

Przeciwciała przeciw receptorom dla płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGF) w twardzinie układowej

Autoantibodies to the platelet-derived growth factor receptor in systemic sclerosis

Mariusz Puszczewicz, Grażyna Białkowska-Puszczewicz

Katedra i Klinika Reumatologiczno-Rehabilitacyjna i Chorób Wewnętrznych Akademii Medycznej w Poznaniu, kierownik Katedry i Kliniki dr hab. med. Mariusz Puszczewicz

Słowa kluczowe: autoprzeciwciała, płytkopochodny czynnik wzrostu, twardzina układowa.

Key words: autoantibodies, platelet-derived growth factor, systemic sclerosis.

Streszczenie

W pracy przedstawiono charakterystykę płytkopochodnego czynnika wzrostu, jego mechanizm działania oraz strukturę i znaczenie receptora dla PDGF. Omówiono nowo wykryte przeciwciała przeciw receptorom dla PDGF oraz ich prawdopodobny wpływ na patogenezę twardziny układowej.

Summary

This article briefly reviews the structure and function of platelet-derived growth factor and its receptor. The authors describe presence of autoantibodies against platelet-derived growth factor receptor in systemic sclerosis, and emphasize their probable influence on pathogenesis of the disease.

Wstęp

Data 22 czerwca 2006 r. wydaje się przełomowa dla zrozumienia patogenezы oraz nowych możliwości terapeutycznych twardziny układowej. W tym dniu Silvia Svegliati Baroni i wsp. opublikowali w *New England Journal of Medicine* swoje obserwacje dotyczące obecności autoprzeciwciał skierowanych przeciwko receptorom dla płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGF) u chorych na twardzinę układową [1].

Twardzinę układową charakteryzuje przewlekły proces zapalny o podłożu autoimmunologicznym, którego wynikiem jest postępujące włóknienie skóry oraz narządów wewnętrznych. Mimo że zaburzenia immunologiczne, uszkodzenie komórek śródbłónka i nadmierna produkcja macierzy pozakomórkowej są dobrze udokumentowane, to patogenezа choroby jest nie do końca poznana. Występowanie autoprzeciwciał stwierdza się

u większości chorych [2], w ponad 95% przypadków są to przeciwciała przeciwjądrowe, a niektóre z nich wykazują się wysoką swoistością dla choroby. W przebiegu choroby można także stwierdzić przeciwciała reagujące z antygenami błony komórkowej, cytoplazmy, a także ze składowymi takimi komórek, jak fibroblasty oraz komórki śródbłónka naczyń krwionośnych. Jednak do tej pory nie wiadomo, czy autoprzeciwciała są czynnikiem patogennym, czy jedynie epifenomenem wynikającym z utraty tolerancji immunologicznej.

Od czasu, gdy stwierdzono, że PDGF pobudza produkcję wolnych rodników tlenowych (ROS – *reactive oxygen species*) w fibroblastach [3] oraz gdy wykazano, że przeciwciała pochodzące od chorych na twardzinę układową reagują z fibroblastami zdrowych dawców [4], podjęto próbę znalezienia czynnika stymulującego fibroblasty. Początkowo Yamakage i wsp. zaobserwowali selektywne zwiększenie liczby receptorów dla PDGF (PDGFR)

Adres do korespondencji:

dr hab. med. Mariusz Puszczewicz, Katedra i Klinika Reumatologiczno-Rehabilitacyjna i Chorób Wewnętrznych, Akademia Medyczna, ul. 28 Czerwca 1956 r. 135/147, 61-545 Poznań, tel. +48 61 831 02 71, faks +48 61 831 02 71, e-mail: puszczewicz@hotmail.com

Praca wpłynęła: 7.08.2006 r.

