L´antigene PCNA

S. Platzgummer[a], N. Bizzaro[b]

[a] *Laboratorio Analisi, Ospedale di Merano (BZ)*
[b] *Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale di Tolmezzo (UD)*

Riassunto

L'antigene PCNA è una proteina nucleare che svolge un ruolo chiave nella sintesi del DNA a doppia elica. Il PCNA viene espresso solo nelle fasi G1 tardiva e S del ciclo cellulare ed è riconosciuto da autoanticorpi specifici il cui riscontro è utile ai fini diagnostici e prognostici. Gli anticorpi anti-PCNA sono presenti soprattutto in pazienti affetti da LES e il loro livello anticorpale è correlato alla gravità del danno renale e al decorso clinico della malattia.

Summary

The PCNA antigen.

The proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is predominantly expressed by proliferating cells with increased production in the late G1 to S phase. PCNA plays an essential role in DNA replication and repair. Autoantibodies to PCNA are mainly detected in patients with systemic lupus erythematosus, but not exclusive to this disease. However, in patients with SLE, they have a prognostic value for neurological and renal involvement and they strictly correlate with the disease course.

Key words: PCNA, SLE, review.

Nel 1978 Miyachi et al. hanno rilevato mediante tecniche di immunofluorescenza indiretta (IFI) su substrati costituiti da colture cellulari attivate da mitogeni, un autoanticorpo diretto contro antigeni associati al ciclo cellulare, caratterizzato da fluorescenza nucleare granulare diffusa di intensità variabile e ristretta alle sole cellule in mitosi [1]. Per tale motivo, l'antigene bersaglio è stato denominato proliferating cell nuclear antigen (PCNA).

Evidenziato inizialmente solo in pazienti affetti da lupus eritematoso sistemico (LES)[2], l'anticorpo anti-PCNA è stato per lungo tempo considerato specifico per questa malattia; studi recenti hanno dimostrato che gli epitopi riconosciuti da questi anticopi sono in realtà numerosi e complessi, alcuni dei quali esclusivi del LES e altri invece condivisi con altre malattie autoimmuni del connettivo [3].

Nel 1980 è stato identificato un anticorpo diretto contro la ciclina, con quadro fluoroscopico simile al PCNA [4,5]. Benchè per molti anni sia stata considerata il target degli autoanticorpi anti-PCNA [6], la ciclina è in realtà una proteina funzionalmente associata ma diversa dal PCNA [7].

Struttura molecolare dell´antigene PCNA

L´antigene PCNA è un polipeptide nucleare di 34 kDa che esiste prevalentemente in forma omotrimerica con un foro anulare centrale [2,6] (Figura 1). Questa forma permette al PCNA di fungere da "molletta" e di interagire con le molecole coinvolte nella sintesi del DNA. La proteina è molto conservata nelle specie e l'isoforma umana mostra un'analogia con quella del ratto (90%) e con quella del lievito (35%). L´espressione del PCNA nelle cellule è aumentata nella fase tardiva di G1 e nella fase S del ciclo cellulare, cioè prima della sintesi del DNA. Negli ultimi anni è stato chiarito che il PCNA è presente nel nucleo cellulare sia in forma libera che associato ad altre proteine nucleari a formare complessi essenziali per la replicazione del DNA e per la regolazione del ciclo cellulare [8,9].

