

Nyupptäckta samband mellan lungsjukdom och surfaktantproteiner

■ Lungans surfaktantsystem har två huvuduppgifter: att förhindra kollaps av perifera lufrum genom att sänka ytspänningen i alveolerna och att bidra till försvaret mot invaderande mikroorganismer.

Surfaktant syntetiseras i alveolära typ II-celler och består av en blandning av fosfolipider och ett fåtal specifika proteiner. Denna blandning lagras i typ II-cellerna i form av s k lamellära kroppar, vilka utsöndras i det vätskeskikt som täcker alveolerna. I alveolerna sväller de lamellära kropparna till tubulärt myelin, ett komplext nätverk av fosfolipidmembraner och proteiner, som sannolikt utgör en reservoar från vilken ytaktiva fosfolipider kan spridas till vätskeytan [1] (Figur 1).

Under senare år har fyra lungsurfaktantassocierade proteiner identifierats, benämnda SP-A, SP-B etc efter den ordning i vilken de upptäcktes. Två av dessa proteiner är vattenlösliga, SP-A och SP-D, och två är hydrofoba, SP-B och SP-C. Aminosyrasekvens och sekundärstruktur har studerats i detalj för samtliga fyra proteiner, och för SP-C och SP-D finns även högupplösande tertiärstrukturdata. SP-A är en 18-mer och SP-D är en 12-mer, men proteinerna är strukturellt lika och består av en kollagenlik del kopplad till en lektinlik globulär del. SP-B består av två identiska subenheter. SP-C har en mycket speciell struktur och består av en peptiddel och en lipid (Figur 1).

Surfaktantproteinernas interaktioner med lungans ytaktiva lipider är delvis klarlagda. SP-A och SP-D binder till fosfolipider men är vattenlösliga. SP-B och SP-C är däremot konstant lipidassocierade och accelererar de ytaktiva lipidernas adsorption till en luft-vätskeinterfas, vilket gör att de, gemensamt eller var för sig, kan förmodas spela en viktig roll i den neonatala adaptationsprocessen.

SP-A, SP-B och kalcium är tillsammans nödvändiga och tillräckliga för att bilda tubulärt myelin *in vitro*. SP-A och SP-D stimulerar de alveolära makrofagernas förmåga att bekämpa invaderande bakterier och virus och medverkar förmodligen i lungans försvarssystem.

SP-B har en central roll i lungans funktion

Genetiskt manipulerade möss, vars gener för respektive surfaktantprotein slagits ut eller modifierats, har tagits fram av forskargrupper vid Children's Hospital Medical Center i Cincinnati och vid Cardiovascular Research Institute i San Francisco. Utifrån de egenskaper som beskrivits ovan hade man

SAMMANFATTAT

Fyra surfaktantproteiner är kända, och deras specifika funktioner och betydelse för lungsjukdom har nu börjat kartläggas.

SP-A och SP-D tillhör familjen kollektiner och ingår i lungans försvar mot mikroorganismer.

SP-A-knockout i mus ger en normal lunga men ökad infektionskänslighet.

SP-D-knockout i mus ger alveolär lipoproteinos.

