

57/M87

IȘCALENCU, FLORICA MAILAT, G. A. SZEGLI,
CRISTINA BORDEA, ILINCA NICOLAE, MIHAELA CHIVU

**MOLECULE MATRICIALE
INTERCELULARE
ÎN CANCER**

Editura Universității din București

D. MIȘCALENCU, FLORICA MAILAT, G. A. SZEGLI,
CRISTINA BORDEA, ILINCA NICOLAE, MIHAELA CHIVU

MOLECULE MATRICIALE INTERCELULARE ÎN CANCER

RD 858 #10

EDITURA UNIVERSITĂȚII DIN BUCUREȘTI
2003

Referenți științifici: Prof. dr. **Irina Teodorescu**
Prof. dr. **Viorica Manolache**

IV 517 364

375 03

© Editura Universității din București
Șos. Panduri, 90–92, București - 76235; Telefon/Fax: 410.23.84
E-mail: editura@unibuc.ro
Internet: www.editura.unibuc.ro

Tehnoredactare computerizată: Victoria Iacob

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României

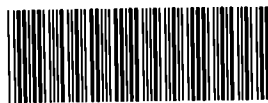
Molecule matriciale intercelulare în cancer / D. Mișcalencu,
Florica Mailat, G. A. Szegli, ... – București: Editura Universității
din București, 2003

100 p.

Bibliogr.

ISBN 973-575-729-X

B.C.U. Bucuresti



C20031712

- I. Mișcalencu, Dumitru
- II. Mailat, Florica
- III. Szegli Geiza Adalbert

576.385.5

CUPRINS

Introdacere	5
Fibronectin	7
Trombospondin	30
Osteopontin	44
Tenascin	57
Galectin-3	69
Agrin	79
Netrin-1	91

INTRODUCERE

În organismele pluricelulare, agregatele celulare se constituie în țesuturi, care la rândul lor formează organele. Asocierea celulelor nu este aleatorie. Există mecanisme moleculare ce determină sinteza unor molecule care, transportate în afara celulei îndeplinesc rolul de gliant cu celulele ambiante similare, sau via matricei extracelulare, cu alte tipuri celulare sau exclusiv cu matricea.

Formarea țesuturilor prin organizarea adeziunii celulă-celulă sau celulă-matrice atribuie celulelor, la prima vedere, rezistență la acțiunile mecanice externe sau interne, dar în același timp moleculele matricei extracelulare determină fiziologia moleculară a celulelor în condițiile tisulare respective.

De la început se impune menționarea sistemelor de aderență care sunt radical diferite la nivelul țesutului conjunctiv și respectiv epitelial. Astfel, în țesuturile conjunctive, spațiile intercelulare sunt largi sau foarte largi, ele conținând o matrice bogată în polimeri fibrilari, în particular, de collagen. În țesuturile epiteliale însă, celulele sunt dispuse în proximitate, deși și în acest caz rămân totuși unele spații, fapt relevat de microscopia electronică. În aceste spații se găsesc molecule proteice implicate în conexiunile intercelulare, la rândul lor conectate la citoschelet prin molecule transmembranare și intermediare.

În procesul aderenței, însăși celulele aflate în contact elaborează molecule necesare acestui proces, molecule cu rol în producția de proteine matriciale intercelulare și aceasta, atât timp cât celulele își conservă statutul normal.

Țesuturile, îndeosebi cele epiteliale se reînnoiesc permanent, ceea ce impune o serie de modificări care presupun mișcarea și migrarea lor. Reepitelizarea presupune importante mecanisme moleculare dependente de genele codificante ale proteinelor citoscheletale, pe de o parte, și ale moleculelor matricei extracelulare, pe de altă parte.

Mobilitatea celulelor și migrarea lor sunt procese normale prezente îndeosebi în embriogeneză, dar și la organismele mature. Astfel, de exemplu intervenția leucocitelor în procesul infecțios presupune modificări adecvate ale citoscheletului și moleculelor matricei acestuia în vederea modelării celulelor prin pătrunderea lor în țesutul infectat sau traumatizat. Există astfel, o permanentă alternanță între starea de aderență (fixare) a celulelor și mișcarea lor, ceea ce presupune și schimbarea registrului lor metabolic. În consecință, moleculele matricei intercelulare, pe lângă rolul de a conecta celulele între ele sau la substrat, îndeplinesc și alte funcții precum: motilitate, transmiterea semnalelor, stimularea replicării, impunerea diferențierii și specializării celulelor, apoptoză.

La nivelul țesuturilor mezenchimale, relația celulă-matrice extracelulară a fost intens investigată, iar datele privind tipurile de collagen implicate sunt impresionante. Relația dintre aceste țesuturi și cele epiteliale a deschis un nou capitol de interes.

Interesul major pentru asemenea aspecte s-a dezvoltat vizavi de mișcarea celulelor tumorale, de invazivitatea și metastazarea lor. Celulele tumorale își pierd aderența, fie prin pierderea capacității de a sintetiza molecule matriciale, fie prin creșterea sintezei moleculelor ce dezagregă matricea, așa cum sunt metaloproteinazele, care lizând moleculele de aderență permit migrarea anormală a celulelor. Interesul pentru aceste procese biologice este foarte mare, deoarece metastazarea celulelor canceroase reprezintă momentul culminant al evoluției tumorale, finalizat cu moartea purtătorului metastazei. Acest interes este marcat de investigațiile extinse asupra matricei extracelulare în tumori, asupra motilității celulelor tumorale și asupra stabilirii proteinelor care realizează sau nu aderența intercelulară, ca și prin cunoașterea schimbărilor acestora în condițiile alterării metabolismului celular.

Lucrarea prezintă câteva dintre moleculele matricei extracelulare cu rol important în adezivitatea intercelulară sau cea dintre celule și matricea extracelulară. În cazul unor țesuturi,

raportul dintre tipurile de molecule matriciale și cele intercelulare este bine cunoscut, justificând rolul de prognostic în evoluția unei tumori, condiție în care acest raport este grav alterat îndeosebi prin reducerea variatelor molecule matriciale dintre celulele tumorale, sau numai prin diminuarea lor cantitativă raportată la masa de țesut tumoral.

În condițiile metastazării, reglarea sintezei moleculelor matriciale de către celulele tumorale este afectată până la imposibilitatea acestora de a mai sintetiza asemenea molecule; totuși în cazul în care acestea mai persistă, metaloproteinazele – molecule care dezagregă matricea – sunt dominant elaborate.

Matricea extracelulară este sintetizată de celulă ca mijloc de asociere cu celula vecină în scopul consolidării existenței acesteia într-un țesut. Matricea intervine în mod deosebit în stabilirea fazei “dormante” a celulelor, fază care poate alterna cu cea de creștere și diviziune, ceea ce solicită modificarea relațiilor celulă-celulă. Această modificare alternează cu schimbarea sistemelor de biosinteză, astfel că în condițiile transformării ea poate fi afectată în favoarea creșterii și diviziunii neîntrerupte, ceea ce presupune și diminuarea sintezei de molecule ale matricei extracelulare.

FIBRONECTINA

Fibronectina este o glicoproteină multifuncțională a matricei extracelulare (ECM), prezentă la toate vertebratele, cu rol major în adeziunea celulară. În condiții fiziologice, conformația ei rămâne încă controversată. Matricea extracelulară conține numeroase proteine de adeziune necolagenice organizate specific în domenii multiple, fiecare comportând un situs de legare specific pentru alte molecule ale matricei, ca și pentru receptorii de la suprafața celulelor.

Fibronectina este un dimer format, evident, din două mari subunități unite printr-o punte disulfidică la capetele lor COOH-terminale. Fiecare subunitate este replicată într-o serie de domenii globulare separate de segmentele lanțurilor polipeptidice flexibile. Ripiturile din molecula sa sugerează faptul că gena ei, ca și genele colagenului s-au format prin duplicarea exonilor. Principalul tip de modul numit RIPIT de tip III de fibronectină are o lungime de 90 aminoacizi și se regăsește de peste 15 ori în fiecare subunitate, dar și în unele molecule matriciale, în unele molecule proteice membranare, ca și în citoplasmă.

Unul din domeniile fibronectinei se leagă la collagen, un altul, la heparină și un al treilea, la receptorii specifici de la suprafața diverselor tipuri celulare. Regiunea principală responsabilă de legarea celulelor cu secvența tripeptidică RGD (Arg-Gly-Asp) prezentă într-unul din ripiturile tip III este caracteristica esențială a sitului de legare. Este motivul pentru care unele peptide mici care conțin secvența RGD pot intra în competiție cu fibronectina pentru situsurile de legare la numeroși membri ai familiilor de integrine receptoare de la suprafața celulelor.

Multiplele forme de fibronectină sunt produse alternativ de același RNA. Există astfel numeroase izoforme numite fibronectine plasmatică (solubile) care circulă în sânge, în fluidele corpului și sunt active în procesul coagulării sângelui, al cicatrizării și al fagocitozei. Celelalte forme se găsesc în matricea extracelulară, pe suprafața celulelor, ca filamente insolubile. Formele sale matriciale asociate în dimeri se leagă între ele prin punți disulfidice suplimentare, exact invers decât moleculele de collagen care se autoasamblează în fibrile.

Toate formele de fibronectină sunt codificate de o unică genă de 50 k.b, care conține aproximativ 50 exoni. Transcrierea produce o singură mare moleculă de ARN care suferă translații alternative în 3 regiuni, vizavi de tipul celular și de stadiul dezvoltării. La om se produc în jur de 20 diferiți mARN, la fiecare modificare. Astfel, fibronectinei plasmatică secretată de hepatocite îi lipsesc două ripituri de tip III, care însă se găsesc la formele ei asociate matricei extracelulare. Prin translațiile alternative se deletează situsul de legare specific celulei; un astfel de situs este utilizat de limfocite pentru a adera la fibronectină. Se consideră că translația alternativă permite elaborarea tipurilor de fibronectină vizavi de cerințele tisulare. Fibronectina din perioada timpurie a dezvoltării diferă de cea de la adult, dar poate reapare în timpul regenerării țesuturilor lezate, ceea ce sugerează că ea stimulează migrarea și proliferarea celulelor pentru dezvoltarea și regenerarea țesuturilor.

Fibronectina are o importanță crucială în dezvoltare, fapt demonstrat prin inactivarea genei sale în timpul embriogenezei șoarecilor. Absența ei determină apariția a numeroase anomalii morfologice care vizează notocordul, somitele, inima și vasele de sânge, tubul neural.

Fibronectina este importantă nu numai pentru adeziunea celulelor la matrice, ci și pentru ghidajul migrării acestora în timpul embriogenezei vertebratelor. Astfel, cantități substanțiale de fibronectină se constată în timpul gastrulării Amfibiilor, când celulele migrează în mezoderm.

Anticorpi anti-fibronectină care conțin secvența RGD, ca și anticorpi anti-integrine (receptorii fibronectinei) inhibă migrarea celulelor, astfel încât reiese evident rolul ei de promotor al migrării celulelor, ceea ce, probabil, permite atașarea acestora la matricea extracelulară. Pe de altă parte, matricea extracelulară poate acționa asupra citoscheletului. În acest sens, celulele transformate care

frecvent sintetizează mai puțină fibronectină decât cele normale se comportă diferit: astfel, ele aderă slab la substrat și nu pot forma fascicule organizate de filamente de actină intracelulară cunoscute sub numele de fibre de tensiune, proces care poate contribui la tendința celulelor canceroase de a părăsi tumora primară și de a se disemina în tot organismul.

Interacțiunea dintre matricea extracelulară și citoschelet este reciprocă, dat fiind că filamentele de actină intracelulară pot influența orientarea moleculelor de fibronectină. De exemplu, filamentele de fibronectină extracelulară se assemblează în proximitatea suprafeței fibroblastelor în cultură, aliniindu-se cu fibrele de tensiune intracelulare adiacente. Tratate cu citochalazin care distruge filamentele de actină, filamentele de fibronectină se disociază la suprafața celulei, ceea ce se observă și în timpul mitozei, când celulele devin rotunde (1),

Conformația fibronectinei în condiții fiziologice, așa cum menționam, rămâne controversată (2). Alungirea mecanică poate altera starea funcțională a fibronectinei care este asamblată de către celule în fibrile elastice și supusă forțelor contractile. Asamblarea fibrilelor coincide cu expresia recunoașterii locurilor biologice care apar în starea ei solubilă. S-a folosit FRET (fluorescence resonance energy transfer) ca indicator al conformației fibronectinei în matricea fibrilară a fibroblastelor NIH3T3. Fibronectina a fost marcată pe reziduurile de amine cu fluorofori donori și pe locul specific de pe reziduurile cisteină în module FnIII (7) și FNIII (15), cu fluorofori acceptori. FRET intramolecular s-a corelat cu schimbările structurale ale fibronectinei în soluție denaturată și apoi s-a aplicat în cultura celulară ca indicator al conformației fibronectinei din fibrilele matriciale ale fibroblastelor. Pe baza nivelului FRET, în multe fibrile fibronectina a fost alungită de către celule, așa încât brațele sale dimer s-au extins la cel puțin un modul FnIII necutat. Când tensiunea citoscheletală s-a perturbat cu citochalasin D, FRET a crescut indicând recrutarea fibronectinei în fibrile. Se sugerează că forța generată de celule este necesară pentru menținerea fibronectinei în conformații parțial necutate. Rezultatele suportă un model al elasticității fibrilei de fibronectină, bazat pe desfacerea și recrutarea modelelor FNIII. S-a observat variația FRET dintre și de-a lungul fibrilelor singulare, indicând variația în gradul necutării fibronectinei în fibrile. Se discută mecanismele moleculare prin care forța mecanică poate altera structura fibronectinei convertind forțele elastice (3).

Legarea integrinelor cu moleculele matricei extracelulare induce agregarea actinei și proteinei care o cuplează, în focare de adeziune care servesc la cuplarea mecanică a matricei cu citoscheletul.

În timpul progresiei și vindecării rănilor, depunerea și remodelarea matricei pot oferi focare tensionale adiționale care modulează funcțiile celulelor mediate de integrină, inclusiv migrarea și proliferarea. S-a utilizat abilitatea celulelor de a contracta gel plutitor de colagen, pentru a determina efectul polimerizării fibronectinei asupra generării de către celule a tensiunii mecanice. Polimerizarea fibronectinei promovează diseminarea celulelor în gel și stimulează contractilitatea acestora printr-un mecanism dependent de Rho. Contractilitatea celulelor stimulată de fragmente de fibronectină este dependentă de legarea integrinei, proces însă, insuficient pentru a induce fie generarea tensiunii, fie diseminarea celulelor.

Tratarea celulelor cu peptide RGD polivalente sau cu fibronectină pre-polimerizată nu stimulează contractilitatea celulelor. Contractilitatea indusă de fibronectină este blocată de agenți care-i inhibă polimerizarea, proces critic în generarea tensiunii, țintind citoscheletul. Deci, contractibilitatea celulelor mediată de Rho este reglată de procesul polimerizării fibronectinei și sugerează un nou mecanism prin care fibronectina matricei extracelulare reglează organizarea citoscheletului și funcția celulei (4).

Fibronectina și integrinele

Starea fizică a matricei extracelulare poate regla asamblarea citoscheletului mediată de integrină și fosforilarea tirozinei pentru a genera două tipuri distincte de adeziune celulă-matrice. În fibroblastele primare, integrina alfa5beta1 se asociază principalmente cu fibrilele de fibronectină formând adeziuni structurale, distincte de contactele focale independente de contractilitatea celulei

mediată de actomiozină. Aceste “adeziuni fibrilare” sunt bogate în tensină, dar conțin nivele scăzute de componente tipice de contact focal, cum sunt paxilin, vinculin și proteine tirozin-fosforilate. Totuși, când fibronectina este legată covalent la substrat, integrina alfa5beta1 formează contacte focale “clasice” tirozin-fosforilate, care conțin nivele înalte de paxilin și vinculin. Prin urmare, nu atât compoziția moleculară a matricei, cât starea sa fizică este un factor critic în definirea organizării și fosforilării la locurile de adeziune. Se admite că, organizarea moleculară a locurilor de adeziune este controlată de cel puțin două mecanisme:

1 – integrinele specifice se asociază cu liganzii în complexe transmembranare constituite din proteine de ancorare citoplasmatică potrivite, cum este și complexul fibronectină-integrină alfa5beta1-tensină.

2 – proprietățile fizice ale matricei extracelulare (exemplu, rigiditatea) reglează tensiunea locală la locurile de adeziune și activează fosforilarea locală a tirozinei recrutând o varietate de molecule “plăci” în aceste locuri.

Cele două mecanisme generează între fibroblaste, tipuri de adeziuni matriciale distincte structural și funcțional (5).

Asamblarea matricei de fibronectină este un proces în multe trepte dependent de integrină. Cu o tehnică specială s-a stabilit că, în timp ce receptorul vitronectinei (alfa5beta3) rămâne în contactele focale, receptorul fibronectinei (alfa5beta1) se translocă în contactele focale de-a lungul contactelor matricei extracelulare. Această translocare este independentă de migrarea celulelor, este indusă de legarea integrinelor alfa5beta1 și depinde de interacțiunea cu citoscheletul funcțional de actină și de legarea receptorului vitronectinei. În timpul diseminării celulelor, translocarea integrinelor alfa5beta1 ligand efectuată departe de contactele focale și de-a lungul benzilor de filamente de actină, generează contacte matriciale.

Tensina este o componentă citoscheletală primară a acestor contacte și un nou inhibitor dominant negativ al matricei, care blochează formarea contactelor, translocarea integrinei și fibrilogeneza fibronectinei fără să afecteze contactele focale.

Se propune ca translocarea integrinei alfa5beta1 induce fibrilogeneza fibronectinei prin tensiunea generată de citoschelet și transmisă moleculelor de fibronectină extracelulară. Blocarea translocării integrinei de către o varietate de tratamente previne formarea contactelor matriciale și fibrilogeneza fibronectinei. S-a identificat astfel, un mecanism pentru asamblarea matricei, mecanism localizat și direcționat de translocarea integrinei (6).

Cuplarea fibronectinei mediată de RGD la integrina alfa5beta1 este dramatic amplificată de un loc sinergic din domeniul 9 al fibronectinei III (Fn9). S-au selectat aminoacizi din Fn9 care se proiectează în aceeași direcție ca RGD, probabil, către integrină și s-au transferat la alanină. R1379 și R1374 din peptidul PHSRN sunt importanți pentru adeziunea mediată de alfa5beta1, iar un set de mutante arată că R1379 este rezidul cheie în efectul sinergic, deși și R1374 contribuie substanțial la adeziune. Dubla mutantă R1374-R1379 este mai puțin adezivă decât R1374A singură. Mutantele R1369A, R1371A, T1385A și N1386A au efecte neglijabile asupra adeziunii celulelor. Se conchide că, în plus față de receptorii peptidului PHSRN, celelalte reziduuri de pe aceeași față a Fn9 sunt necesare pentru efectul sinergic deplin. Locul de cuplare sinergic pentru integrină este mult mai extins decât mica secvență lineară a peptidului (7).

Pe baza evidențierii CD au fost definite structural în soluție, două fragmente recombinante izolate din integrina umană alfa5beta1, fragmente ce cuprind ripiturile FG-GAPIII---VII ale alfa5 și domeniul tip-insertie din beta1. Cationul divalent cuplat, induce o adaptare conformațională cu alfa5, care este realizată de Ca^{2+} , Mg^{2+} sau Mn^{2+} și numai de Mg^{2+} sau Mn^{2+} cu beta1. Mn^{2+} cuplează la beta1 și este înalt hidratat (aproximativ 3 molecule de H_2O), bazat pe relaxarea NMR a apei, în acord cu adeziunea dependentă de ionul de metal. Fiecare fragment saturat cu Mg^{2+} sau Mn^{2+} cuplează un ligand recombinat de fibronectină, într-o manieră dependentă de RGD. Un rearanjament conformațional bazat pe CD este indus pe ligandul fibronectină după cuplarea la integrina alfa5, dar nu la beta1. Cuplarea ligandului duce la deplasarea ionului de metal din beta1. Ambele fragmente, alfa5 și beta1 formează un heterodimer stabil (alfa5beta1 mini-integrină) care păstrează recunoașterea

ligandului pentru a forma un complex terțiar 1:1:1 în prezența Mg^{2+} și induce o adaptare conformațională specifică ligandului fibronectină (8).

Fibronectina este componenta majoră a matricei extracelulare. S-a demonstrat existența unei izoforme a sa, asociată suprafeței celulei, sintetizată de limfocitele T activate. Fibronectina derivată din limfocitele T are un model de legare neobișnuit; un domeniu adițional produs- EDB-, în timp ce secvențele din celălalt domeniu- IIICS- sunt alternativ eliminate; iar domeniul CS1 de cuplare pentru Ag.4 foarte târziu (VLA-4) continuă totuși să fie generat.

S-a subreglat sinteza fibronectinei asociată suprafețelor celulare printr-un oligonucleotid antisens, după care s-a indus proliferarea celulelor T prin legarea încrucișată anti-CD3 și s-a constatat că proliferarea s-a redus pe măsură ce s-a exprimat CD25. Când celulele T au fost cultivate la densitate înaltă, peptidul sintetic QILDVRST corespunzător lui CS1 inhibă proliferarea așa cum o face și anticorpii anti-VLA-4. Se propune ca fibronectina asociată suprafeței celulei să fie un ligand pentru VLA-4, care prin cuplarea acestei proteine pe o celulă adiacentă să ofere un semnal costimulator, susținând astfel proliferarea celulelor T (9).

VLA-4 este o moleculă critică de adeziune care reglează traficul celulelor mononucleare către locurile inflamatorii. Molecula de adeziune la celula vasculară (VCAM-1) este un prim ligand al VLA-4, deși fibronectina legată alternativ care conține regiunea CS1(CS1FN) cuplează, de asemenea. CS1FN este exprimată de către celulele endoteliale sinoviale din artrita reumatoidă.

S-au incubat celule din vena ombilicală umană (HUVEC) cu IL-1 pentru 8-48 ore și s-a determinat fibronectina totală și mRNA CS1FN. Ambele erau constitutiv exprimate de HUVEC iar IL-1 a crescut mRNA și fibronectina totală ca și izoforma care conține proteina CS1FN. În continuare s-a urmărit dacă cuplarea celulelor mediată de proteina CS1FN este indusă de IL-1. Peptidul ciclic CS1 blochează adeziunea celulelor Jurkat indusă de IL-1 la celulele HUVEC, pe când anticorpii anti-VCAM-1 o inhibă mai slab. Peptidul CS1 și anticorpii anti-VCAM nu sunt aditivi, iar adeziunea nouă mediată de VLA-4 a HUVEC tratate cu IL-1 se datorează unei creșteri în CS1FN. Prin urmare, IL-1 crește expresia CS1FN de către HUVEC ca și adezivitatea celulelor mediată de CS1. Mimarea acțiunii lui CS1 ar putea avea eficacitate terapeutică prin blocarea recrutării celulelor care poartă VLA-4 (10).

În pre-eclampsie și în eclampsie nivelele VCAM-1 și fibronectinei sunt mai înalte decât în sarcina normală și se corelează semnificativ cu presiunea diastolică a sângelui. De asemenea, există o corelație lineară directă între fibronectina din plasmă și nivelele VCAM-1. Femeile normotensive au biopsia placentară normală iar incidența placentei patologice crește cu severitatea pre-eclampsiei. În concluzie, invazia trofoblastică inadecvată a arterelor spiralate și nivelele ridicate de VCAM-1 și de fibronectină sunt prezente la femeile cu pre-eclampsie. Magnitudinea în fazele trofoblastice defective și nivelele de VCAM-1 și fibronectină din sânge se corelează cu severitatea clinică a pre-eclampsiei (11).

Condrocitele produc variate matrici extracelulare în timpul condrogenezei. În țesutul cartilajinos, în timpul condrogenezei, proteinele majore ale matricei sunt fibronectina și proteoglicanii. Din sarcomul osteogenic al mandibulei umane s-a creat linia USAC cu fenotip condrocitic. Celulele aderă imediat la fibronectină și apoi se diseminează. În funcție de doză, proteoglicanii inhibă această adeziune, în timp ce colagenul nu. Expresia mRNA subunităților alfa5 și beta1 ale integrinei s-au detectat la 12 ore după tratarea cu proteoglicani, dar mRNA al subunității beta1 scade la 24 de ore după tratament. Se sugerează că proteoglicanii ar putea modula transducția semnalelor din fibronectină prin scăderea expresiei integrinei alfa5beta1 (12).

Agresarea plămânului este însoțită de depozitarea crescută a fibronectinei matriciale. Monocitele activate care sunt recrutate la locul injuriei pulmonare exprimă receptori integrină pentru fibronectină, care mediază interacțiunea lor cu matricea. Astfel, integrina alfa5beta1(VLA5) mediază multe efecte biologice ale fibronectinei, expresia ei fiind importantă pentru funcția imună a celulelor la locul injuriei.

PMA(forbol-12-miristat-13-acetat) amplifică aderența monocitelor U937 la fibronectină prin expresia crescută a mRNA subunităților integrinei alfa5 și beta1 și prin expresia de suprafață a

proteinei. În aceste celule transfectate cu o genă reporter –promotor alfa5 s-a constatat că PMA induce transcrierea genei alfa5 prin acțiunea pe secvențele promotor foarte specifice, altele decât AP-1 (proteina activatoare), în manieră dependentă de PKC. Efect similar au și LPS. Modularea expresiei integrinei alfa5beta1 poate fi importantă pentru reglarea, după injurie, a funcției monocitelor în inflamațiile pulmonare (13).

Fibronectina are un rol critic în diferite faze ale vindecării rănilor, fiind degradată de proteaze în rănile cronice. Fibroblaste cultivate din ulcere cronice ale picioarelor arată un nivel mai înalt de fibronectină comparativ cu celulele normale. S-au analizat biopsii de piele normală și din marginile ulcerelor cronice venoase de pe picioare. Nivelele mRNA al fibronectinei în pielea normală și în rana acută nu sunt detectabile, dar sunt substanțiale în dermul rănilor cronice. Anticorpi monoclonali anti-subunitatea alfa5 a integrinei relevă că rănile cronice și pielea normală arată nivele nedetectabile de integrină alfa5beta2, nivele ridicate de alfa5 constatându-se în rănile acute. În concluzie, pentru reepitelizare este necesar ca keratinocitele epidermice să migreze pe suprafața rănii, proces care reclamă interacțiunea între fibronectină și receptorul său de suprafață integrina alfa5beta2. Se sugerează că, deși mRNA al fibronectinei este crescut în rănile cronice, absența receptorului de suprafață al fibronectinei poate preveni migrarea keratinocitelor epidermice în rănile cronice (14).

Expresia dinamică a fibronectinei cuplată și a proteinei de membrană integral sialilată-integrina beta1 – a fost analizată pe plasmalema apicală a celulelor MDCK. Fibronectina și integrina beta1, lectine marcate fluorescent, apar uniform distribuite pe întreaga suprafață apicală a celulelor. Expresia fibronectinei pe această suprafață variază mult mai mult decât a integrinei beta1, moleculă sialilată, localizată în proporție de peste 92% pe microplicile plasmalemei, ceea ce nu este cazul pentru fibronectină. Absența colocalizării acestor proteine este confirmată de experimentele de dublu marcaj, constatându-se că, fibronectina nu cuplează la integrina beta1 sialilată. Desialilarea integrinei beta1 nu acoperă receptorii adiționali ai fibronectinei de pe plasmalema apicală. Se concluzionează că, aceste lectine permit în celulele vii, evidențierea celor două glicoproteine asociate plasmalemei și că fibronectina cuplează pe celulele MDCK numai la integrina beta1 desialilată (15).

Defectele celulelor senzoriale auditive din cohlee și ale celulelor senzoriale din vestibul – structuri ale urechii interne-, duc la pierderea auzului și respectiv la probleme de echilibru. Integrina alfa8beta1, ligandul său fibronectina și kinaza de adeziune focală (FAK) reglată de integrină sunt colocalizate pe suprafața apicală a celulelor ciliate unde se formează stereocili. La șoarecii homozigoți pentru o mutație țintă a integrinei alfa 8 (codifică subunitatea alfa 8) această colocalizare este perturbată, celulele ciliate din utricul (subcompartiment al vestibulului) fiind lipsite de stereocili sau aceștia sunt malformați. Majoritatea șoarecilor deficienți în integrina alfa8beta1 mor curând după naștere prin insuficiență renală. Mulți dintre supraviețuitorii arată deficiențe de echilibru datorate defectelor din urechea internă. Se sugerează că integrina alfa8beta1 și posibil, alte integrine reglează diferențierea celulelor ciliate și maturarea stereociliilor. Mutațiile care afectează moleculele matriciale induc forme ereditare de afecțiuni ale urechii interne, iar integrinele pot media, la nivelul urechii, unele efecte ale moleculelor matriciale; astfel, mutațiile în gena integrinei pot duce la afecțiuni ale urechii interne (16).

Fibronectina are o secvență funcțională – YTIYVIAL – în domeniul 2 care cuplează heparina (Hep2), secvență ce supresează adeziunea celulei la matricea extracelulară, adeziune mediată de integrină. Activitatea anti-adezivă a fibronectinei poate fi exprimată prin procese fiziologice. Astfel, un fragment chemotriptic de fibronectină de 30kD derivat din domeniul Hep2 și care nu are efect pe linia celulară 3T3 neproductiv transformată de MSV, exprimă activitate anti-adezivă după tratamentul cu 6M uree, tratament care induce schimbări conformaționale ale fragmentului Hep2 din forma compactă cutată în una necutată. Incubarea fragmentului Hep2 cu heparină induce, de asemenea, schimbări conformaționale similare și expresia activității anti-adezive. În plus, tratamentul cu uree și heparină face ca fragmentul Hep2 și fibronectina intactă să fie mai accesibile la anticorpii monoclonali (alfaIII14A) cu recunoașterea locului de lângă situsul anti-adeziv al fibronectinei. Clivajul specific efectuat de metaloproteinaza2 matricială, fie al fragmentului Hep2, fie al fibronectinei intacte, eliberează un fragment de 10kD cu activitate antiadezivă, prezent în regiunea

amino-terminală. Astfel, activitatea criptică anti-adezivă a fibronectinei poate fi exprimată după schimbările conformaționale și clivajul proteolitic al domeniului Hep2 (17).

Fibronectina transmite semnale

Asamblarea fibronectinei matriciale este reglată de un proces în trepte inițiat de interacțiunea dintre fibronectină și receptorul său integrina, de la suprafața celulelor. Această interacțiune activează numeroase căi de semnalizare intracelulară care reglează adeziunea, migrarea și supraviețuirea celulelor. Celulele SYF lipsite de kinazele Src au abilitate redusă de a asambla fibrilele de fibronectină. Cantitatea fibronectinei matriciale este redusă prin tratamentul cu inhibitorul kinazei PI3 – wortmanin –. Celulele CHOa5 care depind de fibronectina exogenă pentru a iniția formarea fibrilelor sunt, de asemenea, semnificativ reduse când sunt tratate cu acest inhibitor. Combinarea inhibitorului lui Src și wortmanin are efect inhibitor adițional asupra asamblării, efect concomitent cu pierderea fosforilării lui FAK. Cuplarea redusă a fragmentelor de 70kD N-amino-terminal la asamblarea matricei atestă un rol timpuriu al acestor kinaze în acest proces. Rezultă că, cele două molecule de semnalizare localizate aval de integrină și FAK sunt esențiale pentru inițierea eficientă a asamblării fibronectinei matriciale (18).

Majoritatea celulelor transformate, pentru creșterea și supraviețuirea lor pierd ancorajul și dependența de ser. În absența serului, semnalele de supraviețuire a fibronectinei transduse de FAK supresează apoptoza reglată de p53 în fibroblaste primare și celule endoteliale. Cuplarea domeniului SH3 al p130Cas la regiunea 1 a FAK bogată în prolină este necesară pentru supraviețuirea fibroblastelor pe fibronectină când serul este absent. Complexul FAK-p130Cas activează C-jun NH2-terminal kinaza (JNK) via căii Ras/Rac1/Pak1/MAPK – kinaza-4. JNK fosforilată se colocalizează cu FAK în focarele de adeziune a fibroblastelor cultivate pe fibronectină care suportă supraviețuirea lor. Frecvent, celulele supraviețuiesc în absența matricei când factorii serici sunt prezenți, caz în care se confirmă faptul că semnalele de supraviețuire sunt transmise de FAK, fosfatidilinozitol 3- kinaza (PI3-kinaza) și PKB (Akt/proteinkinaza B). Totuși, când serul lipsește PI3-kinaza și AKT/PKB sunt implicate în calea FAK-JNK de supraviețuire a fibronectinei. Astfel, semnalele de supraviețuire a fibronectinei din matricea extracelulară și din ser sunt transduse de FAK via a două căi distincte (19).

Unirea alternativă a transcripților genei fibronectinei dă naștere la forme care includ segmentul EIIIA (sau ED-A) al fibronectinei. Fibronectinele care îl conțin se exprimă substanțial în timpul embriogenezei și vindecării rănilor, mediind schimbări în adeziunea celulei și expresia genei acestei molecule, dar integrinele care cuplează acest segment nu au fost încă identificate. S-a cartat epitopul pentru 2 anticorpi monoclonali blocanți, la regiunea C-C a segmentului EIIIA. Secvența acestui epitop (39PEDGIHELFP48) este asemănătoare cu secvența din tenascin-C la care cuplează integrina alfa9beta1. De altfel și integrina alfa4beta1 poate media adeziunea celulei la segmentul EIIIA. Totuși, această interacțiune este blocată de anticorpi monoclonali ca și de anti-integrinele respective.

Mutantele de deleție ale acestui segment ce includ bucla C-C și secvența care o flanchează, cuplează celulele ce exprimă fie alfa9beta1, fie alfa4beta1. Adeziunea celulelor MOLT-3 la segmentul EIIIA stimulează fosforilarea kinazei p44/42 MAP. Observația că cele două integrine cuplează segmentul EIIIA stabilește un nou mecanism prin care adeziunea celulei la fibronectină este reglată prin splicing alternativ (20).

Fibronectina în procesul dezvoltării

Fibronectina, componentă a matricei extracelulare este esențială pentru dezvoltarea vertebratelor. Ea formează o matrice fibrilară la suprafața celulelor, care controlează morfologia, migrarea, proliferarea și alte importante procese celulare. Fibronectina normală și cea mutantă

recombinată (rec FN) au fost introduse în cavitatea blastocelică a embrionilor amfibianului *Pleurodeles waltl*. O recFN nativă – FN (A-B) – ca și recFN cu mutații specifice în domeniul de cuplare, sunt asamblate în matricea fibrilară, ducând la perturbarea in vitro și in vivo a adeziunii, diseminării și migrării celulelor. Perturbarea dezvoltării embrionilor a condus la defecte în modelul mezodermal și la inhibarea gastrulării. Se concluează că structura fibrilară și compoziția fibronectinei matriciale sunt determinante importante ale adeziunii și migrării celulare în timpul dezvoltării (21).