Ruolo biologico del PCNA

Il PCNA è una proteina ausiliaria della DNA polimerasi δ, enzima deputato alla produzione di lunghe catene di DNA a doppia elica (dsDNA) [10-12] e il complesso proteico PCNA-ciclina svolge un ruolo chiave nei meccanismi di regolazione del ciclo cellulare [13]. Evidenze indirette sulla sua funzione regolatoria sono state ottenute osservando gli effetti inibitori prodotti da anticorpi anti-PCNA. Infatti, su nuclei di uova di rana, gli anticorpi anti-PCNA presenti nel siero di pazienti con LES sono in grado di bloccare la sintesi del dsDNA, inibendo la unione della δ polimerasi e del fattore di replicazione C (RFC) al PCNA [14]. Tuttavia, il suo ruolo biologico è certamente molto più ampio e complesso a causa del gran numero di interazioni che il PCNA ha con altre proteine che regolano la sintesi e la riparazione del DNA [15]: oltre alla polimerasi δ, le DNA polimerasi α e ε, le DNA primasi, l'RNAasi H, la proteina di replicazione A (RPA), l'RFC, la DNA ligasi I, le topoisomerasi I e II, l'endonucleasi 1 flap specifica (FEN1), la proteina dello Xeroderma *pigmentosum* di gruppo G (XP-G), la DNA elicasi II (NDH II), la proteina *mute S homolog 2 mismatch*

Corrispondenza a: Dott. Stefan Platzgummer, Laboratorio Analisi, Ospedale "Franz Tappeiner" - USL Ovest Merano, Via Rossini 5, 39012 Merano (BZ), Tel. 0473-263001, fax 0473-264692, e-mail: stefan.platzgummer@asbmeran-o.it

Figura 1. Struttura molecolare dell'antigene PCNA (per gentile concessione del Department of Biochemistry & Molecular Biology of the University College London).

repair (MSH2), la proteina *mute L homologous 1* (MLH1), il *growth arrest and DNA damage induced gene 45* (Gadd45) e la gliceraldeide 3 fosfato deidrogenasi (GAPDH) [16,17].
Il PCNA è coinvolto inoltre nella metilazione del DNA, nel condensamento della cromatina e nella trascrizione del rDNA insieme ad altre proteine: la DNA (citosina 5) metiltransferasi (MCMT), il fattore 1 di assemblaggio della cromatina (CAF1), la RNA polimerasi I, il Ku70/80, il fattore di trascrizione IID (TFIID) e il fattore di trascrizione terminale del rDNA (TTF-1) [3].

Gli autoanticorpi

Dopo la prima descrizione da parte di Miyachi nel 1978 [1], negli anni successivi numerosi ricercatori hanno studiato gli epitopi del PCNA utilizzando antigene purificato, antigene ricombinante e peptidi sintetici con sieri di pazienti LES e anticorpi monoclonali murini ed hanno osservato che gli anticorpi anti-PCNA murini reagiscono soprattutto con epitopi lineari di PCNA ricombinante o con frammenti peptidici di PCNA ma non con epitopi presenti nella molecola nativa [18,19].
Gli epitopi principali individuati da anticorpi murini risiedono nei segmenti aminoacidici 111–125 e 181–195, mentre quelli immunopurificati da soggetti con LES reagiscono con epitopi conformazionali in cui sia presente il residuo 261 N terminale [20,21]. Inoltre, Takasaki et al. hanno evidenziato che gli anticorpi monoclonali murini reagiscono soprattutto con PCNA complessato ad altre proteine, mentre gli autoanticorpi di pazienti LES reagiscono prevalentemente con PCNA libero [22]. A dimostrazione della complessità delle interazioni immunologiche, recentemente gli stessi autori hanno riscontrato che la maggior parte dei pazienti con LES, oltre agli autoanticorpi anti-PCNA (34 kDa) produce anche autoanticorpi diretti contro numerose componenti dei complessi proteici associati al PCNA [3].

Gli anticorpi monoclonali anti-PCNA sono stati utilizzati nella ricerca per identificare le proteine e i meccanismi coinvolti nella sintesi del dsDNA e negli altri processi sopra menzionati. Anticorpi ricombinanti anti-PCNA sono stati inoltre utilizzati in test capture-ELISA e citometria a flusso per la ricerca di cellule blastoidi e nella valutazione dell´attività proliferativa delle cellule maligne in pazienti affetti da neoplasie solide [23-25].