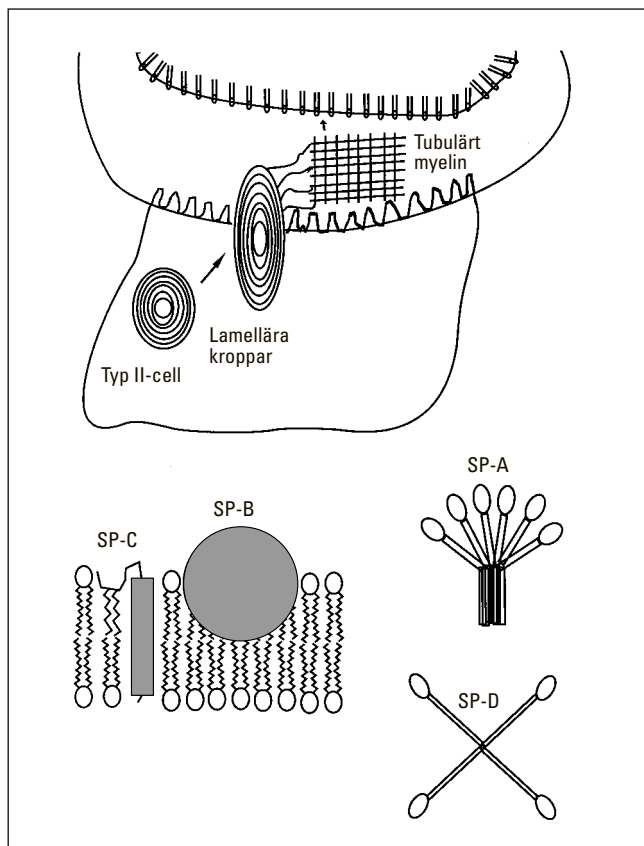
Hereditär brist på SP-B har beskrivits hos barn, är kopplad till flera störningar i surfaktantsyntesen, och resulterar i fatal neonatal andningsinsufficiens.

Mutation i prekursorproteinet till SP-C ger inga akuta lungsymtom men långsamt progredierande lungfibros, möjligen utlöst av aggregerat SP-C.

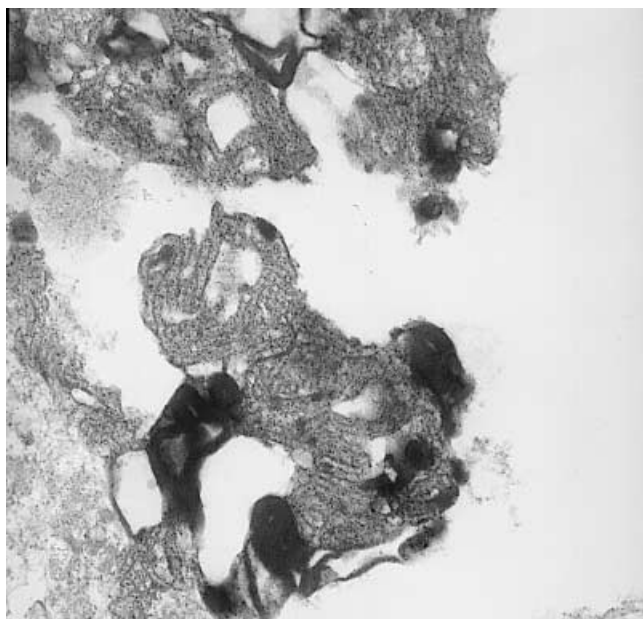
förväntat sig att knockout av SP-A, SP-B eller SP-C skulle leda till andningssvikt, medan brist på SP-A eller SP-D skulle leda till ökad infektionskänslighet. Dessa knockoutstudier har emellertid givit delvis oväntade resultat.

Vid knockout av SP-A kan djuren visserligen ej längre bilda tubulärt myelin men uppvisar trots det ingen andningssvikt i neonatalperioden [2]. Ej heller ses tecken till andningssvikt hos nyfödda försöksdjur efter blockering av SP-A med monoklonal antikropp [3]. SP-A-knockoutmöss har dock ökad känslighet för infektion med grupp B-streptokocker och andra mikroorganismer [4].

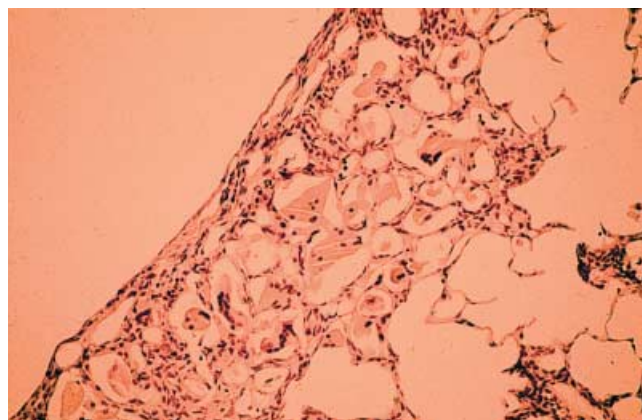
Knockout av genen för SP-D ger varken akuta lungsymtom hos nyfödda möss eller ökad infektionskänslighet men leder till ackumulation av lipider i alveolarrummen, med histologiska förändringar motsvarande s k alveolär lipoproteinos [5, 6] (Figur 2). Fynden talar för att SP-D har betydelse för omsättningen av surfaktantlipider i perifera lufrum. En besläktad observation är alveolär lipoproteinos hos möss där genen för granulocyt/makrofag kolonistimulerande faktor



