

# Citrullináció – új lehetőség az allergia kezelésére

Dr. Endre László, Vasútegészségügyi Központ, Budapest

Vitán felüli tény, hogy az allergia gyakori betegség. A különböző allergiás kórállapotok kezelésére többnyire jó gyógyszerekkel rendelkezünk. Elég megemlítenünk a különböző (helyileg is alkalmazható) antihisztaminokat, a rövid és hosszú hatású hörgőtágítókat, a helyileg is alkalmazható szteroidokat, a leukotrién antagonistákat, az IgE ellenanyagot, vagy a több mint 100 éve használt hiposzzenzibilizáló kezelést. Az allergiás reakcióban szerepet játszó sejtek és sejtermékek megismerésének köszönhetően ma már előrehaladott állapotban van (az anti-IgE-n kívül) számos egyéb biológiai készítmény kipróbálása is<sup>1</sup>.

Hogy lehet ezek után gyökeresen új gyógyszert felfedezni? Nem tudom. Emlékszem viszont arra, hogy 2004-ben arról írtam ugyanebben a lapban, hogy küszöbön a szép új világ az allergiás kötőhártya-gyulladások kezelése területén<sup>2</sup>. Nem volt nehéz dolgom, mert akkoriban már forgalomban volt néhány országban egy olyan szemcsepp, amelyik az antihisztamin hatása mellett a kötőhártyában lévő speciális hízósejtek membránját is képes stabilizálni.

Most azonban közel sem ilyen rózsás a helyzet. Csupán arról tudok beszámolni, hogy létezik már olyan vegyület (sajnos még nem gyógyszeralapanyag), amelyik egészen újfajta hatásmechanizmussal jelentősen csökkenteni tudja az állatkísérletekben létrehozott allergiás reakciót és *in vitro* az emberi sejtválaszokat. Az erről szóló beszámoló az *Allergy* 2015 októberi számában jelent meg<sup>3</sup>.

Ebben a torontói (Kanada) és birminghami (USA) szerzők azt bizonyították, hogy 2-chloroacetamidin kezeléssel jelentősen mérsékelni tudták az eozinofil sejteknek a gyulladás helyszínére történő áramlását és az IgE-termelést (egerekben). Mindez úgy jöhetett létre, hogy a 2-chloro-

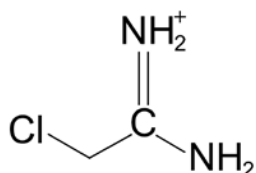
acetamidin úgy ölte meg az aktiválódott limfoid sejteket, hogy az immunrendszer egyéb sejtjeire nézve egyáltalán nem bizonyult toxikusnak.

E jelenség megértéséhez kicsit fel kell frissítenünk bio-kémiai ismereteinket. A 2-chloroacetamidin (az ecetsav amidinje) egy speciális, kis molekulású enzimgátló, amelyik kifejezetten a peptidil-arginin deimináz (a továbbiakban: PAD) enzimek hatását gátolja<sup>4</sup>.

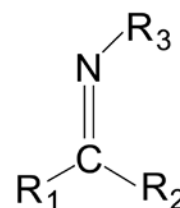
Ezek a PAD enzimek a fehérjében lévő arginin aminosavat kalcium jelenlétében citrullin aminosavvá alakítják. Az arginin guanidino csoportja egy ureido csoporttá és ammóniává hidrolizálódik. A deimináz kifejezés megértéséhez nem árt tisztában lenni azzal, hogy mik azok az „iminek”. Az imin olyan szerves kémiai funkció csoport, amelyben szén-nitrogén kettős kötés található, és a nitrogén atomhoz hidrogén vagy szerves csoport kapcsolódik (természetesen a szénen kívül). Nos, az argininnek van ilyen imin csoportja.

