primjerice u psorijazi uočena snižena apoptoza keratinocita unutar epidermisa.⁹ Budući da proteini porodice Bcl-2 nadziru proces apoptoze, važno je razjasniti njihovu ulogu u patogenezi psorijaze.

Psorijaza – bolest poremećene proliferacije i diferencijacije keratinocita

Psorijaza je kronično recidivirajuća upalna bolest kože obilježena poremećajem diferencijacije i proliferacije keratinocita, nakupljanjem neutrofila u epidermisu te upalnim infiltratom, mahom T-limfocita u dermisu.¹¹ Ubrzana proliferacija epidermisa u genetski podložne osobe izazvana je vjerojatno imunomnom reakcijom na do sada još nedovoljno definiran epidermalni, dermalni ili cirkulirajući imunogeni peptid. Zato se danas pretpostavlja da je psorijaza genski poremećaj proliferacije keratinocita posredovan limfocitima T.¹²

Epidermalna hiperproliferacija, glavno patohistološko obilježje psorijaze, vjerojatno nastaje zbog genetski uvjetovanog hiperproliferativnog poremećaja CD29+K1+/K10- subpopulacije nediferenciranih matičnih stanica smještenih u bazalnom sloju epidermisa.^{13,14} Naime, analizom zdravog epidermisa uočeno je da se proliferativni odjeljak sastoji od dvije subpopulacije epidermopoetskih stanica. Jedna subpopulacija je CD29+K1+/K10- subpopulacija sporoproliferirajućih, nediferenciranih matičnih stanica smještena pretežno u bazalnom sloju. Druga skupina stanica je CD29+ K1+/K10+ te stoga proliferativna i visoko diferencirana, smještena pretežno suprabazalno. Analizirajući stanice psorijatičnog epidermisa, Bata-Csorgo i sur. pronašli su povišen broj CD29+K1+/K10- bazalnih matičnih stanica, dok je broj proliferirajućih CD29+K1+/K10+ stanica sličan kod psorijaze i zdravog epidermisa.¹⁵ Nadalje, obilježavanje stanica anti-PCNA (od engl. proliferating cell nuclear antigen) protutijelom pokazalo je da sve CD29+ K1+/K10- stanice promijenjenoga psorijatičnog epidermisa, posjeduju visoku razinu PCNA, upućujući na činjenicu da su potaknute u stanični ciklus. Stoga se na temelju tih rezultata može zaključiti da je epidermalna proliferacija u psorijazi rezultat povećane skupine stanica nastalih iz CD29+K1+/K10- matičnih stanica koje onda djeluju kao ciljna populacija za limfokine T-limfocita.¹³

Upalni stanični infiltrat u aktivnome psorijatičnom žarištu sadržava pretežito pomoćničke CD4+ limfocite T u dermisu, dok se citotoksični CD8+ limfociti T nakupljaju u epidermisu.^{15,16} Čini se da aktivirani CD4+ limfociti T lučenjem odgovarajućih citokina potiču aktivaciju epidermalnih CD8+ limfocita T i pokreću psorijatičnu kaskadu složenih staničnih i molekularnih zbivanja. Limfociti T unutar psorijatičnog žarišta luče citokine tipa 1, interleukin 2 (IL-2), interferon gama (IFN γ) i čimbenik nekroze tumora alfa (TNF α), pa se psorijaza, danas, smatra bolešću obilježenom citokinskim obrascem tipa 1.¹⁷ Aktivirani keratinociti također luče različite citokine koji potiču aktivaciju i kemotaksiju T-limfocita u kožu (IL-6 i IL-8) te pojačavaju izražavanje pojedinih adhezijskih molekula (IL-1) važnih za usmjeravanje T-limfocita u kožu.¹⁸ Stoga središnju ulogu u započinjanju i održavanju psorijatičnih lezija ima interakcija limfocita i keratinocita posredovana citokinima.