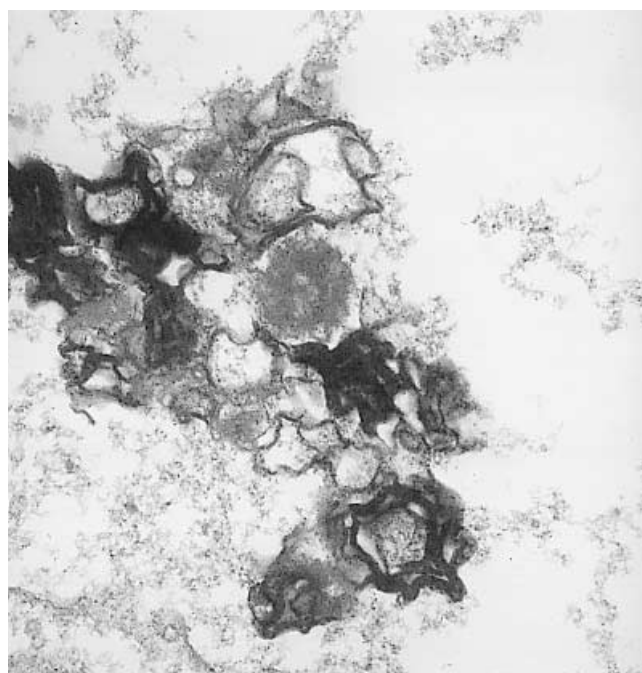
Figur 1. Schematisk bild av surfaktantomsättning och surfaktantproteinernas strukturer. Bilden visar en del av en alveol innehållande tubulärt myelin, monolagret av fosfolipider som sänker ytspänningen samt en alveolär typ II-cell med lamellära kroppar bestående av fosfolipiddubbellager. SP-C består huvudsakligen av en transmembranell del, och SP-B är förmodligen lokaliserad i de ytliga delarna av fosfolipidmembranen. SP-A och SP-D består av långa kollegenlika delar och globulära, lektinlika, perifert lokaliserade huvuden som kan binda och opsonisera mikroorganismer. De olika strukturerna är inte skalenligt återgivna; molekylvikten för SP-A är ca 600 kDa, för SP-D ca 500 kDa, för SP-B 17 kDa och för SP-C 4 kDa.



Figur 3. Normal bildning av rutmönstrigt tubulärt myelin från lamellära kroppar i alveol från nyfödd kanin. Elektronmikroskopisk bild.