Matricea extracelulară endometrială modulează adeziunea trofoblastului în timpul implantării blastocistului la șoarece. Activitatea de cuplare a fibronectinei pe suprafața apicală a celulelor trofoblastului, proces mediat de integrină, este inițial scăzută, dar devine substanțială după ce embrionii sunt expuși la fibronectină și reclamă legarea integrinei, ceea ce duce la creșterea calciului liber din citoplasmă. Chelația calciului intracelular prin folosirea BAPTA-AM, a inhibării proteinelor dependente de calciu, a PKC (protein-kinaza C) sau a calmodulin atenuează semnificativ efectul fibronectinei asupra activității de cuplare. Creșterea directă a nivelului calciului citoplasmatic cu ionomicină suprareglează activitatea de cuplare a fibronectinei, demonstrând că semnalizarea calciului este necesară și suficientă pentru adeziunea puternică la fibronectină. Semnalizarea poate induce traficul proteinei necesar suprareglării procesului de cuplare a fibronectinei indus de ligand. Se sugerează că, în timpul implantării contactul dintre blastociste și fibronectină duce la creșterea calciului intracelular care fortifică adeziunea trofoblastului la matricea extracelulară prin redistribuirea proteinei (22).

Dezvoltarea specifică a glandei adrenale fetale umane reclamă proliferarea, migrarea, apoptoza și activitatea steroidogenică specifică zonei. Culturi primare de celule adrenale din glanda fetală, crescute pe collagen IV, laminină sau fibronectină relevă că morfologia celulelor este afectată de mediul de cultură. Matricea extracelulară modulează, de asemenea, profilul secreției steroide a celulelor fetale. Astfel, collagenul IV favorizează secreția corticală după stimularea cu ACTH sau angiotensină II și crește producția de dehidroepiandrosteron când receptorul AT2 al angiotensinei II este stimulat specific. Aceste efecte se corelează cu schimbările nivelului mRNA al 3beta-hidroxisteroid dehidrogenazei și citocromului P450C17. Din contră, fibronectina și laminina scad răspunsul celulei la ACTH privind secreția corticală, dar amplifică secreția de androgen. Matricea extracelulară poate, de asemenea, monitoriza comportarea celulei. Collagenul IV și laminina amplifică proliferarea celulelor, iar fibronectina crește apoptoza. În concluzie, se demonstrează că natura matricei extracelulare coordonează specific căile steroidogenice și turnoverul celulei în dezvoltarea adenalei fetale umane (23).

Celulele epiteliale MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) din rinichiul de câine crescute pe gel de collagen în prezența HGF (factorul de creștere al hepatocitelor) formează nefroni ramificați, proces inhibat de rhodostamină. Plasmalema lor latero-bazală vine în contact cu gelul, iar cea apicală privește către lumenul nefronilor. Celulele care mărginesc nefronii produc o membrană bazală incompletă ce conține un substrat discontinuu de laminină. În plus, plasmalema bazală este ambiată de un strat gros de fibronectină (FN). Transfectantele care exprimă RNA FN antisens, arată imunohistochimic un nivel relativ scăzut de fibronectină sintetizată și o marcată scădere a colorației nefronilor ramificați, comparativ cu clona de control. Inhibarea morfogenezei indusă de supraexpresia RNA FN antisens se manifestă prin scăderea ratelor de creștere și migrare a celulelor. Se concluează că, depunerea fibronectinei pe epiteliul care câtușește tuburile renale (uroteliul) servește la amplificarea proliferării și migrării celulelor, facilitând astfel tubulogeneza ramificată a celulelor epiteliale MDCK (24).

Factori de creștere și fibronectina

TGF și fibronectina. Sinteza excesivă și depozitarea proteinelor matriciale de către celulele mezoteliale peritoneale umane (HPMC) pot duce la schimbări structurale și funcționale în membrana peritoneală afectând pe termen lung eficacitatea dializei peritoneale. Expunerea prelungită la concentrații înalte de glucoză în fluidul de dializă stimulează major acumularea matricei prin inducția lui TGFbeta1.

Cultivate cu concentrație înaltă (30nmol/L) de D-glucoză, HPMC arată volum crescut, numeroși nuclei și denudarea monostratului, comparativ cu cultivarea lor în concentrație fiziologic normală de glucoză (5nmol/L). Concentrația înaltă induce sinteza de TGFbeta1 de către HPMC, iar sinteza de fibronectină este redusă la transcripție și translație. Manitolul nu afectează morfologia HPMC și nici sinteza matricei nu este alterată. Administrarea emodinului cu glucoză în concentrație înaltă duce la scăderea volumului celulelor, la exfolierea lor, ca și la abrogarea inducției de TGFbeta1. În prezența emodinului sinteza fibronectinei indusă de glucoză este redusă în proporție de 40%. Prin urmare, emodin poate ameliora sinteza matricei indusă de glucoză în HPMC, prin supresia lui TGFbeta1, fiind astfel util în prezervarea integrității peritoneale în dializă (25).

Proteinuria glomerulară este un factor de risc pentru evoluția insuficienței renale cronice, contribuind la apariția fibrozei renale interstițiale. În sclerozele glomerulare diabetice experimentale se constată trecerea HGF, TGFbeta1 (factorul de creștere transformant), din plasmă în lichidul din tubulii renali, ambii factori de creștere acționând pe uroteliu prin receptorii plasmalemelor apicale.

Incubarea celulelor uroteliale cultivate cu rhTGFbeta – proteină din matricea extracelulară – crește moderat expresia colagenului tip III, dar în funcție de doză îi blochează expresia. În schimb, cei doi factori de creștere (HGF și TGFbeta) cresc expresia fibronectinei de până la 4 ori și a PDGF-BB până la 6 ori, dar nu a FGF2 (factorul de creștere a fibroblastelor).

Ultrafiltratul colectat de la șobolanii cu nefropatie diabetică (24–30 săptămâni) arată, de asemenea, expresia crescută a fibronectinei și a PDGF-BB în uroteliul tubului proximal. În prezența anticorpilor neutralizanți care blochează acțiunea HGF și TGFbeta, ultrafiltratul pierde însă, expresia lui PDGF-BB din celulele tubului urinar. În schimb, în fibroblastele interstițiale renale NRK-49F, rhPDGF-BB amplifică expresia colagenului tip III, dar nu a celui tip I sau fibronectinei. Se conclud că, HGF și TGFbeta din ultrafiltratul glomerular contribuie la acumularea interstițială de proteine matriciale prin efecte directe pe celulele tubulare, dar și prin mecanisme indirecte via PDGF-BB și acțiunii sale asupra miofibroblastelor. Aceste evenimente pot fi mecanisme importante în fibroza interstițială renală indusă de proteinurie, ca și pentru progresia accelerată a insuficienței renale cronice în nefropatia diabetică și probabil, în alte afecțiuni glomerulare proteinurice (26).

TGFbeta2 poate produce pleurezii. S-a comparat eficiența lui și a fibronectinei în aceste afecțiuni induse la iepuri albi neozelandezi, în urma injectării intrapleurale. Toate animalele care au primit TGFbeta2 au contractat boala, în timp ce iepurii care au primit fibronectină, nu. Animalele care au primit TGFbeta2 produc în primele 4 zile, cantități mari de lichid pleural, pleura lor arătând marcate proliferări ale celulelor fusiforme și depozite de colagen, dar nu inflamații semnificative sau proliferări mezoteliale. Țesutul pleural al animalelor care au primit fibronectină arată numai ocazional depozite fine de colagen. În concluzie, se sugerează că mecanismele prin care TGFbeta2 induce pleurezie nu depind predominant de producția de fibronectină (27).

S-a urmărit abilitatea celulelor stromale din măduva osoasă de a conflua și prolifera în culturi primare de măduvă de la 30 pacienți cu cancer pulmonar netratat (LPC), 27 cu cancer mamar (BCP) și 30 de control (NC), în condițiile în care aceste celule au fost induse să prolifereze în urma a 4 subculturi continue. S-a evaluat și producția de IL-1beta, TGFbeta1, fibronectină și prostaglandină E2 (PGE2) de către fibroblastele pure. În culturile primare s-a constatat confluența celulelor la 60% din cei cu LPC și la 78% din cei cu BCP, comparativ cu 100% din NC. De asemenea, numai fibroblastele de la 7 culturi LPC și 6 BCP aveau capacitate proliferativă în urma celor 4 subculturi. Nivelele IL-1beta erau sub 10pg/ml la ambele grupe de pacienți, iar nivelele TGFbeta1 în BCP erau mai scăzute decât valorile de la martori. De asemenea, pacienții aveau nivele semnificativ scăzute de fibronectină în comparație cu nivelele celor de control. Nivelele PGE2 la cei cu LCP erau mai înalte față de cele de la control. În concluzie, fibroblastele medulare din LCP și BCP sunt defective în privința capacității proliferative și de confluență și în consecință, această deficiență poate fi asociată cu alterarea producției de IL-1beta, TGFbeta1, fibronectină și PGE2 (28).

Efectul inhibitor al cefarantinei (alcaloid) asupra producției de fibronectină în celulele mezangiale de la șobolan stimulate cu factorii de creștere PDGF sau TGFbeta constă în următoarele: stimularea cu PDGF induce creșterea cantitativă a fibronectinei, în timp ce pretratarea cu cefarantină

o supresează aproape complet. În funcție de doză, alcaloidul inhibă tirozinfosforilarea câtorva proteine, inclusiv R-PDGFbeta în celulele stimulate cu PDGF, ca și activitatea tirozinkinazei receptorului prestimulat cu PDGF. Alcaloidul supresează producția de fibronectină stimulată de TGFbeta la aceeași doză. Se conclue că cefarantina inhibă producția de fibronectină indusă de factori de creștere, probabil, prin supresia receptorului autofosforilării (29).

Factorii care stimulează celulele musculare netede pentru a produce proteine ale matricei extracelulare încă nu se cunosc, deși 60%-80% din placa hiperplazică a intimei vasculare mature este compusă din aceste proteine. De aceea s-a urmărit producția de fibronectină – componentul major al matricei – și răspunsul său la variații factori de creștere, citokine și alte proteine matriciale care sunt eliberate în timpul injuriei vasculare. Astfel, după 72 ore de stimulare cu TGFbeta acesta are efectul cel mai profund asupra producției de fibronectină, efect urmat de cel al EGF și colagen tip I. PDGF (AA, AB, BB), FGF, colagen tip IV și laminina însă, nu au efect. Proteina contractilă angiotensina II este un stimulent slab al fibronectinei. TGFbeta stimulează semnificativ producția timpurie de fibronectină, în timp ce producția acesteia ca răspuns la EGF și colagen tip I este inițial modestă, dar crește în timp. În concluzie, citokinele, factorii de creștere și alte proteine matriciale au variate efecte cantitative asupra producției de proteine ale matricei extracelulare de către celulele musculare netede. Cunoașterea factorilor care influențează producția de proteine matriciale ar putea permite desemnarea unor inhibitori specifici care să prevină hiperplazia intimei vasculare (30).

CTGF și fibronectina. Factorul de creștere a țesutului conjunctiv (CTGF) este unul din candidații care mediază evenimentele aval de TGFbeta. La șobolani s-a obstrucționat un ureter și s-a urmărit expresia genei factorilor de creștere TGFbeta1, CTGF și fibronectinei (FN), ca și efectul blocării CTGF endogen asupra expresiei fibronectinei indusă de TGFbeta în culturi de fibroblaste renale prin tratarea cu oligodeoxinucleotide (ODN) antisens. După obstrucționarea ureterului se constată că expresia mRNA CTGF este semnificativ suprareglată de TGFbeta1 și urmată de inducția marcată a mRNA FN. mRNA CTGF este detectat principalmente în ariile fibrotice interstițiale, în celulele uroteliului și în celulele epiteliale parietale glomerulare din rinichiul al cărui ureter a fost obstrucționat. Celulele interstițiale care exprimă mRNA CTGF sunt, de asemenea, pozitive pentru actina alfa din mușchiul neted al ureterului. ODN antisens CTGF transfectat în fibroblastele cultivate atenuază semnificativ suprareglarea mRNA și a proteinei FN în comparație cu transfecția ODN de control și inhibă sinteza colagenului tip I. Activitatea promotorului FN de la șobolan crește de 2,5 ori când este stimulată de TGFbeta1, proces care poate fi abolit prin tratarea cu CTGF antisens. Astfel, CTGF are un rol crucial în sinteza FN indusă de TGFbeta, sugerând că blocarea lui ar putea fi o posibilă țintă terapeutică în fibrozele tubulointerstițiale (31).

CTGF este cunoscut și ca proteina 2 înrudită cu proteina ce cuplează IGF și care induce matricea extracelulară. S-a urmărit dacă CTGF este un mediator autocrin în inducția fibronectinei de către AGE (produsele finale ale glicozilării avansate) care sunt implicate ca factor patogen în fibroza tisulară diabetică. Atât mRNA CTGF cât și proteina sunt suprareglate de către AGE în fibroblastele dermale umane în cultură. Astfel, culturi primare de fibroblaste confluențe în monostrat tratate cu AGE BSA sintetic solubil arată la 48 ore creșterea de 4 ori a mRNA FN, iar a proteinei de două ori, comparativ cu controlul. Adăusul de rhCTGF, induce rapid, în funcție de doză, nivele înalte de mRNA și proteină FN. Pentru a testa dacă AGE BSA acționează prin CTGF derivat din celule pentru a induce FN, s-a constatat că un anticorp neutralizant anti-CTGF atenuază semnificativ, dar nu inhibă total inducția de către AGE a mRNA FN. Se conclue că inducția FN de către AGE este mediată parțial de suprareglarea CTGF celular indus de AGE și că, este dependentă de activitatea PKC (32).

FGF și fibronectina. Celulele pulmonare tip II se atașează, migrează și proliferază pe o matrice bogată în fibronectină (FN), în timpul reparării peretelui alveolar după injuria plămânului. Interacțiunea combinată celulă-substrat via receptorilor integrin și expunerea la factori de creștere locali inițiază semnalele reclamate pentru proliferarea, diferențierea, reepitelizarea și restaurația finală a structurii peretelui alveolar. Celulele primare tip II în cultură cuplează FN, în parte prin integrina alfa5beta1 și ca răspuns la factorii de creștere care induc proliferarea acestor celule, așa cum este FGF-1 (factorul de creștere a fibroblastelor). Tratamentul cu FGF-1 amplifică adeziunea

celulelor la FN, efect care se corelează cu creșterea expresiei integrinei beta la suprafața celulelor, și cu formarea structurilor stabilizatoare ale citoscheletului cum sunt extensiile lamelipodiale și fibrele stres. FGF-1 induce, de asemenea, creșterea incorporării timidinei în DNA. Laolaltă cu fibronectina, FGF-1 stimulează adeziunea, organizarea citoscheletului și creșterea sintezei DNA, influențând astfel interacțiunea celulă-substrat și semnalizarea în timpul reparării peretelui alveolar (33).

În cultură, monocitele umane secretă fibronectină (FN) ca răspuns la activarea cu citokinele pro-inflamatorii. În acest sens, s-au urmărit efectele citokinelor IL-1alfa, IL-6, TNFalfa, IL-4, IL-10, IL-13 și TGFbeta asupra producției de FN de către aceste celule. IL-1alfa, IL-6 și TNFalfa cresc, în funcție de doză, producția de FN, un indicator al activării monocitelor, 4 ore de tratament fiind suficiente pentru măsurarea producției de FN. IL-4, IL-10 și IL-13 însă, inhibă puternic producția de FN indusă de citokine, iar TNFbeta, numai parțial. IL-1, IL-5 și TNFalfa, molecule care singure nu pot induce cantități substanțiale de FN de către monocitele în cultură, o fac în cazul combinării lor în doze suboptimale. mRNA FN se exprimă astfel atât în monocitele cultivate cu o singură citokină (în cantități reduse) cât și în cele cultivate cu o combinație a acestora, chiar în doze suboptimale. În concluzie, activarea in vitro a monocitelor de către citokine singulare sau combinate, poate fi suficientă pentru a induce reacții imune sau inflamatorii. În plus se sugerează că unele citokine elaborate de limfocitele T pot regla activitatea monocitelor (34).

Fibronectina în infecțiile virale și bacteriene

Abilitatea virusurilor și bacteriilor de a interacționa cu matricea extracelulară joacă un rol important în infectivitate și patogenicitate. Fibronectina este componenta majoră matricială din structura ganglionilor limfatici care sunt principalul loc de depozitare și replicare a HIV în faza cronică a infecției.

S-a urmărit dacă această fibronectină ar putea afecta abilitatea HIV de a infecta limfocitele. În această idee s-a folosit superfibronectina (SFN), o formă multimerică a FN, foarte asemănătoare in vivo cu cea matricială. S-a stabilit astfel că, HIV-1IIIIB cuplează eficient la SFN și că infectarea cu HIV a limfocitelor primare CD4+ este amplificată la o magnitudine de peste 1. Infectivitatea crește în prezența SFN datorită adezivității crescute a HIV la suprafața limfocitelor, facilitând și internalizarea particulelor virale.

Îndepărtarea enzimatică a proteoglicanilor de la suprafața celulelor inhibă adeziunea la limfocite a complexului HIV-1IIIIB/SFN, în timp ce anticorpi anti-integrine nu au efect asupra acestui complex care cuplează limfocitele. Singur, peptidul III-c cuplează, de asemenea, eficient complexul și amplifică infecția HIV, deși nu la fel de eficient ca SFN. Gp120 a envelopei HIV-1IIIIB cuplează la regiunea III-c a SFN și poate fi importantă în interacțiunea virus-fibronectina matricială. Se concluzionează că, HIV-1IIIIB interacționează specific cu regiunea III-c a FN matriciale, interacțiune cu rol în facilitarea infecției cu HIV in vivo, în special a ganglionilor limfatici (35).

Interacțiunea celulă-matrice extracelulară este reglată parțial de integrinele beta1 și are rol cheie în reciclarea limfocitelor T și infiltrarea tisulară, în răspunsul inflamator și imun. Infecția cu HIV poate afecta adeziunea celulelor T-CD4+ esențiale pentru recunoașterea antigenilor străini, ca și traficul și migrarea lor. În limfocitele T primare infectate cu HIV in vitro s-a urmărit expresia lanțului integrinei beta1, CD29 și CD49c, d și f, ca și cuplarea fibronectinei la celulele T-CD4+ și producția acestora de către limfocitele T. S-au folosit tulpinile HIV X4 (HIV-1/LAI), R5 (HIV-1/Ba-L) și X4R5 (HIV-2/ROD) și izolatele primare (HIV-1 DAS), HIV-1/TH1) cu citopatogenitate și replicare diferite. Expresia integrinei beta1 asupra CD4+ și CD4- este reglată de activarea celulelor cu PHA-P și IL-2, dar este neafectată de infecția cu HIV chiar și la vârful replicării virale și depleției CD4+. Similar, cuplarea fibronectinei la celulele T CD4+ nu este afectată de infecția cu HIV. Se sugerează că limfocitele infectate pot fi extravazate, migrate și recirculate în organism, înainte de moartea lor (36).

Aderența lui *Staphylococcus aureus* la țesuturile cobailor este o treaptă critică pentru colonizare și inițierea infecției. Proteinele bacteriei care cuplează fibronectina (FnBP) sunt implicate în aderența și internalizarea acesteia în fagocitele neprofesionale. S-a generat un fragment recombinat al domeniului ce cuplează fibronectina (rFnBF), care inhibă potent intrarea bacteriei în celula gazdă. Administrarea intramusculară a rFnBF previne formarea abceselor în rănile infectate, în funcție de doză și potențează beneficiul profilaxiei cu cefazolin. Astfel, administrarea exogenă a acestui domeniu reduce riscul formării abceselor stafilococale și ar putea fi un agent de prevenire a infectării rănilor (37).

Proteinele care cuplează fibronectina (FnBP) sunt importante pentru atașarea stafilococului auriu în timpul infecției. S-a investigat reglarea genelor *fnbA* și *fnbB* ale acestor proteine de către situsurile *sar* și *agr* din tulpinile Newman ale bacteriei, folosindu-se mutante reglatoare specifice acestor locuri. S-a constatat că expresia FnBPA este amplificată în mutanta *agr*, dar inhibată în mutanta *sar* și în dubla mutantă *sar-agr*. Secvența care cuprinde ORF3 localizat amonte de *sarA* este esențială pentru activarea transcripției *fnbA*, care secvență poate modula expresia *SarA* și/sau activitatea nivelului post-transcripțional (38).

Streptococcus pyogenes poate fi eficient internalizat de o varietate de celule epiteliale umane. Abilitatea lui de a intra în celula gazdă reclamă formarea unui complex dintr-o proteină bacteriană care cuplează fibronectina (cum este proteina M1 sau F1), fibronectina umană și receptorul ei – integrina $\alpha 5\beta 1$ – de pe suprafața celulei epiteliale. Un antagonist non-peptid al integrinei – SJ755 – poate inhiba internalizarea bacteriei de către celulele epiteliale ale tonsilei umane și de către cele imortalizate – A549 – amplificând astfel efectul bactericid al antibioticelor. Antagonistul blochează cuplarea fibronectinei la celulele epiteliale, ceea ce sugerează faptul că integrina este receptorul major al fibronectinei, deoarece se exprimă pe ambele tipuri celulare. Streptococul nu afectează însă, cuplarea fibronectinei de către proteinele M1 purificate care nu au abilitatea de a se asocia cu integrina chiar și atunci când aceasta a fost precuplată de către fibronectină. De asemenea, antagonistul blochează *in vitro* formarea complexelor $\alpha 5\beta 1$ – fibronectină – proteina M1. Se concluzionează că fibronectina funcționează ca o moleculă punte între proteina M1 și integrină, și de asemenea, că antagoniștii integrinei pot amplifica eficacitatea antibioticelor în tratamentul infecțiilor cu *Streptococcus pyogenes* (39).

Interacțiunea lui *Streptococcus viridans* cu componentele matricei extracelulare joacă un rol important în patogenizarea endocarditelor infecțioase. S-a identificat o proteină de la suprafața bacteriei *Streptococcus mutans* care cuplează fibronectina din matrice. Inițial s-a constatat că bacteria adsoarbe fibronectina solubilă din plasmă, dar cu eficacitate mai scăzută decât o face *Streptococcus pyogenes*. *Streptococcus mutans* însă, în funcție de doză, ar putea cupla fibronectina imobilizată. Extractele de proteine asociate peretelui celular sau de proteine din *Streptococcus mutans* cuplează totuși specific fibronectina printr-o proteină de 130kDa (FBP) care, purificată și omogenizată reacționează specific cu un anticorp policlonal de iepure atît în celulă, cât și în fracția extracelulară, abundența proteinei fiind mai mare în celulă decât în fracția extracelulară. FBP purificată cuplează specific la fibronectina imobilizată, în timp ce cuplarea fibronectinei solubile (acoperită de proteină) se detectează numai în prezența concentrațiilor înalte de fibronectină. FBP purificată, ca și Ig anti-FBP inhibă, în funcție de doză, aderența streptococului *mutans* la fibronectina imobilizată și la celulele endoteliale ECV304. Deci, FBP mediază specific *in vitro*, aderența streptococului la fibronectină și celulele endoteliale, ceea ce confirmă și faptul că *Streptococcus viridans* adoptă strategii diferite în interacțiunea cu componentele matricei extracelulare (40).

Toxina B eritrogenică streptococică (SPE-B) mutantă, abrogă internalizarea dependentă de fibronectină a lui *Streptococcus pyogenes*, de către celulele mamaliene în cultură. Această bacterie secretă câteva proteine care influențează interacțiunea sa cu celula gazdă. S-a studiat influența proteazei secretată de gena SPE-B asupra interacțiunii dintre tulpina mutantă NZ131 (serotip M49) și celulele mamaliene. Inactivarea genei toxinei amplifică captarea dependentă de fibronectină a patogenului de către celulele ovariene CHO-K1 de hamster chinezesc, comparativ cu tulpina izogenică tip-sălbatic. Preincubarea celulelor NZ131 mutante cu proteaza purificată inhibă

semnificativ captarea patogenului atât de către celulele CHO-K1, cât și de către celulele CHO-pgs745, efect atribuit abrogării cuplării fibronectinei la suprafața bacteriei, proces care nu implică nici proteina M49 și nici proteina streptococală care cuplează fibronectina. Pretratarea NZ131 mutantă SPE-B cu SPE-B nu influențează cuplarea fibronectinei de către celulele CHO-pgs745 mediată de un polizaharid sulfat. În concluzie se relevă că proteaza alterează specific proteinele de la suprafața bacteriei influențând astfel captarea acesteia (41).

Factorul opacității serice (SOF) este o proteină mare, extracelulară care aparține streptococilor din grupul A și are două funcții cunoscute: opacizarea serului și cuplarea la fibronectină. S-a descris o nouă funcție a sa și anume cuplarea la fibrinogen. Utilizându-se proteine SOF recombinante trunchiate și purificate s-a localizat un domeniu de cuplare a fibrinogenului, într-o regiune din C-terminus al SOF care cuprinde reziduurile de aminoacizi 844-1047. S-a constatat că inițial, SOF cuplează și subunitatea beta a fibrinogenului, iar mutanta SOF cuplează cu 50% mai puțin fibrinogen decât o face proteina tip-sălbatic. Mai mult, fibrinogenul blochează cuplarea SOF la fibronectină. De aici, ideia că, fibrinogenul și fibronectina cuplează la același domeniu din SOF. Rămâne însă de stabilit dacă cuplarea fibrinogenului la SOF contribuie la virulența streptococilor din grupul A (42).

Mycobacterium bovis BCG este folosit în tratarea cancerului intravezical superficial. Atașarea lui la fibronectina din structura vezicii urinare este necesară pentru medierea răspunsului antitumoral. S-a identificat un receptor bacterian-proteina de atașare la fibronectină (FAP) – ca un important mediator al acestui proces. Interacțiunea stabilă BCG/fibronectină este dependentă de cuplarea FAP la fibronectină; totuși rolul acestei proteine în atașarea in vivo nu este încă elucidat. S-a clonat *M. bovis* BCG FAP (FAP-B) in vivo, demonstrându-se rolul important al FAP în atașarea bacteriei la peretele vezicii urinare și inducția activității antitumorale mediată de bacterie. Secvența de aminoacizi predicată pentru FAP-B are omologie de 61% cu *M. avium* (FAP-A) și 71% cu *M. leprae* (FAP-L). Anticorpi policlonali anti-FAP *M. vaccae* (FAP-V) reacționează cu toate 3 proteinele recombinante. Astfel, FAP-B cuplează fibronectina via regiunile de atașare înalt conservate identificate anterior pentru FAP-A și FAP-L și inhibă competitiv atașarea BCG la fibronectina matricială. In vivo, FAP este necesară pentru atașarea stabilă a BCG la peretele vezicii, dar și pentru expresia activității antitumorale indusă de acesta: de aici, rolul FAP în medierea acestei activități (43).

Domeniile fibronectinei umane mediază cuplarea antigenului alfa, cel mai imunopotent antigen al *Mycobacteriilor*, care induce imunitate protectivă contra infecției mycobacteriene.

Antigenul alfa imunodominant al mycobacteriei deține un segment care cuplează fibronectina și este unic printre tulpinile de mycobacterii. Fragmente de fibronectină generate prin proteoliză sau prin tehnici cu DNA recombinat arată abilitatea de a cupla antigenul alfa. Fragmentele care conțin fie domeniul C-terminal care cuplează heparina, fie domeniul care cuplează constant la antigenul alfa după mutații, duc la pierderea activității de cuplare a heparinei și a antigenului alfa. Deci, locul mutant al fibronectinei, respectiv cel care cuplează heparina, este și locul principal pentru cuplarea antigenului alfa. De asemenea, domeniul fibronectinei care cuplează antigenul alfa poate cupla toate bacteriile, sugerând că ambele locuri sunt importante pentru infecție (44).

Fibronectina în modelarea și remodelarea matricei extracelulare

Grefe de politetrafluoroetilen de înaltă porozitate s-au implantat în carotidele a 10 câini. Acestea au fost pretratate cu fibronectină, sau nu (grefe de control). Grefele au fost apoi prelevate 4-6 săptămâni după implant și nu prezentau diferențe semnificative între ele. Aria lipsită de trombusi era mai extinsă în grefele cu fibronectină, decât în cele de control (86,9% față de 34,0%). Pseudointima vaselor era mai bine înlocuită de țesutul fibros în cazul grefelor cu fibronectină, decât în cele de control, și apare căptușită cu o pătură de celule asemănătoare cu celulele endoteliale, iar țesutul transmural apare vizibil crescut în grefele cu fibronectină față de cele de control (45).

Cicatricile radiare sunt un factor independent de risc histologic pentru cancerul mamar. Dată fiind importanța interacțiunii stromă-epiteliu în patogeneza acestui cancer s-au studiat cicatricile

radiare pentru expresia unor factori implicați în formarea stromei vasculare din tumori. Nivelul expresiei variatelor molecule de adeziune din matricea extracelulară s-a urmărit în 9 cazuri de cicatrice radiare și s-a comparat cu cel din 15 probe de țesut mamar normal și 4 cazuri de carcinom mamar ductal infiltrativ. În comparație cu țesutul mamar normal, cicatricile radiare arată un număr crescut de focare vasculare și expresie crescută a mRNA pentru colagen tip1, fibronectină totală, extradomeniul A(ED-A)+ al fibronectinei, trombospondin-1, VPF (factorul de permeabilitate vasculară), VEGF și KDR (receptor care conține domeniul de inserție a kinazei – receptorul endotelial al VPF). Acest model de supraexpresie a mRNA este similar cu cel prezent în 4 cazuri de cancer invaziv. S-a concluz astfel că, există similarități între cicatricile radiare și cancerele mamare invazive, la nivelul exprimării mRNA al câtorva factori implicați în formarea stromei vasculare. Se sugerează că, o disturbantă similară există și în interacțiunile stromă-epiteliu la nivelul ambelor tipuri de leziuni, respectiv cicatricile radiare și leziunile canceroase (46).

În țesuturile inflamate s-a constatat remodelarea extinsă a matricei extracelulare. Astfel, leziunea celiacă a intestinului subțire se caracterizează prin inflamații însoțite de profunde alterări morfologice. La pacienții cu asemenea leziuni netratate, s-a determinat distribuția izoformelor lamininei, fibronectinei și tenascinului din biopsii de intestin. În mucoasa normală distribuția izoformelor lamininei definește 3 zone epiteliale ale membranei bazale, a căror organizare este menținută și în mucoasa celiacă. Astfel, componente ale lamininei-5 (alfa3și beta3) sunt prezente în membrana bazală la suprafața epitelului, lanțul alfa2 în criptele profunde, iar lanțul alfa5, unic în mijlocul criptei membranei bazale.

Distribuția fibronectinei și tenascinului în leziunile celiace este astfel similară cu cea din intestinul normal. Organizarea fibroblastelor pericriptale și catenelor laminei propria din pătura musculară netedă definită ca actina alfa a mușchiului, rămân, de asemenea, neschimbate în mucoasa celiacă. Schimbări majore nu s-au detectat nici în matricea extracelulară din leziunea celiacă (47).

Glandele mamare sunt reglate atât structural cât și funcțional de interacțiunile dintre epiteliu și matricea extracelulară cu componentele ei glicoproteice majore care trimit semnale pentru proliferarea și diferențierea celulelor epiteliale mamare. Fragmente proteolitice ale fibronectinei s-a constatat că supresează creșterea și pot stimula apoptoza celulelor epiteliale mamare de la șoarece. În timpul involuției glandelor mamare, nivelul total al fibronectinei și fragmentelor sale sunt crescute atingând maximum la 4–6 zile după înțarcare, moment care coincide cu apogeul morții celulelor epiteliale. Tratarea celulelor TM-6, o linie tumorogenică de celule epiteliale mamare de șoarece, cu fragmente de fibronectină exogenă (FN120) reduce numărul celulelor și induce apoptoza și activitatea de degradare a proteazei matriciale. Inhibarea acestei enzime reface viabilitatea celulelor TM-6 sugerând că pierderea celulelor este mediată de activarea acesteia.

Într-un model tridimensional vizând dezvoltarea glandei mamare se constată că, FN120 reduce dezvoltarea structurilor asemănătoare alveolelor mamare și stimularea structurilor asemănătoare ductelor mamare de către mecanisme dependente de protează. Se conclue că în timpul involuției post-lactație, fragmentele de fibronectină pot contribui la pierderea celulelor epiteliale și la disoluția alveolelor mamare, prin inducerea proteinazelor degradante din matricea extracelulară (48).

Celulele tiroidei șobolanilor Fischer (FRT) organizează o matrice a fibrilelor de fibronectină extracelulară care suferă marcată remodelare vizavi de confluența culturii celulare. În cazul celulelor neconfluente fibronectina formează o arie fibrilară asociată cu suprafața ventrală a celulelor. Totuși, în culturile confluențe, fibronectina bazală este progresiv îndepărtată și substituită cu depozite de fibronectină nefibrilară în părțile laterale ale celulelor și anume în regiunile de contact intercelular.

Celulele FRT secretă și exprimă pe plasmalemă activatori ai plasminogenului tip-tisular, iar în culturile lipsite de ser plasminogenul induce o rapidă pierdere a fibrilelor de fibronectină, proces drastic redus prin incubarea cu inhibitori ai plasminei. Celulele FRT exprimă, de asemenea, și anexin II, un receptor al plasminogenului sugerând că activitatea plasminei este asociată cu mediul pericelular, fapt ce susține observația că o scădere enormă a degradării fibronectinei apare în condițiile în care celulele sunt preincubate cu carboxipeptidaza B care previne cuplarea plasminogenului la celule.

Activitatea gelatinolitică a unui echivalent de aceeași greutate moleculară cu MMP2 este relevantă de zimografia mediului de cultură și de prezența metaloproteinazelor MMP2 și MMP1 detectate cu imunofluorescență pe plasmalema celulelor. În timpul maturării epiteliului FRT în procesul remodelării fibronectinei se constată apariția proteinei tPA activată dependentă sau nu de plasmînă, ambele fiind activități proteolitice implicate (49).

În vivo apar natural fragmente de fibronectină care cresc în lichidul sinovial din articulațiile artritice. Fragmentul de fibronectină 45kDa (Fn-f-45) care reprezintă domeniul de cuplare a fibronectinei la N-terminal al colagenului, modulează expresia de către condrocitele din articulație, a MMP la porcine, in vitro. Stimularea cu Fn-f-45 a condrocitelor cultivate sau explantelor de cartilaj crește nivelul MMP13, datorat, se pare, mai curând sintezei sale decât eliberării din rezervele matriciale. Fn-f-45 stimulează și sinteza de MMP3 (stromelizin1) atât de către condrocitele cultivate, cât și din culturile de cartilaj. Sinteza crescută a celor două MMP indusă de acest fragment apare pe calea unui mecanism independent de IL-1, deoarece receptorul antagonist al IL-1 nu poate bloca acest proces. În aceste culturi MMP2 și MMP9, gelatinazele nu apar modulate de Fn-f-45. Se concluează că acest fragment de fibronectină poate induce un fenotip catabolic în condrocitele articulare, prin suprareglarea expresiei MMP specifice pentru degradarea colagenului, dar și agrecanului din explantele de cartilaj (50).