Metodi di determinazione degli autoanticorpi

Gli anticorpi anti-PCNA possono essere ricercati con diversi metodi analitici: IFI su cellule HEp-2, tecniche di precipitazione su gel (immunodiffusione e controimmunoelettroforesi), ELISA con antigene ricombinante, capture-ELISA con anticorpi monoclonali anti-PCNA, line immunoassay (LIA) e Westernblot su estratti cellulari. Il metodo di elezione nella fase di screening è l'IFI su cellule HEp-2, in cui il pattern fluoroscopico è caratteristicamente pleomorfo con una fluorescenza che varia in dipendenza del ciclo cellulare e che interessa solo il 10-50% delle cellule presenti nel preparato (Figura 2). Le cellule che si trovano in fase G1 sono negative; nella fase tardiva G1-iniziale S compaiono granulazioni nucleari fini che interessano anche i nucleoli, mentre nella fase tardiva S i nucleoli diventano negativi [26]. E' bene tener presente che non sempre la presenza di anticorpi anti-PCNA può essere messa in evidenza col metodo IFI, dal momento che il tipico pattern puó essere mascherato da altri anticorpi presenti nel siero.
In IFI sono stati descritti almeno 3 sottotipi, PCNA, pseudo PCNA-1 e pseudo PCNA-2 [27] (Tabella I) che sarebbe opportuno saper riconoscere correttamente dal momento che solo gli anticorpi anti-PCNA hanno sicura rilevanza clinica, mentre gli altri autoanticorpi sono rivolti verso proteine associate al ciclo cellulare, il cui significato non è chiaro [28,29].
Considerata la difficoltà di interpretazione del quadro, noi riteniamo che in IFI sia sufficiente segnalare la presenza di un pattern "tipo PCNA", demandando la corretta definizione della specificità ad indagini di secondo livello (ELISA, LIA, Western blot).

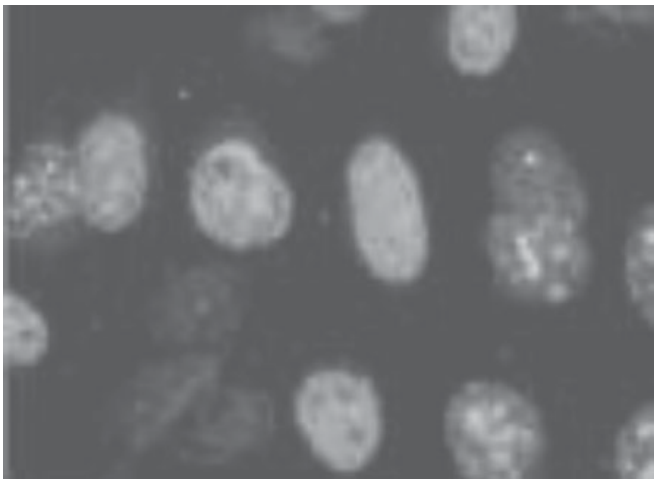

Figura 2. Quadro fluoroscopico pleomorfo prodotto da anticorpi anti-PCNA in immunofluorescenza indiretta su cellule HEp-2.

Tabella I. Classificazione degli anticorpi anti-PCNA e quadro fluoroscopico osservato in immunofluorescenza indiretta su cellule HEp-2 nelle diverse fasi del ciclo cellulare[27].

Ciclo cellulare	*PCNA*	*Pseudo PCNA 1*	*Pseudo PCNA 2*
G1	Negativo	Negativo	Negativo
S iniziale	Rare granulazioni	Rare granulazioni	Negativo
S intermedia	Grandi granuli separati	Granuli fini condensati	Granuli fini e rari
S tardiva	Rare granulazioni	Granuli fini e condensati	Grandi granuli irregolari
G2	Rare granulazioni, nucleoli negativi	Granuli molto fini e condensati	Grandi "spot" e fluorescenza nucleolare

Frequenza, significato e associazioni cliniche

L´esatta prevalenza degli anticorpi anti-PCNA nel LES e nelle altre patologie autoimmuni è controversa. Complessivamente, i dati presenti in letteratura riportano una frequenza nel LES compresa tra il 2 e il 10% a seconda del metodo di rilevazione utilizzato [9,30].