Tudni kell, hogy az arginin (neutrális pH mellett) pozitív töltéssel rendelkező aminosav (ilyen még a lizin és a hisztidin), míg a citrullin neutrális. Mivel citrullin tRNS egyáltalán nincs az emlősök szervezetében, citrullin viszont van néhány fehérjénkben, ezen aminosav megjelenése csak a transzláció utáni módosítás eredménye lehet. Annak lehetőségét, hogy a citrullin előfordulhat valamilyen fehérjében, először 1939-ben írták le<sup>5</sup>, majd jóval később (1962-ben) a *Nature*-ben jelent meg az a cikk, amelyik ezt bizonyította is<sup>6</sup>.

Ezt a módosítást (azaz a citrullinná való átalakítást) elvégző PAD enzimet 1977-ben fedezték fel<sup>7</sup>. Ma már azt is jól tudjuk, hogy ebből a PAD enzimből legkevesebb öt különböző fajta van (közülük egyet nemcsak az emlősökben, hanem a csirkében is megtaláltak), és valamennyiük



1. ábra: A 2-chloroacetamidin képlete



2. ábra: Az imin csoport képlete

génje az 1-es kromoszómán helyezkedik el (1p36.1). A PAD2 a legnagyobb, a PAD6 a legkisebb gén<sup>8</sup>.

További fontos tudnivaló, hogy a PAD enzimek kizárólag a peptidekben található arginin citrullinná történő átalakítását tudják elvégezni, a szabad L-arginin szabad L-citrullinná történő átalakítását a nitrogén-monoxid szintáz végzi, és ez a folyamat nem kalcium dependens (míg a PAD enzim működéséhez kalciumra van szükség). Az sem mindegy, hogy a peptidben hol helyezkedik el az arginin. Ha például két prolin molekula között van, akkor egyáltalán nem tud rá hatni a PAD.

Miért fontos tudnunk erről az arginin–citrullin átalakulásról? Elsősorban azért mert az arginin pozitív töltéssel rendelkező aminosav, a citrullin pedig neutrális, ezért ez az átalakulás nagymértékben befolyásolja a protein töltését, hidrofobitását, térszerkezetét (pl. a protein intracelluláris „hajtogatottsága” megszűnik), ezen keresztül a citrullint tartalmazó fehérjével szembeni immunválasz is. Ezt a tényt felismerve már számos autoimmun betegségben vizsgálták a citrullint is tartalmazó peptidek kóros szerepét (allergiás betegségben szenvedő embereken még nem).

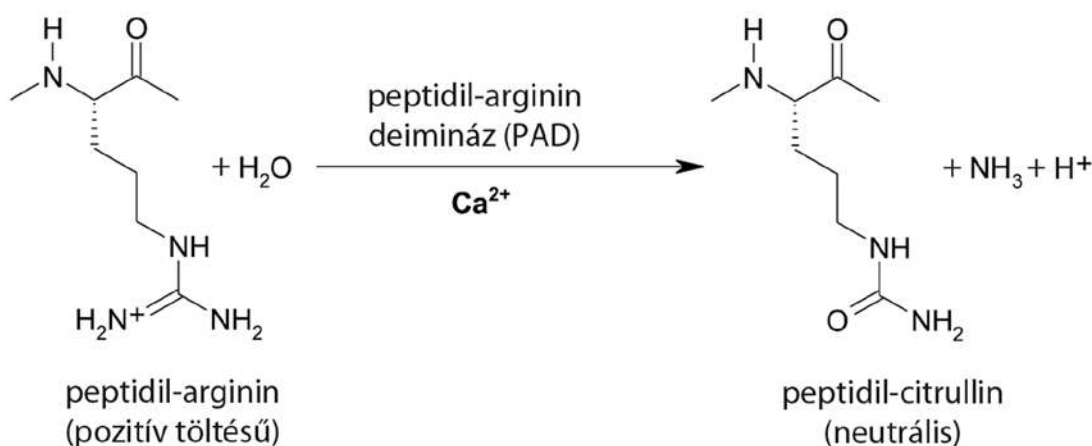
Ahhoz, hogy megértsük a citrullinná való átalakítás (más szóval citrullináció) klinikai jelentőségét, legalább érintőlegesen meg kell ismernünk a különböző PAD enzimeket. A PAD1 főleg a méhben és az epidermiszben fordul elő. A keratinociták végleges kialakulása során a keratint és a filaggrint citrullinálja. A PAD2-ből van a legtöbb. Kimutatható a vázizomzatban, a lépben, az agyban és a külső elválasztású mirigyekben. Két fő szubsztrátja: a mielin bázikus protein (MBP) a központi idegrendszerben és a vimetin a vázizomzatban. Egészséges egyénekben az MBP molekulák 18%-a tartalmaz hat citrullin molekulát, míg a sclerosis multiplexben szenvedőkön ez az arány sokkal magasabb. A makrofágokban is kimutatható