Efectele injectării Fn-f-45 în cartilajul de articulație din genunchiul iepurilor sunt investigate vizând metabolismul și degenerarea acestuia. Cartilajele injectate și neinjectate s-au tratat cu anticorpi anti-epitopului VDIPEN și anti-neoepitopilor NITEGE ai agrecanului degradat și anti-MMP3. În cartilajul injectat, celulele care au cuplat fragmentul la 6 și 24 ore sunt cele din zona superioară superficială. În ziua a doua, proteina MMP3 apare amplificată și conținutul cartilajului în proteoglican (PG) și ratele sintezei acestuia apar reduse cu 40% și respectiv 70%. Epitopul MMP3 și neoepitopii VDIPEN și NITEGE apar, de asemenea, amplificați. Ulterior, conținutul în PG crește până la nivele supranormale începând din ziua 14 până în ziua 35 după care revine la nivelele normale în ziua 70, ceea ce se constată și cu ratele sintezei sale. În cartilajele neinjectate nu s-a detectat Fn-f-45. Se concluează că, în acest model de degenerare a cartilajului articular, pierderea PG este urmată de răspunsuri anabolice supranormale care facilitează restaurarea PG (51).

S-a comparat în intervalul de 15–72 ore, forța de adeziune a osteoblastelor din bolta craniană a nou-născutului de șobolan, la sticlă acoperită cu fibronectină după incubarea lor cu particule de titanu, constatându-se că această forță este semnificativ afectată de prezența particulelor de titanu. În schimb, ea nu este afectată dacă incubarea durează sub 4 ore, deși după acest interval este relativ redusă comparativ cu controlul. Colorația pentru actina-F indică faptul că particulele de titanu ingerate de osteoblaste (ele găsindu-se mai curând în citoplasmă decât pe suprafața acestora), influențează aranjamentul citoscheletului și diseminarea celulelor. În plus, nivelele mRNA pentru colagenul tip1 și pentru fibronectină sunt semnificativ reduse sub 4 ore după expunerea la particulele de titanu, comparativ cu nivelul de control. Acest efect se constată până la 72 ore. Se apreciază că expunerea directă a osteoblastelor la particule de titanu poate reduce semnificativ forța de adeziune a celulelor cu consecința scăderii activității acestora și a expresiei genei fibronectinei și colagenului tip 1 (52).

S-a evaluat in vitro, în interval de 72–96 ore, biocompatibilitatea a 4 faze ale aliajului metalic dentar, în ideea determinării ratelor proliferării fibroblastelor umane cultivate, proces corelat cu organizarea fibronectinei din matricea extracelulară. S-a stabilit astfel că, ratele proliferării sunt direct corelate cu expresia fibronectinei și că un procent ridicat de celule aflate în faza S a ciclului lor arată predominanța fibrilelor de fibronectină organizată în focare de adeziune. Aliajul cu conținut ridicat în aur se dovedește cel mai biocompatibil deoarece se comportă într-o manieră foarte similară cu cea a controlului. Din contră, fibroblastele expuse la cel mai înalt conținut în argint se comportă foarte diferit comparativ cu controlul. Aranjamentul fibronectinei împreună cu ratele proliferării celulare ar putea fi util pentru determinarea biocompatibilității aliajelor dentare metalice (53).

Fibronectina, glicoproteină polimorfă multifuncțională intervine semnificativ în păstrarea homeostaziei. După infarctul miocardic acut (AMI) al ventriculului stâng s-a urmărit nivelul

fibronectinei plasmatice și rolul ei posibil în formarea chiagurilor intraventriculare la 87 bărbați, 10 femei și 30 martori. S-a constatat că nivelele fibronectinei sunt semnificativ mai înalte la cei cu infarct, decât la martori, iar trombuși s-au detectat la 20 din cei 97 pacienți. Mai mult chiar, nivelele fibronectinei erau semnificativ mai înalte la cei cu trombuși intraventriculari, decât la cei fără, deși nivelele ei plasmatice nu reprezintă un predictor independent de formarea acestora. Se sugerează astfel că, nivelele crescute de fibronectină plasmatică pot fi un risc pentru formarea chiagurilor intraventriculare după AMI (54).

Fibroblastele tegumentare de la pacienții cu sindromul Ehlers-Danlos au defectiv organizată fibronectina matricială. Vindecarea târzie a ulcerelor cronice de la picioare este un semn al acestei afecțiuni, care se pare că poate fi tratată cu dexametazonă (dex), un glucocorticoid sintetic (55).

Glucocorticoizii sunt hormoni de stress anti-inflamatorii implicați în numeroase procese patologice. Incubarea cu dexametazonă a celulelor din stroma prostatei umane duce la proliferarea marcată a acestora, îndeosebi a fibroblastelor. Mai mult chiar, expresia genei fibronectinei și secreția proteinei cresc substanțial la doze înalte, în timp ce la dozele mici nu au efect. In vitro, celulele stromei sunt sensibile la dexametazonă care le crește proliferarea și sinteza de fibronectină. Acumularea locală a glucocorticoizilor poate influența astfel, in vivo, reglarea creșterii celulare și sinteza matricei extracelulare în prostata umană și poate juca un rol în patologia glandei (56).

Proteinele plasmatice fibrinogenul (Fg), fibronectina (Fn), vitronectina (Vn) și factorul von Willebrand (vWF) când sunt adsorbite ca proteine purificate pot media adeziunea plachetelor sangvine la materiale sintetice. Se crede că Fg are un rol de lider în medierea adeziunii plachetelor la biomateriale (polistiren) pre-adsorbite cu plasmă. S-a comparat adeziunea plachetelor la suprafețe pre-adsorbite cu plasma normală, plasma depletată de Fn sau de Vn sau de ambele, plasma de la donori deficienți genetic în vWF și ser. S-a constatat astfel că, foarte puține plachete aderă la suprafețele pre-adsorbite cu ser, în timp ce depleția din plasmă a Fn, Vn sau vWF nu scade semnificativ adeziunea lor. Reintroducerea Fg exogen în ser, înainte de adsorbția proteinei restaurează adeziunea sugerând că Fg este proteina plasmatică majoră care mediază acest proces (57).

În ideea explorării funcției vasculare a subtipului de receptor al angiotensinei II (ANG II) – AT(2)R-, s-a generat o linie de celule musculare netede (SMC) care exprimă acest receptor – (SMC-vAT(2)). Implicarea lui în motilitatea SMC s-a investigat în aceste celule și în cele de control (SMC-v) cultivate cu tehnica picăturii de agaroză, fie pe laminina, fie pe fibronectina din matricea extracelulară, în prezența losartanului care inactivează subtipul de receptor AT(1)R. S-a constatat că ambele linii celulare migrează în afara picăturilor, dar exclusiv pe laminină. Tratamentul cu angiotensină II inhibă semnificativ migrarea SMC-vAT, dar nu a celulelor SMC-v, efect prevenit însă de antagonistul lui AT(2)R – CGP-42112A-. Migrarea redusă a SMC-vAT(2) nu s-a asociat cu schimbări în creșterea celulei, afectarea citoscheletului sau cu expresia actinei, desminei și tenascinei musculare, dar s-a corelat cu sinteza crescută și cuplarea fibronectinei. Ambele răspunsuri sunt prevenite de incubarea celulelor cu antagoniști selectivi ai AT(2)R. Adăusul peptidului GRGDTP, care previne atașarea fibronectinei la celule reversează efectul inhibitor al receptorului asupra migrării SMC-vAT(2). Se sugerează că, AT(2)R inhibă migrarea SMC pe calea sintezei și cuplării fibronectinei celulare (58).

Culturi omogene de celule musculare netede vasculare (VSMC) de la șobolani spontan hipertensivi produc angiotensină II (ANG II) ca răspuns la creșterea nivelului angiotensinogenului, catepsinei D și enzimei ce convertește angiotensina (ACE). Schimbarea VSMC din fenotip contractil în fenotip sintetic duce la creșterea cantității de organite sintetice, cu consecința producerii proteazelor și factorilor de creștere. Culturi de VSMC de la șobolani Wistar-Kyoto s-au incubat cu un fragment activ de fibronectină – Arg-Gly-Asp-Ser- pentru 24, 48 și 72 ore după sincronizarea ciclului celular cu 0,2% ser de vițel pentru 48 ore. În funcție de doză, fibronectina crește sinteza DNA în VSMC, sinteză însă inhibată de antagonistul ANG II – CV-11974R tip1. Imunoreactivitatea ANG II-like este semnificativ crescută în mediul condiționat din VSMC. În plus, mRNA pentru proteazele catepsina D și ACE generate de ANG II sunt crescute de către fibronectină. Expresia mRNA TGFbeta1, lanțului A al PDGF și factorului de creștere a fibroblastelor sunt, de asemenea, crescute de către fibronectină.

Concluzia este că, schimbările care însoțesc alterarea fenotipului sintetic în culturile omogene de VSMC induc creșterea expresiei celor două proteaze care, la rândul lor, produc ANG II. Pe de altă parte, aceste schimbări cresc expresia factorilor de creștere care ulterior induc creșterea VSMC (59).

Angiotensina II (ANG II) este implicată în remodelarea cardiacă, fiind recunoscută pentru activitatea ei profibrotică. S-au izolat fibroblaste din ventriculii inimii umane explantate și s-a adăugat ANG II în prezența unor antagoniști specifici – R-AT(1) și R-AT(2) – pentru a induce creșterea, acumularea matricei extracelulare și adezivitatea celulelor. S-a constatat o scădere a expresiei R-AT(1) în insuficiența cardiacă progresivă.

În culturi de fibroblaste cardiace umane ANG crește activitatea PK activată de mitogeni, sinteza DNA (de 5 ori), nivelul mRNA TGF beta1 (de două ori) la două ore, nivelul mRNA lamininei și mRNA fibronectinei la 24 ore. ANG II amplifică, de asemenea, expresia activator/inhibitor-1 al plasminogenului care, la rândul lui, inhibă metaloproteinazele ce degradează matricea extracelulară. ANG II crește atașarea fibrelor cardiace la colagenul tip I și III, ceea ce se asociază cu creșterea activității kinazei în focarul de adeziune. În concluzie, activarea în inima umană a R-AT(1) inițiază fibroza, iar ANG II stimulează expresia activator/inhibitor-1 al plasminogenului și adeziunea la colagen a fibrelor cardiace (60).

Fibronectinele (FN) sunt glicoproteine adezive care se exprimă principalmente în matricea extracelulară. Sunt molecule polimorfe ale căror variate izoforme depind de modelul splicingului alternativ. Izofoma care conține ED-B prezentă în țesuturile fetale și neoplazice (oncofetală sau FN-B) este considerată un marker al angiogenezei. Distribuția ei s-a analizat folosindu-se anticorpi monoclonali specifici, într-o serie consecutivă de 134 meningioame umane obținute chirurgical. S-a constatat că FN fetală este larg distribuită în vasele meningioamelor anaplazice, expresia ei fiind restrictată în vasculatura tipică și absentă în țesutul cerebral învecinat. Expresia fibronectinei oncofetale în vasculatura meningioamelor maligne ar putea fi, in vivo, o țintă a agenților angiosupresivi (61).

Oncogena Db1 este un factor de schimbare pentru micile GTP-aze Rho și cdc42 implicate în polimerizarea actinei din fibrele solicitate (fibre stress) și lamelipode. După adeziunea la fibronectină, celulele NIH3T3 transformate de Db1 capătă o formă poligonală contractată, cu abundente fibre solicitate, scurte. Din contră, celulele netransformate capătă morfologia caracteristică de fibră blast organizând o rețea regulată de fibre solicitate, lungi. În ambele tipuri celulare se observă și o formă diferită de organizare a citoscheletului de actină, implicând în stadiile timpurii de adeziune, activitatea GTP-azelor. După adeziunea la fibronectină, morfologia celulelor transformate depinde de activarea lui RhoA și nu a cdc42. În contrast, activarea lui cdc-42 este necesară pentru ca celulele netransformate să preia forma propriilor fibroblaste. De asemenea, în ambele tipuri celulare se impune activarea lui Rac pentru a susține organizarea fibrelor stress, în timp ce activarea lui Rac constitutiv inițiază “unduirea” și formarea lamelipodelor. Ca o consecință a activării lui RhoA, celulele transformate exprimă activitate înaltă a efectorilor Rho (kinazele ROK alfa și CRIK). În plus, celulele transformate care exprimă constitutiv forma activă a RhoA sunt slab motile pe fibronectină, față de cele care exprimă constitutiv cdc42 activ.

Concluzia care rezultă constă în aceea că, în celulele NIH3T3 expresia oncogenei ca răspuns la fibronectină, duce la activarea predominantă a RhoA care suportă forma deosebită a celulei și organizarea citoscheletului de actină în fibrele stress, reglând în același timp și motilitatea celulei (62).

Gena supresoare de tumori von Hippel-Lindau (vHL) este fie absentă, fie inactivată în sindromul cancerului VHL și în majoritatea cancerelor renale sporadice, ea fiind necesară pentru asamblarea unei matrice extracelulare proprii de fibronectină. Se demonstrează că celulele 786-0 de cancer renal nu pot organiza o matrice adecvată chiar în prezența unui exces de fibronectină. Deoarece formarea adeziunilor integrinelor fibrilare are rol pivotal în organizarea fibronectinei extracelulare, s-a urmărit expresia și distribuția subcelulară a integrinelor în celulele VHL (-) și în partenerii lor de tip-sălbatic VHL(+) stabil transfecțați. S-a stabilit că, nivelele integrinelor beta-1 și alfa-v sunt crescute în celulele VHL(-) în comparație cu transfecțantele VHL(+). Pe măsură ce cultura avansează și celulele devin confluențe, integrinele alfa-v trec parțial în joncțiunile intercelulare ale

transfectantelor VHL(+) care ulterior formează adeziuni fibrilare tip beta1 și sunt ancorate ferm la substrat. Din contră, celulele VHL(-) nu pot asambla asemenea adeziuni, contactele focale alfa-v rămânând neschimbate în toate stadiile culturii. Activarea exogenă a integrinelor beta1 fie cu cationi divalenți, fie cu anticorpi activanți, restaurează, în parte, capacitatea celulelor VHL(-) de a asambla adeziuni fibrilare beta și fibre de fibronectină. Maturarea lanțului integrinei beta este provocată în celulele VHL(-) și nu în cele VHL(+). Deci, VHL apare ca un reglator al integrinelor fiind esențial pentru formarea adeziunilor fibrilare beta1, ceea ce poate explica organizarea anormală a matricei extracelulare și motilitatea crescută a celulelor canceroase renale VHL(-) (63).

Nivelul mRNA TGFbeta3 din probele de leiomiom este de 3,5 ori mai înalt decât în cele de miometru. Prelevate în timpul fazei secretorii mijlocii, probele de leiomiom arată nivele de 5 ori mai înalte de mRNA TGFbeta3, decât cele prelevate în timpul fazei proliferative. TGFbeta3 se exprimă astfel în celulele leiomiomului și stimulează direct proliferarea în cultură atât a acestora cât și a celulelor miometrului. De aici se sugerează că acest factor de creștere poate fi mediator al efectelor ce stimulează creșterea steroizilor sexuali în leiomiome, datorită rolului lui în procesul fibrogenic și în proliferarea celulelor ce caracterizează aceste tumori. Și expresia mRNA FN (fibronectină) este mai înaltă în leiomiom decât în miometru (64).

Invasia intercelulară reprezintă mișcarea continuă a celulelor dintr-un tip de țesut, în alt tip, fiind caracteristică tumorilor maligne, celulelor sangvine inflamatorii din țesuturile angajate în mișcările morfogenetice din embriogeneza normală, dar și în cazuri de remodelare a țesuturilor normale și patologice la adult. Invasia se materializează în apariția unei interfețe difuze între țesuturile contigui. Alternativa invaziei este menținerea granițelor stabile ale țesuturilor. S-au urmărit procesele care stabilizează contactul interfețelor și care, pe de altă parte, induce destabilizarea integrității lor prin creșterea invaziei intercelulare. Adezivitatea intercelulară este mediată, printre altele, de moleculele fibronectinei matriciale, care în unele cazuri stimulează invazia, iar în altele o previne. Aceste aspecte depind de faptul dacă țesutul invaziv este migrat într-o matrice extracelulară, sau dacă invazia implică diverse țesuturi; în primul caz este stimulată invazia, iar în cel de al doilea are loc stabilizarea interfețelor tisulare în contact prevenind invazia (65).

Fibronectina prezintă un loc funcțional critic (YTIYVIAL) expus adeziunii celulelor la matricea extracelulară. Ea conține, de asemenea, și locul anti-adeziv (peptidul III 14-2) care afectează apoptoza și adeziunea celulelor prin subreglarea fosforilării protein-tirozinei. Peptidul supresează adeziunea mediată de integrina alfa5beta1 a celulelor leucemice K562 și HL60 și inhibitorul protein-tirozin – fosfatazei fenilarsin oxid (PAO) – care blochează efectul antiadeziv al peptidului III 14-2. Expuse la concentrații înalte de PAO, celulele leucemice suferă apoptoza (fragmentarea nucleului și DNA-ului), care însă este abolită de inhibitorul genistein al TK. Peptidul III 14-2 supresează apoptoza indusă de PAO, în timp ce un peptid de control în care secvența anti-adezivă YTIYVIAL este absentă, devine inactiv. PAO stimulează fosforilarea tirozinei proteinelor celulare, respectiv kinaza de adeziune focală și cea a peptidului inhibat sugerând că acest proces reprezintă un semnal timpuriu, comun pentru adeziune și apoptoză. Locul antiadeziv al moleculei de fibronectină poate juca un rol crucial într-o varietate de procese celulare, altele decât adeziunea și apoptoza, prin scăderea reglării fosforilării protein-tirozinei (66).

Limfocitele T CD4+ au rol important în monitorizarea răspunsului imun al gazdei, la cancer, îndeosebi prin intervenția critică pentru apariția și extinderea supraviețuirii limfocitelor CD8+. Celulele tumorale rețin fibronectina mutantă ca antigen tumoral recunoscut de antigenul leucocitar uman de histocompatibilitate DR2, restrictat la T CD4+. Această genă conține o mutație care duce la substituția lizinei cu acidul glutamic și la apariția unui nou epitop de celulă T recunoscut de T CD4+. Celulele tumorale cu fibronectină mutantă pierd matricea de fibronectină, ceea ce duce la pierderea capacității de formare a matricei extracelulare de fibronectină și la apariția potențialului de metastazare bazat pe modelul migrării, în comparație cu cel al celulelor tumorale care exprimă fibronectina tip-sălbatic.

Experimente cu linii celulare care exprimă stabil cDNA fibronectinei mutante, demonstrează că mutația punct în fibronectină este responsabilă de pierderea vizualizării ei în matricea extracelulară

și de migrarea amplificată a celulelor tumorale. Se concludă că, produsul unei gene mutante recunoscut de T CD4+ este direct implicat în metastazele tumorale, ceea ce indică importanța acestor limfocite în controlul diseminării celulelor tumorale la distanță de locurile anatomice primare (67).

În linii celulare de carcinom hepatocelular s-a investigat facilitarea invaziei factorilor de creștere și a factorilor chemotactici. Celulele de hepatom (PLC/PRF5 și HepG2) arată un puternic chemotaxis în mediul condiționat, cele de cancer pancreatic (SU.86.86) metastazează, iar cele de cancer de colon (LS174T) nu migrează către mediul condiționat. Celulele de hepatom secretă fibronectină, TGFbeta și proteaza cathepsina D. Fibronectina induce migrarea lor, iar anticorpul anti-fibronectină abolă acest proces. Anticorpul anti-integrina beta1 oprește, de asemenea migrarea, celulelor către mediul condiționat. Anticorpi policlonali anti-TGFbeta și inhibitorii proteazei (alfa2-macroglobulina și leupeptinul) adăugați la mediul de cultură mediază secreția fibronectinei de către celulele hepatomului. Deci, acest factor exogen supresează celulele canceroase pancreatice, amplifică adeziunea la substrat a celulelor hepatomului, crescând numărul celulelor viabile. De aici concluzia că, tumora (carcinomul hepatocelular) deține un mecanism autocrin forte care permite celulelor să supraviețuiască și să prolifereze în condiții cirotice (68).

Supraviețuirea și creșterea independentă de ancoraj sunt două caracteristici critice ale celulelor maligne. Adușul factorului de creștere exogen al hepatocitelor (HGF) și prezența fibrilelor de fibronectină stimulează creșterea independentă de ancoraj a coloniilor de celule carcinoatoase mamare murine (SP1) care exprimă HGF și HGF-R (Met). Tirozin-fosforilarea Met în aceste celule este crescută de adeziunea celulară și diseminarea lor pe substratul de fibronectină. Din contră, celulele detașate, în absența serului reduc tirozin-fosforilarea Met și suferă apoptoza în 18–24 ore. În aceste condiții, adușul de HGF stimulează acest proces și restaurează supraviețuirea celulelor canceroase. Fibronectina solubilă stimulează, de asemenea, aceste procese și cooperează la răspunsul de supraviețuire cu HGF, însă nu afectează tirozin-fosforilarea Met. Deci, fibronectina acționează în celulele detașate pe o cale independentă de Met. Pe de altă parte, inhibarea activității fosfatidil-inozitol-3-kinazei (PI-3 kinazei), blochează sinteza DNA în celulele tumorale indusă de HGF. În celulele detașate se constată un efect cooperant al HGF și fibronectinei, pentru activarea PI-3 kinazei. Activitatea acestei kinaze este reclamată și pentru supraviețuirea celulelor indusă de HGF și fibronectină, ca și pentru creșterea independentă de ancoraj a coloniilor. Activitatea kinazei c-Src și MEK/2 este totuși reclamată pentru supraviețuirea celulelor. Se concludă că, PI-3 kinaza este un efector cheie al supraviețuirii celulelor carcinoatoase mamare indusă de HGF și fibronectină în condiții de detașare, coroborând interacțiunea dintre integrină și căile de semnalizare HGF/Met, în apariția cancerului mamar invaziv (69).

Migrația transcelulară a hepatomului ascitic de șobolan (AHI 130 – MM1) printr-un monostrat de celule mezoteliale cultivate (MCL) este determinată de acidul lizofosfatidic (LPA), care stimulează polimerizarea, fosforilând lanțul ușor al actinei și miozinei, prin activarea cascadei Rho-kinazei. Motilitatea fagocinetică a celulelor MM1 pe suprafața de sticlă acoperită cu fibronectină nu este totuși, indusă de LPA, deși aceasta este însoțită de apariția celulelor fusiforme și adeziunilor focale. Integrina beta1 care este receptorul fibronectinei este exprimată pe celulele MM1. Anticorpi anti-fibronectină și anti-beta1 integrină supresează remarcabil motilitatea fagocinetică indusă de LPA, ca și migrația transcelulară prin MCL. Se concludă că, polimerizarea actinei și fosforilarea lanțului ușor al miozinei prin activarea Rho, sunt procese insuficiente pentru inducerea motilității celulare. Aderiunea mediată de cooperarea fibronectină/integrină beta1 este însă, necesară pentru fagocinetică și pentru migrarea transcelulară a celulelor MM1 (70).

La șoareci dublu deficienți în integrina beta1 s-a transfectat în celulele Esb de limfom, mutante beta1, și s-a testat capacitatea de metastazare a acestora în ficat și splină, comparându-se cu invazia dependentă de integrina alfa4beta1 în monostrat in vitro și cu adeziunea la fibronectină indusă de mangan. Deleția a 5 reziduuri C-terminal sau mutația treoninelor T788 și T789 la alanină blochează invazia și metastazele, reducând enorm și adeziunea celulelor cu efecte cunoscute in vitro. Totuși, mutațiile secvenței NPXY a tirozinei are consecințe neașteptate. Astfel, o mutație Y783F are efecte limitate asupra invaziei și metastazării. Celulele care exprimă o subunitate himerică beta1beta2

ce conține fenilalanină în secvențele NPXY/F aderă slab, dar invazia și metastazarea sunt deplin restaurate la aceleași nivele ca cele din celulele ce exprimă beta1 tip-sălbatic. Se conclue că, o parte din funcțiile domeniului citoplasmatic beta1 necesar adeziunii celulelor nu este esențială pentru procesele invaziei și metastazării dependente de beta1 (71).

Reziduurile Arg-Gly-Asp (RGD) de aminoacizi din vitronectină și fibronectină arată afinitate pentru integrinele alfavbeta3 exprimate în celulele endoteliale vasculare. Creșterea adenocarcinomialor umane de rinichi și colon poate induce suprareglarea expresiei acestor integrine pe celulele tumorale pentru invazie și metastază, iar neovascularizarea țesuturilor sugerează potențialul apariției peptidului RGD radiomarcant, ca antagonist al integrinelor pentru spectrul larg specific tumoral (72).

Administrarea BCG (Bacilul Calmette-Guerin) induce expresia înaltă a secreției de IL-6 de către celulele carcinomului tranzitional uman. Influența acestei interleukine s-a evaluat în ceea ce privește interrelațiile critice variabile care reglează tumorile BCG, și expresia integrinei alfa5beta1 din tumori. Linia tumorală umană 253J a fost transfectată cu un vector care conține secvența cDNA IL-6 de lungime deplină. Hiperexpresia acestui DNA, ca și a proteinei s-a confirmat cu metoda ELISA.

Clonele care exprimau IL-6 s-au investigat pentru expresia integrinei. Astfel, efectul alterărilor expresiei acesteia pe aderența celulelor tumorale la fibronectină și a BCG la celulele tumorale relevă că mRNA subunităților alfa5 și beta1 ale receptorului fibronectinei cresc de 9,4 și respectiv 125,7 ori în transfectantele care supraexprimă IL-6, comparativ cu celulele parentale 253J. Expresia crescută a acestor mRNA este asociată cu expresia crescută la suprafața celulelor a ambelor proteine, cu consecința afinității de cuplare mai mare a fibronectinei și cu aderența crescută a BCG la celulele tumorale.

Se conclue că, expresia autonomă a IL-6 suprareglează expresia subunităților receptorului fibronectinei în celulele carcinomului tranzitoriu, iar expresia crescută a alfa5beta1 crește aderența celulelor la fibronectină și a BCG la celulele tumorale. De aici, rolul lui IL-6 în medierea activității antitumorale a BCG prin influența aderenței bacilului la celulele carcinoatoase (73).

Inhibiția diferențiată a invaziei celulelor de carcinom renal este mediată de fibronectină, collagen tip IV și laminină. Invazia celulelor canceroase în matricea extracelulară este o treaptă esențială în formarea metastazelor, proces în care sunt implicate molecule de adeziune precum integrinele beta1 care cuplează la secvența RGD (arginină-glicină-asparagină) și CD44. S-a urmărit invazia celulelor liniei CCF-RC1 de carcinom renal în cele 3 componente ale matricei extracelulare și efectul TGFbeta și IFNgamma asupra acestui proces, evaluându-se efectul inhibitor al unui anticorp anti-subunitatea beta1 a integrinelor (CD29) ca și a unui pentopeptid care include secvența RGD. Adăusul moleculelor menționate induce creșterea de 5–10 ori a invaziei ce depinde substanțial de prezența lui beta1, fapt demonstrat prin folosirea unui anticorp anti-CD29 sau a unei RGD care include peptide inhibitoare ale migrării celulelor, cu aproximativ 88%.

CD44 este mai puțin implicat în migrarea dependentă de collagen tip IV, iar influența asupra migrării dependente de fibronectină și laminină, aproape nu există. De asemenea, TNFalfa și IFNgamma nu influențează semnificativ expresia CD44 sau CD29 și nu alterează migrarea celulelor tumorale. Prin urmare, invazia celulelor cancerului renal este reglată diferențiat de componentele matricei extracelulare, printre care fibronectina pare să fie molecula critică. Interacțiunile moleculare în acest proces sunt puternic dependente de integrinele beta1 și de secvența RGD din aminoacizii corespunzători (74).

Leucemia limfocitică cronică cu celule B se distinge prin acumularea de limfocite B maligne, ca rezultat al semnalelor anormale de supraviețuire care operează in vivo. Adeziunea acestor celule la fragmentul H89 al fibronectinei – un ligand pentru integrina alfa4beta1 – previne in vitro, apoptoza lor spontană. S-a urmărit dacă interacțiunea integrină alfa4beta1/H89 afectează răspunsul limfocitelor maligne la terapia cu fludarabin. Celulele maligne cultivate pe H89 arată, în timpul terapiei, viabilitate mai înaltă decât cele de control (cultivate pe polilizină), pentru toate dozele de fludarabin testate (75).

Interacțiunile celulă-matrice extracelulară sunt parțial mediate pe calea integrinei beta1, care reglează supraviețuirea, proliferarea, adeziunea și migrația celulelor. Alterarea expresiei integrinei beta1 și PK co-localizate, respectiv kinaza legată la integrină (ILK), s-a analizat în liniile A549 și

SKMES1 de carcinom pulmonar expuse iradierii, în prezența sau absența diferitelor proteine matriciale dependente de integrina beta1. Celulele cultivate pe fibronectină și laminină arată o creștere semnificativă a supraviețuirii, în comparație cu cele cultivate pe plastic. După 48 ore, inducția integrinei beta1 și expresia ILK dependente de doza de iradiere și de matrice, demonstrează că adezivitatea celulelor la cele două molecule crește de 10 ori față de celulele cultivate pe plastic, ambele proteine fiind astfel suprareglate de iradiere. În plus, ele sunt co-localizate cu fibrele de actină acumulate pe fața citoplasmatică a plasmalemei, în arii bine delimitate.

Radiațiile ionizante induc astfel expresia marcată a celor două proteine matriciale în ambele linii tumorale, în funcție de matricea folosită. Localizarea subcelulară a fibronectinei și lamininei este alterată de iradiere, iar radiosensibilitatea celulelor este redusă în prezența matricei. Celulele ar putea adera mai puternic prin creșterea densității receptorilor suprafeței funcționale, prevenind astfel metastaza. Celulele tumorale intravasculare reglate de integrina beta1 ar putea adera la endoteliu, ceea ce este o condiție pentru metastază (76).

Implicarea gonadotropinelor în reglarea adezivității celulelor carcinomului epitelial ovarian uman s-a investigat pe două căi, anterior implicate în implantarea metastazelor în peritoneu. Celulele MLS și OC238 de carcinom ovarian au fost stimulate fie cu hormon luteinizant și/sau cu FSH, constatându-se o adezivitate crescută la plăcile de cultură acoperite cu hialuronan, ca și la cele acoperite cu fibronectină sau cu un derivat al trombinei ce conține peptidul RGD. Stimularea cu gonadotropină duce la expresia subunității alfa a integrinei și a CD44 – receptorul hialuronan de la suprafața celulelor. Pe de altă parte, celulele OC238 nu exprimă această subunitate a integrinei și nu arată efect hormonal pe expresia fie a RGD, fie a CD44. Se concluzionează că, nivelele ridicate de gonadotropine pot, în unele cazuri, să faciliteze diseminarea metastazică peritoneală a cancerului ovarian, prin creșterea adeziunii celulei, prima treaptă esențială în procesul invaziv (77).

1. Bruce Alberts, Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. Biol. Mol. Cell., Med. Sci. Flammarion, 949–1011, 1994.

2. Pelta J., Berry H., Fadda G. C., Pauthe E., Lairez D., Statistical conformation of human plasma fibronectin. *Biochemistry*, 39(17), 5146–54, 2000.

3. Baneyx G., Baugh L., Vogel V., Supramolecular Chemistry And Self-assembly Special Feature: Fibronectin extension and unfolding within cell matrix fibrils controlled by cytoskeletal tension. *Proc. Natl. Acad. USA*, 99(8), 5139–43, 2002.

4. Hocking D.C., Sottile J., Langenbach K. J., Stimulation of integrin-mediated cell contractility by fibronectin polymerization. *Journal of Biological Chemistry*, 275(14), 10673–82, 2000.

5. Katz B. Z., Zamir E., Bershadsky A., Kam Z., Yamada K. W., Geiger B., Physical State of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesion. *Molecular Biology of the Cell*, 11(3), 1047–60, 2000.

6. Pankov R., Cukierman E., Katz B. Z., Matsumoto K., Lin D. C., Lin S., Hahn C., Yamada K. M., Integrin dynamics and matrix assembly: tensin-dependent translocation of alpha (5)beta(1) integrin promoter early fibronectin fibrillogenesis. *Journal of Cell Biology*, 148(5), 1075–90, 2000.

7. Redick S. D., Satlles D. L., Briescie G., Erickson H. P., Defining fibronectin's cell adhesion synergy site by site-directed mutagenesis. *Journal of Cell Biology*, 149(2), 521–7, 2000.

8. Baneres J. L., Roquet F., Martin A., Parello J., A minimized human integrin alpha(5)beta(1) that retains ligand recognition. *Journal of Biological Chemistry*, 275(8), 5888–903, 2000.

9. Wagner C., Burger A., Radsak M., Blums S., Hug F., Hanach G. M., Fibronectin synthesis by activated T lymphocytes: up-regulation of a surface-associated isoform with signalling function. *Immunology*, 99(4), 532–9, 2000.

10. Boyle D. L., Shi Y., Gay S., Firestein G. S., Regulation of CS1 fibronectin expression and function by IL-1 in endothelial cells. *Cellular Immunology*, 200(1), 1–7, 2000.

11. Madazli R., Budak E., Calay Z., Aksu M. F., Correlation between placental bed biopsy findings cell adhesion molecule and fibronectin levels in pre-eclampsis. *BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynecology*, 107(4), 514–8, 2000.

12. Imoto E., Kakuta S., Hori M., Yagami K., Nagumo M., Adhesion of a chondrocytic cell line (USAC) to fibronectin and its regulation by proteoglycan. *J. Oral. Pathol. Med.*, 31(1), 35–44, 2002.

13. Boles B. K., Ritzenthaler J., Birkenmeier T., Roman J., Phorbol ester-induced U-937 differentiation effects on integrin alpha (5) gene transcription. *American Journal of Physiology*, 278(4), 2703–12, 2000.

14. Ongenaes K. C., Phillips T. J., Park H. Y., Level of fibronectin mRNA is markedly increased in human chronic wounds. *Dermatologic Surgery*, 26(5), 447–51, 2000.