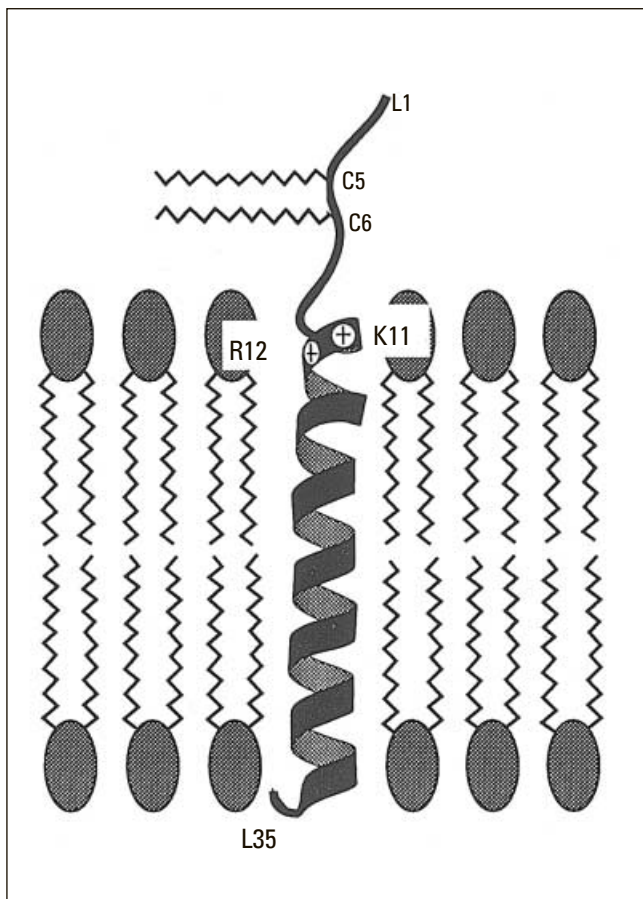
Figur 2. Inlagring av lipoproteinkomplex i alveoler hos mus som saknar SP-D. Ljasmikroskopisk bild.



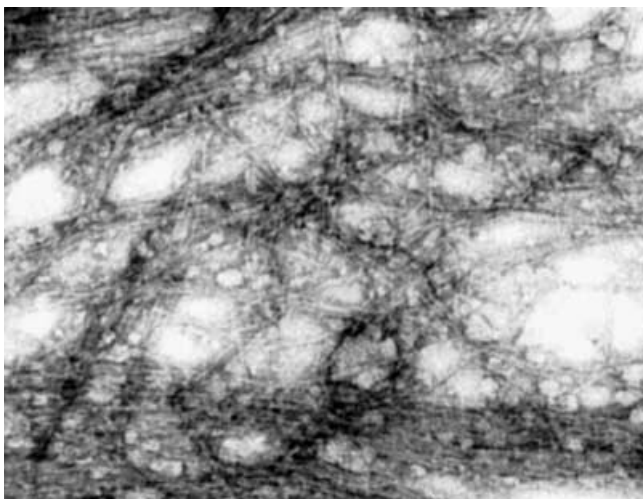
Figur 4. Nyfödd kanin som behandlats med anti-SP-B-antikropp saknar förmåga att bilda tubulärt myelin i alveolrummen. Elektronmikroskopisk bild.

(GM-CSF) slagits ut [7]. Det är dock troligt att patogenesen för lipoproteinos är olika vid brist på SP-D respektive GM-CSF.

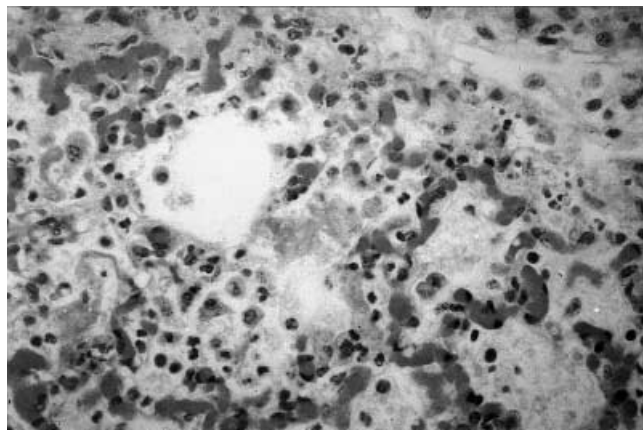
Knockout eller experimentell antikroppsblockering av SP-B leder till akut neonatal andningsinsufficiens med sjunkande eftergivlighet i lungvävnaden, ökat läckage av plasmaproteiner till alveolarrummen, utveckling av hyalina membraner och oförmåga att bilda tubulärt myelin (Figur 3 och Figur 4) [8-10]. SP-B-knockoutmöss saknar både lamellära kroppar och tubulärt myelin. De har sålunda defekt intracellulär syntes och mognad av surfaktant och kan inte stabilisera alveolerna genom att minska ytspänningen. Dessa dramatiska effekter tyder på att SP-B har en central roll i lungans funktion. Sjukdomsförlopp och morfologiska fynd hos barn med kongenital SP-B-brist pekar i samma riktning [11, 12]. Vanligen föreligger här en mutation i genen för prekursorproteinet till SP-B (proSP-B) på kromosom 2. Detta ger en läsramsförskjutning som orsakar prematurt stopp av translationen och total avsaknad av SP-B. De kliniska symtomen domineras av andningssvikt, som inte svarar på surfaktantbehandling. Hos