a PAD2, de ezekben a sejtekben túlságosan alacsony a kalcium koncentráció ahhoz, hogy aktivitását kifejthesse. A PAD3 kizárólag a hajhagymákban (vagy az állatok szőrének hagymáiban) mutatható ki. A PAD5 megfelel az egerek PAD4 enzimjének, ezért *Vossenaar és munkatársai* azt javasolják<sup>8</sup>, hogy nevezzük PAD4 enzimnek. Ezt a javaslatot a *HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC)* el is fogadta. Ez a PAD4 enzim főként a granulocitákban és monocitákban expresszálódik. Ez az egyetlen, sejtmagban található PAD enzim. A PAD6 tulajdonképpen az ötödik PAD enzim, amely emlős petesejtekben és korai embriókban mutatható ki<sup>8</sup>.

Legalább a felületes ismeret szintjén meg kell említenünk azt a néhány humán betegséget, amelyekben már sejtek a citrullint tartalmazó fehérjék szerepét.

Psoriasisban például a hiperproliferatív plakkokban található keratinociták nem tartalmaznak citrullinizált keratint. Normál esetben ez a PAD1 enzim hatására keletkezik és ettől lesznek tömörek a keratin filamentumok, ami az epidermis normális szarusodási folyamatához elengedhetetlen<sup>9</sup>.

Rheumatoid arthritisben a legspecifikusabb autoellenanyagok a citrullinizált fehérjék ellen termelődnek. Ezeknek a fehérjéknek nemcsak a szerkezete, hanem az antigenitása és a funkciója is megváltozik. Jelenleg négy ilyen citrullinizált fehérjét ismerünk rheumatoid arthritisben: fibirinogén, vimetin, II-es típusú kollagén és az alfa-enoláz<sup>10</sup>. A citrullint tartalmazó fehérjével szembeni autoellenanyag helyileg a gyulladt ízületi folyadékban termelődik. Ezek a speciális autoellenanyagok már a betegség korai szakaszában kimutathatóak a betegek 80%-ában és a specifitásuk 99%-os, emiatt alkalmasak a kórisme nagyon korai megállapítására<sup>11</sup>. A gyulladt ízületi folyadékban sok PAD2-t kiválasztó makrofág és gyakran PAD4-et tartalmazó granulocita is van.



**3. ábra:** Az arginin–citrullin hidrolizáció

Az idegrostok destrukcióját okozó sclerosis multiplexről érintőlegesen már esett szó. Már említettem, hogy egészséges felnőttekben az MBP molekulák 18%-ában a 19 arginin molekula közül hat citrullinná van átalakítva. Sclerosis multiplexben szenvedő betegeken az MBP molekulák 45%-ában található meg a hat citrullin. Ez a citrullináció az MBP molekulát érzékenyebbé teszi a katepszin D általi degradációval szemben<sup>12</sup>. Azt, hogy a humán MBP molekulát a PAD enzim deiminálni képes, már 1993-ban leírták<sup>13</sup>.