15. Praetorius J., Spring K. R., Specific Lectins Map the Distribution of Fibronectin and beta1-Integrin on Living MDCK cells. *Exp. Cell. Res.*, 276(1), 52–62, 2002.
16. Littlewood Evans A., Muller U., Stereocilia defects in the sensory hair cells of the inner ear in mice deficient in integrin alpha8beta1. *Nature Genetics*, 24(4), 424–8, 2000.
17. Watanabe K., Takahashi H., Habu Y., Kamiya-Kubushiro N., Kamiya S., Nakamura H., Yajima F., Ishii T., Katayama T., Miyazyki K., Fukai F., Interaction with heparin and matrix metalloproteinase 2 cleavage expose a cryptic anti-adhesive site to fibronectin. *Biochemistry*, 39(24), 7138–44, 2000.
18. Wierzbicka-Patynowski I., Schwarzbauer J., Regulatory role for SRC and P13-Kinase in initiation of fibronectin matrix assembly. *J. Biol. Chem.*, 2002.
19. Almeida E. A., Ilia D., Han Q., Hanck C. R., Jin F., Kamakatsu H., Schlaepfer D. D., Damsky C. H., Matrix survival signaling: from fibronectin via focal adhesion kinase to c-junNH(2)-terminal kinase. *Journal of Cell Biology*, 149(3), 741–54, 2000.
20. Liao Yung-Feng, Gotwals Philip J., Koteliansky Victor E., Sheppard Dean, Van De Water Livingston., The EIIIA segment of fibronectin is a ligand for integrins alpha9beta1 and alpha4beta1 providing a novel mechanism for regulating cell adhesion by alternative splicing. *Journal of Biological Chemistry*, 277(17), 14467–14474, 2002.
21. Darribere T., Schwarzbauer J. E., Fibronectin Matrix composition and organization can regulate cell migration during amphibian development. *Mechanisms of Development*, 92(2), 239–50, 2000.
22. Wang J., Mayernik L., Armant D. R., Integrin signaling regulates blastocysts adhesion to fibronectin at implantation: intracellular calcium transients and vesicle trafficking in primary trophoblasts cells. *Dev. Biol.*, 245(2), 270–9, 2002.
23. Chamoux E., Nancy A., Lehoux J. G., Gallo-Payet N., Fibronectin, laminin, and collagen IV as modulators of cell behavior during adrenal gland development in the human fetus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 87(4), 1819–28, 2002.
24. Jiang S. T., Chuang W. J., Tang M. J., Role of fibronectin deposition in branching morphogenesis of Madin-Darby canine kidney cells. *Kidney International*, 57(5), 1860–7, 2000.
25. Yung S., Liu Z. H., Lai K. N., Li L. S., Chan T. M., Emodin ameliorates glucose-induced morphologic abnormalities and synthesis of transforming growth factor beta1 and fibronectin by human peritoneal mesothelial cells. *Perit. Dial. Int.*, 21(3), 41–7, 2001.
26. Wang S. N., Hirschberg R., Growth factor ultrafiltration in experimental diabetic nephropathy contributes to interstitial fibrosis. *American Journal of Physiology*, 278(4), 554–60, 2000.
27. Lee Y. C., Malkerker D., Devin C. J., Thompson P. J., Johnson J. E., Lane K. B., Light R. W., Comparing transforming growth factor beta-2 and fibronectin as pleurodesing agents. *Respirology*, 6(4), 281–6, 2001.
28. Honegger A. E., Hofer E. L., Baranao R. I., Mackinaly T. A., Mackinaly D. A., Bullrsky E. O., Bordenave R. H., Chasseing N. A., Interleukin-1 beta, transforming growth factor beta 1, prostaglandin E2, and fibronectin levels in the conditioned mediums of bone marrow fibroblasts cultures from lung and breast cancer patients. *Ann. Hematol.*, 81(2), 80–5, 2002.
29. Hayama M., Inoue R., Akiba S., Sato T., Inhibition effect of cepharanthine on fibronectin productia in growth factor-stimulated rat mesangial cells. *European Journal of Pharmacology*, 390(1–2), 37–42, 2000.
30. Kaiura T. L., Itoh H., Kubaska S. M. 3rd, McCaffery T. A., Liu B., Kent K. C., The effect of growth factors cytokines, and extracellular matrix proteins on fibronectin production in human vascular smooth muscle cells. *J. Vasc. Surg.*, 31(3), 577–84, 2000.
31. Yokoi H., Mukoyama M., Sugawara A., Mori K., Nagae T., Makino H., Suganami T., Yahata K., Fujinaga Y., Tanaka I., Nakao K., Role of connective tissue growth factor in fibronectin expression and tubulointerstitial fibrosis. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 282(5), F933–42, 2002.
32. Twigg S. M., Joly A. H., Chen M. M., Tsubaki J., Kim H. S., Hwa V., Oh Y., Rosenfeld R. G., Connective tissue growth factor/IGF-binding protein-related proein-2 is a mediator in the induction of fibronectin by advanced glycosylation end-products in human dermal fibroblasts. *Endocrinology*, 143(4), 1260–9, 2002.
33. Pagan I., Khosla J., Li C. M., Sannes P. L., Effect of growth factor-fibronectin matrix interaction on rat type II cell adhesion and DNA synthesis. *Exp. Lung. Res.*, 28(2), 69–84, 2002.
34. Kitamura N., Nishinarita S., Takizawa T., Tomita Y., Horis T., Cultured human monocytes secrete fibronectin response to activation by proinflammatory cytokines. *Clinical and Experimental Immunology*, 120(1), 66–70, 2000.
35. Tellier M. C., Greco G., Klotman M., Mosoian A., Cars A., Arap W., Ruoslahti E., Pasqualini R., Schnapp L. M., Superfibronectin, a multimeric form of fibronectin, increases HIV infection of primary CD4+T lymphocytes. *Journal of Immunology*, 164(6), 3236–45, 2000.
36. Leblond V., Legendre C., Gras G., Derenddre-Bosquet N., Lafuma C., Dormont D., Quantitative study of beta1-integrin expresia and fibronectin interaction profile of T Lymphocytes in vitro infected with HIV. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 16(5), 429–33, 2000.
37. Menzies B. E., Kourteva Y., Kaiser A. B., Kernodle D. S., Inhibition of staphylococcal wound infection and potentiation of antibiotic prophylaxis by recombinant fragment of the fibronectin-binding protein of *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.*, 185(7), 937–43, 2002.
38. Wolz C., Pohlmann-Dietze P., Steinhuber A., Chien Y. P., Manna A., van Wamel W., Cheung A., Agr-independent regulation of fibronectin-binding protein(5) by the regulatory locus sar in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 36(1), 230–43, 2000.

39. Cue D., Southeru S. O., Southeru P. J., Prabhkar J., Lorelli W., Swallheer J. M., Mousa S. A., Cleary P. P., A monoepitope integrin antagonist can inhibit epithelial cell ingestion of *Streptococcus pyogenes* by blocking formation of integrin $\alpha 5\beta 1$ -fibronectin-M1 protein complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(6), 2858–63, 2000.
40. Chia J. S., Yeh C. Y., Chen J. Y., Identification of a fibronectin binding protein from streptococcus mutans. *Infection and immunity*, 68(4), 1864–70, 2000.
41. Chaussee M. S., Cole R. L., van Putten J. P., Streptococcal erythrogenic toxin B abrogates fibronectin-dependent internalization of streptococcus pyogenes by cultured mammalian cells. *Infection and Immunity*, 68(6), 3226–32, 2000.
42. Courtney H. S., Dale J. B., Hasty D. L., Mapping the fibrinogen-binding domain of serum opacity factor of group a streptococci. *Curr. Microbiol.*, 44(4), 236–40, 2002.
43. Zhao W., Schorey J. S., Bong-Mastek M., Ritchey J., Brown E. J., Ratliff T. L., Role of a bacillus Calmette-Guerin fibronectin attachment protein in BCG-induced antitumor activity. *International Journal of Cancer*, 86(1), 83–8, 2000.
44. Naito M., Fukuda T., Sekiguchi K., Yamada T., The domains of human fibronectin mediating the binding of alpha antigen, the most immunopotent antigen of mycobacteria that induces protective immunity against mycobacteria that induces protective immunity against mycobacterial infection. *Biochemical Journal*, 347(3), 725–31, 2000.
45. Nishibe T., Okuda Y., Kumada T., Tanabe T., Yasuda K., Enhanced graft healing of high-porosity expanded polytetrafluoroethylene grafts by covalent bonding of fibronectin. *Surgey Today*, 30(5), 426–31, 2000.
46. Jacobs Timothy W., Schnitt Stuart J., Tan Xiaolian, Brown Lawrence F., Radial scars of the breast and breast carcinomas have similar alterations in expression of factors involved in vascular stroma formation. *Human Pathology*, 33(1), 29–38, 2002.
47. Korhonen M., Ormio M., Burgeson R. E., Virtanen I., Savilahti E., Unaltered distribution of laminins, fibronectin, and tenascin in celiac intestinal mucosa. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 48(7), 1011–20, 2000.
48. Schedin P., Strange R., Mitrenga T., Wolfe P., Kaeck M., Fibronectin fragments induce MMP activity in mouse mammary epithelial cells: evidence for a role in mammary tissue remodeling. *Journal of Cell Science*, 113(5), 795–806, 2000.
49. Nezi L., Greco D., Nitsch L., Garbi C., The role of proteases in fibronectin matrix remodeling in thyroid epithelial cell monolayer cultures. *Biol. Chem.*, 383(1), 167–76, 2002.
50. Stanton H., Ung L., Fosang A. J., The 45 kDa collagen – binding fragment of fibronectin induces matrix metalloproteinase-13 synthesis by chondrocytes and aggrecan degradation by aggrecanases. *Biochem. J.*, 364(1), 181–90, 2002.
51. Homandberg G. A., Kang Y., Zhang J., Cole A. A., Williams J. M., A single injection of fibronectin fragments into rabbit knee joints enhances catabolism in the articular cartilage followed by reparative responses but also induces systemic effects in the non-injected knee joints. *Osteoarthritis Cartilage*, 9(8), 673–83, 2001.
52. Kwon S. Y., Takei H., Piolletti D. P., Lin T., Ma Q. J., Akeson W. H., Wood D. J., Sung K. L., Titanium particles inhibit osteoblast adhesion to fibronectin-coated substrates. *Journal of Orthopedic Research*, 18(2), 203–11, 2000.
53. Grill V., Sandrucci M. A., Di Lenarda R., Dorigo E., Narducci P., Martelli A. M., Bareggi R., Cell proliferation rates and fibronectin arrangement as parameters for biocompatibility evolution of dental metal alloys in vitro. *Journal of Oral Science*, 42(1), 1–7, 2000.
54. Orem C., Celik S., Orem A., Calapoglu M., Erdol C., Increased plasma fibronectin levels in patients with acute myocardial infarction complicated with left ventricular thrombus. *Thromb. Res*, 105(1), 37–41, 2002.
55. De Panfilis G., Ghidini A., Graifenberghi S., Barlati S., Zoppi N., Colombi M., Dexamethasone-induced healing of chronic leg ulcers in patient with defective organization of the extracellular matrix of fibronectin. *British Journal of Dermatology*, 142(1), 166–70, 2000.
56. Albrecht M., Janssen M., Konrad L., Renneberg H., Aumuller G., Effects of dexamethasone on proliferation of and fibronectin synthesis by human primary prostatic stromal cells in vitro. *Andrologia*, 34(1), 11–21, 2002.
57. Tsai W. B., Grunkemeier J. M., McFarland C. D., Horbett T. A., Platelet adhesion to polystyrene-based surfaces preadsorbed with plasmas selectively depleted in fibrinogen, fibronectin, vitronectin, or von Willebrand's factor. *J. Biomed. Mater. Res.*, 60(3), 348–59, 2002.
58. Chassagne C., Adamy C., Ratajczak P., Gingras B., Teiger E., Planus E., Oliviero P., Rappaport L., Samuel J. L., Meloche S., Angiotensin II AT(2) receptor inhibits smooth muscle cell migration via fibronectin cell production and binding. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 282(4), C654–64, 2002.
59. Hu W. Y., Fukuda H., Satoh C., Jian T., Kuba A., Nakayama M., Kishioka H., Kanmatsuse K., Phenotypic modulation by fibronectin enhances the angiotensin II-generating system in cultured vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 20(6), 1500–5, 2000.
60. Kawano H., Do Y. S., Kawano Y., Sternes V., Barr M., Law R. E., Hsueh W. A., Angiotensin II has multiple profibrotic effects in human cardiac fibroblasts. *Circulation*, 101(10), 1136–7, 2000.
61. Castellani P., Dorcaratto A., Pan A., Nicola M., Sosi A., Gasparetto B., Zardi L., Viall G., The angiogenesis marker ED-B+ fibronectin isoform in intracranial meningiomas. *Acta Neurochirurgica*, 142(3), 277–82, 2000.
62. Olivo C., Vauni C., Mancini P., Silengo L., Torrasi, M. R., Tarone G., Defilippi P., Eva A., Distinct involvement of cdc42 and Rho A GTP-ases in actin organization and cell shape in untransformed and Db1 oncogene transformed MH3T3 cells. *Oncogene*, 19(11), 1428–36, 2000.
63. Esteban-Barragan Miguel A., Avila Pilar, Alvarez-Tejado Miguel, Gutierrez M. Dolores, Garcia-Pardo Angeles, Sanchez-Madrid Francisco, Landazuri Manuel O., Role of the von Hippel-Lindau: tumor suppressor gene in the formation of beta1-integrin fibrillar adhesions. *Cancer Research*, 62(10), 2929–2936, 2002.

64. Arici A., Sozen I., Transforming growth factor-beta3 is expressed at high levels in leiomyoma where it stimulates fibronectin expression and cell proliferation. *Fertility and Sterility*, 73(5), 1008–11, 2000.
65. Armstrong P. B., Armstrong M. T., Intercellular invasion and the organizational stability of tissues: a role for fibronectin. *Biochemica and Biophysica Acta*, 1470(2), 9–29, 2000.
66. Fukai F., Kamiya S., Ohwaki T., Goto S., Akiyama K., Goto T., Katayama T., The fibronectin-derived anti-adhesive peptide III14–2 suppresses adhesion and apoptosis of leukemic cell lines through down-regulation of protein tyrosine phosphorylation. *Cellular and Molecular Biology*, 46(1), 145–52, 2000.
67. Wang Helen Y., Zhou Juhua, Zhu Kuichun, Riker Adam I., Marincola Francesco M., Wang Rong-Fu, Identification of mutated fibronectin as a tumor antigen recognized by CD4+ T cells: its role in extracellular matrix. *Journal of Experimental Medicine*, 195(11), 1397–1406, 2002.
68. Ho H., Miyazaki M., Nishimura F., Nakajima N., Secretion of extracellular matrix (fibronectin), growth factor (transforming factor beta) and protease (cathepsin D) by hepatoma cells. *Oncology*, 58(3), 261–70, 2000.
69. Qiao H., Saulnier R., Patryzkat A., Rahimi N., Raptis L., Rossiter J., Tremblay E., Elliott B., Cooperative effect of hepatocyte growth factor and fibronectin in anchorage-independent-survival of mammary carcinoma cells: requirement for phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Cell Growth and Differentiation*, 11(2), 123–33, 2000.
70. Ayaki M., Mukai M., Yamamura F., Iwasaki T., Mammoto T., Schinkai K., Nakamura H., Akedo H., Cooperation of fibronectin with lysophosphatidic acid induces motility and transcellular migration of rat ascites hepatoma cells. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1495(1), 40–50, 2000.
71. Stroeken P. J., van Rijthoven E. A., Boer E., Geerta D., Ross E., Cytoplasmic domain mutants of beta1 integrin, expressed in beta1-knockout lymphoma cells, have distinct effects on adhesion, invasion and metastasis. *Oncogene*, 19(9), 1232–8, 2000.
72. Su Zi-Fen, Liu Guozheng, Gupta Suresh, Zhu Zhiohng, Rusckowski Mary, Hnatowich Donald, In vitro and in vivo evaluation of a technetium-99m-labeled cyclic RGD peptide as a specific marker of alpha5beta3. *Bioconjugate Chemistry*, 13(3), 561–570, 2002.
73. Zhang G. J., Crist S. A., McKerrow A. K., Xu Y., Ladehoff D. C., See W. A., Autocrine IL-6 production by human transitional carcinoma cells upregulates expression of the alpha5beta1 fibronectin receptor. *Journal of Urology*, 163(5), 1553–9, 2000.
74. Brenner W., Gross S., Steinbach F., Horn S., Hohenfellner R., Thuroff J. M., Differential inhibition of renal cancer cell invasion mediated by fibronectin, collagen IV and laminin. *Cancer Letters*, 155(2), 199–205, 2000.
75. de la Fuente M. T., Casanova B., Moyano J. V., Garcia-Gila M., Sanz L., Garcia-Marco J., Silva A., Garcia-Pardo A., Engagement of alpha4beta1 integrin by fibronectin induces in vitro resistance of B chronic lymphocytic leukemia cells to fludarabine. *J. Leukoc. Biol.*, 71(3), 495–502, 2002.
76. Cordes N., Blaese M. A., Meineke V., Van Beuningen D., Ionizing radiation induces up-regulation of functional beta1-integrin in human lung tumor cell lines in vitro. *International Journal of Radiation Biology*, 78(5), 347–357, 2002.
77. Schiffenbauer Yael S., Meir Gila, Maoz Miriam, Even-Ram Sharona Cohen, Bar-Shavit Rachel, Neeman Michal., Gonadotropin stimulation of MLS human epithelial ovarian carcinoma cells augments cell adhesion mediated by CD44 and by alpha5-integrin. *Gynecologic Oncology*, 84(2), 296–302, 2002.

TROMBOSPONDIN-1 (TSP-1)

Trombospondin-1 este o glicoproteină eliberată din granulele plachetare alfa ca răspuns la stimularea cu trombină; este o componentă tranzitorie a matricei extracelulare implicată în dezvoltarea și repararea țesuturilor. Este un homotrimer de 420kD, fiecare subunitate constând din multiple domenii structurale. Expresia proteinei este reglată de o varietate de factori și poate fi degradată pe căi intra- și extracelulare. TSP-1 funcționează ca o moleculă de adeziune celulară și, de asemenea, modulează mișcarea, proliferarea celulelor, creșterea axonilor și angiogeneza (1).

Trombospondin-1, proteină multifuncțională cu roluri importante în reglarea funcțiilor celulelor vasculare are numeroase domenii exprimate în multiple tipuri celulare. Mutațiile sau pierderea genelor supresoare de tumori duc la subreglarea expresiei TSP-1 contribuind la dezvoltarea fenotipului angiogenic tumoral și, probabil, la metastazare. TSP-1 este un inhibitor natural al angiogenezei. Peptidele din domeniul procolagen-like și ripurile tip-1 ale TSP-1, asemenea întregii proteine, inhibă răspunsul angiogenic in vivo la o varietate de stimuli angiogenici, și migrarea celulelor endoteliale in vitro – prin acțiunea directă pe acestea. Expresia lui este subreglată în celulele endoteliale din creierul de șoarece transformate de AgTM Polyoma (2).

TSP-1 în țesuturile normale

TSP-1 a fost clonată din odontoblastele mandibulei de la bovine, unde participă la dentinogeneză. cDNA de 5289pb conține un ORF care codifică proteina de 1170 resturi de aminoacizi. TSP-1 de la bovine are înalte omologii cu partenerul de la șoarece și cu cel uman. Este detectabil în poziția predentinei localizată între dentină și pulpa dentară nemineralizată. În odontoblaste, dar nu în pulpa dentară sau în gingii, există nivele înalte de mRNA TSP-1.

Factorii osteotropici precum calcitriolul și TGF-beta induc TSP-1 la nivelul transcrierii în celulele clonale ale pulpei dentare de șobolan. Se sugerează că TSP-1 are un rol deosebit în dentinogeneză și/sau în menținerea dentinei și a pulpei dentare (3).

În piele, TSP-1 este localizat pe membrana bazală, expresia sa crescând în embriogeneza și în timpul vindecării rănilor. Sursele primare pentru tegument ar fi macrofagele și keratinocitele.

La diferite vârste, tegumentul șoarecilor prezintă mRNA TSP-1 în celulele mezenchimale dermale și în fibroblastele mature, fiind reglat în timpul creșterii postnatale a tegumentului. Se sugerează că reglarea transcrierii TSP-1 în celulele mezenchimale poate juca un rol important în dezvoltarea postnatală a tegumentului. Expresia mRNA este o caracteristică a celulelor papilei dermice a firului de păr, cu rol potențial în dezvoltarea acestuia (4).

S-a demonstrat că limfocitele-T exprimă TSP-1. Linia limfocitară-T cu TSP are un turnover înalt, fapt ilustrat de creșterea rapidă a brefeldinului și monensimului, în timp ce ciclohexamida tinde să scadă. TSP-1-T este înmagazinat preferențial intracelular și arată expresie de suprafață variabilă. Adeziunea celulelor T la fibronectină și colagen tip IV induce expresia TSP-1 pe suprafața celulelor via unui mecanism sensibil la brefeldin.

Un anticorp monoclonal anti-TSP-1 inhibă turtirea celulelor T aderente și formarea de pseudopode și, de asemenea, are efect inhibitor asupra migrării celulelor T în absența TSP-1 exogen. Deci, TSP-1 endogen este parte a unui mecanism dependent de adezivitatea ce controlează diseminarea citoplasmatică a acestuia și migrarea lui în limfocitele T (5).

Interacțiunea celulă-celulă și celulă-matrice, joacă roluri reglatoare importante în homeostazia limfocitelor. TSP-1 promovează diferențiat adezivitatea acestor celule astfel că, adezivitatea limfocitelor T Jurkat la substratul acoperit cu TSP-1 sau cu peptide derivate din acesta, este mediată de integrinele beta1, CD47 și de proteoglican heparan sulfat. TSP-1 sau peptidele sale stimulează activitatea Ras indusă de CD3 și de tirozin fosforilarea câtorva proteine din celulele T.

Semnalele din TSP-1 și peptidele derivate, sinergizează diferențiat cu activitatea TCR pentru a induce fosforilarea linkerului în vederea activării T(LAT) și kinazei care reglează semnalul extracelular (ERK)1/2, c-jun N-terminal kinază și kinazele p38.

Fosforilarea ERK în prezența TSP-1 de lungime deplină este tranzitorie și dependentă de receptorul-integrinei beta-1. Peptidele derivate din repiturile tip-1 ale TSP-1 stimulează, de asemenea, fosforilarea MAP-kinazei. Deoarece TSP-1 activează și AP1, aceasta poate fi inhibată de inhibitorul PD 98059 heparin și kinaza MAP/ERK, oferind o legătură între interacțiunea moleculei de adeziune și evenimentele de transactivare din nucleu via căilor MAP-kinazei. Aceste aspecte au implicații în rolul fragmentelor extracelulare de TSP-1 și implicații ale TSP-1 în reglarea funcțiilor limfocitelor T în timpul homeostaziei, reparării rănilor și altor răspunsuri inflamatorii (6).

TSP formează o familie de proteine extracelulare ce cuplează calciul și care modulează fenotipul celular. El reglează atașarea, proliferarea, migrarea și diferențierea in vitro a celulelor. Pentru a i se stabili funcțiile in vivo s-a perturbat în genomul șoarecelui, gena TSP-1 prin recombinare omologă.

Plachetele acestor animale sunt complet lipsite de TSP-1 și totuși agregarea lor indusă de trombină nu este diminuată. Șoarecii prezintă variate curburi ale coloanei vertebrale de tipul lordozelor și procente înalte de monocite și eozinofile circulante. Creierul, inima, rinichii, splina, stomacul, intestinul, aorta și ficatul nu arată anomalii majore. În schimb, în plămâni apar la 4 săptămâni postnatal, anomalii de tipul pneumoniei acute extinse, cu neutrofile și macrofage și hemoragie alveolară difuză. Mai târziu, numărul neutrofilelor scade dar crește acut numărul macrofagelor cu hemosiderină, proces asociat cu hiperplazia epitelială. Epiteliul căilor aeriene se îngroașă prin depozitarea colagenului și elastinei. În concluzie TSP-1 este implicat în homeostazia pulmonară normală (7).

Cuplat la fibronectină sau heparină, TSP-1 suferă modificări funcționale. Cuplarea are loc în două trepte care induc schimbări ce permit conectarea la locul secund. În complex cu fibronectina sau heparina TSP-1 adoptă conformația care conține sau nu calciu. Asemenea complexe sunt înalt rezistente la clivajul cu tPA (activator al plasminogenului tisular), iar dacă sunt clivate de alte enzime, fragmentele de TSP-1 rămân cuplate la celelalte componente ale matricei extracelulare. Aceste caracteristici au profundă semnificație pentru adezivitatea plachetelor și pentru migrarea celulelor în rănile în care concentrația calciului este redusă (8).

În diferențierea neurotipică indusă de EGF în celulele TC-1S derivate din stroma timică, celule care conțin printre numeroase gene cunoscute, și gena trombospondin-1 ca mediator al diferențierii neurotipice, EGF crește nivelele mRNA și TSP-1. TSP-1 exogen poate amplifica în aceste celule creșterea prelungirilor neurit-like ca și expresia neurofilamentelor și moleculelor de adeziune neurală. Se sugerează că suprareglarea sintezei TSP-1 indusă de EGF contribuie la diferențierea celulelor epiteliale timice către soarta neurală, reminiscență a originii lor în creasta neurală (9).

Așa cum s-a menționat, TSP-1 este important în adezivitatea și agregarea plachetelor în inflamații, interacțiunea celulă-celulă, angiogenza și în proliferarea celulelor musculare netede. Expresia lui crește rapid odată cu injuria celulei. Se crede că joacă un rol și în dezvoltarea hiperplaziei întimei aortei de iepure. In vitro, anticorpi anti-TSP-1 inhibă proliferarea celulelor musculare netede indusă de PDGF și colesterol. Hiperplazia este însă mai marcată în probele de la iepurii hipercolesterolemici care au suferit angioplastie, unde TSP-1 este semnificativ mai ridicat decât la cei cu dieta regulată și care nu au suferit angioplastie. În concluzie, se confirmă ipoteza că TSP-1 contribuie la apariția hiperplaziei întimei sugerând că arterele agresate de hipercolesterolemie supraexprimă TSP-1 (10).

În cultură, celulele tiroidiene au capacitatea de a organiza foliculi în structura tridimensională specifică tiroidei, ca răspund la TSP-1. Hormonul stimulator al tiroidei (TSH) promovează formarea foliculilor și inhibă producția de TSP-1. Dimpotrivă, ester forbol (12-O-tetradecanoil forbol 13 acetat) și TGF previn formarea foliculilor indusă de TSP-1, crescând puțin sinteza acestuia. Se sugerează că,

controlul formării foliculilor tiroidieni poate opera, cel puțin în parte, prin reglarea producției de TSP-1 care acționează ca un modulator al proteinelor de adeziune intercelulară, fiind astfel implicat în morfogeneza foliculilor tiroidieni (11).

Muskelin este o proteină identificată la periferia a numeroase tipuri celulare. În celulele aderente C2 C17, supraexpresia acestei proteine promovează atașarea celulelor la domeniul C-terminal al TSP-1, alterează mecanismul atașării la TSP-1 intact și se corelează cu formarea redusă a microspiculilor de fascin și cu creșterea indusă de celulele aderente la TSP-1 a contactelor ansamblelor focale. Atașarea și diseminarea celulelor, ca și organizarea citoscheletului sunt reduse specific în celulele care aderă la TSP-1 după depleția antisens a muskelin (12).

“Receptorul” CSVTCG TSP-1 și receptorul CD36

TSP-1 este elaborat de celulele endoteliale, fibroblaste și macrofage. Domeniul său unic de cuplare CSVTCG (cisteină-serină-valină-threonină-cisteină-glicină) joacă un rol important în cuplarea celulelor și în modularea proceselor celulare. În rănile de pe pielea fetală s-a urmărit evaluarea histologică și cantitativă a TSP-1 și a gamma receptorului său CSVTCG. Animalele gestante au suferit laparotomie și histerectomie. La a 65-a zi de gestație (nașterea are loc în a 145-a zi) s-au practicat incizii pe pielea spatelui fetal și rănile au fost excizate la 1, 3, 7, 21 și 28 de zile, iar uterul și laparotomia au fost închise. TSP-1 arată un vârf timpuriu în timpul reparării pielii fetale, urmat de o scădere treptată. Receptorul CSVTCG arată, de asemenea, o scădere înceată în expresia sa în timpul reparării fetale. Între probele incizionale și excizionale nu apar diferențe semnificative, în timp ce diferențe temporare și histologice există în localizarea și expresia TSP-1 și receptorului său în timpul reparării rănilor fetale. În țesut, TSP-1 apare suprareglat timpuriu, ceea ce corespunde cu rolul său în interacțiunea celulă-celulă și în potențarea activității factorilor de creștere. TSP-1 modulează, de asemenea, matricea în stadiile timpurii ale reparării, depozitat fiind de către plachete. Potențarea activității proteazei asociată celulei, de către TSP-1 suportă turnoverul tisular și matricial, activitate ce poate elimina formarea cicatricei, facilitând mitozele și migrația celulelor, ca și aderența TSP-1 la membranele acestora. Expresia receptorului CSVTCG scade în timpul reparării fetale pe măsură ce celulele migrează către suprafața epitelială, sugerând un rol semnificativ al acestuia în maturarea, diferențierea și epitelizarea keratinocitelor (13).

Factorii de creștere au un rol crucial în reglarea proliferării celulare și degradării matricei în procesul vindecării rănilor și în cancer. TSP-1 și receptorul său specific (CSVTCG) joacă un rol cheie în invazia celulară și în degradarea matricei în diferite carcinoame. În vindecarea rănilor, se exprimă foarte timpuriu în stromă, după care declină. Receptorul lui TSP-1 este localizat pe noile vase și pe celule înalt proliferante (fibroblaste, celule bazale) nivelele sale rămânând relativ constante. Celulele canceroase și microvasele asociate tumorii exprimă TSP-1R, în timp ce TSP-1 este localizat predominant în stroma asociată tumorii. În urma determinărilor efectuate pe răni fetale, pe arsuri la adult și pe diferite malignități umane, s-a sugerat că TSP-1 și receptorul său dețin un rol critic în vindecarea rănilor și în cancer și, de asemenea, că intervin important în progresia cancerului mamar. De aceea poate fi considerat un antigen de semnalizare a bolii canceroase (14, 15).

TSP-1 poate potența progresia tumorilor mamare la șoareci, metastazele acestora fiind stimulate de el și inhibitate de anticorpii anti-TSP-1. De asemenea, el induce adeziunea, migrarea și invazia celulelor tumorale, dar și angiogeneza într-un model al aortei de șoarece. Suprareglează sistemul activator al plasminogenului, printr-un mecanism care implică activarea TGF beta-1.

Tumorile umane exprimă nivele crescute de TSP-1 și receptorul său specific CSVTCG, stroma tumorală fiind foarte bogată în TSP-1. Pacienții cu cancer prezintă înalte nivele de TSP-1 și slaba lor supraviețuire se corelează tocmai cu expresia înaltă pe celulele tumorale a acestuia, ca și a receptorului său. De aici concluzia că, TSP-1 promovează progresia tumorală (16).

Celulele MDA-MB-231 de carcinom mamar exprimă nivele crescute de un nou receptor TSP (TSP-1R) care aderă in vitro la TSP-1. Numai 10% din celulele de control sunt inhibitate de anticorpii anti-TSP-1R, care inhibă și in vivo progresia acestui tip de cancer. Șoarecii tratați cu anticorpii IgG sau

cu soluție salină relevă diseminarea intraperitoneală a tumorii. Se sugerează astfel că TSP-1 și receptorul său joacă un rol important în progresia cancerului mamar (17).

Folosirea unei serii de proteine de fuziune care leagă aproape toate moleculele de TSP-1 a demonstrat că celulele ovariene K1 de hamster chinezesc (CHO) se atașează puternic la N-terminal al TSP-1 și nu la domeniul C-terminal sau la ripiturile 1, 2 și 3. Pe de altă parte, atașarea la N-terminal a celulelor CHO5745 defective în glicozaminoglicani (GAG) de la suprafața lor, scade cu 47% în comparație cu celulele CHO K1, indicând prezența locurilor de adeziune celulară dependente de GAG. Proteina sintetizată cu reziduurile 79–84 (MKKTRG) suportă atașarea celulelor CHO când sunt îndepărtate secvențele KKTR care cuplează heparina, apărând mutanta cu QNTR și constatându-se o scădere cu 36% a atașării celulelor CHOK1 la N-terminal al TSP-1. Prin urmare, adezivitatea celulelor la acest terminus este dependentă de GAG și de anumite reziduuri ale N-terminal TSP-1 (18).

Saliva de la om și primat neuman întârzie infectivitatea cu HIV-1 *in vitro* și *in vivo*. Deoarece trombospondin-1 (TSP-1)-glicoproteina trimerică cu înaltă greutate moleculară – este concentrat în salivă, și poate inhiba infectivitatea diversilor patogeni *in vitro*, urmărindu-se astfel supresia infecției cu HIV-1.

TSP-1 radiomarcant recombinat cu secvențele ripit tip-1 CSVTCG, cunoscute ca locuri de cuplare la receptorul TSP-1 CD36, cuplează direct gp120. TSP-1 și proteinele de fuziune ce au domeniul de cuplare la CD36 pot competiționa cu cuplarea lui CD4 solubil radiomarcant pentru a imobiliza gp120. În paralel, TSP-1 purificat inhibă infecția cu HIV-1 a mononuclearelor din sângele periferic, a liniilor de promielocite și a celulelor T transformate.

Nivelele de TSP-1 reclamate pentru agregarea virală și blocarea directă a infecției cu HIV-1 sunt fiziologice, iar afinitatea depleției TSP-1 salivar abrogă peste 70% din efectul inhibitor al salivei asupra infectării cu HIV-1. Specificitatea caracteristică de cuplare TSP-1-gp 120 sugerează un mecanism de blocare directă a infecției HIV-1, care ar putea fi exploatat pentru întârzierea transmiterii HIV, via mucoaselor (19).

Vascularizația mucoaselor este determinată de echilibrul dintre variația factorilor angiogenici și angio-inhibitori din stroma tumorilor canceroase. Receptorul trombospondin-1-CD36 este structura de adeziune celulară care interacționează cu ligandul TSP-1. Urmărindu-se corelația dintre expresia TSP-1, CD36, vascularizația și progresia a 65 cancere de colon, s-a constatat că la 27 din cazuri există diferite nivele ale expresiei genei TSP-1. Expresia CD36 s-a detectat în 33 cazuri fiind semnificativ corelată cu scăderea vascularizării stromei. Astfel, cancerele de colon care exprimă CD36 au un prognostic mai bun. Nivelele expresiei TSP-1 nu afectează expresia CD36. Se sugerează că expresia CD36 care scade vascularizația stromei este corelată cu progresia mai înceată a acestui tip de cancer (20).

TSP-1 amplifică eliberarea IL-6 din monocitele umane U937 stimulate cu forbol miristat acetat și LPS, inhibă eliberarea IL-10, iar fragmentele de 70kD de TSP-1 care conțin ripituri de tip-1 au același efect reglator. Eliberarea completă a IL-6 de către TSP-1 este inhibată de anticorpi anti-CD36 sau de anticorpi anti-secvența locului de cuplare la CD36 a ripiturilor TSP-1 tip 1.

Implicarea TGF-beta1 în eliberarea IL-10 de către TSP-1 este susținută de faptul că TSP-1 induce activitatea TGF-beta1 produs de celulele U937. Adăugat, TGF-beta 1 exogen inhibă eliberarea IL-10, iar anticorpii anti-TGF-beta 1 blochează inhibarea acestuia de către TSP-1. Se sugerează că TSP-1 amplifică eliberarea IL-6 din macrofage prin interacțiunea cu CD 36, în timp ce eliberarea IL-10 este reglată de echilibrul dintre efectul amplificator al TSP-1 via CD 36 și efectul supresor al TGF-beta 1 activat de TSP-1 (21). Deci, ceea ce numesc unii cercetători receptor CSVTCG este de fapt numai un domeniu de cuplare a moleculei TSP-1, adevăratul receptor al TSP fiind CD 36.

TSP-2

Trombospondin-2 (TSP-2) și trombospondin-1 (TSP-1) sunt proteine matriciale multifuncționale codificate de gene separate. TSP-1 se detectează în inima și epitelul intestinal al embrionilor de șoarece de 10 zile (E10), în megacariocite în E11 și în plămâni în E14.