na fibroblastach pochodzących od chorych na twardzinę układową. Zjawisko to tłumaczono zaburzeniem w przekazywaniu sygnału przez TGF- β (*transforming growth factor β*), czynnik ten miał również zwiększać wrażliwość fibroblastów na PDGF [5]. Następnie Sambo i wsp. stwierdzili, że fibroblasty produkują zwiększoną liczbę wolnych rodników tlenowych przy udziale oksydazy NADPH (NOX) [6]. ROS zaś aktywuje proces apoptozy oraz pobudza jądrowy czynnik kappa-B, który aktywuje ekspresję genów dla niektórych czynników biorących udział w procesie zapalnym, takich jak cząsteczki adhezyjne i cytokiny. Ci sami autorzy opisali także istnienie pętli przekazywania sygnału w fibroblastach osób zdrowych, za pośrednictwem której PDGF zwiększa produkcję ROS przez aktywację NOX [7].

W kolejnym etapie badań wykazano, że PDGF oraz wolne rodniki regulują stężenie białka Ras poprzez układ ERK1/2 (kinaz 1. i 2. regulujących pozakomórkowe przekazywanie sygnału aktywowane czynnikiem wzrostu) w fibroblastach chorych na twardzinę układową [7]. Ponadto stwierdzono, że układ ERK 1/2 indukuje gen *H-ras* (*viral Harley rat sarkoma*), ten zaś sam może także aktywować ERK1/2 poprzez protoonkogen *v-ref-1*.

Aktywacja *H-ras* prowadzi do zmian wewnątrzkomórkowych, których rezultatem jest wpływ na jądrowy czynnik kappa-B. Czynnik ten z kolei oddziałuje na zja-

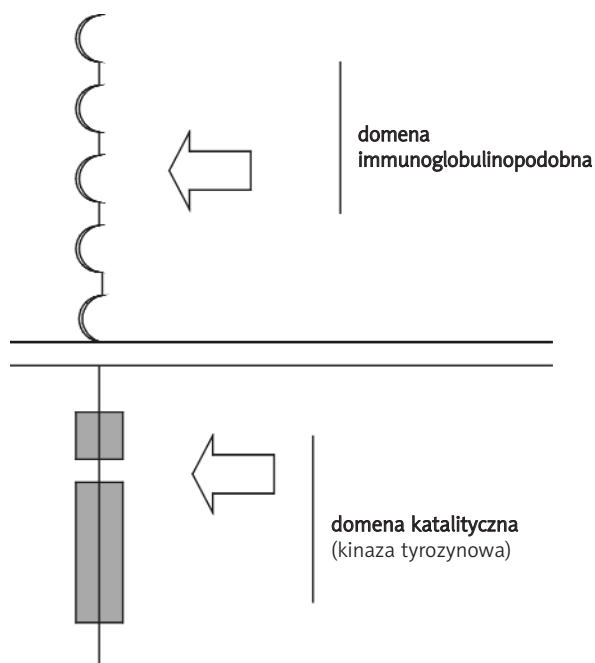
wisko apoptozy, proces zapalny oraz syntezę kolagenu. Fibroblasty pochodzące od chorych na twardzinę w porównaniu z fibroblastami osób zdrowych wykazują względnie zwiększoną aktywność układu Ras-ERK1/2-ROS, a zablokowanie przez preparaty farmakologiczne poszczególnych składowych zmniejsza transkrypcję genów dla kolagenu. Od tego momentu zaczęto poszukiwać w surowicy krwi chorych na twardzinę układową czynnika (czynników) stymulującego (stymulujących) Ras, ERK1/2 i ROS. Wysunięto hipotezę, że obecne u chorych autoprzeciwiactwa mogą pobudzać receptory dla PDGF, co w efekcie prowadzi do aktywacji fibroblastów, a w konsekwencji do rozwoju choroby.

Płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF)

PDGF stanowi grupę białek tworzących 4 rodzaje łańcuchów, tj. PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, które w formie aktywnej występują jako dimery. Z łańcuchów PDGF-A i PDGF-B mogą powstać 3 izoformy, tworzące homodimery PDGF AA, BB lub heterodimer AB. Ich ekspresja jest uzależniona od rodzaju komórki. Z łańcuchów PDGF-C i PDGF-D mogą powstać tylko homodimery CC i DD. Geny dla łańcuchów A i B PDGF znajdują się odpowiednio na chromosomie 7 i 22. Płytkopochodny czynnik wzrostu jest produkowany przez wiele komórek, m.in. przez płytki krwi/megakariocyty, przez komórki śródbłonna naczyń, fibroblasty, komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych, astrocyty, neurony oraz przez monocyty i komórki cytotrofoblastu. PDGF bierze udział w regulacji wzrostu i różnicowania się wielu komórek, a także wykazuje właściwości jako chemoatraktant dla granulocytów obojętnochłonnych, monocytów, komórek mięśni gładkich, fibroblastów oraz komórek mezangium. W procesie gojenia się ran PDGF pobudza syntezę kolagenu I i III oraz glikozaminoglikanów. PDGF jest także czynnikiem biorącym udział w angiogenezie oraz regulacji napięcia naczyniowego – zmniejsza agregację płytek. Odgrywa kluczową rolę w embriogenezie, szczególnie w rozwoju nerek, płuc, naczyń krwionośnych oraz ośrodkowego układu nerwowego [8].

Receptory dla PDGF (PDGFR)

Omawiany czynnik wzrostu działa przez aktywację dwóch strukturalnie zbliżonych receptorów: α i β . Oba receptory to kinazy tyrozynowe, które charakteryzują się różnym powinowactwem do czynnika wzrostu. Receptor α o masie cząsteczkowej 170 kD wiąże wszystkie izoformy PDGF, a receptor β , którego masa cząsteczkowa wynosi 180 kD, wiąże tylko izoformy zawierające łańcuch PDGF-B. Receptory są zbudowane z fragmentu pozakomórkowego, będącego cząsteczką zbudowaną z 5 immunoglobulinopodobnych fragmentów, oraz czę-



Ryc. 1. Struktura receptora dla płytkopochodnego czynnika wzrostu.

Fig. 1. Structure of platelet-derived growth factor receptor.

ści wewnątrzkomórkowej, stanowiącej kinazę tyrozynową podzieloną na dwie domeny katalityczne (ryc. 1.).

Struktura receptorów jest podobna do receptora dla czynnika stymulującego kolonie 1 (CSF-1). Gen dla receptora α jest zlokalizowany na chromosomie 4q12, a dla β na chromosomie 5. Receptory – zarówno α , jak i β – dla PDGF występują na różnych komórkach (tab. I).

Fibroblasty oraz komórki mięśni gładkich zawierają oba receptory, natomiast płytki krwi mają tylko receptory α , a makrofagi tylko β . Interesujący jest fakt, że liczba receptorów na komórkach nie jest stała. Na przykład liczba receptorów β na komórkach tkanki łącznej jest mała, jednak zwiększa się w czasie procesu zapalnego [9].

Po połączeniu się PDGF z dwoma receptorami dochodzi do internalizacji kompleksu oraz jednoczesnej fosforylacji i pobudzenia kinazy tyrozynowej. Fosforyzowana tyrozyna tworzy miejsce dla domeny SH2 licznych wewnątrzkomórkowych substratów. Należą do nich: kinaza fosfatydyloinozytol 3 (PI3K), białko adaptorowe Grb-2, które tworzy kompleks z Sos-1 aktywujące Ras, fosfolipaza C γ (PLC γ), RasGAP (białko aktywujące GTPazę Ras), fosfataza tyrozynowa SHp2 oraz kinaza Src. Substraty te bezpośrednio lub pośrednio aktywują kinazę PDGFR, czego efektem jest pobudzenie transkrypcji odpowiednich genów. Ponadto może ona aktywować lub inaktywować cząsteczki zaangażowane w proces apoptozy komórki oraz inne jej czynności [10].