*Vossenaar és munkatársai* úgy vélik, hogy érdemes lenne PAD gátló gyógyszerek fejlesztésén fáradozni, mivel a PAD enzimek termékei számos emberi betegség kialakításában részt vehetnek<sup>8</sup>. A következőkben egy erre irányuló kísérlet kezdeti eredményeit ismertetem.

*Maezawa és munkatársai* egereket immunizáltak<sup>8</sup> a szokásos módon, alumíniumhoz kapcsolt ovalbumin intraperitoneális injekciójával. Az injekciót követő 21. és 23. napon porlasztott ovalbumin belélegeztetésével provokálták ugyanezeket az állatokat. Azt tapasztalták, hogy a várákosnak megfelelően a hörgőmosó folyadékban igen nagy mértékben, 15-szörösre emelkedett a teljes sejtszám, az eozinofil sejtszám pedig a 100-szorosára nőtt. Szöveti vizsgálattal masszív mononukleáris és eozinofil sejt infiltrációt láttak a kishörgők és az erek körül, PAS-festéssel pedig a nyáktermelés fokozódását igazolták. A szenzitizáció hatására az egerek szérumban jelentősen nőtt az ovalbumin-specifikus és a teljes IgE koncentráció.

Ha viszont az ugyanígy kezelt egereknek a 21. és a 24. nap között 5 napig naponta 40 µg/g adagban 2-chloroacetamidin injekciót is adtak, majd a 25. napon leölték őket, akkor nemcsak a tüdő szövettani képe lett jelentősen „normálisabb”, hanem a szérumban allergén-specifikus és teljes IgE koncentrációja is, sőt a Th2-es típusú immunválaszra utaló IL-5 és IL-13 koncentrációja is szignifikáns mértékben csökkent az ilyen kezelést nem kapó egerekhez képest. A 2-chloroacetamidin kezelés során nemcsak az eozinofil sejtszám csökkent szignifikáns mértékben, hanem drámaian esett a CD4+ és kisebb mértékben a CD8+ limfociták száma is. A kezelés viszont egyáltalán nem befolyásolta a provokációt követő IgG1 és IgM szint emelkedést. Mindebből arra következtetnek, hogy a

2-chloroacetamidin szelektíven, csak a Th2-es immunválaszra hatott, és az IgE-n kívül a többi immunglobulint nem befolyásolta.

Megmérték a tüdőszövet és a tüdőt „drenáló” nyirokcsomó, valamint a lép PAD aktivitását és citrullin tartalmát is. Az ovalbumin provokáció után kismértékben megemelkedett a tüdő, és nagymértékben a nyirokcsomó PAD aktivitása, a lépben viszont nem változott. A provokációt követően szignifikánsan nőtt a tüdőszövet citrullin tartalma, amit 2-chloroacetamidin kezeléssel szintén szignifikáns mértékben csökkenteni lehetett.

Az egér lépből származó CD4+ T-sejtek proliferációja *in vitro* ovalbumin-specifikus aktivációt követően nagymértékben beindult, és ezt dózistól függő mértékben jelentősen csökkenteni lehetett a táptalajhoz adott 2-chloroacetamidinnal. Ha viszont a 2-chloroacetamidint 48 órával a tenyésztés kezdete után adták a táptalajhoz, akkor már semmilyen hatása nem volt (nem volt toxikus hatása sem), ami arra utal, hogy a szernek nem általános mérgező hatása van, hanem a korai aktiváció fázisának valamelyik lépését gátolja.

Ezt követően egészséges emberek véréből izoláltak mononukleáris sejteket, majd ezeket forbolmirisztát-acetáttal aktiválták. Az aktiváció mértékét 2-chloroacetamidin hozzáadásával (dózistól függő mértékben) szignifikánsan csökkenteni lehetett. A Jurkat T-sejtek (egy ismert humán T-sejt daganatos sejtvonal) szaporodását a 2-chloroacetamidin szintén gátolta.