În mezenchim, în cartilaje și oase, TSP-2 nu se detectează înainte de ziua a 14-a. Distribuția sa este diferită, dar se și suprapune cu TSP-1. În cartilaj TSP-1 este în cantități reduse în matricea din jurul condrocitelor zonei de creștere, în jurul condrocitelor care suferă diferențierea și hipertrofierea, pe când TSP-2 este absent. Cele două proteine se exprimă însă, în centrele de osificare de membrană ale oaselor craniului, în dermul profund, pe suprafața apicală a epiteliului nazal, și în mușchii scheletici. Ariile colorate exclusiv de TSP-2 includ pericondrul cartilajelor nazale, mandibulei în formare și glanda adrenală. Localizarea distinctă a proteinelor TSP-1 și TSP-2 indică faptul că au funcții specifice în timpul vieții embrionare la șoareci (22).

TSP-2 este ca și TSP-1 o glicoproteină matricială care are rol în angiogeneza primară. S-a urmărit efectul biologic al expresiei TSP-2 asupra creșterii tumorale și angiogenezei în celulele carcinomului scvamos uman A431 care nu exprimă TSP-2. Acestea au fost stabil transfectate cu un vector care exprimă TSP-2 murin sau numai cu vectorul. Celulele care exprimă TSP-2 nu au rată de creștere alterată, formarea de colonii stabile și nici susceptibilitatea de a induce apoptoză in vitro. Totuși injectarea clonelor TSP-2 transfectate în dermul șoarecilor nuzi duce la inhibarea marcată a creșterii tumorii care este semnificativ mai puternică decât cea a clonelor A431 stabil transfectate cu un vector care exprimă TSP-1, iar supraexpresia combinată a TSP-1 și TSP-2 previne complet formarea tumorii. În tumorile care exprimă TSP-2 se constată arii extinse de necroză, iar densitatea și dimensiunile vaselor tumorale este semnificativ redusă, deși celulele tumorale care exprimă factorul tumoral angiogenic major (VEGF) s-au menținut la nivele înalte. De aici concluzia că, TSP-2 este un inhibitor endogen potent al creșterii tumorale și angiogenezei (23).

Vascularizația stromei tumorale este un factor major implicat în progresia carcinoamelor; proces care ar putea fi reglat de diferite citokine produse de celulele neoplazice sau de celulele stromale. TSP-1 are rol inhibitor al vascularizației in vitro.

Expresia TSP-2 este semnificativ scăzută în NSCLC (non-small cell lung cancer) comparativ cu țesutul pulmonar extraneoplazic. Vascularizația celulelor carcinoatoase se corelează invers cu expresia genei TSP-2. Pacienții cu adenocarcinom care exprimă TSP-2 arată o evoluție mai bună, decât cei la care TSP-2 nu se exprimă. Se sugerează astfel că proteina inhibă vascularizația tumorii (24).

Cum menționam, cele două subtipuri de trombospondin (TSP-1 și TSP-2) au rol inhibitor în angiogeneza in vitro. Din 61 cancere de colon, 38 exprimă TSP-2, iar incidența metastazelor hepatice este semnificativ mai redusă decât la pacienții la care TSP-2 nu se exprimă. Pacienții care exprimă TSP-2 au asociate și izoforme de VEGF-189. Tumorile de colon TSP-2 (-)/VEGF189 (+) au un număr semnificativ crescut de vase, stromă densă și un prognostic mai sumbru decât cele cu TSP-2(+)/VEGF189(-). Se sugerează că metastazele acestui tip de cancer sunt determinate de angiogeneza ce rezultă din echilibrul dintre factorul angiogen-inhibitor TSP-2 și cel angiogenic VEGF-189 (25).

TSP și angiogeneza în țesuturile normale și tumorale

Inhibiția angiogenezei de către TSP-1 este mediată de două regiuni independente din ripiturile de tip 1. Activitatea sa antiangiogenică a fost stabilită în partea amino-terminală a proteinei, în regiunea procolagen a ripiturilor de tip 1.

S-a evaluat specificitatea și eficiența diferitelor regiuni ale TSP-1 asupra angiogenezei membranei corioalantoidiene și proliferării celulelor endoteliale, folosind fragmente recombinante ale proteinei. Fragmentele cu ripiturile de tip 1 secundare și terțiare, dar nu regiunea procolagen inhibă atât angiogeneza, cât și proliferarea celulelor endoteliale. S-au definit două secvențe care supresează independent angiogeneza; capătul amino-terminal al ripiturilor tip 1 arată potență mai înaltă de inhibare a angiogenezei condusă de FGF-2, în timp ce regiunea secundă blochează în mod egal angiogeneza condusă atât de FGF-2 cât și de VEGF.

Inhibarea creșterii xenogrefelor de tumori mamare la șoarecii nuzi este independentă de secvența care activează TGF-beta localizată în ripitul secund tip 1. Se concludă că ripiturile tip 1 ale TSP-1 conțin două subdomenii care pot inhiba independent neovascularizația. S-au identificat și două

căi independente prin care TSP-1 poate bloca semnalele angiogenice ale FGF-2 și VEGF pe celulele endoteliale (26).

Celulele epiteliale ale prostatei secretă numeroase molecule care reglează angiogeneza, secreții anti-angiogenice datorate TSP-inhibitor; acesta este însă scăzut în secrețiile pro-angiogenice eliberate din celulele prostatice hiperplazice benigne ca și din cele canceroase. Activitatea pro-angiogenică depinde primar de FGF-2 și/sau de VEGF a căror secreție este crescută. Astfel, în timpul progresiei tumorii prostatice, producția TSP-1 – inhibitorul major – este sub reglată în timp ce a FGF-2 și/sau VEGF crește ducând la inducția unor noi vase necesare creșterii tumorii (27).

Menționăm că TSP-1 este o proteină a matricei extracelulare care inhibă proliferarea și migrarea celulelor endoteliale, dar și angiogeneza. S-a urmărit rolul TSP-1 în neovascularizația retinei ischemice. Astfel, într-un model murin de neovascularizare a retinei, mRNA TSP-1 crește în a 13-a zi postnatală atingând un vârf de trei ori mai mare în ziua a 15-a, ceea ce corespunde tocmai momentului neovascularizării. Expresia marcată a TSP-1 se constată în endoteliul neovascularizat în special în celulele adiacente ariei retiniene neperfuzate. Se sugerează de asemenea, că VEGF joacă un rol major în neovascularizarea retinei indusă de ischemie.

Proliferarea celulelor endoteliale induse de VEGF este complet inhibată de TSP-1 exogen, iar dacă se aplică un anticorp anti-TSP-1 proliferarea crește cu 35,5%. În retina ischemică endoteliul neovascularizat stimulează deci creșterea TSP-1, iar VEGF stimulează inducția TSP-1 endogen care inhibă creșterea celulelor endoteliale. Inducția TSP-1 mediată de VEGF în angiogeneza indusă de ischemie poate fi astfel un mecanism de feed-back negativ (28).

VEGF este un puternic mitogen angiogenic ce intervine în variate condiții fiziologice. Activitatea sa angiogenică in vivo este reglată de inhibitori extracelulari, deoarece este produs și în țesuturi avasculare precum cartilajul. Factorul de creștere a țesutului conjunctiv (CTGF) cupleză specific la VEGF165 cu două clase de locuri de cuplare. Interacțiunea aceasta inhibă cuplarea VEGF165 la celulele endoteliale și imobilizează factorul KDR/IgE care este o proteină recombinantă pentru receptorul VEGF165. Celulele endoteliale cu CTGF de lungime deplină și mutanta de deleție care conține domeniul TSP-1, inhibă semnificativ in vitro angiogeneza indusă de VEGF165 în forma complexă. Deci VEGF165 cupleză la CTGF via interacțiunii proteină-proteină sugerând că activitatea sa angiogenică este reglată negativ de CTGF din mediul extracelular (29).

Examinarea expresiei TSP-1 (inhibitor al angiogenezei) vizavi de VEGF, (factor angiogenic), în tumorile solide de prostată, a stabilit relația dintre cele două proteine și statutul p53. S-a analizat imunohistochimic expresia TSP-1, VEGF și p53 în 82 probe: 23 de hiperplazie prostatică benignă, 22 de cancer prostatic localizat și 37 cu metastaze. Șapte pacienți din cei 37 cu metastază au primit terapia deprivativă de androgeni. Gradul de creștere a tumorilor s-a evaluat imunohistochimic în urma analizei relației dintre expresia TSP-1, VEGF și p53. S-a constatat o înaltă expresie a VEGF și semnificativ mai scăzută a TSP-1 în cazul cancerului prostatei, decât în cazul hiperplaziei benigne. De asemenea, expresia TSP-1 este semnificativ mai scăzută în metastaze decât în tumora primară; de aici reiese o corelație semnificativă între statutul VEGF și p53 dar nu și în cazul expresiei TSP-1. În concluzie, factorii care intervin în neoangiogeneza, VEGF și TSP-1, sunt importanți în apariția și progresia cancerului de prostată, activitatea lor putând fi influențată de statutul lui p53 (30).

Colangiocarcinomul este relativ hipovascularizat, în contrast cu carcinomul hepatocelular care este înalt vascularizat. Piese chirurgicale de ambele tumori arată nivele de mRNA TSP-1 semnificativ mai înalte în colangiocarcinom decât carcinomul hepatocelular. Din contră ratele privind nivelele mRNA VEGF se corelează cu carcinomul hepatocelular. Creșterea relativă a TSP-1 și scăderea relativă a VEGF în tumori, comparativ cu țesuturile normale, pot sublinia angiogeneza limitată în cazul colangiocarcinomului. Gena p53 nu afectează expresia TSP-1 în colangiocarcinom și nici a VEGF în carcinomul hepatic (31).

Urmărindu-se efectele TSP-1 asupra pasajelor seriale de xenogrefe de gliom uman M-229, xenogrefe care îl supraexprimă, s-a analizat creșterea și vascularizarea acestora. Persistența supraexpresiei TSP-1 se confirmă după 3 pasaje seriale de mici tumori xenogrefate de celule stabil transfectate cu clonele C9 și C7 de cDNA-TSP-1, sau cu vectori de control (clonele A7-A9) la

șoarecii nu/nu imunodeficienți. Supraexpresia TSP-1 inhibă semnificativ creșterea tumorii, dar totuși nu previne atingerea unor dimensiuni mari ale acestora (32).

Dezvoltarea carcinomului tegumentar se crede că se corelează cu mutații în p53 și gena ras, ca și cu pierderea cromosomului 9, deși s-a demonstrat că și pierderea cromosomului 15 poate fi un defect genetic relevant. Reintroducerea unei copii a cromosomului 15 în celulele carcinomului tegumentar uman SCL-la condus după injectarea subcutană la șoareci, la supresia tumorii.

Transfecția TSP-1 cartată pe cromosomul 15q15 induce, de asemenea, supresia tumorii. Tumorile ezitante rămân ca mici chisturi încapsulate de stroma ambientă și de vase de sânge. Chisturile se caracterizează prin depozite crescute de TSP-1 matricial la granița tumoră/stromă și prin lipsa totală de vascularizare a tumorii. Coinfectarea oligonucleotidelor anti-sens TSP-1 reduce dramatic expresia acestuia și abolește aproape complet depunerea celui matricial la granița tumoră/stromă. Se sugerează că TSP-1 este un potențial supresor tumoral de pe cromosomul 15, care acționează ca o barieră matricială la granița tumoră/stromă și care, prin vascularizarea tumorală ezitantă previne invazia celulelor tumorale prevenind astfel expansiunea tumorii (33).

Analiza rolului timidin-fosforilazei și TSP-1 în angiogeneză și în progresia colangiocarcinomului intrahepatic, a demonstrat că în 26 cazuri (38,8%) enzima se exprimă pozitiv și se corelează semnificativ cu invazia vasculară, cu permeabilitatea limfaticelor, cu invazia perivasculară și cu metastazele ganglionare, iar 34 (50,7%) din cazuri se corelează cu expresia TSP-1. Statutul microvascular este semnificativ înalt în cazurile cu TSP-1 negativ. Se concludă că statutul timidin-fosforilazei și TSP-1 scăzut în colangiocarcinoame pot amplifica agresivitatea acestora (34).

Angiogeneza este un proces cheie în creșterea și metastazarea tumorilor, iar densitatea microvaselor influențează progresia carcinomului de endometru. Densitatea macrofagelor asociate tumorii și expresia VEGF ar putea stimula formarea vaselor, proces inhibat de TSP-1.

În analiza de regresie cox, expresia moderată sau marcată a VEGF este semnificativ asociată cu densitatea înaltă a microvaselor și cu numărul crescut de macrofage în tumorile agresive (35).

Extravazarea leucocitelor în sinovie este importantă în artritele reumatoide, TSP-1 mediind adezivitatea celulelor și migrarea lor, iar pe de altă parte inhibând angiogeneza. Implantat în glezna șobolanilor tratați în prealabil cu adjuvant ce induce artrite, TSP-1 amplifică severitatea bolii. Explicația ar fi, printre altele, efectul modulator al TSP-1 asupra inflamației, efect corelat cu angiogeneza prezentă în aceste afecțiuni (36).

Funcția TSP-1, inhibitorul endogen al angiogenezei, în apariția celulelor epiteliale tumorale este controversată. Supraexpresia sa inhibă creșterea in vitro a tumorilor carcinoatoase scvamoase umane A431 xenotransplantate, abolește complet formarea tumorilor SCC-13, determină arii extinse de necroză și scăderea numărului vaselor sangvine. Efectele TSP-1 asupra creșterii celulelor tumorale sunt indirecte, deoarece ratele proliferării lor in vivo și in vitro nu sunt dependente de ancoraj. Totuși, supraexpresia TSP-1 suprareglează receptorul său CD36 ducând la creșterea adeziunii celulelor A431. În concluzie se apreciază că TSP-1 este un potent inhibitor al angiogenezei și creșterii tumorilor carcinoatoase tegumentare (37).

Cunoscut ca un factor antiangiogenic, în condițiile supraexpresiei tranzitorii sau stabile a factorului de transcriere c-jun în fibroblastele de șobolan, TSP-1 este represat, proces indirect care nu reclamă cuplarea promotorului său la c-jun. În schimb, implică un factor secretat de celulele care hiperexprimă c-jun, factor care țintește o cale de transducție a semnalelor de la membrană la nucleu, semnale care duc la cuplarea produsului genei supresoare de tumori WT-1 (tumora Wilms), la regiunea - 210 a promotorului TSP-1. Această regiune cuplează WT-1 și SP-1, dar nu EGR-1. Supraexpresia WT-1 în celulele transfectate inhibă expresia genei endogene TSP-1 și transcrierea proteinei în experimentele care folosesc constructe reporter-promotor TSP-1. Izoforma WT-1-KTS este mai activă în represia transcrierii TSP-1, decât WT-1+KTS, în timp ce EGR-1 este inactivă.

Mecanismul menționat pentru supresia TSP-1 s-ar putea aplica la alte gene cărora le-ar coordona reglarea în vecinătatea unei celule care supraexprimă c-jun. Astfel, WT-1 descoperit pe baza proprietăților sale de supresor tumoral, poate deține și proprietăți oncogene în procesele transformante cu c-jun, represând, în consecință proteina antioncogenă TSP-1 (38).

Sarcomul Kaposi, un neoplasm frecvent asociat cu imunopresia iatrogenă se caracterizează prin angiogeneză marcată. Factorii angiogenici eliberați de celulele sarcomatoase, dar și de ale gazdei, ca și produsele HHV-8 și HIV sunt implicați în patogenia acestor leziuni. Angiogeneza rezultă din dezechilibrul dintre promotorii și inhibitorii ei, ceea ce perturbă homeostazia. Leziunile stromei Kaposi au reactivitate histochimică la TSP și sub 10%, în leziunile vasculare. Celulele fusiforme tipice pentru sarcomul Kaposi nu reacționează la TSP. In vitro, proteina inhibă proliferarea celulelor endoteliale și motilitatea lor indusă de supernatant. De asemenea, previne motilitatea celulelor endoteliale indusă de Tat, o proteină HIV-1 cu potențial angiogenic inclusiv în patogenia SIDA-sarcom Kaposi. In vivo, TSP inhibă activitatea angiogenică exercitată de Tat, astfel încât, subreglat el ar putea fi permisiv pentru dezvoltarea angiogenezei asociată sarcomului Kaposi. (39).

TSP-1 este, printre altele, o proteină cu activitate pro-și antiadezivă. Cuplarea la glicoconjugate sulfatate mediază cel mai mult afinitatea de cuplare a formei sale solubile la celulele MDA-MB-435 de carcinom mamar. Atașarea și diseminarea acestora pe TSP-1 imobilizează primar celulele dependent de integrina beta-1. Integrina alpha3beta1 este un mediator major al adezivității celulelor carcinomului mamar și al chemotaxisului pentru TSP-1. Integrina este parțial activă în aceste celule, dar foarte activă în cele MDA-MB-231 și MCF-7, care recalamă activarea integrinei beta-1 pentru a induce diseminarea pe TSP-1, proces însoțit de extensia filopodelor care conțin acest tip de integrină. Cuplarea integrinei alpha3beta1 pe TSP-1 nu este stimulată de peptidele care cuplează CD47 prezente în TSP-1, sau de activitatea PTK-C, care activează funcția integrinei alphavbeta3 în aceleași celule. Activitatea proadezivă a TSP-1 la celulele carcinomului mamar este astfel controlată de semnale care resping activitatea integrinei alpha3beta1 (40).

Imunoreactivitatea TSP-1 este masivă în stroma adenocarcinomului de vezică biliară și mai puțin radicală în celulele canceroase. Conform clasificării TNM, 74,5% din cancerule T2 și T3 sunt TSP-1 pozitive și nici un procent din cele tip T1. Metastazele din ganglionii limfatici și implicarea venoasă sunt, de asemenea, TSP-1 pozitive. De aici sugestia că TSP-1 joacă un rol important în creșterea celulelor tumorale și în metastazarea adenocarcinomului uman de vezică biliară. Imunoreactivitatea TSP-1 este un bun predictor al implicării vasculare și metastazării ganglionilor limfatici (41).

TSP-1 se exprimă înalt în țesuturile maligne umane, și la nivele mai înalte în plasmă, comparativ cu controlul. Induce și diseminarea hematogenă a celulelor tumorale, adezivitatea acestora și angiogeneza; de aici importanța lui în progresia tumorilor (42).

Relația TSP-1 cu p53 (genă supresoare de tumori)

Dacă activarea genei p53 este implicată în progresia și metastazarea cancerului de colon, ea poate afecta fenotipul angiogenic in vitro. Urmărindu-se corelația dintre acumularea p53 și expresia TSP-1 în probe de cancer de colon s-a constatat că nivelele expresiei genei TSP-1 sunt variabile, în timp ce acumularea p53 este detectabilă numai în 42 din 65 cazuri. Nivelele expresiei genei TSP-1 indică astfel o corelație inversă semnificativă, cu acumularea p53. De aici, ideea că alterările genei p53 pot inhiba expresia TSP-1 în cancerul de colon (43).

Plasmida BAP-p53 care codifică p53 complexată în liposomi și introdusă intravenos, atenuază marcat creșterea tumorilor mamare umane maligne. De asemenea, liposomii complexați cu plasmida care exprimă peptidul antioncogenic stabilizat TSP-1 (BAP-TSP-f) reduce la șoarecii nuzi BAP-p53 creșterea tumorilor mamare MDA-MB-435, comparativ cu controlul. În comparație cu grupul BAP-TSP-f, BAP-p53 are eficacitate antitumorală similară. Liposomii complexați cu BAP-TSP-f și BAP-p53 scad sinergic creșterea tumorilor, comparativ cu fiecare din acestea luate separat. Astfel, terapia combinată p53-BAP-TSP-f inhibă celulele endoteliale in vitro mai marcat decât o fac cele două proteine luate separat, iar densitatea vaselor de sânge scade semnificativ în tratamentul p53-TSP-1 decât la control. Se propune tratamentul cu liposomi complexați cu gena supresoare de tumori și cu genele antiangiogenice dovedindu-se eficiența lor în tratarea tumorilor metastazice (44).

Pe baza faptului că p53 mutantă (mp53) scade expresia TSP-1 și crește angiogeneza, s-au comparat probe de melanom primar și metastazic, în ideea dacă acești factori sunt asociați cu progresia metastazelor. Astfel, linia de melanom zaz exprimă p53 tip-sălbatic și nivele înalte de TSP-1, în timp ce linia M14 exprimă mp53 și nivele scăzute de TSP-1. În clinică, incidența semnificativ mai înaltă de exprimare a mp53 s-a observat în tumorile metastazante (64%), comparativ cu cele primare (27%). Probele de tumori primare au nivele mai înalte de TSP-1 și mai puține microvase decât tumorile metastazante. Se sugerează că, achiziția lui mp53 scade TSP-1 și crește infiltrarea microvaselor ceea ce se poate corela și asocia cu fenotipul malign al melanomului (45).

Factorii implicați în angiogeneză, respectiv VEGF și în antiangiogeneză, respectiv TSP-1 ar putea fi importanți în apariția și progresia cancerului de prostată, iar modificările lor pot fi influențate de p53. Identificarea acestor factori implicați în cancerul prostatic ar putea duce la descoperirea unei strategii terapeutice bazată pe antiangiogeni (46).

Inhibarea metastazei pulmonare este o problemă în terapia curentă. În această idee s-a conceput un sistem de aerosoli folosind un polimer cationic (polyethyleneimine-PEI) pentru eliberarea genei topicale în plămâni, în scopul tratării cancerului pulmonar. La șoarecii C57BL/6 transplantați cu melanom murin B16-F10, aerosolii determină eliberarea DNA PEI-p53, ceea ce duce la o reducere semnificativă a greutății tumorilor la animalele tratate, ca și la circa 50% creștere în supraviețuirea medie a șoarecilor purtători de melanom pulmonar. În țesutul pulmonar și în serul animalelor, transfecția p53 a dus la o suprareglare a TSP-1 și la subreglarea VEGF, în comparație cu cele netratate. În țesutul pulmonar și în serul animalelor cu B16-F10 tratate cu complexul PEI-DNA p53 s-a constatat subreglarea VEGF comparativ cu animalele netratate.

Colorația pentru factorul von Willebrand, un marker pentru vasele neoformate, relevă că tratamentul cu p53 duce la scăderea fenotipului angiogenic al tumorilor B16-F10. Expresia transgenei relevă că, complexe aerosolice PEI-p53 sunt transfectate în principal în celulele epiteliale care câpтуșesc căile aeriene, iar în celulele care câpтуșesc alveolele, transfecția este difuză ca și în focarele tumorale din țesutul pulmonar, focare în care s-a constatat și apoptoză la animalele tratate cu p53. Se sugerează că eliberarea complexelor PEI-p53 indusă de aerosoli duce la inhibarea metastazelor pulmonare, în parte prin supresia angiogenezei (47).

Glicoproteina matricială multifuncțională TSP interferă cu factorii de creștere, cu angiogeneza și metastazele. Expresia ei este amplificată de produsul genei p53 și subreglată când apar alterări în această genă. Totuși, s-a demonstrat o activitate reglatoare a p53 asupra VEGF uman. În neoangiogeneza carcinomului pulmonar cu celule mari, alterările p53 și expresia VEGF au implicații majore în apariția și progresia acestui tip de cancer. S-a urmărit identificarea și cuantificarea mRNA TSP-1 și TSP-2 în celulele canceroase, în ce privește alterările p53, expresia VEGF și densitatea microvasculară. 11 din 24 cazuri erau pozitive pentru expresia mRNA TSP-2 și 8 din 24 pentru expresia mRNA TSP-1. O asociere inversă semnificativă s-a găsit între mRNA TSP-1 și expresia proteinei FGF. Nu s-a observat asocierea între expresia mRNA TSP și VEGF sau neovascularizație tumorală. Din contră, tumorile cu nivele înalte de FGF arată un număr mai mare de microvase. În 19 din 24 tumori s-au detectat aberații ale genei p53, dar nu asociere între alterările acesteia și expresia mRNA TSP. În schimb, s-a găsit o semnificativă asociere între prezența mutațiilor în p53 și expresia înaltă a proteinei VEGF și neovascularizație. Tumorile înalt vascularizate arată expresia mai înaltă a proteinei VEGF. Se consideră că în acest tip de carcinom pulmonar p53 are rol important în controlul neoangiogenezei, influență mediată, probabil, de VEGF. Pe de altă parte, asocierea inversă dintre TSP-1 și FGF sugerează un rol diferit al TSP-1 și TSP-2 în schimbarea angiogenică susținând ipoteza că în special TSP-1 poate avea o funcție semnificativă în angiogeneza tumorală (48).

Promotorul genei TSP-1 poate fi transactivat de p53 tip-sălbatic. HCMV (citomegalovirusul uman) inactivează p53 tip-sălbatic din variate tipuri celulare. În conjuncție cu p53 acumulat, expresia mRNA și a proteinei TSP-1 este semnificativ redusă în cultură de fibroblaste umane infectate cu HCMV. De asemenea, celulele liniei U373M6 de astrocitom, infectate cu HCMV exprimă redus TSP-1, în timp ce expresia variantei p53 mutante rămâne neschimbată. În ambele linii celulare, expresia scăzută a mRNA TSP-1 apare imediat după infecție (4 ore) sugerând că virusul inhibă

transcrierea TSP-1 în timpul fazei imediat timpurii a infecției și înainte replicării lui. Inhibarea sintezei DNA HCMV de către ganciclovir nu influențează scăderea TSP-1, în timp ce oligonucleotidul antisens ISIS2922, complementar la mRNA HCMV imediat timpuriu, previne complet supresia TSP-1 mediată de virus. De aici, rolul acestui virus în modularea angiogenezei datorată subreglării expresiei TSP-1 independentă de p53 (49).

Neovascularizația caracterizează numeroase cancere umane, deși s-au relatat puține defecte moleculare în genele care reglează angiogeneza. Expresia scăzută a inhibitorului angiogenezei TSP-1, reglat de p53 și Rb este prezentă în unele tumori umane printre care și glioblastomul multiform. S-a demonstrat că, metilarea de novo este o potențială cale de inactivare a expresiei TSP-1 în liniile de glioblastom uman (50).

Cum s-a relatat, TSP este un inhibitor dependent de p53 în angiogeneza tumorală, inclusiv în tumorile prostatice. Expresia lui se asociază semnificativ cu densitatea microvaselor, cu expresia p53 și cu supraviețuirea. Invazia vezicii seminale reprezintă un predictor semnificativ al recurenței bolii. La pacienții cu expresia p53 alterată, recurența bolii și densitatea microvaselor au rate înalte, iar expresia TSP nu se asociază cu recurența bolii. Nu s-a găsit o asociere semnificativă între expresia TSP, statutul p53, densitatea microvaselor sau decesul pacienților după prostatectomia radicală impusă de stadiul T3 al cancerului de prostată. Se sugerează că p53 și densitatea microvasculară pot fi asociate cu decesul acestor pacienți (51).

TSP-1 și TGF-beta1

Proteoliza pericelulară este crucială în invazia celulelor tumorale. Sistemul plasminogen/plasmină este unul din principalele sisteme proteazice implicate în progresele cancerului. TSP-1 prin activarea lui TGF-beta 1 suprareglează principalul activator al plasminogenului uPA (urokinase plasminogen activator) și receptorul său (uPAR). Expresia acestuia este suprareglată de peste două ori atât de TSP-1, cât și de TGF-beta 1 în celulele carcinomului mamar MDA-MB-231. Efectul lui TSP-1 implică și receptorul său și activarea lui TGF-beta1 de către TSP-1. Invazia celulelor canceroase este suprareglată de 7-8 ori de către TSP-1 și TGF beta 1 în comparație cu controlul. Deci, TSP-1 prin activarea lui TGF-beta 1 endogen suprareglează sistemul plasminogen/plasmină și induce invazia celulelor tumorale în cancerul mamar (52).

Celulele carcinomului pancreatic ASPC-1 și COLO-375 au fost tratate cu TSP-1 sau TGF-1 în concentrații variabile. Invazia celulelor tumorale este suprareglată de 3,5 ori de către TGF-beta 1 și de 4,5 ori de către TSP-1. Efectul acestora poate fi blocat cu anticorpi anti-TSP-1 și anti TGF-beta 1, proteine care însă nu afectează producția de uPA. Pe de altă parte, anticorpi anti-uPA și anti-uPAR blochează complet invazia celulelor tumorale pancreatice mediată de cele două proteine, mediere realizată prin suprareglarea sistemului plasminogen/plasmină (53, 54).

TSP-1, proteină matricială multifuncțională, este implicată în adezivitatea, migrarea, invazia celulelor canceroase, ca și în inhibarea angiogenezei și în activarea TGF-beta latent. Implicarea ei în motilitatea celulelor de gliom malign a fost investigată prin transfecția expresiei vectorilor sens și antisens cDNA TSP-1 complementar, în linia T98G-G7 de glioblastom care secretă mari cantități de TSP-1. Producția TSP-1 în trei clone transfectate cu cDNA antisens este semnificativ redusă cu 51%, 43% și respectiv 47%, în comparație cu celulele gazdă T98G-G7. Motilitatea acestor trei clone a fost evaluată prin invazie și comparată cu motilitatea celulelor gazdă și cu două clone sens transfectate. Migrarea celulelor este semnificativ redusă în cele trei clone antisens transfectate cu producția scăzută de TSP-1 de 56%, 61% și respectiv 43% în comparație cu celulele gazdă. Celule gazdă și alte celule de glioblastom, precum A172 și YMG5 care secretă TSP-1 au fost tratate cu un peptid sintetic care include trei secvențe consecutive ale locurilor de adeziune din molecula TSP-1 și cu un peptid de control. Peptidul sintetic implică semnificativ migrația celulelor gazdă și a celor A172 în funcție de doză. Inhibarea maximă a migrației s-a obținut cu 100 microg/ml de peptid și reducerea motilității celulelor, comparativ cu celulele netratate fiind de 34,6% și respectiv 53,9%. Pe de altă parte, inhibarea

migrației de către peptid este minimă în celulele YMG5 care secretă o cantitate mai mică de TSP-1 decât celulele gazdă și cele A172. Se sugerează că TSP-1 secretat de celulele de gliom malign este implicat în motilitatea acestora (55).

TGF-beta 1 este un polipeptid secretat cu rol major în reglarea foliculogenezei și diferențierii celulelor tiroidiene. În culturi de celule foliculare tiroidiene porcine, pe substrat de plastic, TGF-beta 1 determină, în funcție de concentrație, disrupția foliculilor, diseminarea celulelor, migrarea și confluența lor printr-un mecanism care nu implică proliferarea. Proteina activează producția de TSP-1 și de TSP-1R (integrina alphavbeta3) în funcție de concentrație, dar expresia tiroglobulinei nu este afectată.

În prezența TSP-1 celulele nu se organizează în structuri asemănătoare foliculilor ci diseminarea și confluența lor apar independente de proliferare, efect suprasat de un peptid care conține RGD. Proprietatea adezivă a TSP-1 pentru celulele tiroidiene este mediată de domeniul amino-terminal care cuplează heparina, dar și de domeniul RGD al TSP-1 și implică integrina. Prin urmare, TGF-beta1 influențează funcția și comportarea celulelor foliculare, procese mediate, probabil, de sinteza TSP-1 și a receptorului său integrina alphavbeta3 (56).

TSP în relație cu alte molecule matriciale

Adenocarcinomul pancreatic uman, o boală malignă agresivă arată o puternică reacție desmoplazică caracterizată prin proliferarea intensă a țesutului conjunctiv interstițial. Expresia TSP-1 și a metaloproteinazei MMP-9 (enzima care degradează matricea extracelulară) în adenocarcinomul pancreatic și țesutul pancreatic normal a fost măsurată imunohistochimic. 85% din cazuri arată TSP-1 crescut în stroma desmoplazică adiacentă celulelor tumorale, dar nu în țesutul normal și nici în ariile inflamate. TSP-1 localizat în stroma tumorală care înconjură celulele, exprimă MMP-9. Cantitatea de TSP-1 detectată în mediul de cultură și în extractele de fibroblaste sau celule endoteliale este de cel puțin 2-3 ori mai mare decât în celulele pancreatice canceroase. In vitro, celulele pancreatice cu TSP-1 induc creșterea producției de MMP-9. Producția de MMP-9 de către celulele adenocarcinomului pancreatic este suprareglată de TSP-1 astfel că, stroma bogată în TSP-1 este implicată în remodelarea matricei în invazia tumorală (57).

TSP-1 suprareglează sistemul plaminogen/plasmină declanșând invazia celulelor tumorale mamare. El implică și uPAR, receptorul activator al plasminogen urokinazei. Transfecția uPAR antisens crește adezivitatea celulelor tumorale cu 46%–53%, efect similar având și în tumorile mamare umane MDA-MB-231 tratate cu acid aminocaproic epsilon. Invazia celulelor tumorale mediată de TSP-1 este aproape complet inhibată, fie de uPAR antisens, fie prin tratarea cu fosfolipaza C sau cu acidul menționat. Astfel, uPAR joacă un rol crucial în reglarea adezivității celulelor tumorale și în invazia acestora mediată de TSP-1 (58).

TSP-terapie. Numeroase celule umane normale produc TSP-1, o potentă proteină antiangiogenică care induce "liniștea" vasculară. În creier, glande mamare și vezica urinară ca și în fibroblaste, secreția de TSP-1 este redusă în timpul tumorogenezei permițând inducția unei neovascularizări viguroase reclamată de creșterea tumorilor și de metastazare.

Peptidele derivate din TSP-1 de lungime deplină sau scurte inhibă angiogeneza prin inducerea apoptozei celulelor endoteliale disturbând astfel vascularizația tumorii în creștere.

CD36 exprimat pe suprafața celulelor endoteliale funcționează ca un receptor antiangiogenic primar pentru TSP-1.

Un enantiomer D-izoleucil al TSP-1 heptapeptid specific de 450kD inhibă proliferarea și migrarea celulelor endoteliale ale capilarelor. DI-TSP, o versiune de aproximativ 1kD a acestui peptid este, de asemenea, antiangiogenic in vitro având activitate specifică apropiată de a moleculei parentale. În funcție de doză, DI-TSP eliberat inhibă creșterea metastazei melanomului murin. Asemenea TSP-1 intact, aceste peptide nu au efect pe celulele canceroase crescute in vitro, dar supresează marcat creșterea celulelor endoteliale prin inducerea apoptozei dependentă de receptor. Anticorpi anti-CD36 blochează abilitatea peptidelor de a induce apoptoza în celulele endoteliale, dar

nu are efect pe apoptoza indusă de TNF-alfa. In vivo, peptidele mimetice sunt asociate cu o semnificativă reducere a densității microvaselor și indicelui apoptotic crescut în celulele endoteliale și tumorale. Asemenea mici peptide țintite către un receptor specific antiangiogenic potent și ușor de sintetizat, promit compuși utilizabili în strategii antiangiogenice (59)

Când linia HT 1080 de fibrosarcom uman crește subcutan la șoarecii nuzi cu melanom pulmonar experimental B16/F10, ea induce rezistența tumorii concomitent cu prevenirea creșterii metastazei melanomului. Rezistența se datorează producției de către celulele tumorale a cantității înalte de TSP-1 în plasmă. Acesta inhibă angiogeneza în corneele șoarecilor. La șoarecii cu clone de HT1080 care secretă puțin sau deloc TSP-1, nu se observă nici o influență în controlul metastazelor pulmonare. Purificat din plachetele umane, TSP-1 nu are efect asupra creșterii in vitro a celulelor de melanom, dar când este injectat arată abilitatea de a opri creșterea metastazelor oferind evidențe clare asupra eficacității sale ca agent antitumoral (60).