Uloga proteina porodice Bcl-2 u psorijazi

Temeljno obilježje psorijatičnog epidermisa je hiperproliferacija uz poremećenu terminalnu diferencijaciju keratinocita.¹⁹ Volumen epidermisa u psorijazi mnogostruko je

veći od volumena normalnog epidermisa što se histološki očituje akantozom. Također je uvelike pojačana mitotska aktivnost stanica temeljnog sloja epidermisa uz skraćen stanični ciklus na samo 37 sati. Stoga su psorijatični keratinociti uz hiperplaziju označeni i nepotpunom diferencijacijom, što se histološki očituje parakeratozom. Noviji radovi upućuju na to da psorijatični keratinociti pokazuju neuobičajenu otpornost na apoptozu te da to može biti jedan od mogućih patogenetskih mehanizama nastanka bolesti.²⁰

Kao što je već ranije navedeno, proteini porodice Bcl-2 nadziru proces apoptoze, potičući ili kočeći programiranu smrt stanice.⁷ Ravnoteža između proapoptotskih (Bax, Bak, Bad) i protuapoptotskih molekula (Bcl-2, Bcl-xl) odgovorna je za održavanje homeostaze unutar epidermisa. Trenutačno se malo toga zna o značenju i nadzoru programirane stanične smrti u epidermisu psorijatične lezije. Učinjena su brojna istraživanja kako bi se utvrdilo jesu li epidermalna proliferacija i zadebljanje psorijatičnog plaka posljedica otpora apoptozi.²¹⁻²³ Međutim, postoje oprečna mišljenja o prevlasti pojedinih proteina porodice Bcl-2 u psorijazi. Tako su Bianchi i sur. uočili povećano izražavanje molekule Bcl-2 u keratinocitima temeljnog sloja zdravog epidermisa, ali ne i u keratinocitima psorijatičnog epidermisa.²⁴ Suprotno tomu, Wrone-Smith i sur. nisu utvrdili izražavanje te molekule ni u psorijatičnim ni u keratinocitima zdrave kože.²¹ Sljedeći radovi upozorili su na pojačano izražavanje proteina Bcl-2 u temeljnom i trnastom sloju stanica psorijatičnog epidermisa u odnosu na nepromijenjenu kožu bolesnika sa psorijazom.²⁵ Isti autori uočili su i pojačano izražavanje protuapoptotske molekule Bcl-xl i proapoptotske molekule Bax u psorijatičnim lezijama. Tomkova i sur. također su upozorili na pojačano izražavanje proteina Bax u suprabazalnom sloju psorijatičnog i zdravog epidermisa, dok su Fukuya i sur. uočili difuzan raspored molekule Bax uzduž cijelog epidermisa psorijatičnog plaka.^{26,27} Međutim, zbog oprečnih mišljenja o izražavanju protuapoptotske Bcl-2 i proapoptotske molekule Bax u psorijazi, potrebno je učiniti dodatna istraživanja kako bi se razjasnila njihova uloga u razvoju psorijatične lezije.

Daljnijim studijama je uočeno pojačano izražavanje proapoptotske molekule Bad u središnjem i donjem dijelu psorijatičnog epidermisa te značajno slabije izražavanje te molekule u gornjim slojevima epidermalnog odjeljka psorijatične kože.^{28,29} Protein Bad je inače nazočan samo u suprabazalnom sloju zdravog epidermisa. Stoga se čini da slabije izražavanje proteina Bad u gornjim slojevima psorijatičnog epidermisa omogućava keratinocitima povećanu otpornost na apoptozu. Štoviše, smanjena aktivacija proteina Bad u višim slojevima epidermisa u suodnosu je s povišenom ekspresijom protuapoptotske molekule Bcl-xl što u konačnici vodi epidermalnoj hiperproliferaciji koja je temeljna značajka psorijatičnog epidermisa.^{25,28}

Smatra se da je TNF- α odgovoran za pojačanu sintezu protuapoptotskih proteina Bcl-2 i Bcl-xl te u manjoj mjeri proapoptotske molekule Bax u psorijatičnoj leziji.^{21,30} Povišena koncentracija TNF- α utvrđena je u psorijatičnom plaku i čini se da upravo taj citokin pokreće upalnu kaskadu u psorijazi.³¹ Terapeutska učinkovitost antagonista TNF- α u liječenju bolesnika sa psorijazom također je dokaz važne uloge tog citokina u patogenezi bolesti.³² Naime, čini se da neutralizacija TNF- α mijenja ravnotežu proteina Bax/Bcl-2 u keratinocitima psorijatične lezije čime potiče apoptozu psorijatičnih keratinocita.³⁰ Suprotnu ulogu ima citokin interferon- γ (IFN- γ) čije izražavanje je čak 10 puta veće u psorijatičnom žarištu nego u zdravoj koži.³³ IFN- γ potiče

proliferaciju keratinocita u psorijazi te istodobno koči njihovu programiranu smrt. Nadalje, taj citokin potiče ekspresiju protuapoptotske molekule Bcl-2 i time sprječava apoptozu psorijatičnih keratinocita. Stoga se smatra da je upravo IFN- γ u velikoj mjeri odgovoran za hiperproliferaciju keratinocita u psorijatičnoj leziji.