Przeciwciała przeciw PDGFR

Baroni i wsp. wykazali obecność autoprzeciwciał pobudzających receptor dla PDGF w surowicy krwi chorych na twardzinę układową, natomiast nie wykazali ich u nikogo z grupy kontrolnej. Swoje wnioski wysunęli na podstawie 5 niezależnych badań. W pierwszym doświadczeniu wykazali, że izolowane od chorych na twardzinę układową immunoglobuliny G stymulowały produkcję wolnych rodników w komórkach zawierających receptory dla PDGF, natomiast brak było tego działania w komórkach pozbawionych receptorów. W drugim badaniu stwierdzono, że immunoglobuliny chorych na twardzinę układową rozpoznają i immunoprecypitują natywne receptory α i β dla PDGF. W trzecim badaniu stwierdzono, że frakcja immunoglobulin lub oczyszczone autoprzeciwciała uzyskane od chorych na twardzinę układową indukują przekształcenie fibroblastów osób zdrowych w miofibroblasty, zwiększają w nich ekspresję kolagenu typu I oraz nasilają syntezę wolnych rodników tlenowych. W czwartym doświadczeniu wykazano, że immunoglobuliny pochodzące od chorych na twardzinę, łączące się z receptorami dla PDGF oraz aktywujące produkcję rodników tlenowych, są usuwane przez adsorpcję na rekombinowanych PDGFR

Tabela I. Komórki zawierające receptory dla PDGF

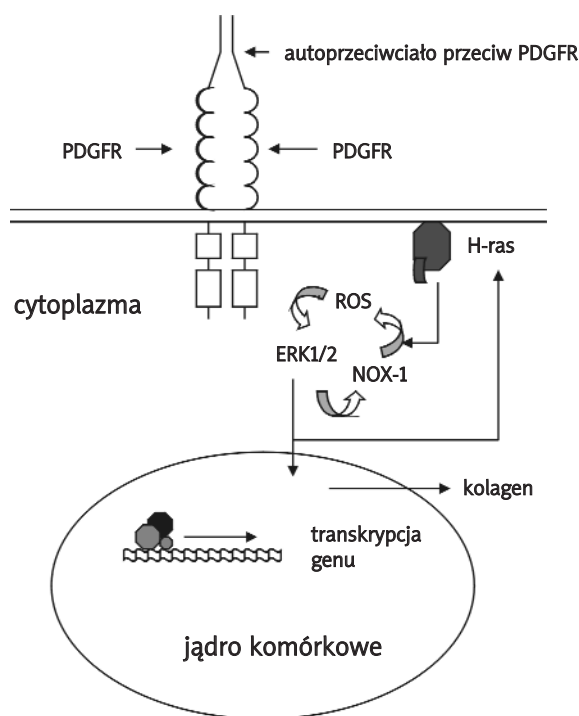
Table I. Cell type expression PDGF receptors

Typ komórki	Receptor α	Receptor β
fibroblasty	+	+
komórki mezangialne nerki	+	+
komórki Leydiga	+	+
komórki śródbłonka zatok wątroby	+	
mioblasty		+
komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych	+	+
komórki śródbłonka naczyń włosowatych		+
peritocyty		+
astrocyty	+	
neurony	+	+
płytki krwi	+	
limfocyty T		+
makrofagi		+

lub na komórkach zawierających te receptory, nie obserwowano tego zjawiska w przypadku wykorzystania komórek bez PDGFR. PDGF kompetencyjnie hamował wiązanie się oczyszczonych przeciwciał do obecnych na komórkach PDGFR, ponadto działanie immunoglobulin stymulujących produkcję wolnych rodników tlenowych było hamowane przez inhibitory PDGFR. W końcu w piątym doświadczeniu autorzy wykazali przeciwciała przeciw PDGFR u wszystkich 46 chorych na twardzinę układową, natomiast nie stwierdzono ich u osób z grupy kontrolnej, która obejmowała 20 zdrowych osób, 14 chorych na toczeń rumieniowaty układowy, 15 z objawem Raynauda, 15 chorych na reumatoidalne zapalenie stawów oraz 10 na idiopatyczne włóknienie płuc.