1. Adams J. C., Thrombospondin-1. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 29(6), 861–5, 1997.
2. Sheibani N., Frazier W. A., Thrombospondin-1, PECAM-1, and regulation of angiogenesis. *Histol. Histopathol.*, 14(1), 285–94, 1999.
3. Ueno A., Yamashita K., Nagata T., Tsurumi C., Miwa Y., Kitamura S., Inoue H., cDNA cloning of bovine thrombospondin 1 and its expression in odontoblasts and predentin. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1382(1), 17–22, 1998.
4. Pablos J. L., Everett E. T., Leroy E. C., Norris J. S., Thrombospondin 1 is expressed by mesenchymal cells in mouse post-natal skin and hair follicle development. *Histochem. J.*, 30(7), 461–5, 1998.
5. Li S. S., Ivanoff A., Bergstrom S. E., Sandstrom A., Christensson B., Nerven Jv J., Holgersson J., Hauzenberger D., Arencibia I., Sundqvist K. G., T lymphocyte expression of thrombospondin-1 and adhesion to extracellular matrix components. *Eur. J. Immunol.*, 32(4), 1069–79, 2002.
6. Wilson K. E., Li Z., Kara M., Gardner K. L., Roberts D. D., Beta 1 integrin- and proteoglycan – mediated stimulation of T lymphoma cell adhesion and mitogen-activated protein kinase signaling by thrombospondin-1 and thrombospondin-1 peptides. *J. Immunol.*, 163(7), 3621–8, 1999.
7. Lawler J., Sunday M., Thibert V., Duquette M., George E. L., Rayburn H., Hynes R. O., Thrombospondin-1 is required for normal murine pulmonary homeostasis and its absence causes pneumonia. *J. Clin. Invest.*, 101(5), 982–92, 1998.
8. Dardik R., Lahav J., Functional change in the conformation of thrombospondin-1 during complexation with fibronectin or heparin. *Exp. Cell. Res.*, 248(2), 407–14, 1999.
9. Vacca A., Di Marcotullio L., Giannini G., Farina M., Scarpa S., Stoppacciaro A., Calce A., Maroder M., Frati L., Screpanti I., Gulinio A., Thrombospondin-1 is a mediator of the neurotypic differentiation induced by EGF in tymic epithelial cells. *Exp. Cell. Res.*, 248(1), 79–86, 1999.
10. Roth J. J., Gathan J. L., Gerhard C., Swami V. K., Rothman V. L., Tulenko T. N., Tuszynski G. P., Thrombospondin-1 is elevated with both intimal hyperplasia and hypercholesterolemia. *J. Surg. Res.*, 74(1), 11–8, 1998.
11. Pellerin S., Croizet K., Rabilloud R., Feige J. J., Rousset B., Regulation of the three-dimensional organization of thyroid epithelial cells into follicle structures by the matricellular protein, thrombospondin-1. *Endocrinology*, 140(3), 1094–103, 1999.
12. Adams J. C., Seed B., Lawler J., Muskelin, a novel intracellular mediator of cell adhesive and cytoskeletal responses to thrombospondin-1. *EMBO. J.*, 17(17), 4964–74, 1998.
13. Roth J. J., Sung J. J., Granick M. S., Solomon M. P., Longaker M. T., Rothman V. L., Nicosia R. F., Tuszynski G. P., Thrombospondin 1 and its specific cysteine-serine-valine-threonine-cysteine-glycine receptor in fetal wounds. *Ann. Plast. Surg.*, 42(5), 553–63, 1999.
14. Roth J. J., Reiver D. M., Granick M. S., Rothman V. L., Nicosia R. F., Tuszynski G. P., Histopathology and clinical assessment correlate with the cysteine-serine-valine-threonine-cysteine-glycine (CSVTCG) receptor of thrombospondin-1 in breast tumors. *Histol. Histopathol.*, 12(4), 1013–8, 1997.
15. Roth J. J., Albo D., Rothman V. L., Longaker M. T., Granick M. S., Long C. D., Solomon M. P., Tuszynski G. P., Thrombospondin-1 and its CSVTCG-specific receptor in wound healing and cancer. *Ann. Plas. Surg.*, 40(5), 494–501, 1998.
16. Tuszynski G. P., Nicosia R. F., The role of thrombospondin-1 in tumor progression and angiogenesis. *Bioessays*, 18(1), 71–6, 1996.
17. Wang T. N., Qian X. H., Granick M. S., Solomon M. P., Rothman V. L., Berger D. H., Tuszynski G. P., Inhibition of breast cancer progression by an antibody to a thrombospondin-1 receptor. *Surgery*, 120(2), 449–54, 1996.
18. Clezardin P., Lawler J., Amiral J., Quentin G., Delmas P., Identification of cell adhesive active sites in the N-terminal domain of thrombospondin-1. *Biochem. J.*, 321(3), 819–27, 1997.
19. Crombie R., Silverstein R. L., MacLow C., Pearce S. F., Nachman R. L., Laurence J., Identification of a CD36-related thrombospondin 1-binding domain in HIV-1 envelope glycoprotein gp120: relationship to HIV-1-specific inhibitory factors in human saliva. *J. Exp. Med.*, 187(1), 25–35, 1998.
20. Tsuchida T., Kijima H., Tokunaga T., Oshika Y., Hatanaka H., Fukushima Y., Abe Y., Kawai K., Yoshida Y., Miura S., Yamazaki H., Tamaoki N., Ueyama Y., Nakamura M., Expression of the thrombospondin 1 receptor CD36 is correlated with decreased stromal vascularisation in colon cancer. *Int. J. Oncol.*, 14(1), 47–51, 1999.

21. Yamauchi Y., Kuroki M., Iamakiire T., Abe H., Uchida H., Beppu R., Yamashita Y., Kuroki M., Shirakusa T., Thrombospondin-1 differentially regulates of IL-6 and IL-10 by human monocytic cell line U937. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 290(5), 1551–7, 2002.
22. Tooney P. A., Sakai T., Sakai K., Aeschlimann D., Mosher D. F., Restricted localization of thrombospondin-2 protein during mouse embryogenesis: a comparison to thrombospondin-1. *Matrix Biol.*, 17(2), 131–43, 1998.
23. Streit M., Riccardi L., Velasco P., Brown L. F., Hawighorst T., Bornstein P., Detmar M., Thrombospondin-2 a potent endogenous inhibitor of tumor growth and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 96(26), 14888–93, 1999.
24. Oshika Y., Masuda K., Tokunaga T., Hatanaka H., Kamiya T., Abe Y., Ozeki Y., Kijima H., Yamazaki H., Tamaoki N., Ueyama Y., Nakamura M., Thrombospondin 2 gene expression is correlated with decreased vascularity in non-small cell lung cancer.
25. Tokunaga T., Nakamura M., Oshika Y., Abe Y., Ozeki Y., Fukushima Y., Hatanaka H., Sadahiro S., Kijima H., Tsuchida T., Yamazaki H., Tamaoki N., Ueyama Y., Thrombospondin 2 expression is correlated with inhibition of angiogenesis and metastasis of colon cancer. *Br. J. Cancer*, 79(2), 354–9, 1999.
26. Iruela-Arispe M. L., Lombardo M., Krutzsch H. C., Lawler J., Roberts D. D., Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-1 is mediated by 2 independent regions within the type 1 repeats. *Circulation*, 100(13), 1423–31, 1999.
27. Doll J. A., Reiher F. K., Crawford S. E., Pins M. R., Campbell S. C., Bouck N. P., Thrombospondin-1 vascular endothelial growth factor and fibroblasts growth factor-2 are key functional regulators of angiogenesis in the prostate. *Prostate*, 49(4), 293–305, 2001.
28. Suzuma K., Takagi H., Otani A., Oh H., Honda Y., Expression of thrombospondin-1 in ischemia-induced retinal neovascularization. *Am. J. Pathol.*, 154(2), 343–54, 1999.
29. Inoki I., Shiomi T., Hashimoto G., Enomoto H., Nakamura H., Makino K., Ikeda E., Takata S., Kobayashi K., Okada Y., Connective tissue growth factor binds vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits VEGF-induced angiogenesis. *FASEB J.*, 16(2), 219–21, 2002.
30. Kwak C., Jin R. J., Lee C., Park M. S., Lee S. E., Thrombospondin-1, vascular endothelial growth factor expression and their relationship with p53 status in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *BJU. Int.*, 89(3), 303–9, 2002.
31. Kawahara N., Ono M., Taguchi K., Okamoto M., Shimada M., Takenaka K., Hayashi K., Mosher D. F., Sugimachi K., Tsuneyoshi M., Kuwano M., Enhanced expression of thrombospondin-1 and hypovascularity in human cholangiocarcinoma. *Hepatology*, 28(6), 1512–7, 1998.
32. Kragh M., Quistorff B., Tenan M., Van Meir E. G., Kristjansen P. E., Overexpression of thrombospondin-1 reduces growth and vascular index but not perfusion in glioblastoma. *Cancer Res.*, 62(4), 1191–5, 2002.
33. Bluel K., Popp S., Fusenig N. E., Stanbridge E. J., Boukamp P., Tumor suppression in human skin carcinoma cells by chromosome 15 transfer or thrombospondin-1 overexpression through halted tumor vascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 96(5), 2065–70, 1999.
34. Aishima Si S., Taguchi Ki K., Sugimachi K., Asayama Y., Nishi H., Shimada M., Sugimachi K., Tsuneyoshi M., The role of thymidine phosphorylase and thrombospondin-1 in angiogenesis and progression of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Int. J. Surg. Pathol.*, 10(1), 47–56, 2002.
35. Salvesen H. B., Akslen L. A., Significance of tumor-associated macrophages, vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 expression for tumor angiogenesis and prognosis in endometrial carcinomas. *Int. J. Cancer*, 84(5), 538–43, 1999.
36. Koch A. E., Szekanecz Z., Friedman J., Haines G. K., Langman C. B., Bouck N. P., Effects of thrombospondin-1 on disease course and angiogenesis in rat adjuvant-induced arthritis. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 86(2), 199–208, 1998.
37. Streit M., Velasco P., Brown L. F., Skobe M., Richard L., Lawler J., Detmar M., Overexpression of thrombospondin-1 decreases angiogenesis and inhibits the growth of human cutaneous squamous cell carcinomas. *Am. J. Pathol.*, 155(2), 441–52, 1999.
38. Dejong V., Degeorges A., Filleur S., Ait-Si-Ali S., Mettouchi A., Bornstein P., Binetruy B., Cabon F., The Wilms' tumor gene product represses the transcription of thrombospondin 1 in response to overexpression of c-Jun. *Oncogene*, 18(20), 3143–51, 1999.
39. Taraboletti G., Benelli R., Borsotti P., Rusnati M., Presta M., Giavazzi R., Ruco L., Albin A., Thrombospondin-1 inhibits Kaposi's sarcoma (KS) cell and HIV-1 Tat-induced angiogenesis and is poorly expressed in KS lesions. *J. Pathol.*, 188(1), 76–81, 1999.
40. Chandrasekaran S., Guo N. H., Rodrigues R. G., Kauser J., Roberts D. D., Pro-adhesive and chemotactic activities of thrombospondin-1 for breast carcinoma cells are mediated by alpha3beta1 integrin and regulated by insulin-like growth factor-1 and CD98. *J. Biol. Chem.*, 274(16), 11408–16, 1999.
41. Ohtani Y., Kijima H., Dowaki S., Kashiwagi H., Tobita K., Tsukui M., Tanaka Y., Tsuchida T., Tokunaga T., Yamazaki H., Nakamura M., Ueyama Y., Tanaka M., Tajima T., Makuuchi H., Stromal expression of thrombospondin-1 is correlated with growth and metastasis of human gallbladder carcinoma. *Int. J. Oncol.*, 15(3), 453–7, 1999.
42. Qian X., Tuszyński G. P., Expression of thrombospondin-1 in cancer: a role in tumor progression. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 212(3), 199–207, 1996.
43. Tokunaga T., Nakamura M., Oshika Y., Tsuchida T., Kazuno M., Fukushima Y., Kawai K., Abe Y., Kijima H., Yamazaki H., Tamaoki N., Ueyama Y., Alteration in tumor suppressor gene p53 correlate with inhibition of thrombospondin-1 gene expression in colon cancer cells. *Virchows. Arch.*, 433(5), 415–8, 1998.
44. Xu M., Kumar D., Stass SA, Mixon AJ. Gene therapy with p53 and fragment of thrombospondin 1 inhibits human breast cancer in vivo. *Mol. Genet. Metab.*, 63(2), 103-9, 1998.
45. Grant S. W., Kyshtobayeva A. S., Kurosaki T., Jakowatz J., Fruehauf J. P., Mutant p53 correlates with reduced expression of thrombospondin-1, increased angiogenesis, and metastatic progression in melanoma. *Cancer. Detect. Prev.*, 22(3), 185–94, 1998.

46. Kwak C., Jin R. J., Lee C., Park M. S., Lee S. E., Thrombospondin-1, vascular endothelial growth factor expression and their relationship with p53 status in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *BJU Int.*, 89(3), 303–9, 2002.
47. Gutam A., Densmore C. L., Melton S., Golunski E., Waldrep J. C., Aerosol delivery of PEI-p53 complexes inhibits B16-F10 lung metastases through regulation of angiogenesis. *Cancer. Gene. Ther.*, 9(1), 28–36, 2002.
48. Fontaini G., Boldrini L., Calcinai A., Chine S., Lucchi M., Mussi A., Angelletti C. A., Basolo F., Bevilacqua G., Thrombospondin I and II messenger RNA expression in lung carcinoma: relationship with p53 alterations, angiogenic growth factors, and vascular density. *Cli. Canmcer. Res.*, 5(1), 155–61, 1999.
49. Cinatl J. Jr., Kotchetkov R., Scholz M., Cinatl J., Vogel J. U., Driever P. H., Doerr H. W., Human cytomegalovirus infection decreases expression of thrombospondin-1 independent of the supressor protein p53. *Am. J. Pathol.*, 155(1), 285–92, 1999.
50. Li Q., Ahuja N., Burger P. C., Issa J. P., Methylation and silencing of the Thrombospondin-1 promoter in human cancer. *Oncogene*, 18(21), 3284–9, 1999.
51. Grossfeld G. D., Carroll P. R., Lindeman N., Meng M., Groshen S., Feng A. C., Hawes D., Cote R. J., Thrombospondin-1 expression in patients with pathologic stage T3 prostate cancer undergoing radical prostatectomy: association with p53 alterations, tumor angiogenesis, and tumor progression. *Urology*, 59(1), 97–102, 2002.
52. Albo D., Berger D. H., Tuszynski G. P., The effect of thrombospondin-1 and TGF-beta 1 on pancreatic cancer cell invasion. *J. Surg. Res.*, 76(1), 86–90, 1998.
53. Albo D., Berger D. H., Wang T. N., Hu X., Rothman V., Tuszynski G. P., Thrombospondin-1 and transforming growth factor-beta 1 promote breast tumor cell invasion through up-regulation of the plasminogen/plasmin system. *Surgery*, 122(2), 493-9, discussion 499–500, 1997.
54. Albo D., Berger D. H., Vogel J., Tuszynski G. P., Thrombospondin-1 and transforming growth factor beta-1 upregulate plasminogen activator inhibitor type 1 in pencreatic cancer. *J. Gastrointest. Surg.*, 3(4), 411–7, 1999.
55. Amagasaki K., Sasaki A., Kato G., Maeda S., Nukui H., Naganuma H., Antisens-mediated reduction in thrombospondin-1 expression reduces cell motility in malignant glioma cells. *Int. J. Cancer.*, 94(4), 508–12, 2001.
56. Claisse D., Martiny I., Chaqour B., Wegrowski Y., Petitfrere E., Schneider C., Haye B., Bellon G., Influence of transforming growth factor beta1 (YGF-beta1) on the behaviour of porcine thyroid epithelial cells in primary culture through thrombospondin-1 syntesis. *J. Cell. Sci.*, 112(9), 1405–16, 1999.
57. Qian X., Rothman V. L., Nicosia R. F., Tuszynski G. P., Expression of thrombospondin-1 in human pancreatic adenocarcinomas: role in matrix matalloproteinase-9 production. *Pathol. Oncol. Res.*, 7(4), 251–9, 2001.
58. Albo D., Berger D. H., Rothman V. L., Tuszynski G. P., Role of urokinase plasminogen activator receptor in thrombospondin 1-mediated tumor cell invasion. *J. Surg. Res.*, 82(2), 331–8, 1999.
59. Reiher F. K., Volpert O. V., Jimenez B., Crawford S. E., Dinney C. P., Henkin J., Haviv F., Bouck N. P., Campbell S. C., Inhibition of tumor growth by systemic treatment with thrombospondin-1 peptide mimetics. *Int. J. Cancer.*, 98(5), 682–9, 2002.
60. Volpert O. V., Lawler J., Bouck N. P., A human fibrosarcoma inhibits systemic angiogenesis and the growth of experimental metastases via thrombospondin-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95(11), 6343–8, 1998.

OSTEOPONTIN (OPN)

Structura osteopontin, funcții și distribuție

Osteopontin (OPN) este o glicoproteină cu caracteristici structurale și funcționale specifice proteinelor matricei extracelulare. Este exprimată constitutiv într-un număr limitat de țesuturi normale precum rinichii, este prezentă în plasmă și alte fluide corporale, este abundentă în oase și alte țesuturi mineralizate. Expresia sa este crescută în diferite țesuturi în unele patologii, precum și în situații fiziologice cum ar fi dezvoltarea sau răspunsul la stress. Expresia OPN a fost implicată în cancer, răspunsul imun și inflamator, remodelarea vasculară, afecțiuni renale, lactație, calcifiere și remodelarea țesuturilor mineralizate (1).

OPN a fost inițial descrisă în 1980 ca fiind o proteină secretată de către celulele transformate în cultură (2). În 1985 a fost identificată atât în țesutul osos ca fiind o proteină majoră necolagenică primind numele "osteopontin" (3), cât și la bacterii ca o proteină cu rol important în rezistența bacteriană codificată de gena *eta-1*, proteină similară cu *Eta-1* umană implicată în activarea timpurie a limfocitelor T (early T-lymphocyte activation-1) (4).

Masa moleculară a fost dedusă în urma mobilității în SDS-PAGE, aceasta variând între 55 și 80 kDa în funcție de condițiile de electroforeză (5). OPN este codificată de 7 exoni și este formată din aproximativ 300 aminoacizi (6). Secvența de aminoacizi a OPN a fost determinată pentru multe specii de vertebrate (7), conservarea unei mari părți a acesteia printre diferitele specii de vertebrate sugerând că această moleculă are un rol fundamental în sistemul biologic în timpul evoluției.

OPN este bogată în acid aspartic și poate fi înalt fosforilată la reziduurile de serină și treonină (în funcție de țesut), proteina dobândind un caracter foarte acid. Structural, OPN conține câteva domenii de adeziune celulară care sugerează diferitele sale funcții (figura 1). Acestea includ:

- un domeniu format din 9 reziduuri consecutive de acid aspartic (pAsp);
- domeniul ce conține secvența de aminoacizi arginină – glicină – acid aspartic (RGD) prin intermediul căreia interacționează cu integrinele de pe suprafața celulară $\alpha\beta3$, $\alpha\beta1$, $\alpha\beta5$;
- un domeniu criptic ce conține secvența serină – valină – valină – tirozină – acid glutamic – leucină – arginină (SVVYGLR) care interacționează cu $\alpha9\beta1$ în urma expunerii prin clivarea de către trombină;
- situs de clivare al trombinei;
- locuri de legare pentru alți receptori celulari (ex. CD44);
- regiuni de legare pentru Ca^{2+} și heparan sulfati.

OPN are o distribuție restrânsă în organism fiind prezentă în principal în țesutul osos și rinichi, dar este exprimată constitutiv și în celulele epiteliale ale tracturilor gastrointestinal, urinar și reproducător, în pancreas, bronhiile pulmonare, glanda mamară, glandele salivare și sudoripare (8). OPN a fost găsit și în majoritatea secrețiilor incluzând urina, saliva, laptele și bila. OPN este produs și de macrofage, limfocite, celule endoteliale vasculare, celule musculare netede, celulele fibroblastice din stroma embrionară, celulele din urechea internă, precum și în locurile de vindecare a leziunilor (7).

Studiile asupra OPN în diverse afecțiuni și leziuni au revelat o creștere a nivelului proteinei în timpul proceselor inflamatorii și de remodelare tisulară. Patologii asociate cu expresia *de novo* a OPN includ cancerul (9), restenoza arterială (10), ateroscleroza (11), infarctul miocardic (12) și un număr de afecțiuni granulomatoase incluzând sarcoidioza și tuberculoza (13). În plus, expresia OPN este indusă în diferite tipuri celulare: macrofage și celule endoteliale vasculare în timpul fazei granulare a proceselor de vindecare a leziunilor. Toate aceste situații au în comun o componentă inflamatorie, sugerând rolul OPN în răspunsul de apărare al gazdei.

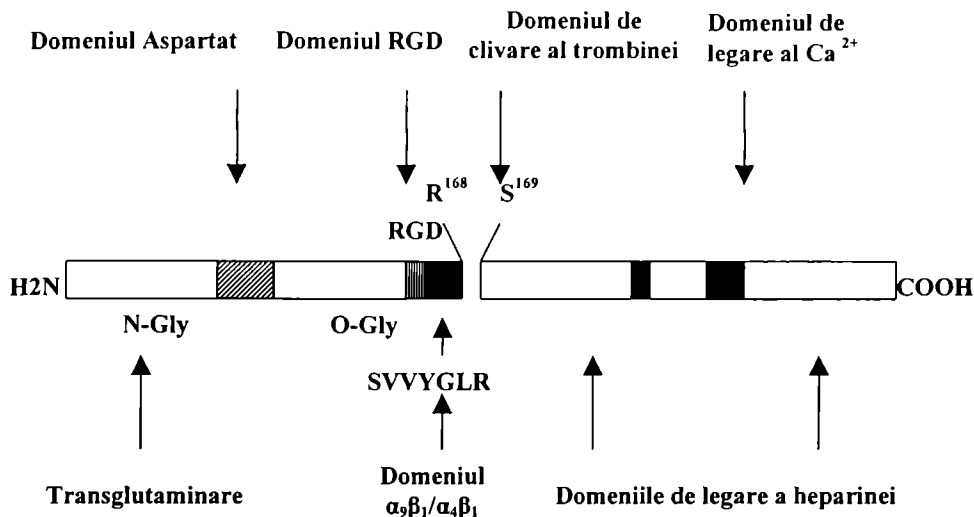


Figura 1. Structura proteinei osteopontin (OPN). Sunt prezentate schematic principalele domenii și situl de clivare a trombinei.

Receptorii și căile de semnalizare

OPN poate lega atât receptori celulari de suprafață cât și componente ale matricei extracelulare. Astfel în interacțiile cu celulele, OPN interacționează cu integrinele: $\alpha\beta_3$, $\alpha\beta_1$, $\alpha\beta_5$, $\alpha_9\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$ prin intermediul domeniilor RGD și SVVYGLR, precum și cu CD44 variantele v3-v6 prin secvențe care nu au fost încă pe deplin elucidate (figura 2). Există dovezi care susțin că pentru legarea la CD44 este necesară cooperarea integrinei β_1 (14).

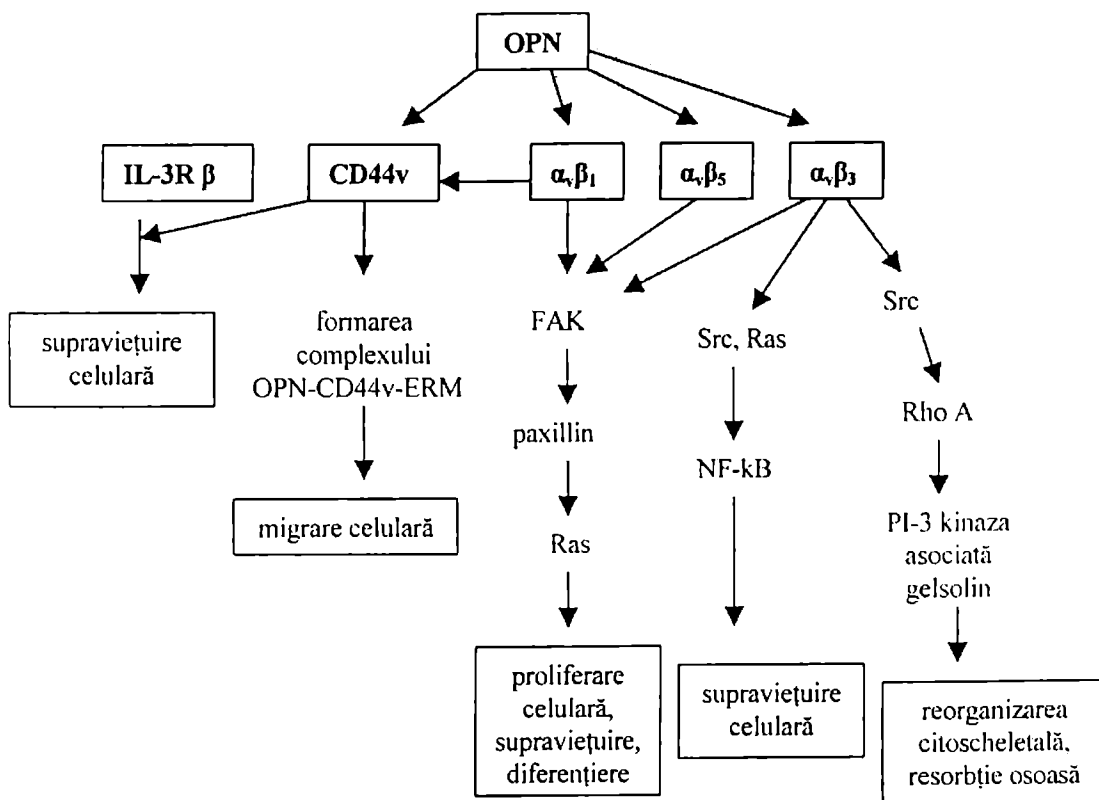


Figura 2. Căile de semnalizare activate de OPN.

În interacțiile OPN cu componentele matricei sunt implicate domeniile de legare pentru heparan sulfat din regiunea C-terminală care reglează legarea acestuia la colagen, fibronectină și osteocalcin.

CD44 este o glicoproteină celulară de suprafață care servește ca moleculă de adeziune în interacțiile celulă-substrat sau celulă-celulă, fiind puternic exprimată în inflamațiile acute și cronice. Liganzii CD44 sunt molecule ale matricei extracelulare (ECM): acidul hialuronic și condroitin sulfatii. Unele variante ale CD44, v3 – v6, s-a demonstrat că pot lega OPN în prezența integrinei $\beta 1$. S-a descris un complex intracelular format de OPN cu CD44 și proteinele ERM (ezrin/radixin/moesin), cu localizare perimembranară în câteva tipuri celulare, incluzând fibroblastele și macrofagele. Acest complex se formează în regiunea principală care direcționează migrarea celulară (15).

O altă cale de semnalizare în care este implicată OPN este cea a supraviețuirii celulelor indusă în celulele hematopoietice de semnalizarea IL-3 și GM-CSF, ambele dependente de subunitatea comună β a receptorului IL-3. OPN stimulează supraviețuirea și creșterea celulelor hematopoietice pe calea interacției cu CD44 (16). Evenimente semnalizatoare consecutive interacției OPN cu integrinele au fost descrise în multe tipuri celulare: fibroblaste, osteoclaste, osteoblaste, celule din melanom și celule endoteliale. Figura 2 prezintă pe scurt câteva dintre căile de semnalizare cunoscute. Semnalizarea OPN pe calea integrinei $\alpha v\beta 3$ activează calea NF-kB în celulele endoteliale inhibându-le apoptoza. NF-kB este un reglator major al inflamației în celulele endoteliale și poate fi implicat în angiogeneza care însoțește, în general, procesul de vindecare a leziunilor. Activarea NF-kB necesită și activarea Src – Ras (17).

Interacția OPN cu integrina $\alpha v\beta 3$ stimulează, de asemenea, PI3-kinaza asociată gelsolin (fosfatidil-inozitol 3-hidroxi kinaza) cu efecte asupra reorganizării citoscheletale și resorbției osoase. În absența gelsolin nu se formează podosomi, structuri pasagere implicate în adeziunea osteoclastelor la matricea extracelulară în timpul mobilității celulare. Absența podosomilor duce la reducerea motilității osteoclastelor și deficiențe în resorbția osoasă (18). Rho-A stimulează formarea podosomilor și activitatea osteoclastelor, imitând acțiunea semnalului OPN / integrina $\alpha v\beta 3$ (19).

În urma interacției cu integrina $\alpha v\beta 1$ sau $\alpha v\beta 5$, OPN poate induce proliferarea celulară, supraviețuirea și diferențierea, pe calea fosforilării unor intermediari ai semnalizării intracelulare: kinaza principală a adeziunii FAK (focal adhesion kinase), paxillin și Src (20).

Interacția OPN cu integrinele este consecința clivării acesteia de către trombină. OPN clivată, dar nu și forma intactă, poate suporta migrarea dependentă de RGD a celulelor de melanom. Celulele liniei eritroleucemice K562 se leagă prin intermediul integrinei $\alpha 5\beta 1$ activate la secvența RGD în OPN clivată. Numai după clivarea cu trombină OPN poate interacționa cu integrinele via secvenței SVVYGLR, care este localizată între domeniul RGD și situl de clivare a trombinei (21). Fragmentele OPN rezultate au acțiune puternic chemotactică pentru celulele endoteliale și pot ajuta astfel la formarea unor noi vase de sânge promovând angiogeneza.

Osteopontin și procesul inflamator

O temă comună expresiei normale sau patologice a OPN este cea a creșterii nivelului acestei proteine în apropierea unor celule activate aparținând liniei monocitare/macrofagice. Aceste descoperiri sugerează un rol important al OPN în aceste tipuri celulare. Numeroase studii corelative *in vitro* au demonstrat că OPN poate modula adeziunea macrofagelor, migrarea (22), generarea speciilor de oxigen reactiv (23), eliberarea de citokine, stadiul diferențierii și fagocitoza (24) (figura 3).

O varietate de mediatori inflamatori și factori de creștere, incluzând IL-1, TNF- α și PDGF, stimulează transcripția OPN pe calea activării protein-kinazei C (25).

O funcție majoră a răspunsului inflamator este aceea de a aduce leucocite la locul leziunii/infecției în scopul înlăturării agenților patogeni locali și pentru a stimula vindecarea. Studii recente sugerează că OPN acționează în primele faze ale acestui proces ca un reglator al infiltrării

macrofagelor. Utilizarea experimentală a anticorpilor neutralizanți anti – OPN a blocat infiltrarea macrofagelor în țesut ca răspuns la peptida chemotactică bacteriană formyl-methionine-leucine-phenylalanine (26). Studii pe șoareci OPN-null au confirmat aceste rezultate, întrucât în cazul glomerulonefritelor induse experimental, influxul de macrofage în rinichi a fost de trei până la cinci ori mai scăzut comparativ cu valorile înregistrate pe șoareci sălbatici (27).

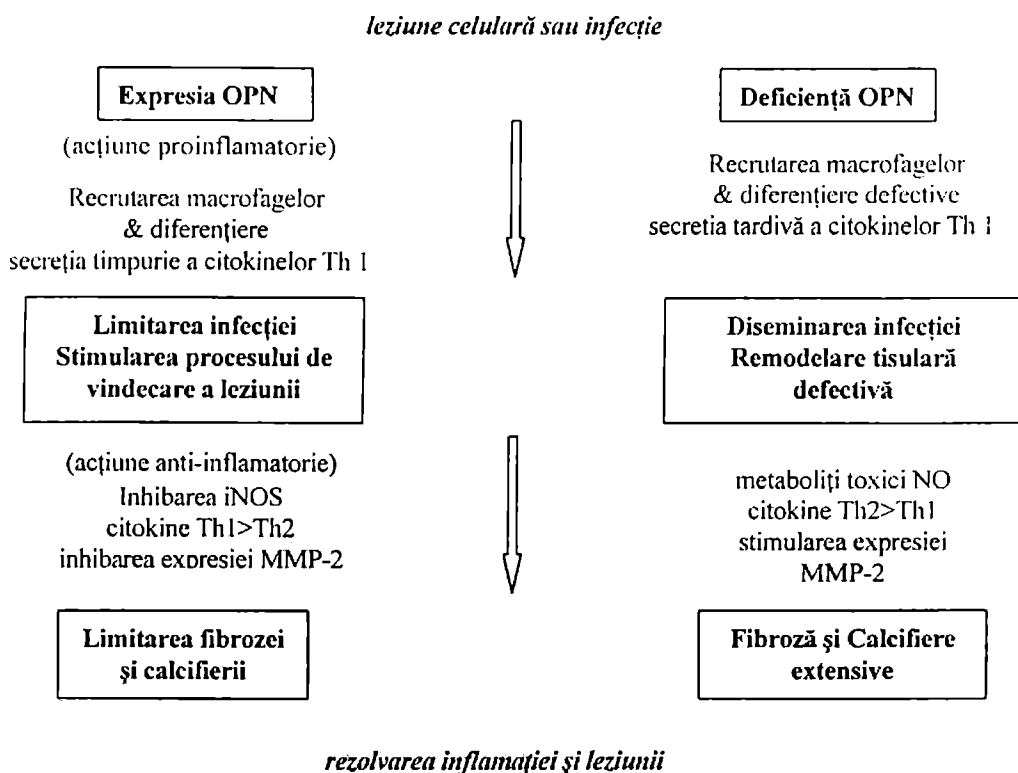


Figura 3. Acțiunile pro- și anti-inflamatorii ale OPN în leziunea celulară și infecție. Partea stângă a diagramei sumarizează evenimentele pro-inflamatorii și anti-inflamatorii care pot fi reglate de OPN. Partea dreaptă prezintă evenimente cunoscute sau presupuse de la șoarecii OPN-null. MMP-2 – matrix metaloproteinaza –2.

OPN are atât acțiuni pro- cât și anti-inflamatorii. Ca agent pro-inflamatoriu, este un factor chemotactic pentru limfocitele T și monocite/macrofage, suportă adeziunea și modulează funcțiile acestora. Injectarea OPN în țesutul subcutanat conduce la o acumulare a macrofagelor la locul injecției (28).

Polarizarea limfocitelor T către fenotipul Th1 sau Th2, un aspect critic al imunității mediate celular, este influențată de producția unor citokine timpurii, inclusiv OPN, care interacționează cu integrinele și CD44 pentru a stimula expresia citokinelor Th1 și a inhiba pe cele Th2. În culturi de macrofage peritoneale de șoarece, interacțiile dintre OPN și integrine induc sinteza IL-12, o citokină care conduce răspunsul Th1. În aceleași celule, interacția OPN cu CD44 previne producția citokinei Th2 IL-10 în urma stimulării cu LPS. Împreună cu datele obținute *in vivo*, aceste rezultate sugerează că OPN acționează ca o citokină Th1 și este importantă în răspunsul timpuriu Th1 (24).