Negli ultimi anni la presunta specificità degli anti-PCNA per il LES è stata messa in discussione. Nel 1983 Fritzler ne ha riscontrato la presenza in 7 sieri su 3000 pazienti con connettivite [31]. Cinque di questi sette pazienti erano affetti da LES (5 con artrite, 4 con glomerulonefrite diffusa proliferativa e 4 con ipocomplementemia); gli altri due pazienti erano affetti rispettivamente da glomerulonefrite rapidamente progressiva e da artrite reumatoide. Nel 1997 Nojima, utilizzando la tecnica di immunodiffusione con antigene purificato, ha descritto due casi di pazienti anti-PCNA positivi affetti da pseudostruzione cronica intestinale con segni clinici e radiografici di sclerosi sistemica [32].

In uno studio taiwanese, in cui sono stati impiegati metodi ELISA e di immunoblot con antigene ricombinante, anticorpi anti-PCNA sono risultati positivi nel 12.3% di 243 pazienti affetti da infezione da HBV, nel 18.7% di 379 pazienti affetti da epatite da HCV e solo nel 6.3% degli 80 pazienti con LES [33].

La spiegazione di questa apparente aspecificità risiede probabilmente nell'utilizzo di test diagnostici che impiegano preparazioni antigeniche di PCNA non perfettamente purificato. Recentemente è stato infatti dimostrato come i sieri di pazienti con LES, positivi per anti-PCNA, contengano in realtà numerosi autoanticorpi diretti non solo contro il PCNA libero, ma anche contro almeno altre 20 diverse proteine PCNA-associate, mentre i sieri di pazienti con altre malattie del connettivo o con malattie infettive reagiscono solo con un numero ristretto di proteine PCNA-associate ma non con il PCNA libero [3,34]. A conferma di ciò, Takasaki ha dimostrato con metodi di immunoblot che autoanticorpi diretti contro proteine associate al PCNA sono presenti nel 31% dei pazienti con LES, nel 15% di quelli con sindrome di Sjögren, nel 15% con PM/DM, nel 20% con sclerosi sistemica e nel 9% con artrite reumatoide [9]. Da questi dati sembrerebbe pertanto chiaro che nel LES la risposta autoanticorpale è multipla e include epitopi specifici (anti-PCNA da 34 kDa) e aspecifici (anti-proteine associate al PCNA), mentre nelle altre malattie la specificità autoanticorpale è sempre e solo diretta verso le proteine associate al PCNA.

A prescindere dalla loro prevalenza e specificità, vi sono indicazioni che la presenza di anticorpi anti-PCNA in pazienti con LES si associ a interessamento renale, cerebrale e trombocitopenia [35] e che anche il titolo anticorpale correli fortemente con il danno renale [36].

Dopo il trattamento con steroidi si assiste in genere ad un calo del titolo anticorpale e dopo l'impiego di sostanze citotossiche come la ciclofosfamide, si è osservata la scomparsa dell'anticorpo.

In conclusione, l'insieme di questi dati induce a ritenere che molto spesso gli anticorpi che vengono definiti nei sistemi diagnostici come anticorpi anti-PCNA siano costituiti in realtà da anticorpi anti-proteine associate al PCNA e come tali non siano esclusivi del LES ma possano essere presenti in altre patologie. Tuttavia, quando si riscontrano in soggetti con LES, hanno un chiaro significato prognostico negativo per un aumentato interessamento dei distretti renale e neurologico.