Kísérleteik eredményét összefoglalva megállapítják, hogy a 2-chloroacetamidin a tüdő allergiás gyulladásában szerepet játszó legfontosabb szereplőkre hat. Elnyomja a Th2-sejtek aktivációját és csökkenti az antigén-specifikus és a teljes IgE termelést. Állatkísérletes asztma modellben *in vivo* hatékony kezelési módnak bizonyult, anélkül hogy általános toxicitása lenne.

Mindezek ismeretében mit gondoljunk? Hát, nincs még küszöbön a szép új világ... Nem derült ki, minek a citrullinálása történt meg a tüdőben, senki nem vizsgálta még azt sem, hogy a citrullintartalom asztmás betegek tüdőszövetében is megnő-e allergén provokáció után, kimutatható-e a PAD enzimaktivitás fokozódása az allergiás asztmásokon, amikor fulladnak, nincs-e esetleg tartós használat esetén valami-

lyen káros hatása a 2-chloroacetamidinnek (hiszen citrullint tartalmazó fehérjékre normálisan is szükség van az emberi szervezetben, azt pedig csak a PAD enzimek tudják előállítani, amelyeket 2-chloroacetamidin gátol). Azt meg még állatkísérletben sem vizsgálták, nincs-e hatása a magzatra. Szóval, van még kutatnivaló, de legálább tudjuk, hogy érdemes. ■

### Irodalom

1. Boyman O, Kaegi C, Akdis M, et al. EAACI IG Biologicals task force paper on the use of biologic agents in allergic disorders. *Allergy* 2015; 70: 727-754.
2. Endre L: Az allergiás kötőhártya-gyulladás korszerű kezelése. Egy szép új világ küszöbén. *Ameqa* 2004; 10(1): 16-19.
3. Maezawa Y, Paltser G, Tsui H, et al. 2-Chloroacetamide, a novel immunomodulator, suppresses antigen-induced mouse airway inflammation. *Allergy* 2015; 70: 1130-1138.
4. Stone EM, Schaller TH, Bianchi H, et al. Inactivation of two diverse enzymes in the amidinotransferase superfamily by 2-chloroacetamide: dimethylargininase and peptidylarginine deiminase. *Biochemistry* 2005; 44: 13744-13752.
5. Fearon WR. The carbamido diacetyl reaction. A test for citrulline. *Biochem J* 1939; 33: 902-907.
6. Rogers GE. Occurrence of citrulline in proteins. *Nature* 1962; 194: 1149-1151.
7. Rogers GE, Harding HW, Liewellyn-Smith IJ. The origin of citrulline-containing proteins in the hair follicle and the chemical nature of trichohyalin, an intracellular precursor. *Biochim Biophys Acta* 1977; 495: 159-175.
8. Vossenaar ER, Zendman AJW, van Venrooij WJ, Pruijn GJM. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *BioEssays* 2003; 25: 1106-1118.
9. Ishida-Yamamoto A, Senshu T, Takahashi H, et al. Decreased deiminated keratin K1 in psoriatic hyperproliferative epidermis. *J Invest Dermatol* 2000; 114: 701-705.
10. Wegner N, Lundberg K, Kinloch, et al. Autoimmunity to specific citrullinated proteins gives the first clues to etiology of rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 2010; 233: 34-54.
11. Kroot EJ, de Jong BA, van Leeuwen MA, et al. The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1831-1835.
12. Pritzker LB, Joshi S, Gowan JJ, et al. Deimination of myelin basic protein. 1. Effect of deimination of arginyl residues of myelin basic protein on its structure and susceptibility to digestion by cathepsin D. *Biochemistry* 2000; 39: 5374-5381.
13. Lamensa JWE, Moscarello MA. Deimination of human myelin basic protein by a peptidylarginine deiminase from bovine brain. *J Neurochem* 1993; 61: 987-996.