OPN exercită efecte anti-inflamatorii inhibând expresia oxidului nitric (NO). *In vitro*, inhibă NO sintaza inductibilă (iNOS) și scade producția de NO de către macrofage și celulele epiteliale ale tubulilor renali (29). NO stimulează expresia OPN, care, în schimb, inhibă transcripția iNOS și reduce producția NO, stabilind astfel o buclă autoreglatoare (30).

În artrita reumatoidă și osteoartrită, expresia OPN este crescută în fluidele sinoviale. OPN este exprimat predominant de către fibroblastele sinoviale atașate de cartilaje la locul invaziei. Acțiunile pro-inflamatorii ale OPN includ abilitatea acestuia de a stimula expresia colagenazei 1 (matrix metaloproteinaza 1) și de a activa comportamentul invaziv al macrofagelor și condrocitelor

articulare. Totuși OPN poate acționa și într-o manieră anti-inflamatorie, datorită abilității sale de a inhiba producția mediatorilor pro-inflamatori precum NO și prostaglandina E2, reducând astfel extinderea afectării cartilajului și contribuind la menținerea integrității tisulare (31).

Osteopontin în remodelarea osoasă și tisulară

OPN este înalt exprimată în țesuturile mineralizate incluzând oasele și dinții, reprezentând cea mai abundentă proteină non-colagenică. De asemenea., poate fi întâlnită invariabil în calcifierile patologice din țesuturile moi. Asocierea sa cu biomineralizarea a constituit subiectul a numeroase studii în scopul elucidării funcțiilor proteinei în acest proces. Pe baza observațiilor realizate *in vivo* și *in vitro* au fost propuse trei funcții diferite ale OPN în țesuturile calcificate: (1) reglarea adeziunii celulare în țesutul osos; (2) reglarea funcției osteoclastelor; și (3) reglarea mineralizării matricei extracelulare.

OPN este produs la nivele înalte de către osteoblaste și osteoclaste, și s-a demonstrat *in vitro* că mediază adeziunea la substrat a ambelor tipuri celulare (32, 33).

Un alt rol al proteinei este acela de a stimula migrarea osteoclastelor în urma interacției cu integrina $\alpha\beta3$, pe calea activării PI-3 kinazei asociate gelsolin, cu formarea de podosomi, intervenind astfel în resorbția osoasă (18). Obstrucționarea funcției integrinei $\alpha\beta3$ cu ajutorul anticorpilor sau a peptidelor mimetice conduce la inhibarea resorbției osoase *in vivo*, antagoniștii integrinei $\alpha\beta3$ fiind în prezent testați clinic și utilizați ca tratament pentru osteoporoză (34).

OPN imobilizat la suprafața matricei osoase mineralizate acționează pentru inhibarea acumulării de bioapatită prin interacțiile cu cristalele. OPN solubil eliberat de osteoblaste și osteoclaste poate regla negativ formarea precursorilor osteoclastelor, probabil, ca parte a unui feedback negativ. Funcții similare sunt atribuite OPN în reglarea calcifierii ectopice. În acest caz, celulele mezenchimale, precum celulele musculare netede sau celulele interstițiale ale valvelor, pot utiliza OPN pentru adeziune și pot elabora în aceste condiții o matrice mineralizatoare competentă (35). OPN poate induce, de asemenea, mobilizarea monocitelor și diferențierea macrofagelor sau a celulelor gigant multinucleate capabile de fagocitoză și/sau resorbția calcifierii ectopice (36). În final, OPN se leagă la depozitele ectopice de minerale și inhibă creșterea cristalelor (37). Calcifieri ectopice și nivele crescute de OPN au fost raportate în leziuni aterosclerotice avansate (38), calculi renali (39), plăci dentare (40), pilomatomas (41), și în calcifieri asociate tumorilor (42). În aceste studii acumularea de OPN a fost atribuită celulelor rezidente și macrofagelor infiltrate.

Asocierea osteopontin cu cancerul

Prima evidență a unei legături între OPN și cancer a fost furnizată de Senger și colaboratorii, care au descris o fosfoproteină asociată transformării secretată în cultură de un număr de linii celulare transformate (43). O altă legătură între OPN și cancer a fost descoperită prin studiul liniei NIH 3T3 care, în timpul transformării induse de *ras*, a dobândit abilități metastazice. Una dintre genele a căror expresie a fost indusă în procesul transformării a fost OPN, sugerând că această proteină poate contribui la achiziția fenotipului metastazic (44). Mecanismul prin care expresia oncogenică a *ras* duce la inducerea OPN a fost clarificat ulterior de Guo et al. (45), care a identificat un nou enhancer activat de *ras* în promotorul OPN. Un studiu recent în care *ras* a fost transfectată în celule OPN deficiente în paralel cu celule control, a sugerat că pentru un efect transformator complet al *ras*, poate fi necesară expresia OPN. O creștere a expresiei OPN a fost descoperită și în multiple stadii ale carcinogenezei pielii la șoarece (46). Transfecția mai multor tipuri celulare cu ADN complementar antisens OPN sau utilizarea ribozimelor au demonstrat o inhibare a tumorigenezei sau proprietăților metastazice ale celulelor (47). Împreună aceste studii experimentale dovedesc că OPN poate avea un rol funcțional în progresia tumorală și metastazare.

Implicațiile interacției OPN cu receptorii, în cancer

Abilitatea OPN de a lega unele integrine de pe suprafața celulară furnizează informații asupra posibilului său rol funcțional în cancer. Integrinele sunt proteine dimerice transmembranare alcătuite din subunitățile α și β . Există multiple forme ale ambelor subunități, fiecare heterodimer putând cupla o largă varietate de liganzi cu care celula vine în contact. Liganzii includ proteine ale matricei extracelulare (ECM) precum fibronectina, vitronectina, OPN.

Celulele tumorale exprimă o mare varietate de integrine și, în funcție de gradul de diferențiere al tumorii, nivelul unor integrine poate fi crescut sau scăzut (48). Se știe că supra-expresia integrinelor poate cauza activarea constitutivă a căilor de semnalizare conducând la accelerarea creșterii celulelor tumorale (49, 50).

Legarea OPN la integrine poate contribui la rolul acestei molecule în cancer, pe calea semnalizării mediate de integrine și a efectului secundar asupra adeziunii și migrării. S-a arătat că OPN interacționează cu diferite integrine prin intermediul secvenței RGD. Dintre aceste integrine, $\alpha v \beta 3$ în special a fost asociată cu unele aspecte ale procesului cancerizării (51). Studii recente pe o linie celulară de cancer mamar înalt tumorigenică (MDA-BD-435) au demonstrat că celulele utilizează $\alpha v \beta 3$ pentru migrarea în direcția OPN, în timp ce alte două linii de cancer mamar nemetastazice (21PT, 21NT) utilizează integrinele $\alpha v \beta 1$ și $\alpha v \beta 5$ (52).

Expresia integrinei $\alpha v \beta 3$ a fost, de asemenea, asociată cu progresia cancerului mamar pe calea interacției cu activitatea protein-kinazei C- α (PKC- α). O creștere a activității PKC- α în celulele canceroase MCF-7 stimulează expresia integrinei $\alpha v \beta 3$ inhibând apoptoza. Aceste celule devin rezistente la apoptoza indusă de forbol esterii în prezența OPN, dar adăugarea anticorpilor anti – integrina $\alpha v \beta 3$ blochează efectiv supresia apoptozei (53). Aceste studii sugerează că celulele tumorale care sunt capabile să lege OPN prin intermediul integrinei $\alpha v \beta 3$, pot avea un avantaj de supraviețuire.

Pe lângă interacția cu integrinele, OPN poate lega și alți receptori de suprafață precum CD44. Familia CD44 include multiple izoforme proteice codificate de o singură genă și generate prin splicing alternativ. Multe dintre aceste izoforme sunt supra-exprimate în celulele maligne (54). OPN se poate lega la CD44 inducând o activitate chemotactică, promovând migrarea și diseminarea celulară. Acest mecanism poate reprezenta o cale alternativă prin care CD44 semnalizează pentru activarea funcției integrinelor, ajutând la adeziunea și migrarea celulelor tumorale (14). De asemenea, complexul format de OPN cu CD44 și proteinele ERM, se știe că este implicat activ în migrarea celulelor metastazice de cancer mamar (55).

OPN poate influența comportamentul celulelor tumorale și prin interacții cu receptori ai factorilor de creștere. Migrarea celulelor tumorale poate fi influențată de HGF și receptorul acestuia Met, semnalizarea pe această cale fiind asociată cu un fenotip transformat în celulele NIH 3T3 (56) și cu invazivitatea celulelor canceroase prin creșterea avidității integrinelor pentru liganzii specifici (57). Se pare că există o relație sinergică între OPN și HGF în inducerea migrării celulare (52).

OPN mediază inducția proteazelor celulare

S-a descoperit că integrinele pot interacționa și cu alți compuși membranari, de exemplu **urokinaza activatoare a plasminogenului (uPA)** și receptorul acesteia (uPAR), care au fost implicați în metastazare. uPA este una dintre cele câteva proteaze adesea supra-exprimate în celulele tumorale. Aceasta, la fel ca alte enzime exprimate de celulele canceroase, poate contribui la fenotipul malign pe calea degradării componentelor ECM, facilitând migrarea și invazia, sau prin activarea altor proteaze (58).

Transfecția OPN în celulele epiteliale mamare sau adăugarea exogenă a acestuia induce creșterea invazivității celulelor și supra-expresia uPA. Un mecanism care explică acest fapt ar putea fi interacțiile de la suprafața celulară dintre integrinele cuplate cu OPN și complexe uPA/uPAR (59). Diverse studii au arătat că legarea uPA/uPAR este necesară pentru migrarea mediată de integrina $\alpha 5 \beta 1$ a celulelor de carcinom pancreatic sau cancer mamar (60).

Inhibarea uPAR a fost asociată cu latența celulelor tumorale. Într-un model experimental s-a observat că inducerea latenței se datorează insuficienței interacțiilor dintre uPA/uPAR și integrina $\alpha 5\beta 1$. Această limitare se traduce printr-o semnalizare inadecvată având drept consecință absența creșterii tumorale. Rezultatele sunt intrigante ele evidențiând posibilitatea ca legarea și activarea unor integrine specifice de la suprafața celulară de către moleculele ale ECM precum OPN ar putea scoate din latență celulele tumorale prin promovarea interacțiilor integrină-uPAR (61).

OPN poate induce expresia și activarea și a altor proteaze, precum **metaloproteinazele (MMP)**, care pot contribui la metastazare prin mai multe mecanisme. S-a descoperit că activarea MMP-2 în celulele tumorale GCT23 este indusă de OPN ca și de alte peptide ce conțin domeniul RGD, pe calea interacției cu integrina $\alpha v\beta 3$ (62). În celulele musculare netede, activarea MMP-1 de către OPN a fost blocată prin introducerea unor anticorpi anti- integrina $\alpha v\beta 3$ (63). Supraexpresia MMP duce la o creștere a adezivității și migrării celulelor tumorale datorită proteolizei matricei. În consecință se poate spune că OPN are un rol critic în reglarea proteolizei matricei de către celulele tumorale și ca urmare în procesele de invazie și metastazare.

Rolul OPN în angieneză

OPN a fost implicat în procesul de angieneză, (formarea unor noi vase de sânge) care permite susținerea creșterii și metastazarea celulelor tumorale, datorită abilității de a lega integrina $\alpha v\beta 3$, care este un marker cunoscut al angiogenezei fiind exprimat de celulele endoteliale neovasculare.

Studii experimentale *in vivo* asupra angiogenezei în membranele chorioalantoide ale embrionului de pui au demonstrat că expresia integrinei $\alpha v\beta 3$ crește în timpul angiogenezei, și dacă această integrină este blocată angiogeneza poate fi inhibată. Integrina $\alpha v\beta 3$ are, de asemenea, un rol important în supraviețuirea și diferențierea celulelor vasculare în timpul angiogenezei. Creșterea nivelului de exprimare a integrinei $\alpha v\beta 3$ și al OPN imediat după o leziune vasculară, sugerează un rol important al acestora în repararea vasculară și regenerare, OPN fiind implicat în stimularea adeziunii și migrării celulelor endoteliale (64).

S-a demonstrat că OPN protejează celulele endoteliale de apoptoză, acest efect fiind mediat de activitatea NF-kB. Activitatea NF-kB crește în urma legării OPN la integrina $\alpha v\beta 3$ (17). Ca urmare, OPN poate fi implicat în promovarea cancerului atât prin efectele asupra angiogenezei, cât și prin susținerea supraviețuirii celulelor endoteliale pe care la protejează de apoptoză prin intermediul activității NF-kB.

OPN poate contribui la angieneză prin efectele pe care le are asupra expresiei factorului de creștere a endoteliului vascular (VEGF). S-a demonstrat că VEGF cooperează cu OPN și integrina $\alpha v\beta 3$ pentru a stimula migrarea celulelor endoteliale. Aceste interacții au și relevanță clinică, expresia lor fiind asociată cu angiogeneza în glioblastom (65) și cu o prognoză rezervată în cazul pacienților cu adenocarcinom pulmonar stadiul I (66).

Influența OPN asupra supraviețuirii celulelor tumorale

În plus față de posibilele contribuții ale OPN la apariția fenotipului metastazic descrise anterior, OPN poate avea un rol important în cancer și prin inducerea supraviețuirii unor diferite tipuri de celule, prin interacții cu sistemele defensive ale gazdei. Un exemplu în acest sens este furnizat de efectele OPN asupra producției de oxid nitric (NO). NO este produs de diferite tipuri celulare (macrofage și celule endoteliale vasculare activate), și acționează ca o moleculă de semnalizare puternică inducând citotoxicitate locală. NO este un radical activ care poate induce leziuni celulare prin afectarea căilor metabolice celulare. Inhibarea iNOS, enzima sintetizatoare a NO de către OPN poate avea un rol în apărarea tumorală împotriva sistemului imun. O astfel de inhibiție a fost descrisă la nivelul celulelor epiteliale renale, macrofagelor și țesutului vascular. Țesutul tumoral prezent

produce OPN, acesta promovând creșterea tumorală și metastazarea prin protejarea celulelor tumorale de NO produs de către macrofagele și celulele vasculare ale gazdei. În acest fel celulele tumorale producătoare de OPN sunt favorizate în procesul creșterii în comparație cu celulele tumorale care nu pot secreta OPN (67).

Efectele OPN în micromediul tumoral sunt complexe. Celulele tumorale care secretă OPN își pot afecta propria supraviețuire prin atragerea celulelor inflamatorii ale gazdei, OPN fiind, așa cum s-a arătat, un factor chemotactic pentru mai multe tipuri celulare, inclusiv macrofage. Dacă aceste macrofage sunt citotoxice pentru celulele tumorale, atunci tumora ar promova propria sa distrucție. Pe de altă parte, descoperiri recente au indicat că infiltrarea limfocitelor poate duce, în unele cazuri, la supraviețuirea celulelor tumorale prin secreția de factori angiogenici, promovând astfel angiogeneza în cadrul tumorii (68).

S-a demonstrat, de asemenea, că OPN poate proteja celulele tumorale de liza indusă pe calea sistemului complement prin interacția cu unele componente ale acestui sistem. Atât OPN cât și sialoproteina osoasă (BSP) pot lega factorul H inactivând calea alternativă a complementului, protejând astfel celulele tumorale care scapă de acest mecanism de supraveghere (69).

Studiile prezentate în această secțiune aduc dovezi experimentale asupra rolului funcțional al OPN în progresia tumorală și malignizare. În aceste procese sunt implicate mecanisme multiple, incluzând interacții cu diferiți receptori de suprafață, și căile de semnalizare ale complexelor factori de creștere/receptori ai acestora și proteinaze. Interacțiile OPN cu variați receptori celulari de suprafață, integrine și CD44, pot duce la activarea a diferite căi de semnalizare, inducând schimbări în expresia unor gene precum: NF- κ B, VEGF, uPA, Met, ale căror proteine contribuie la un comportament celular alterat, incluzând migrarea și invazia. Aceste efecte ale OPN variază între tipurile celulare, fiind dependente de tipul integrinelor exprimate și de tipul de semnal care poate fi activat. Deși detaliile acestor interacții sunt complexe, este clar că OPN poate avea efecte funcționale asupra comportamentului celulelor maligne.

Semnificația OPN în cancerul uman

Există studii experimentale care susțin ideea că exprimarea OPN de către celulele tumorale poate induce alterarea proprietăților maligne ale acestora. În plus, aceste studii arată că OPN produs de către celulele tumorale *in vivo* poate avea multiple efecte asupra abilității tumorii de a crește, invada și metastaza. Nivelurile OPN în sângele pacienților cu cancer sau chiar în tumori pot furniza informații clinice utile pentru prognoză.

Expresia OPN în tumori umane

Expresia OPN în tumori umane a fost demonstrată pentru prima dată de Brown și colaboratorii. Acestia au găsit nivele substanțial crescute de ARNm OPN în toate cele 14 tumori pe care le-au studiat (6 de colon, 3 de cancer mamar, 2 pulmonare, 1 de stomac, 1 de endometru și 1 de cancer tiroidian), comparativ cu țesuturile normale corespunzătoare. În cazul a două tumori benigne studiate (un adenom de colon și un leiomiom uterin) nivelurile ARNm ale OPN au fost comparabile cu cele din țesuturile normale. Celulele pozitive pentru transcriptul OPN au fost mai numeroase în cazul tumorilor avansate și în ariile apropiate de necroză (70). Alte studii au arătat prezența ARNm OPN și supra-expresia proteinei în diferite cancere, inclusiv cel pulmonar, mamar, esofagian, gastric, în leziuni premaligne și maligne ale cavității orale, în cancere de prostată și gliome (71-77). Utilizând imunohistochimia, proteina OPN prezentă în tumori a fost localizată pe macrofage și pe celulele tumorale.

OPN este prezentă în microcalcifierile din tumorile mamare (78) și în calcifierile ectopice din alte tumori, spre exemplu chistadenocarcinomul seros papilar ovarian, meningioame, carcinomul

papilar al tiroidei și pilotrichoame (79-81). Aceste descoperiri nu sunt însă surprinzătoare, întrucât s-a demonstrat anterior că OPN poate lega calciul. Deși calcifierea poate fi utilă radiologic pentru identificarea prezenței tumorii, semnificația funcțională a prezenței OPN în aceste focare de calcifiere ectopică nu este încă elucidată.

Prezența OPN în tumori primare ca indicator al creșterii agresivității tumorii

Variabilitatea prezenței OPN în unele tumori dar nu în toate, detectarea prin imunohistochimie a transcriptului ARNm OPN uneori în celulele tumorale, altele în celulele imune ale gazdei sau în celulele vasculare endoteliale, a trezit interesul asupra implicațiilor posibile ale acestor variabilități asupra expresiei OPN ca marker al agresivității tumorale și prognozei.

Primul studiu în acest sens a fost efectuat în 1996 (1971). În studiu au fost incluși 25 de pacienți operați pentru cancer pulmonar. A fost examinată expresia OPN în tumoră și în probe din țesutul adiacent. În țesutul normal pulmonar adiacent s-au detectat nivele neglijabile de OPN, în timp ce majoritatea probelor tumorale au fost pozitive, cu variații între tumori și nivelul supra-expresiei ARNm OPN. Proteina a fost localizată prin imunohistochimie atât în celulele tumorale cât și în macrofagele asociate tumorii. În urma studiului, datele au relevat o asociere statistic semnificativă între pozitivitatea OPN a tumorii și scăderea ratei de supraviețuire a pacientului (71).

O posibilitate de a studia asocierea dintre expresia OPN și progresia tumorii mamare a fost oferită de o pacientă care avea carcinom mamar bilateral cu histologie similară, și care ulterior a dezvoltat recurență locală și metastazică unilateral. Tumora din partea dreaptă s-a răspândit în nodulii limfatici, spre deosebire de cea din stânga. Mai târziu, pacienta a dezvoltat recurență locală în partea dreaptă cu metastazare. Examinând expresia OPN și p53, precum și pe cea a Ki-67, c-erbB și a receptorului pentru estrogen, atât în tumora primară cât și în recurența locală și în metastaze, s-a descoperit că tumora primară din partea dreaptă a fost pozitivă pentru OPN și p53, în timp ce tumora din stânga a fost negativă pentru ambi markeri. În schimb, ambele tumori au fost pozitive pentru receptorul de estrogen și markerul de proliferare celulară Ki-67, în timp ce c-erbB nu a fost detectată în nici o tumoră. Tumora recurentă locală și metastazele din nodulii limfatici au fost înalt pozitive pentru OPN și p53. Nivelul plasmatic al OPN a fost măsurat înaintea morții pacientei, și a fost semnificativ mai mare decât media stabilită anterior în cazul femeilor sănătoase. Ca urmare, atât expresia OPN cât și imunopozitivitatea p53 au fost asociate cu agresivitatea tumorii, fiind detectate în asociere cu progresia tumorală (82). Rezultatele acestui studiu sugerează că nivelul crescut al OPN, atât în celulele tumorale cât și în plasmă, poate reprezenta un marker al agresivității tumorii în cancerul mamar și poate prezice dezvoltarea ulterioară a metastazelor.

Nivelul OPN a fost corelat cu creșterea invazivității și cu potențialul metastazic și în alte tumori umane. S-a examinat expresia OPN în 40 de carcinoame gastrice primare, 5 focare metastazice și în mucoasa corespondentă normală (74). Au găsit expresia ARNm OPN în 72% dintre tumorile primare și în 60% dintre cele cu metastaze în nodulii limfatici în comparație cu mucoasa normală. Ulterior, o creștere a expresiei OPN a fost observată în paralel cu avansarea stadiului clinicopatologic.

Expresia OPN a fost asociată cu agresivitatea tumorală și metastazarea și în alte tipuri de cancer precum: astrocitoame, cancer de prostată, cancer ovarian (77, 83, 84).

Semnificația OPN în plasma pacienților cu cancer

OPN a fost detectat în plasma pacienților cu diferite tipuri de cancer: pulmonar, hepatic, mamar, și de prostată. În scopul cuantificării nivelului OPN s-a utilizat tehnica ELISA. Măsurători inițiale au determinat nivelul bazal al OPN în plasma pacienților sănătoși. Nivelul mediu al OPN a fost de 60μg/L (între 15–117 μg/L) (85). Ulterior s-au realizat măsurători în plasma pacienților cu cancer pentru a stabili o asociere între nivelul plasmatic al OPN și stadiul tumorii. Au fost luate în

studiu 70 de pacienți cu cancer mamar metastazic, nivelul mediu detectat al OPN în plasmă fiind de 142 $\mu\text{g/L}$ (între 38–1312 $\mu\text{g/L}$).

A fost analizată semnificația clinică a nivelelor OPN în plasmă, pacientele fiind împărțite în trei grupe: cu nivel OPN crescut (< 118), mediu (118–203) și scăzut (> 203). S-a observat că nivele crescute de OPN în plasmă se asociază cu o supraviețuire scurtă de aproximativ 170 zile. De asemenea, s-a remarcat că nivele crescute de OPN se asociază cu un număr crescut de focare metastazice. Acest studiu a demonstrat că un nivel crescut al OPN în plasmă poate fi asociat cu un prognostic nefavorabil pentru femeile cu cancer mamar metastazic (86).

Există studii care sugerează că OPN poate aduce informații asemănătoare pentru pacienții cu alte tipuri de cancer. În consecință, OPN are potențialul de a furniza informații clinice utile în lucrul cu pacienții care prezintă diferite tipuri de tumori.

Înțelegerea contribuțiilor fundamentale ale OPN în influențarea diferitelor tipuri celulare, este importantă în dezvoltarea unor strategii terapeutice anti-OPN. Integrinele (în special $\alpha\beta3$) sunt în prezent în studiu ca ținte ale terapiei anticanceroase și antiangiogenice, terapii anti- $\alpha\beta3$ fiind deja dezvoltate și aflate în studii clinice. Rapoartele asupra acestor încercări sunt promițătoare (87), totuși rămân multe de aflat despre utilitatea acestor compuși și căile pe care aceștia acționează. Deși aceste strategii nu sunt specifice OPN, totuși ca ligand ce se cuplează la această integrină, abordările terapeutice pot interfera cu efectele sale de intensificare a malignizării, reducând, în consecință, creșterea celulelor tumorale și metastazarea.

1. Furger K. A., Menon R. K., Tuck A. B., Bramwell V. H. C., Chambers A. F., The functional and clinical roles of osteopontin in cancer and metastasis, *Current Molecular Medicine* 2001, 1:681–632.
2. Senger D. R., Wirth D. F., Hynes R. O., Transformation-specific secreted phosphoproteins, *Nature* 1980, 286:619–621.
3. Franzen A., Heinegard D. E., Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix, *Biochem. J.*, 1985, 232:715–724.
4. Patarca R., Saavedra R., a., Cantor H., molecular and cellular basis of genetic resistance to bacterial infection: the role of the early T-lymphocyte activation-1/osteopontin gene, *Crit. Rev. Immunol.* 1993, 13:225–246.
5. Denhardt D. T., Gachelli C. M., Rittling S. R., Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2001, 41:723–749.
6. Crosby A. H., Edwards S. J., Murray J. C., Dixon M. J., Genomic organization of the human OPN gene: Exclusion of the locus from a causative role in the pathogenesis of dentinogenesis imperfecta type II, *Genomics*, 1995, 27:55–60.
7. Sodek J., Ganss, T., McKee M. D., Osteopontin., *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2000, 11:279–303.
8. Brown L. F., Berse B., Van de Water L., et al., Expression and distribution of osteopontin in human tissues: Widespread association with luminal epithelial surfaces, *Mol. Biol. Cell.*, 1992, 3:1169–1180.
9. Oates A. J., Barraclough R., Rudland P. S., The role of osteopontin in tumorigenesis and metastasis, *Invasion Metastasis*, 1997, 17:1–15.
10. O'Brian E. R., Garvin M. R., Stewart D. K., et al., Osteopontin is synthesized by macrophage, smooth muscle and endothelial cells in primary and restenotic human coronary atherosclerotic plaques, *Arterioscler. Thromb.*, 1994, 14:1648–1656.
11. Giachelli C., Pichler R., Lombardi D., et al., Osteopontin expression in angiotensin II-induced tubulointestinal nephritis, *Kidney Int.*, 1994, 45:515–524.
12. Murry C. E., Giachelli C. M., Schwartz S. M., Vracko R., Macrophages express osteopontin during repair of myocardial necrosis, *Am. J. Pathol.*, 1994, 145:1450–14620.
13. Carlson I., Tognazzi K., Manseau E. J., et al., Osteopontin is strongly expressed by histiocytes in granulomas of diverse etiology, *Lab. Invest.*, 1997, 77:103–108.
14. Katagiri Y. U., Sleeman J., Fujii H., et al., CD44 variants but no CD44s cooperate with $\beta1$ -containing integrins to permit cells to bind to osteopontin independently of arginine-glycine-aspartic acid, thereby stimulating cell motility and chemotaxis, *Cancer Res.*, 1999, 59:219–226.
15. Zohar R., Cheifetz S., McCulloch C. A., Sodek J., Analysis of intracellular osteopontin as a marker of osteoblastic cell differentiation and mesenchymal cell migration, *Eurr. J. Oral. Sci.*, 1998, 106(Suppl. 1):401–7.
16. Lin Y. H., Hang C. J., Chao J. R., Chen S. T., Lee S. F., Coupling of osteopontin and its cell surface receptor CD44 to the cell survival response elicited by interleukin-3 or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Mol. Cell. Biol.* 2000, 20:2734–2742.

17. Scatena M., Almeida M., Chaisson M. L., et al., NF- κ B mediates α v β 3 integrin-induced endothelial cell survival, *J. Cell. Biol.*, 1998, 141:1083–93.
18. Chellaiah M., Kizer N., Silva M., et al., Gelsolin deficiency blocks podosome assembly and produces increased bone mass and strength, *J. Cell Biol.*, 2000, 148:665–678.
19. Chellaiah M. A., Soga N., Swanson S., et al., Rho-A is critical for osteoclast podosome organization, motility, and bone resorption, *J. Biol. Chem.*, 2000, 275:11993–11202.
20. Denhardt D. T., Lopez C. A., Rollo E. E., et al., Osteopontin-induced modifications of cellular functions, *Ann. NY Acad. Sci.*, 1995, 760:127–142.
21. Denhardt D. T., Noda M., O'Regan A. W., et al., Osteopontin as a mean to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival, *J. Clin. Invest.*, 2001, 107:1055–1061.
22. Nasu K., Ishida T., Setoguchi M., et al., Expression of wild type and mutated rabbit osteopontin in *Escherichia coli* and their effects on adhesion and migration of P388D1 cells, *Biochem. J.*, 1995, 307:257–265.
23. Hwang S., Lopez C. A., Heck D. E., et al., Osteopontin inhibits induction of nitric oxide synthase gene expression by inflammatory mediators in mouse kidney epithelial cells, *J. Biol. Chem.*, 1994, 269:711–715.
24. Ashkar S., Weber G. F., Panoutsakopoulou V., et al., Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell mediated) immunity, *Science*, 2000, 287:860–864.
25. Denhardt, D. T., Noda, M., Osteopontin expression and function: role in bone remodeling, *J. Cell. Biochem. Suppl.*, 1998, 30–31:92–102.
26. Giachelli C. M., Lombardi D., Jhonson R. J., et al., Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo, *Amer. J. Pathol.*, 1998, 152:353–358.
27. Ophascharoensuk V., Giachelli C. M., Gordon K., et al., Obstructive uropathy in the mouse: role of osteopontin in interstitial fibrosis and apoptosis, *Kidney Intl.*, 1999, 56:571–580.
28. O'Regan, A., Berman, J. S., Osteopontin: a key cytokine in cellmediated and granulomatous inflammation. *Int. J. Exp. Pathol* 2000. 81:373–390.
29. Tian, J. Y., et al., Regulation of NO synthesis induced by inflammatory mediators in RAW264.7 cells: collagen prevents inhibition by osteopontin, *Cytokine* 2000, 12:450–457.
30. Takahashi, F., Takahashi, K., Maeda, K., Tominaga, S., and Fukuchi, Y., Osteopontin is induced by nitric oxide in RAW264.7 cells, *IUBMB Life* 2000, 49:217–221.
31. Attur, M. G., et al., Osteopontin: an intrinsic inhibitor of inflammation in cartilage, *Arthritis Rheum.* 2001, 44:578–584.
32. Butler W. T., Ridall A. L., McKee M. D., Osteopontin. In: Bilezikian J. P., Raisz L. G., Rodan G. A. (Eds.), *Principles of Bone Biology*, 1996, Academic Press, San Diego, CA, pp.167–181.
33. Denhardt D. T., Noda M., Osteopontin. In: *Principles of Bone Biology* vol. I, Second Edition, 2002, Academic Press, San Diego, CA, pp. 239–250.
34. Engleman V. W., Nickols G. A., Ross F. P., et al., A peptidomimetic antagonist of the α (v) β (3) integrin inhibits bone resorption in vitro and prevents osteoporosis in vivo, *J. Clin. Invest.*, 1997, 99:2284–2293.
35. Wanda T., McKee M. D., Steitz S., Giachelli C. M., Calcification of vascular smooth muscle cell cultures: inhibition by osteopontin, *Circ. Res.*, 1999, 84:166–178.
36. Giachelli C. A., Steitz S., Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization, *Matrix Biology*, 2000, 19:615–622.
37. Jono S., Peinado C., Giachelli C. M., Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification, *J. Biol. Chem.*, 2000, 275:20197–20203.
38. Giachelli C., Bae N., Almeida M., et al., Osteopontin is elevated during neointima formation in rats arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques, *J. Clin. Invest.*, 1993, 92:1686–1696.
39. McKee M. D., Nanci A., Khan S. R., Ultrastructural immunodetection of osteopontin and osteocalcin as major matrix components of renal calculi, *J. Bone. Min. Res.*, 1995, 10:1913–1929.
40. Kido J., Kasahara C., Ohishi K., et al., Identification of osteopontin in human dental calculus matrix, *Arch. Oral Biol.*, 1995, 40:967–972.
41. Hirota S., Asada H., Kohri K., et al., Possible role of osteopontin in deposition of calcium phosphate in human pilomatricomas, *J. Invest. Dermatol.*, 1995, 105:138–142.
42. Bellahcene A., Castronovo V., Expression of bone matrix proteins in human breast cancer: potential roles in microcalcification formation and in the genesis of bone metastases, *Bull Cancer*, 1997, 84(1):17–24.
43. Senger D. R. Perruzzi C. A., Papadopoulos A., Elevated expression of secreted phosphoprotein I (osteopontin) as a consequence of neoplastic transformation, *Anticancer Res.*, 1989, 9:1291–1299.
44. Chambers A. F., Tuck A. B., Ras-responsive genes and tumor metastasis, *Crit. Rev. Oncog.*, 1993, 4:95–114.
45. Guo X., Zhang Y. P., Mitchell D. A., et al., Identification of a ras-activated enhancer in the mouse osteopontin gene and its interaction with a putative ETS-related transcription factor whose activity correlates with the metastatic potential of the cell, *Mol. Cell. Biol.*, 1995, 15:476–487.
46. Craig A. M., Bowden G. T., Chambers A. F., et al., Secreted phosphoprotein mRNA is induced during multistage carcinogenesis in mouse skin and correlates with the metastatic potential of murine fibroblasts, *Int. J. Cancer*, 1990, 46:133–137.
47. Feng B., Rollo E. E., Denhardt D. T., OPN may facilitate metastasis by protecting cells from macrophage NO-mediated cytotoxicity, evidence from cell lines down-regulated for OPN expression by a targeted ribozyme, *Clin. Expt. Metast.*, 1995, 13:453–462.