Bibliografia

1. Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. J Immunol 1978; 121:2228-34.
2. Takasaki Y, Fishwild D, Tan EM. Characterization of proliferating cell nuclear antigen recognized by autoantibodies in lupus sera. J Exp Med 1984; 159:981-92.
3. Kaneda K, Takasaki Y, Takeuchi K, Yamada H, Nawata M, Matsushita M, et al. Autoimmune response to proteins of proliferating cell nuclear antigen multiprotein complexes in patients with connective tissue diseases. J Rheumatol 2004; 31:2142-50.
4. Bravo R, Celis JE. A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells. J Cell Biol 1980; 84:795-802.
5. Bravo R, Fey SJ, Bellatin J, Mose Larsen P, Arevalo J, Celis JE. Identification of a nuclear and of a cytoplasmic polypeptide whose relative proportions are sensitive to changes in the rate of cell proliferation. Exp Cell Res 1981; 136:311-9.
6. Ogata K, Ogata Y, Nakamura RM, Tan EM. Purification and N-terminal amino acid sequence of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin and development of ELISA for anti-PCNA antibodies. J Immunol 1985;135:2623-7.
7. McCarthy-Farid G. Proliferating cell nuclear antigen autoantibodies. In: Peter JB, Shoenfeld Y (eds.), Autoantibodies. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 1996. pp. 651-4.
8. Applegren N, Hickey RJ, Kleinschmidt AM, Zhou Q, Coll J, Wills P, et al. Further characterization of the