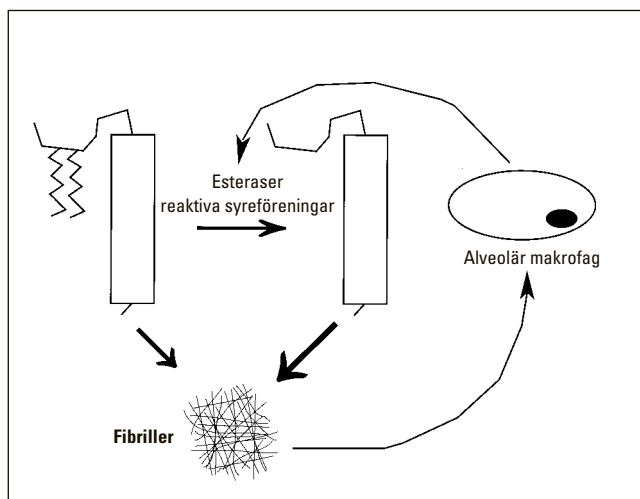
Figur 5. SP-C i ett dubbelskikt av fosfolipider. Specifika aminosyror är identifierade med enbokstavsförkortningar och lokalisering (Leu1, Cys5, Cys6, Lys11, Arg12 och Leu35). De två fettsyrorna bundna till Cys5, och Cys5 är förmodligen lokaliserade inne i lipidlagret men är här ritade utanför membranet för att poängtera att deras lokalisering inte är experimentellt bestämda.



Figur 7. Amyloida fibriller bestående av SP-C, renade från en patient med alveolär proteinos. Elektronmikroskopisk bild.



Figur 6. Ljuskroskopisk bild på lungvävnad från sjuk Belgisk blå-kalv. Bilden visar inflammatorisk lungsjukdom, som vid akut RDS. Förstoring 200x.



Figur 8. Schematisk bild föreställande den föreslagna onda cirkeln där inflammatoriska produkter från alveolära makrofager kan klyva bort fettsyrorna från SP-C, vilket ökar peptidens tendens att ändra struktur och bilda fibriller. SP-C-fibriller kan förmodligen stimulera alveolära makrofager och därmed öka frisättningen av inflammatoriska produkter.

dess barn (och hos SP-B-knockoutmöss) är även den normala proteolytiska klyvningen av prekursorformen av SP-C (proSP-C) till biologiskt aktivt SP-C störd. Detta leder till att ofullständigt spjälkat proSP-C ansamlas vid SP-B-brist (förmodligen på grund av att vidare klyvning inte sker som hos friska individer) och att mängden moget SP-C i alveolrummen är lägre än normalt. En tänkbar förklaring är att SP-B-brist hos möss och människor förhindrar utmognad av lamellära kroppar och att vissa steg i klyvningen av proSP-C sker i dessa organeller.

SP-C är en unik molekyl (inga strukturella släktingar återfinns i det humana genomet) som uttrycks endast i alveolära typ II-celler (Figur 5). Man hade sålunda väntat sig att knockout av SP-C skulle störa lungans neonatala adaptationsprocess och orsaka lungsjukdom. Så är dock inte fallet. Nyligen publicerade data från Glasser och medarbetare i Cincinnati visar väsentligen normal fenotyp hos SP-C-knockoutmöss, vilket talar för att avsaknaden av SP-C under fostrets lungmognadsprocess kan kompenseras genom ännu ej klarlagda mekanismer [13]. Att SP-C-molekylen skulle vara funktionellt betydelselös förefaller osannolikt. SP-C-molekylens struktur,

och genen för proSP-C, är i hög grad bevarad under evolutionen. Nyligen har också rapporterats avsaknad eller mycket låga halter av SP-C, kombinerat med normala SP-B nivåer, i lunga från nyfödda Belgisk blå-kalvar med fatal andningsinsufficiens [14] (Figur 6).