Najnovija istraživanja upozorila su na ulogu interleukina 15 (IL-15) kao jednog od mogućih čimbenika odgovorne apoptoze psorijatičnih keratinocita.³⁴ Naime, uočena povišena ekspresija IL-15 i njegova receptora IL-15R u epidermisu psorijatične lezije upućuje na to da upravo taj citokin koči apoptozu keratinocita u gornjim slojevima psorijatičnog epidermisa i time uzrokuje hiperplaziju epidermalnog odjeljka psorijatične kože. Treba naglasiti da IL-15 ujedno potiče kemotaksiju limfocita T u kožu, koči apoptozu T-limfocita te djeluje kao čimbenik rasta za prirodno ubilačke stanice (NK, od engl. natural killer cells) i same T-limfocite.³⁵ Stoga IL-15, osim što koči apoptozu psorijatičnih keratinocita ujedno potiče nakupljanje efektorskih stanica u koži, poput limfocita T, za koje je dokazano da pokreću razvoj i održavaju kronicitet psorijatične lezije.

Istraživanjem apoptoze u psorijatičnim lezijama, uočeno je da psorijatični epidermis ima protuapoptotska obilježja. Kawashima i sur. su upozorili na povećani broj lomova dvovalčane DNA u psorijatičnom plaku uzrokovanih vjerojatno aktivnom replikacijom DNA, a ne apoptozom.³⁶ Laporte i sur. su utvrdili smanjen broj apoptotskih stanica u psorijatičnom epidermisu u odnosu na zdravu kožu.³⁷ Stoga se čini da većina psorijatičnih keratinocita ne ulazi u proces programirane stanične smrti, nego se pojačano umnožava, što vodi perzistirajućoj epidermalnoj hiperproliferaciji.

Na temelju navedenih spoznaja o ulozi programirane stanične smrti u nastanku psorijaze, čini se da apoptoza ima važnu ulogu u razvoju epidermalne hiperproliferacije psorijatične lezije. Naime, uočena povećana ekspresija protuapoptotskih, a sniženo izražavanje proapoptotskih molekula porodice Bcl-2 u psorijatičnoj koži upućuje na njihovu važnu ulogu u patogenezi bolesti. Međutim, potrebno je razjasniti točan mehanizam ove složene priče te usmjeriti nova saznanja na stvaranje novih terapijskih ciljeva liječenja psorijaze, kao jedne od najčešćih kroničnih bolesti uopće.