Autorzy uważają, że autoprzeciwciała przewlekłe pobudzają receptory dla PDGF, w przeciwieństwie do okresowej stymulacji przez PDGF. Uważają także, że przeciwciała, pobudzając PDGFR, przyczyniają się do stabilizacji białka Ras i indukcji ERK 1/2. Wynikiem tych reakcji jest stałe zwiększenie stężenia wolnych rodników tlenowych, co wspólnie z pobudzeniem ERK 1/2 prowadzi do pobudzenia ekspresji genu dla kolagenu, a w efekcie do zwiększenia syntezy kolagenu i włóknienia (ryc. 2.).

Podsumowując, obecne badania sugerują, że tzw. profibrotyczny fenotyp fibroblastów pochodzących od chorych na twardzinę układową jest wynikiem wpływu trzech czynników.



Ryc. 2. Proponowany mechanizm działania przeciwciał przeciw PDGFR u chorych na twardzinę układową.

Fig. 2. Proposed cascade triggered by autoantibodies against PDGFR in systemic sclerosis.

Pierwszy to wynik nieprawidłowego przekazywania sygnału przez TGF- β , prowadzący do zwiększenia się liczby receptorów dla PDGF. Drugi to względne zwiększenie aktywności szlaku przekazywania sygnału (Ras-ERK 1/2-ROS), będące wynikiem zwiększonej liczby receptorów dla PDGF. Trzeci zaś to obecność pobudzających auto przeciwciał skierowanych przeciwko PDGFR, które aktywują kaskadę Ras-ERK1/2-ROS.

Perspektywy terapeutyczne

Z uwagi na fakt, że receptory dla PDGF należą do kinaz tyrozynowych, zastosowanie selektywnego inhibitora kinazy tyrozynowej (STI571 – *imatinig mesylate*) lub inhibitora fosforylacji PDGFR (AG 1296) może stanowić nową strategię terapeutyczną twardziny układowej.

Piśmiennictwo

1. Baroni SS, Santillo M, Bevilacqua F, et al. Stimulatory autoantibodies to the PDRF receptor in systemic sclerosis. *New Eng J Med* 2006; 354: 2667-76.
2. Puszczewicz M. Przeciwciała przeciwjądrowe w twardzinie układowej – charakterystyka antygenowa i znaczenie kliniczne. *Reumatologia* 2006; 44: 169-75.

3. Stein CM, Tanner SB, Award JA, et al. Evidence of free-radical-mediated injury (isoprostane overproduction) in scleroderma. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1146-50.
4. Chizzolini C, Raschi E, Rezzonico R, et al. Autoantibodies to fibroblasts induce a proadhesive and proinflammatory fibroblast phenotype in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 1602-13.
5. Yamakage A, Kikuchi K, Smith EA, et al. Selective up-regulation of platelet-derived growth factor alpha receptors by transforming growth factor beta in scleroderma fibroblasts. *J Exp Med* 1992; 175: 1227-34.
6. Sambo P, Baroni SS, Luchetti M, et al. Oxidative stress In scleroderma: maintenance of scleroderma fibroblast phenotype by the constitutive up-regulation of reactive oxygen species generation through the NADPH oxidase complex pathway. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 2653-64.
7. Svegliati S, Canello R, Sambo P, et al. Platelet-derived growth factor and reactive oxygen species (ROS) regulate Ras protein levels in primary human fibroblasts via ERK1 /2: amplification of ROS and Ras in systemic sclerosis fibroblasts. *J Biol Chem* 2005; 280: 36474-82.
8. Nowak MM, Mucha K, Foroniewicz B. Znaczenie PDGF w patogenezie wybranych jednostek chorobowych. *Pol Arch Med Wew* 2005; 113: 603-8.
9. Rubin KA, Tingstrom G, Hansson E, et al. Induction of B-type receptors for platelet-derived growth factor in vascular inflammation: possible implications for development of vascular proliferative lesions. *Lancet* 1988; 1: 1353-6.
10. Funa K, Hidetaka U. Regulatory mechanisms for the expression and activity of platelet-derived growth factor receptor. *Act Bioch Pol* 2003; 50: 647-58.