SP-C-aggregat kan sannolikt orsaka sjukdom

I New England Journal of Medicine har Nogee och medarbetare beskrivit de första fallen av hereditär lungsjukdom hos människa kopplad till brist på SP-C [15]. Det rör sig om mor och dotter med kronisk interstitiell fibrotiserande pneumoni, debuterande under första levnadsåret. Immunfärgning av obduktions- respektive lungbiopsimaterial visade avsaknad av proSP-C hos dottern och mycket svag reaktion för proSP-C hos modern. Immunoblotting av lungvävnad visar hos dottern ett smalt band av proSP-C med lägre molekylvikt än normalt proSP-C, men inget påvisbart moget SP-C. DNA-analys avslöjar samma mutation hos mor och dotter. Mutationen påvisades i bägge fallen bara hos en allel, och ärftlighetstypen är med andra ord dominant. Det kan tilläggas att även morfar avlidit i kronisk lungsjukdom med oviss genes.

Mutationen innebär förlust av 37 aminosyror i den karboxyterminala delen av proSP-C, vilket blockerar den intracellulära transporten av proproteinet i typ II-celler och dessutom sannolikt leder till att proproteinet inte veckas normalt och därmed blir obrukbart. Nogee och medarbetare spekulerar i om det abnorma proproteinet kan aggregera i lungvävnaden och därmed utlösa en interstitiell inflammatorisk process. Ett sådant händelseförlopp verkar rimligt, med tanke på att SP-C kan ändra sin struktur och bilda amyloida fibriller som ljus- och elektronmikroskopiskt är mycket lika de fibriller som ses vid amyloidsjukdomar, t ex Alzheimers sjukdom [16]. Stora mängder av olösliga aggregat och fibriller bestående av SP-C har påvisats i lungsköljvätska från patienter med alveolär lipoproteinos (Figur 7).

Vad som orsakar aggregering av SP-C är i nuläget inte känt, men studier av knockoutmöss har givit vissa ledtrådar. Alveolära makrofager från SP-D-knockoutmöss överproducerar väteperoxid, medan alveolära makrofager från GM-CSF-knockoutmöss är underaktiva [17, 18]. Hos SP-D-knockoutmöss ses stora mängder SP-C-aggregat och fibriller, till skillnad från hos GM-CSF-knockoutmöss och normala möss [19]. Det är sålunda möjligt att en ond cirkel etableras genom att å ena sidan en hyperoxiderande alveolär miljö orsakar att SP-C bildar olösliga aggregat eller fibriller och att å andra sidan aggregerat SP-C utlöser en inflammatorisk process (Figur 8).

Som framgått ovan ger isolerad avsaknad av SP-C i knockoutmöss inte upphov till klara patologiska förändringar, medan SP-C-aggregat sannolikt kan orsaka sjukdom. Det samma gäller för amyloid- β -peptiden (A β), som är associerad med Alzheimers sjukdom, och prionproteinet. Det är därför intressant att notera att Kallberg och medarbetare nyligen observerat gemensamma strukturella egenskaper hos SP-C, A β och prionproteinet [20].

Dessa nyupptäckta samband mellan hereditära lungproteindefekter och olika former av lungsjukdom har stor principiell betydelse, även om antalet fall som hittills diagnostiserats är få. Listan över lungsjukdomar orsakade av genetiska defekter, i övrigt omfattande bl a cystisk fibros och α 1-antitrypsinbrist, utvidgas, och därmed växer behovet av nya riktade behandlingsmetoder.