human cell multiprotein DNA replication complex. J Cell Biochem 1995; 59:91-107.
9. Takasaki Y, Kogure T, Takeuchi K, Kaneda K, Yano T, Hirokawa K, et al. Reactivity of anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) murine monoclonal antibodies and human autoantibodies to the PCNA multiprotein complexes involved in cell proliferation. J Immunol 2001; 166:4780–7.
10. Krishna TS, Kong XP, Gary S, Burgers PMJ, Kuriyan J. Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA. Cell 1994; 79:1233-43.
11. Zhang G, Gibbs E, Kelman Z, O´Donnell M, Hurwitz J. Studies on the interactions between human replication factor C and human proliferating cell nuclear antigen. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96:1869-74.
12. Waga S. Stillmann B. Anatomy of a DNA replication fork revealed by reconstitution of SV40 DNA replication in vitro. Nature 1994; 369:207-12.
13. Xiong Y, Zhang H, Beach D. D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. Cell 1992; 71:505-14.
14. Wong RL, Katz ME, Ogata K, Tan EM Cohen S. Inhibition of nuclear DNA synthesis by autoantibody to proliferating cell nuclear antigen/cyclin. Cell Immunol 1987; 110:443-8.
15. Loor G, Zhang SJ, Zhang P, Toomey NL, Lee MYWT. Identification of DNA replication and cell cycle proteins that interact with PCNA. Nucl Acid Res 1997; 25: 5041-6.
16. Takasaki Y, Kaneda K, Yamada H, Nawato M, Ikeda K, Matsushita M, et al. Autoimmune response to glyceraldehyde (GAPDH) is strongly associated with its cellular function in lupus patient. In: Conrad K, Humbel RL, Meurer M, Shoenfeld Y, Tan EM (eds). Autoantigens, Autoantibodies, Autoimmunity. Lengerich: Pabst, 2002. pp 93–115.
17. Takasaki Y, Kaneda K, Matsushita M, Yamada H, Nawata M, Matsudaira R, et al. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is a novel autoantigen leading autoimmune responses to proliferating cell nuclear antigen multiprotein complexes in lupus patients. Int Immunol 2004; 16:1295-304.
18. Roos G, Landberg G, Huff JP, Houghten R, Takasaki Y, Tan EM. Analysis of the epitopes of proliferating cell nuclear antigen recognized by monoclonal antibodies. Lab Invest 1993; 68:204-10.
19. Huff JP, Roos G, Peebles CL, Houghten R, Sullivan KF, Tan EM. Insight into native epitopes of proliferating cell nuclear antigen using recombinant protein products. J Exp Med 1990; 172:419-29.
20. Ogata K, Ogata Y, Takasaki Y, Tan EM. Epitopes on proliferating cell nuclear antigen recognized by human lupus autoantibody and murine monoclonal antibody. J Immunol 1987; 139: 2942–6.
21. Brand SR, Bernstein RM, Mathews MB. Trimeric structure of human proliferating cell nuclear antigen. Implications for enzymatic function and autoantibody recognition. J Immunol 1994; 153:3070-8.
22. Takasaki Y, Ohgaki M, Kodama A, Ogata K, Hashimoto H, Shirai T, et al. A sandwich type enzyme-linked immunosorbent assay for proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin using monoclonal antibodies. J Immunol Methods 1990; 132:227–37.
23. Takahashi T, Takasaki Y, Yano T, Takeuchi K, Oshimi K, Hashimoto H. Detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in peripheral blood mononuclear cells and sera of patients with malignant lymphoma. Leuk Lymphoma 1997; 28:113-25.
24. Haneda, H, Katabami M, Miyamoto H, Isobe H, Shimizu T, Ishiguro T, et al. The relationship of the proliferating cell nuclear antigen protein to cis-diamminedichloroplatinum resistance of a murine leukemia cell line P388/CDDP. Oncology 1991; 48:234-8.
25. Kawasaki H, Mukai K, Yajima S, Tanaka R, Takayama J, Takasaki M. Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining in neuroblastoma. Med Pediatr Oncol 1995; 24:300-4.
26. Muro Y, Tan EM. PCNA. In: van Venrooij WJ & Maini RN (eds.). Manual of biological markers of disease. Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1993. B2.7/1-12.
27. Humbel RL, Kadusch P. Use of HEp-2 cells in the IF test for detection of antinuclear antibodies. In: Peeters E. (ed), Protides of the Biological Fluids. New York: Pergamon Press, 1985.
28. Zuber M, Pfreundschuh M, Sörensen H. A novel cell cycle dependent antinuclear antibody in a patient with a monoclonal gammopathy of unknown significance. Eur J Med Res 1996; 1:349-54.
29. Landberg G, Tan EM. Characterization of a DNA binding nuclear autoantigen mainly associated with S phase and G2 cells. Exp Cell Res 1994; 212**:** 255–61.
30. Grimaudo SA, Guilleron C, Manni JA. Immunoblotting for detection of antiself reactivities in collagen diseases: autoantibody profiles and clinical significance in patients with SLE. Lupus 1995; 4 (Suppl 2): 160-1.
31. Fritzler MJ, McCarty GA, Ryan JP, Kinsella TD. Clinical features of patients with antibodies directed against proliferating cell nuclear antigen. Arthritis Rheum 1983; 26:140–5.
32. Nojima Y, Mimura T, Hamasaki K, Furuya H, Tanaka G, Nakajima A, et al. Chronic intestinal pseudoobstruction associated with autoantibodies against proliferating cell nuclear antigen. Arthritis Rheum 1996; 39:877-9.
33. Tzang BS, Chen TY, Hsu TC, Liu YC, Tsay GJ. Presentation of autoantibody to proliferating cell nuclear antigen in patients with chronic hepatitis B and C virus infection. Ann Rheum Dis 1999; 58:630-4.
34. Kogure T, Takasaki Y, Takeuchi K, Yamada H, Nawata M, Ikeda K, et al. Autoimmune responses to PCNA multiprotein complexes involved in cell proliferation are strongly associated with their structure and biological function in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2002; 46:2946-56.
35.Takasaki Y, Yamanaka K. Clinical significance of antibodies to proliferating cell nuclear antigen. Jpn J Rheumatol 1998; 1-6.
36. Asero R, Origgi L, Crespi S, Bertetti E, D'Agostino P, Riboldi P. Autoantibody to proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in SLE: a clinical and serological study. Clin Exp Rheumatol 1987; 5:241-6.