LITERATURA

- Afford S, Randhawa S. Apoptosis. *Mol Pathol* 2000;53:55–63.
- Bowen AR, Hanks AN, Allen SM, Alexander A, Diedrich MJ, Grossman D. Apoptosis regulators and responses in human melanocytic and keratinocytic cells. *J Invest Dermatol* 2003;120:48–55.
- Allombert-Blaise C, Tamiji S, Mortier L i sur. Terminal differentiation of human epidermal keratinocytes involves mitochondria- and caspase-dependent cell pathway. *Cell Death Differ* 2003;10:850–2.
- Curtin JF, Cotter TG. Live or let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal* 2003;15:983–92.
- Van Gurp M, Festjens N, van Loo G, Saelens X, Vandennebe P. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;304:487–97.
- Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:897–907.
- Adams JM, Cory S. The bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998;281:1322–6.
- Bowen AR, Hanks AN, Murphy KJ, Florell SR, Grossman D. Proliferation, apoptosis, and survivin expression in keratinocytic neoplasms and hyperplasia. *Am J Dermatopathol* 2004;26:177–81.
- Raj D, Brash DE, Grossman D. Keratinocyte apoptosis in epidermal development and disease. *J Invest Dermatol* 2006;126:243–57.
- Wehrli P, Viard I, Bullani R, Tschopp J, French LE. Death receptors in cutaneous biology and disease. *J Invest Dermatol* 2000;115:141–8.
- Krueger JG, Bowcock A. Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. *Ann Rheum Dis* 2005;64 (Suppl II):ii30–ii36.
- Prinz JC. The role of T cells in psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2003;17:257–70.
- Bata-Csorgo Z, Hammerberg C, Voorhees JJ, Cooper KD. Kinetics and regulation of human keratinocyte stem cell growth in short-term primary ex vivo culture. Cooperative growth factors from psoriatic lesional T lymphocytes stimulate proliferation among psoriatic uninvolved, but not normal, stem keratinocytes. *J Clin Invest* 1995;95:317–27.
- Mckay IA, Leigh IM. Altered keratinocyte growth and differentiation in psoriasis. *Clin Dermatol* 1995;13:105–14.
- Griffiths CE. The immunological basis of psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2003;17(suppl 2):1–5.
- Mehlis SL, Gordon KB. The immunology of psoriasis and biologic immunotherapy. *J Am Acad Dermatol* 2003;49:S44–S50.
- Krueger JG. The immunologic basis for the treatment of psoriasis with new biologic agents. *J Am Acad Dermatol* 2002;46:1–23.
- Prinz JC. Psoriasis vulgaris – a sterile antibacterial skin reaction mediated by cross-reactive T cells? An immunological view of the pathophysiology of psoriasis. *Clin Exp Dermatol* 2001;26:326–32.
- Lebwohl M. Psoriasis. *Lancet* 2003;361:1197–204.
- Wrone-Smith T, Mitra RS, Thompson CB, Jasty R, Castle VP, Nickoloff BJ. Keratinocytes derived from psoriatic plaques are resistant to apoptosis compared with normal skin. *Am J Pathol* 1997;151:1321–9.
- Wrone-Smith T, Johnson T, Nelson B i sur. Discordant expression of Bcl-x and Bcl-2 by keratinocytes in vitro and psoriatic keratinocytes in vivo. *Am J Pathol* 1995;146:1079–88.
- Nakagawa K, Yamamura K, Maeda S, Ichihashi M. Bcl-2 expression in epidermal keratinocytic diseases. *Cancer* 1994;74:1720–4.
- Doi H, Shibata MA, Kiyokane K, Otsuki Y. Downregulation of TGF- β isoforms and their receptors contributes to keratinocyte hyperproliferation in psoriasis vulgaris. *J Dermatol Sci* 2003;33:7–16.
- Bianchi L, Farrace MG, Nini G, Piacentini M. Abnormal bcl-2 and tissue transglutaminase expression in psoriatic skin. *J Invest Dermatol* 1994;103:829–33.
- Takahashi H, Manabe A, Ishida-Yamamoto A, Hashimoto Y, Iizuka H. Aberrant expression of apoptosis-related molecules in psoriatic epidermis. *J Dermatol Sci* 2002;28:187–97.
- Tomkova H, Fujimoto W, Arata J. Expression of the bcl-2 homologue Bax in normal human skin, psoriasis vulgaris and non-melanoma skin cancers. *Eur J Dermatol* 1998;8:256–60.
- Fukuya Y, Higaki M, Kawashima M. Effect of vitamin D3 on the increased expression of Bcl-xL in psoriasis. *Arch Dermatol Res* 2002;293:620–5.
- Tomkova H, Fujimoto W, Arata J. Expression pattern of the bcl-2 homologous protein bad in normal skin, psoriasis vulgaris and keratinocytic tumors. *J Dermatol Sci* 2000;22:132–7.
- Franke TF, Cantley LC. A bad kinase makes good. *Nature* 1997;390:116–7.
- Krüger-Krasagakis S, Galanopoulos VK, Giannikaki L, Stefanidou M, Tosca AD. Programmed cell death of keratinocytes in infliximab-treated plaque-type psoriasis. *Br J Dermatol* 2006;154:460–66.
- Gaspari AA. Innate and adaptive immunity and the pathophysiology of psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 2006;54:S67–70.
- Gottlieb AB, Evans R, Li S i sur. Infliximab induction therapy for patients with severe plaque-type psoriasis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Am Acad Dermatol* 2004;51:534–42.
- Chen SH, Istvan A, Apisarnthanarax N i sur. Response of keratinocytes from normal and psoriatic epidermis to interferon- α differs in the expression of zinc- α 2-glycoprotein and cathepsin D. *FASEB J* 2000;14:565–571.
- Rückert R, Asadullah K, Seifert M i sur. Inhibition of keratinocyte apoptosis by IL-15: a new parameter in the pathogenesis of psoriasis. *J Immunol* 2000;165:2240–50.
- Kennedy MK, Glacum M, Brown SN i sur. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineage in interleukin 15-deficient mouse. *J Exp Med* 2000;191:771–80.
- Kawashima, Doi H, Ito Y, Shibata MA, Yoshinaka R, Otsuki Y. Evaluation of cell death and proliferation in psoriatic epidermis. *J Dermatol Sci* 2004;35:207–14.
- Laporte M, Galand P, Fokan D, de Graef C, Heene M. Apoptosis in established and healing psoriasis. *Dermatology* 2000;200:314–6.