Referenser

- Goerke J. Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. *Biochim Biophys Acta* 1998;1408:79-89.
- Korfhagen TR, Bruno MD, Ross GF, Huelsman KM, Ikegami M, Jobe AH, et al. Altered surfactant function and structure in SP-A gene targeted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:9594-9.
- Kobayashi T, Nitta K, Takahashi R, Kurashima K, Robertson B, Suzuki Y. Activity of pulmonary surfactant after blocking the associated proteins SP-A and SP-B. *J Appl Physiol* 1991;71:530-6.
- LeVine AM, Bruno MD, Huelsman KM, Ross GF, Whitsett JA, Korfhagen TR. Surfactant protein A-deficient mice are susceptible to group B streptococcal infection. *J Immunol* 1997;158:4336-40.
- Botas C, Poulain F, Akiyama J, Brown C, Allen L, Goerke J, et al. Altered surfactant homeostasis and alveolar type II cell morphology in mice lacking surfactant protein D. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:11869-74.
- Korfhagen TR, Sheftelyevich V, Burhans MS, Bruno MD, Ross GF, Wert SE, et al. Surfactant protein-D regulates surfactant phospholipid homeostasis in vivo. *J Biol Chem* 1998;273:28438-43.
- Dranoff G, Crawford AD, Sadelain M, Ream B, Rashid A, Bronson RT, et al. Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis. *Science* 1994;264:713-6.
- Clark JC, Wert SE, Bachurski CJ, Stahlman MT, Stripp BR, Weaver TE, et al. Targeted disruption of the surfactant protein B gene disrupts surfactant homeostasis, causing respiratory failure in newborn mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:7794-8.
- Grossmann G, Suzuki Y, Robertson B, Kobayashi T, Berggren P, Li WZ, et al. Pathophysiology of neonatal lung injury induced by monoclonal antibody to surfactant protein B. *J Appl Physiol* 1997;82:2003-10.
- Robertson B, Kobayashi T, Ganzuka M, Grossmann G, Li WZ, Suzuki Y. Experimental neonatal respiratory failure induced by a monoclonal antibody to the hydrophobic surfactant-associated protein SP-B. *Pediatr Res* 1991;30:239-43.
- Nogee LM, de Mello DE, Dehner LP, Colten HR. Brief report: deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis. *N Engl J Med* 1993;328:406-10.
- Nogee LM, Garnier G, Dietz HC, Singer L, Murphy AM, deMello DE, et al. A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal respiratory disease in multiple kindreds. *J Clin Invest* 1994;93:1860-3.
- Glasser SW, Burhans MS, Korfhagen TR, Na CL, Sly PD, Ross GF, et al. Altered stability of pulmonary surfactant in SP-C-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:6366-71.
- Danlois F, Zaltash S, Johansson J, Robertson B, Haagsman HP, van Eijk M, et al. Very low surfactant protein C contents in newborn Belgian White and Blue calves with respiratory distress syndrome. *Biochem J* 2000;351:779-87.
- Nogee LM, Dunbar AE, Wert SE, Askin F, Hamvas A, Whitsett JA. A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease. *N Engl J Med* 2001;344:573-9.
- Gustafsson M, Thyberg J, Näslund J, Eliasson E, Johansson J. Amyloid fibril formation by pulmonary surfactant protein C. *FEBS Lett* 1999;464:138-42.
- Wert SE, Yoshida M, LeVine AM, Ikegami M, Jones T, Ross GF, et al. Increased metalloproteinase activity, oxidant production, and emphysema in surfactant protein D gene-inactivated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:5972-7.
- LeVine AM, Ree JA, Kurak KE, Cianciolo E, Whitsett JA. GM-CSF-deficient mice are susceptible to pulmonary group B streptococcal infection. *J Clin Invest* 1999;103:563-9.
- Zaltash S. Pulmonary surfactant proteins B and C. Molecular organization and involvement in respiratory disease [avhandling]. Stockholm: Karolinska institutet; 2000.
- Kallberg Y, Gustafsson M, Persson B, Thyberg J, Johansson J. Prediction of amyloid fibril-forming proteins. *J Biol Chem* 2001;276:12945-50.