48. Mizejewski G. J., Role of integrins in cancer: survey of expression patterns, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1999, 222:124–138.
49. Clezardin P., Recent insights into the role of integrins in cancer metastasis, *Cell. Mol. Life Sci.*, 1998, 54:541–548.
50. Orr F. W., Wang H. H., Lafrenic F. M., et al., Interactions between cancer cells and the endothelium in metastasis, *J. Pathol.*, 2000, 190:310–329.
51. Seftor R.E., Seftor E.A., Hendrix M.J., Molecular role(s) for integrins in human melanoma invasion, *Cancer Metastasis Rev.*, 1999, 18:359–375.
52. Tuck A. B., Elliot B. E., Hota C., et al., Osteopontin-induced, integrin-dependent, migration of human mammary epithelial cells involves activation of the hepatocyte growth factor receptor, *J. Cell. Biochem.*, 2000, 78:465–475.
53. Noti J. D., Adherence to osteopontin via alphavbeta3 suppresses phorbol ester-mediated apoptosis in MCF-7 breast cancer cells that overexpress protein kinase C-alpha, *Int. J. Oncol.*, 2000, 17:1237–1243.
54. Herrera-Gayol A., Jothy S., Adhesion proteins in the biology of breast cancer: Contribution of CD44, *Exp. Mol. Pathol.*, 1999, 66:149–156.
55. Wielenga V. J., van der Voort R., Tahler T. E., et al., Expression of c-Met and heparan-sulfate proteoglycan forms of CD44 in colorectal cancer, *Am. J. Pathol.*, 2000, 157:1563–1573.
56. Webb C. P., Taylor G. A., Jeffers M., et al., Evidence for a role of Met-HGF/SF during Ras-mediated tumorigenesis/metastasis, *Oncogene*, 1998, 17:2019–2025.
57. Trusolino L., Cavassa S., Angelini P., HGF/scatter factor selectively promotes cell invasion by increasing integrin avidity, *FASEB J.*, 2000, 14:1629–1640.
58. Nguyen D. H., Catling A. D., Webb D. J., Myosin light chain kinase functions downstream of Ras/ERK to promote migration of urokinase-type plasminogen activator-stimulated cells in an integrin-selective manner, *J. Cell. Biol.*, 1999, 146:149–164.
59. Tuck A. B., Arsenault D. M., O'Malley F. P., et al., Osteopontin induces increased invasiveness and plasminogen activator expression of human mammary epithelial cells, *Oncogene*, 1999, 18:4237–4246.
60. Carriero M. V., Del Vecchio S., Capozzoli M., et al., Urokinase receptor interacts with alpha(v)beta5 vitronectin receptor, promoting urokinase-dependent cell migration in breast cancer, *Cancer Res.*, 1999, 59:5307–5314.
61. Aguirre Ghiso J. A., Kovalski K., Ossowski L., Tumor dormancy induced by downregulation of urokinase receptor in human carcinoma involves integrin and MAPK signaling, *J. Cell. Biol.*, 1999, 147:89–104.
62. Teti A., Farina A. R., Villanova I., et al., Activation of MMP-2 by human GCT23 giant cell tumour cells induced by osteopontin, bone sialoprotein and GRGDSP peptides is RGD and cell shape change dependent, *Int. J. Cancer*, 1998, 77:82–93.
63. Bendeck M. P., Irvin C., Reidy M., Smooth muscle cell matrix metalloproteinase production is stimulated via alpha(v)beta(3) integrin, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2000, 20:1467–1472.
64. Liaw L., Lindner V., Schwartz S. M., et al., Osteopontin and beta1 integrin are coordinately expressed in regenerating endothelium in vivo and stimulate RGD-dependent endothelial migration in vitro, *Circ. Res.*, 1995, 77:665–672.
65. Takano S., Tsuboi K., Tomono Y., et al., Tissue factor, osteopontin, alphavbeta3 integrin expression in microvasculature of gliomas associated with vascular endothelial growth factor expression, *Br. J. Cancer*, 2000, 82:1967–1973.
66. Shijubo N., Uede T., Kon S., et al., Vascular endothelial growth factor and osteopontin in stage I lung adenocarcinoma, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1999, 160:1269–1273.
67. Denhardt D. T., Chambers A. F., Overcoming obstacles to metastasis-defenses against host defenses: OPN as a shield against attack by cytotoxic host cells, *J. Cell. Biochem.*, 1994, 56:48–51.
68. Leek R. D., Hunt N. C., Landers R. J., et al., Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in breast cancer, *J. Pathol.*, 2000, 190:430–436.
69. Fedarko N. S., Fohr B., Robey P. G., et al., Factor H binding to bone sialoprotein and OPN enables tumor cell evasion of complement-mediated attack, *J. Biol. Chem.*, 2000, 275:16666–16672.
70. Brown L. F., Papadopoulos-Sergiou A., Berse B., et al., Osteopontin expression and distribution in human carcinomas, *Am. J. Pathol.*, 1994, 145(3):610–623.
71. Chambers A. F., Wilson S. M., Kerkvliet N., et al., Osteopontin expression in lung cancer, *Lung Cancer*, 1996, 15(3):311–323.
72. Tuck A. B., O'Malley F. P., Singhal H., et al., Osteopontin expression in a group of lymph node negative breast cancer patients, *Int. J. Cancer*, 1998, 79(5):502–508.
73. Casson A. G., Wilson S. M., McCart J. A., et al., Ras mutation and expression of the ras-regulated genes osteopontin and cathepsin L in human esophageal cancer, *Int. J. Cancer*, 1997, 72(5):739–745.
74. Ue T., Yokozaki H., Kitadai Y., et al., Co-expression of osteopontin and CD44v9 in gastric cancer, *Int. J. Cancer*, 1998, 79(2):127–132.
75. Devoll R. E., Li W., Woods K. V., et al., Osteopontin (OPN) distribution in premalignant and malignant lesions of oral epithelium and expression in cell lines derived from squamous cell carcinoma of the oral cavity, *J. Oral Pathol. Med.*, 1999, 28(3):97–101.
76. Thalmann G. N., Sikes R. A., Devoll R. E., et al., Osteopontin: possible role in prostate cancer progression, *Clin. Cancer Res.*, 1999, (8):2271–2277.
77. Saitoh Y., Kuratsu J., Takeshima H., Yamamoto S., Ushio Y., Expression of osteopontin in human glioma. Its correlation with the malignancy, *Lab. Invest.*, 1995, 72(1):55–63.

78. Castronovo V., Bellahcene A., Evidence that breast cancer associated microcalcifications are mineralized malignant cells, *Int. J. Oncol.*, 1998, 12(2):305–308.

79. Maki M., Hirota S., Kaneko Y., Morohoshi T., Expression of osteopontin messenger RNA by macrophages in ovarian serous papillary cystadenocarcinoma: a possible association with calcification of psammoma bodies, *Pathol. Int.*, 2000, 50(7):531–535.

80. Hirota S., Nakajima Y., Yoshimine T., et al., Expression of bone-related protein messenger RNA in human meningiomas: possible involvement of osteopontin in development of psammoma bodies, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1995, 54(5):698–703.

81. Tunio G. M., Hirota S., Nomura S., Kitamura I., Possible relation of osteopontin to development of psammoma bodies in human papillary thyroid cancer, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 1998, 122(12):1087–1090.

82. Tuck A. B., O'Malley F. P., Singhal H., et al., Osteopontin and p53 expression are associated with tumor progression in a case of synchronous, bilateral, invasive mammary carcinoma, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 1997, 121:578–584.

83. Tozawa K., Yamada Y., Kawai N., Osteopontin expression in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia, *Urol. Int.*, 1999, 62:155–158.

84. Liapis H., Adler L. M., Wick M. R., Rader J. S., Expression of alpha(v)beta3 integrin is less frequent in ovarian epithelial tumors of low malignant potential in contrast to ovarian carcinomas, *Hum. Pathol.*, 1997, 28:443–449.

85. Bautista D. S., Saad Z., Chambers A. F., et al., Quantification of osteopontin in human plasma with an ELISA: basal levels in pre- and postmenopausal women, *Clin. Biochem.*, 1996, 29(3):231–239.

86. Singhal H., Bautista D. S., Tonkin T. S., et al., Elevated plasma osteopontin in metastatic breast cancer associated with increased tumor burden and decreased survival, *Clin. Cancer Res.*, 1997, 3(4):605–611.

87. Gutheil J. C., Campbell T. N., Pierce P. R., et al., Targeted antiangiogenic therapy for cancer using Vitaxin: a humanized monoclonal antibody to the integrin alphavbeta3, *Clin. Cancer Res.*, 2000, 6(8):3056–3061.

TENASCIN

Tenascin este unul din membrii familiei de macromolecule din matricea extracelulară (ECM), care modulează adeziunea celulelor, expresia și distribuția lui putând influența semnificativ proliferarea și migrarea celulelor. Este prezentă atât în procesul organogenezei cât și în oncogeneză.

În timpul dezvoltării proceselor, tenascin-C are un rol important în numeroase tipuri tisulare; astfel, în formarea dinților la șoareci, mRNA tenascin se exprimă tranzitoriu în timpul înmuguririi epiteliale în mezenchimul dentar și reapare mai târziu în mezenchimul papilei dentare, unde persistă în pulpa dentară, dar în odontoblaste proteina este subreglată.

Epitelul dentar induce tenascin-C în mezenchimul timpuriu, factorii de creștere TGFbeta-1 și FGF putând mima acest efect, iar FGF-4 și TGFbeta-1 stimulează expresia sa în mezenchimul dentar (E12) inducându-i câteva izoforme.

Se concludde de altfel că, izoformele proteinei se exprimă în dezvoltarea dinților la șoareci și că factorii de creștere FGF-4 și TGFbeta-1 pot acționa ca semnale epiteliale ce induc expresia în mezenchimul dentar (1).

Cu ajutorul anticorpilor anti-tenascin-C, anti-fibronectina și anti-colagen tip III s-a stabilit că toate aceste proteine matriciale există în pulpa dentară normală la om. În ariile de hialinizare se găsește numai colagen III, iar în exsudate inflamatorii nu se găsește nici una din cele trei molecule. Reacția puternică pentru tenascin și fibronectină este prezentă lângă pătura odontoblastelor. Se concludde că, în pulpa dentară inflamată cele trei molecule dispar (2). Acestea însă, joacă un rol important în reglarea diferențierii timpurii a osteoblastelor. Tenascin-C se localizează în densitățile mezenchimale ale dinților mandibulari ai embrionilor de șobolan de 14 zile. La 15 zile matricea osului reacționează și pentru colagen și fibronectină.

În tibie, tenascin-C este localizat, la 17 zile, în țesutul mezenchimal pericondral. Se constată astfel în timpul embriogenezei dinților mandibulari și tibiei, variații în apariția colagenului tip I și fibronectinei, pe lângă tenascin-C (3). Pe de altă parte, tenascin-C și metaloproteinazele (MMP) sunt implicate în remodelarea arterelor pulmonare, în sensul că induc creșterea celulelor. După 12 săptămâni de la ligaturarea arterei pulmonare stângi la cobai nou-născuți, s-au analizat modificările hemodinamice pulmonare, expresia proteinei tenascin-C și activitatea MMP de legare a Egr-1 la DNA, vizavi de martor.

Egr-1 este un factor de transcriere care activează expresia tenascin-C. De aici concluzia că, schimbări în fluxul sanguin pulmonar din micromediul neonatal, modifică comportamentul celular (4).

Tenascin-C este puternic implicată în formarea, maturarea și stabilizarea joncțiunii neuromusculare. Reinervarea ce apare după denervarea mușchiului triangular al sternului, diferă de cea de la șoarecii deficienți în tenascin-C, ca și de cea din mușchiul tip-sălbatic, creșterea axonală și stabilitatea arborelui terminal fiind afectate în mușchii lipsiti de tenascin-C. Unii axoni din mușchii mutanți cresc dincolo de țintele lor originare și reinerveaza alte locuri ce astfel pot devenii dublu inervate (5).

În timpul dezvoltării corneei, derivatele crestei neurale din mezenchimul periocular migrează în cornee, timp în care interacționează cu o varietate de proteine ale matricei extracelulare. Urmărindu-se integrinele, fibronectina și tenascin, ca și unii factori de creștere se demonstrează că interacțiunea cu fibronectina permite atașarea și diseminarea, în timp ce tenascin este anti-adeziv (6).

Șoarecii lipsiți de tenascin (TNKO) arată proliferarea redusă a celulelor mezangiale și restaurarea anormală după glomerulonefritele induse cu venin de șarpe. Transcriptele tenascin-C și PDGFR alfa și beta sunt suprareglate la șoarecii tip-sălbatic după injectarea cu venin, dar ale

șoarecilor TNKO nu sunt suprareglate. PDGFR alfa din mușchii netezi este localizat în ariile mezangiale ale actinei alfa colocalizată, dar la șoarecii TNKO receptorul nu este detectabil. Expresia mRNA și proteinei PDGFR alfa și beta în celulele mezangiale în cultură de la șoarecii TNKO este mai scăzută decât în celule provenite de la șoarecii tip-sălbatic (7).

Tenascin în sistemul nervos

Cum menționam, tenascin face parte dintr-o mare familie de glicoproteine matriciale, care se exprimă printre altele și în sistemul nervos. Astfel, tenascin-C, tenascin-R și tenascin-Y se exprimă specific în timpul dezvoltării sistemului nervos, fiind subreglate ulterior maturării. Dintre cele trei forme, tenascin-C este cel mai mult studiat deoarece se reexprimă după leziuni. De aici se sugerează rolurile specifice ale formelor de tenascin în sistemul nervos; în migrarea celulelor precursore, creșterea axonului și orientare. Tenascin-C apare într-un număr mare de izoforme generate de variația combinațiilor cu ripiturile fibronectinei tip III, care se procesează alternativ. Se susține că tenascin-C ar putea fi micromediul neuronal specific, fapt susținut de analizele animalelor tenascin C -/- care relevă disfuncții subtile ale sistemului nervos (8).

Expresia tenascin-C pe oligodendrocite este simultană cu migrarea celulelor granulare din cerebel, în timpul dezvoltării acestora, sugerând un rol al acestei proteine ca ghid pentru neuronii granulari către localizarea lor specifică. În scopul stabilirii rolului tenascin-C în reglarea cu receptorii muscarinic acetilcolinic, s-au folosit neuroni granulari cerebeloși de la șoarecii lipsiți de tenascin-C.

Expunerea la acești receptori a celulelor granulare de la șoarecii tip-sălbatic sau de la cei lipsiți de tenascin-C, duce la sechestrarea normală la suprafața celulelor a acestora. Incubarea acestor celule cu stabilizatorul taxol din microtubuli restaurează la nivele normale reglarea scăzută a tuturor acestor receptori. Se demonstrează astfel, reglarea de către tenascin-C a dezvoltării cerebelului (9).

Tenascin-C reglează proliferarea și migrarea oligodendrocitelor precursori în timpul dezvoltării. Astfel, șoarecii lipsiți de tenascin-C arată o rată scăzută a migrării precursorilor oligodendrocitelor de-a lungul nervului optic și rate reduse ale proliferării acestora în diferite regiuni ale sistemului nervos. Nivelele apoptotice sunt reduse în stadiile târzii ale melanizării celulelor oferind un mecanism corectiv potențial pentru orice reducere a numărului celulelor care rezultă din fenotipul proliferativ. Efectele asupra proliferării celulelor sunt mediate de integrinele alfa beta 3 și de o cale mitogenică stimulată de PDGF, ceea ce subliniază importanța matricei sistemului nervos central în interacțiunea cu factorii de creștere, în reglarea comportării proceselor neuronale (10).

Dezvoltarea astrocitelor în creierul de rozătoare apare după finalizarea neurogenezei.

Tenascin-C derivă din astroglie, expresia ei constatându-se în zona ventriculară germinativă a creierului embrionar, așa că poate fi un marker al precursorilor astrogliali.

Astrocitele tenascin-C pozitive din zona ventriculară încep să migreze radier din ziua a 15-a embrionară (E15). Celule tenascin-C pozitive din cortex și subcortex sunt diferențiate înainte de E17. Modelul migrării astrocitelor către ariile corticale și subcorticale se coreleză astfel, cu un aranjament radier al nevroglii. Aceste celule tenascin-C pozitive reprezintă un nou subset de precursori astrogliali care apar din zona ventriculară, iar astrogliogeneza din acești precursori este, de asemenea, timpurie în neurogeneza embrionară (11). De asemenea, tenascin-C se exprimă ca semnal timpuriu și tranzitoriu în recunoașterea țintei pentru fibrele aferente selective. Expresia sa dispare din neuronii pituitari melanotrofici și hipotalamici după stabilirea contactelor neuronale. Concomitent, melanotrofii devin imunoreactivi pentru laminina cu lanțul izoformei beta2. Semnalul lamininei pare implicat în inducția diferențierii sinaptice, selectiv cu fibrele ce conțin dopamina și GABA, asemenea celor ce inervează melanotrofele in situ (12).

Șoarecii transgenici R6/2 care exprimă primul exon al genei ce induce boala umană Huntington conțin frecvent tenascin-C în neuronii cortexului și talamici. Pierderea expresiei sale începe între săptămânile a patra și a opta postnatal, ceea ce coincide cu apariția fenotipului de comportare anormală

și cu apariția incluziilor intranucleare. La 12 săptămâni, acești șoareci transgenici arată absența totală a tenascin-C în regiunea talamusului dorsal. Pierderea expresiei sale în neuroni include structuri ale căror proiecții axonale excitatorii converg către putamenul caudal, fiind de cel mai mare risc pentru neurodegenerare de tip Huntington. Expresia alterată a tenascin-C în neuroni la șoarecii R6/2 implică activități transcripționale alterate ale proteinei mutante Huntington (13).

Proteine tenascin -R în sistemul nervos

În sistemul nervos central, tenascin-R este exprimat principalmente în oligodendrocite și în tractusuri. Izoforma de 160kD este principalul component al tenascin R în membranele mielinice, ca un dimer ce se degradează în monomeri majori de 125 și 80kD în absența inhibitorilor proteazei. Ionii de calciu determină disocierea tenascin-R pe când cei ai zincului și cuprului o blochează.

Se concludă că ionii metalici bivalenți stabilizează asocierea receptorului tenascin cu proteazele endogene, sugerând implicarea receptorului tenascin derivat din mielină în inhibarea creșterii axonului și în afecțiunile demielinizante (14).

Tenascin-R, glicoproteină matriceală este implicat în timpul dezvoltării și regenerării sistemului nervos central, într-o varietate de interacțiuni celulă-matrice, în controlul creșterii axonului, în mielinizare și în adeziunea celulelor la fibronectină; cel provenit din creier de șoarece adult exprimă condroitin sulfat, glicozoaminoglicani (GAG-precum C-65 și C-4S) recunoscuți de anticorpi monoclonali 473HD și CS-56 specifici CS/dermatan sulfat. CS GAG legat la tenascin-R este implicat în interacțiunea cu locurile ce cuplează heparina, răspunde de inhibarea mediată de tenascin-R a adeziunii celulare la un fragment de 33-36kb, de fibronectină, fragment ce cuplează heparina sau peptidele fibronectin-C/HI și FN-C/HII, care participă la cuplarea fibronectinei la proteoglicani de la suprafața celulelor și, de asemenea, contribuie parțial la interacțiunea dintre tenascin-R și tenascin-C; deși nu duce la o interferență cu inhibarea mediată de cele două forme a creșterii axonilor când aceste două molecule sunt oferite ca substrat mixt în cultură.

Se sugerează că implicarea funcțională a CS GAG legate la tenascin în interacțiunea matricei cu fibronectin și tenascin-C contribuie la modularea comportării celulelor și la organizarea macromoleculor componentelor matricei în dezvoltarea sau în injuria sistemului nervos central adult (15).

În premieră, se arată că tenascin-R și mai ales izoforma sa de 16kD este exprimată tranzitoriu și în sistemul nervos periferic, respectiv nervul sciatic al embrionului târziu (E14-E18) și la șoarecii nou născuți, iar în stadiile și mai târzii de dezvoltare, mRNA și proteina sunt subreglate. In vitro, tenascin-R se exprimă în neuronii nediferențiați și în cei diferențiați de PC-12 ca și în celulele Schwann L1+, dar nu în alți neuroni sau celule non-neuronale provenite din embrioni E17/18. În dezvoltarea sistemului nervos periferic, expresia tenascin-R se corelează în timpul înervării musculaturii scheletice, cu creșterea axonilor și migrarea celulelor Schwann (16).

Prin urmare, matricea extracelulară care este o rețea de macromolecule de glicoproteine precum tenascin-R, polizaharide și condroitin-sulfat proteoglicani, este esențială pentru constituirea unor cuiburi perineuronale. Șoarecii mutanți deficienți în tenascin-R arată o reducere de două ori a posibilităților de transmitere neuronală, comparativ cu șoarecii de tip-sălbatic. Aceiași reducere se constată și la șoarecii de tip-sălbatic care au fost pretratați două ore cu condroitinază ABC, care elimină complet condeoitin sulfatul din matrice. Tenascin-R și condroitin sulfat proteoglican modulează diferențiat diversele forme ale plasticității sinaptice, sugerând implicarea lor în mecanisme diferite. Tenascin-R nu se detectează în toate fantele sinaptice, dar este amplu prezent în fasciculul de axoni, în ariile de contact axon-astrocit și în joncțiunile gap astrocitare (17, 18).

După o leziune traumatică a măduvei spinării, tenascin-R este semnificativ subreglat în prima zi și normalizat după trei săptămâni, iar tenascin J1 declină în 3 zile la cel mai scăzut nivel și revine la nivelul inițial tot după trei săptămâni. Densitatea macrofagelor atinge maximum la trei zile după injurie și pare a se corela invers cu nivelul mRNA tenascin-R. Deci, tenascin-R neuronal poate modula adeziunea celulelor inflamatorii (19).

Tenascin -X

Tenascin X este o proteină a matricei extracelulare, abundentă în mușchi și miocard dar se exprimă și în fibroblaste în cultură. Regiunea promotor a genei tenascin-X de șoarece are două locuri adiacente de inițiere a transcrierii de 68 și 67 p.b. amonte de exonul 5'-netranslatant. Transfecția tranzitorie a limfocitelor 293 T cu ajutorul constructelor reporter cu luciferază a stabilit că regiunea (-144 - -136) conține factorul de transcriere ce cuplează Sp1, care contribuie la expresia genei. Mutațiile direcționate pe acest loc ce cuplează Sp1 anulează transcrierea. Extractul nuclear din celule arată ca se formează un complex distinct Sp1-DNA la elementele care cuplează Sp1. Se demonstrează astfel că, Sp1 joacă un rol critic în expresia genei tenascin-X la șoarece (20).

S-a lezat gena tenascin X în celulele stem embrionare de șoarece, prin recombinare omoloagă și s-au creat șoareci deficienți în proteina tenascin-X, șoareci mutați care nu arată defecțiuni în viața adultă. Inoculându-se subcutan melanom linia B16-BL6 înalt invazivă și metastazantă, ei dezvoltă tumori în 30 de zile, de 1,2 mai mari decât șoarecii de tip sălbatic, iar invazia și metastazarea cresc până la 6,8 ori față de tipul-sălbatic. Analiza altor componente din matricea extracelulară arată că la șoarecii deficienți în tenascin X (TNX -/-) cresc nivelele de metaloproteineze. MMP2 și MMP9 induc scăderea nivelelor de laminină, sub ½ față de nivelul de la animalele de tip-sălbatic. Se concluează că deficiența de tenascin X ar putea facilita invazia și metastazarea celulelor melanomului, prin creșterea metaloproteinelor și degradarea lamininei și că, prezența ei ar împiedica însă metastazarea celulelor tumorale (21).

Absența proteinei tenascin X duce la alterarea proprietăților mecanice ale țesutului conjunctiv din matrice. Din extractele de piele de bovine o moleculă de 100 kD interacționează cu tenascin-X și poate fi abolită când preparatul este digerat cu condroitinază. Se demonstrează astfel că, lanțurile dermatan sulfat ale decorinului cuplează la locul de legare a heparinei inclus în domeniile 10, 11, ale tenascin X, tip fibronectină tip III. Se postulează că asocierea tenascin-X cu fibrilele de colagen este mediata de decorin și contribuie la integritatea rețelei extracelulare (22).

S-a identificat astfel o structură conformațională de cuplare, care implică module fibronectin tip III pentru heparină. În tenascin-X la bovine, receptorii de la suprafața celulelor cu heparan sulfat pot interacționa cu domeniile 10 și 11 ale proteinelor de cuplare, sugerând că tenascin-X poate activa diferite semnale pentru reglarea competenței celulare (23).

Tenascin-X se cuplează la factorii de creștere endoteliali A și B (VEGFA și VEGFB) inducând sinteza DNA în celulele endoteliale via semnalele de creștere induse de aceștia. Laolaltă cu membrii familiei VEGF, tenascin-X joacă un rol important în controlul proliferării celulelor endoteliale in vivo, fapt confirmat prin acțiunea lui VEGF-A asupra explantelor de inimă de embrion de șoarece ce conține sau nu tenascin-X (24).

Tenascin Y este omologul aviar al tenascin-X și se concentrează în porțiunea proximală a nervilor periferici la pui. În culturile îmbogățite cu celule Schwann se demonstrează că tenascin Y recombinat are efecte dependente de doză, asupra atașării, diseminării și migrării celulelor gliale. Se concluează că, proprietățile sale in vitro demonstrează rolul său inhibitor asupra migrării celulelor gliale și regenerării căilor nervoase senzoriale (25).

Deficiența tenascin-X la om se asociază cu sindromul Ehlers-Danlos, afecțiune generalizată a țesutului conjunctiv, rezultată în urma metabolismului alterat al fibrelor de colagen. Pielea șoarecilor lipsiți de gena tenascin-Xb este în general normală histologic, dar conținutul ei în colagen este semnificativ redus. Electronomicroscopic, fibrele de colagen sunt normale ca formă și dimensiuni, dar densitatea lor este redusă proporțional cu reducerea conținutului în colagen. Fibroblastele lipsite de gena tenascin-Xb nu depozitează colagen tip I în matricea extracelulară. Se susține că proteina este un reglator esențial al depunerii de colagen de către fibroblastele dermale (26).

Tenascin în angiogeneză

În condiții patologice ale sistemului nervos central de la om (neoplazie, infecție, ischemie, traume) se produc fenomene de angiogeneză (neovascularizare). Suprareglarea VEGF/VPF și a tenascin-C este legată spațial și temporal de neurovascularizare, deoarece cele două proteine nu sunt detectabile în ariile normale ale creierului. În momentul stopării neovascularizării, VEGF și tenascin-C nu mai sunt detectabile (27).

Terapia prin iradiere a tegumentului uman determină expresia proteinei tenascin și angiogeneză. Expresia crescută a proteinei s-ar putea datora activării unor citochine ca rezultat al iradierii. Pe de altă parte, creșterea angiogenezei s-ar datora necesității reparării vaselor lezate de radiații, prin intermediul factorilor angiogeneici. În cazul cancerului mamar sau tegumentar, în tegumentul iradiat expresia tenascin se corelează cu neurovascularizarea (28).

Izoformele tenascin-C sunt exprimate în sistemul vascular într-o manieră reglată, remodelarea peretelui vascular făcându-se cu celule musculare netede care migrază în zonele lezate ale vaselor. Astfel, tenascin-C în asocieră cu forme ale fibonectinei de tip III stimulează chemotaxisul celulelor musculare netede din carotida de șobolan lezată (29).

Tenascin în relațiile cu alte molecule din complexul matricei extracelulare

În relațiile cu alte molecule din matricea extracelulară, tenascin are funcții importante privind adeziunea celulă-celulă și celulă-matrice, diferențierea celulară și deplasarea celulelor în migrație. În membranele bazale pure, intacte, izolate din foliculii preovarieni de la pui s-au detectat cu anticorpi monoclonali și policlonali, numeroase proteine printre care laminina, entactin (nidogen), tenascin, proteoglican heparan sulfat, osteonectin și collagen tip IV. Aceste proteine au reacționat, de asemenea, încrucișat cu anticorpi anti-EGF, bFGF, AA-PDGF, TGF alfa, TGF-beta (beta2, beta5), IGF-I și II. Similar, și anticorpii-IGF-like, factor de legare -2, -3, -4, -5, -6 și -7 reacționează cu membrana bazală. În plus, anticorpii anti-metaloproteinazele matriciale-1, 2, 3, 4, 8, 9 și 13 au dat reacții pozitive cu membrana bazală, ca și anticorpii care recunosc IL-3, GM-CSF și IFN-gamma. Prin urmare, membrana bazală a foliculilor ovarieni este un depozit și sursă de molecule active biologic cum sunt factorii de creștere, proteinele care cuplează factori de creștere, citochinele, metaloproteinazele matriciale și moleculele tip matricial. Se concludă că, factorii de creștere ar putea exercita efecte majore asupra comportării și funcțiilor celulelor ovariene, iar enzimele ar putea participa la remodelarea țesutului în timpul dezvoltării foliculilor (30).

Tenascin-C și izoformele sale sunt proteine ale matricei extracelulare implicate, printre altele, în reglarea interacțiunii stromă-epiteliu. Unele interacțiuni între tenascin-C și celule sunt mediate de integrine. Astfel, în rănile bucale prezente timp de trei zile se constată că imunoreactivitatea pentru integrina alfa9 este localizată în celulele epiteliale migrate la baza rănii. Izoformele de greutate moleculară mare- tenascin-C și tenascin-C (L) apar localizate în matricea dintre celulele epiteliale care exprimă ulterior integrina alfa9. Paralel cu scăderea reglării graduale a imunoreactivității integrinei alfa9, în rana de 7 zile, expresia integrinei alfabeta 6 este indusă numai temporar. Colocalizarea imunoreactivității integrinei alfa6 se constată în același arii cu tenascin-C și tenascin-C(L). La contactele celulă-celulă din păturile bazale și suprabazale ale epitelului rănii se constată colocalizarea imunoreactivității integrinei alfa6.

În timpul formării țesutului de granulație și a reorganizării epitelului între 7 și 28 de zile după rănire, cele două proteine apar abundent în țesutul de granulație. Tenascin-C (L) este exprimată sub epitelul migrator și în țesutul de granulație în timpul reparării rănii. Pe de altă parte, localizarea preferențială în epiteliu după închiderea rănii a integrinei alfa9 și alfabeta6 sugerează diversele funcții ale acestora în repararea rănii (31).

Diversele forme ale tenascin compun o familie de glicoproteine din matricea extracelulară, care formează cu alte molecule matriciale complexe spațiale în organogeneză, îndeosebi în relația

dintre epitelii și mezenchim. În special în intestinul subțire și în mucoasa colonului la adult, dar și în neoplazii, tenascin-C se exprimă diferențiat în timpul dezvoltării acestor segmente ale tubului digestiv. Tenascin-C apare astfel ca un element cheie în dezvoltarea mucoasei intestinale și în menținerea neoplaziei, dar rolul lui în reglarea funcțională nu este încă elucidat (32).

Diferențierea celulelor epiteliale mamare depinde de hormonii lactogeni, de factorii de creștere și de interacțiunea celulă-celulă și celulă-substrat, toate acestea modulând factorii de transcriere esențiali pentru expresia genei proteinelor din lapte. Familia proteinelor care cuplează CCAAT/enhancer (C/EBP) și Stat5 (semnal de transducție și activator transcripțional) este implicată în creșterea și diferențierea celulelor epiteliale mamare. Urmărindu-se efectele componentelor matricei extracelulare și ale hormonilor lactogeni asupra activității EBP și Stat5, s-a constatat că în glandele mamare, tenascin se exprimă îndeosebi în timpul embriogenezei și carcinogenezei, iar în cultură celulară scade expresia beta-azeinei. În celulele mamare HC11, tenascin dar nu laminina sau fibronectina, determină scăderea specifică a nivelului proteinelor C/EBPalfa fără efect însă, pe cantitatea de Stat5 și pe activitatea de cuplare DNA. De asemenea, glucocorticoizii, prolactina și insulina nu au efect asupra nivelului acestei proteinei, ca și asupra proteinei C/EBPbeta. Astfel, tenascin și hormonii lactogeni intervin în reglarea activității celulelor epitelului mamar (33).

Tenascin-C în patologia cardiovasculară

Glicoproteina tenascin-C este multifuncțională fiind implicată în proliferarea, migrarea și diferențierea celulelor și implicit în patologia stenozelor valvelor aortice umane. S-au analizat 55 valvule tricuspide și valvule stenozate fără cauză reumatismală, de la pacienți cu valvulele înlocuite și 4 valvule normale de la decedați din diverse traume. S-a folosit un anticorp monoclonal anti-tenascin-C (143DB7).

În valvulele normale expresia tenascin-C se asociază cu membrana bazală pe care stau celulele endoteliale, în timp ce la valvulele stenozate nu se exprimă; uneori însă, imunoreactivitatea se constată în părțile mai profunde ale valvulelor, când se asociază cu caracteristicile tipice ale proceselor de stenoză și cu creșterea sarcinii mecanice cauzată de hipertensiune.

Se concludă că, supraexpresia tenascin-C în valvulele aortice stenozate umane, induce o boală activă, mai curând decât un proces degenerativ (34).

Dacă tenascin-C se găsește în os și placa aterosclerotică, iar MMP-2 din matrice este interdependentă de tenascin-C în celulele musculare netede vasculare, se presupune că cele două proteine sunt implicate în patologia stenozei aortice calcificate la om. În acest caz se produce depozitarea masivă a tenascin-C și MMP-2 și activarea lor, ca și activitatea gelatinolitică a celei din urmă. În câteva valvule cuspidale necalcificate s-au constatat cantități mici de tenascin-C, dar niciodată MMP-2 și AP.

În progresia procesului calcifierii are loc inițial acumularea de tenascin-C și ulterior de MMP-2. Prezența lor reziduală în calcifierile severe este indiciul implicării lor în patogeneza (35).

Depozitarea proteinelor matriciale este o cauză majoră a restenozării vasculare după angioplastie coronară percutantă. Depozitarea tenascin-C crește tranzitoriu într-o lună după intervenție, când migrarea și proliferarea celulelor musculare netede este activă. După dispariția proteinei, acumularea de anticorpi PCL-M / versican crește atingând maxima între 1–3 luni când restenozarea clinică progresează cel mai activ.

Se concludă că, proteinele matriciale din leziunile restenotice ale coronarei se schimbă secvențial după angioplastie și de asemenea că, tenascin-C ar putea fi molecula cheie în stadiile timpurii ale procesului (36).

Tenascin-C modulează adeziunea cardiomiocitelor la matricea extracelulară în timpul remodelării țesutului după infarctul miocardic. După 24 de ore de la ligaturarea coronarei la șobolani, fibroblastele interstițiale de la marginea zonei infarctate exprimă un RNA tenascin-C. Unele celule ce produc proteina sunt imunoreactive pentru actina-alfa din mușchiul neted. În cultură, tenascin-C

crește numărul cardiomiocitelor atașate la lamină, dar inhibă formarea contactelor focale. În timpul fazei acute postinfarctante, celulele interstițiale de la marginea zonei sintetizează tenascin-C, care poate pierde adeziunea puternică a cardiomiocitelor supraviețuitoare la țesutul conjunctiv facilitând astfel reorganizarea țesutului (37).

În coarda tendinoasă a cuspidelor anterioare a mușchiului papilar din ventriculul stâng s-a stabilit că subiecții de 80–90 de ani au o acumulare de tenascin-C și colagen tip I și III spre deosebire de cantitatea prezentă la un grup de subiecți de 20 ani. Distribuția și conținutul acestor schimbări sunt legate de schimbările în performanța mecanică a mușchiului cardiac, vizavi de vârstă (38).

Tenascin și cancerul

În diferite neoplazii și alte procese patologice tenascin-C este suprareglată. Feocromocitomul este o tumoră rară a sistemului simpato adrenal a cărei malignizare este imposibil de prevăzut, deoarece nu s-au raportat markeri histologici sau chimici pentru a defini malignitatea lor, cu excepția faptului că metastazează.

Medula adrenală normală este tenascin negativă iar între tumora malignă și benignă există strictă diferență. Tumorile maligne sunt însă, puternic sau moderat tenascin imunopozitive, iar cele benigne (70%) sunt foarte puțin sau deloc imunopozitive.

La 46% din tumori, considerate tumori de graniță, colorația țesutului este fie marcată fie moderată. Paraganglioamele sunt mai heterogen colorate și fără diferențe semnificative între cele maligne și benigne. S-a demonstrat astfel, în premieră, expresia tenascin în feocromocitoame, îndeosebi în cele maligne, sugerându-se că proteina poate fi asociată cu transformarea malignă și metastazarea acestor tumori, reprezentând astfel un marker în stadiul lor agresiv (39).

Tenascin în gliom. Componentele stromale ale matricei extracelulare se crede că joacă un rol important în reglarea invazivă a gliomelor umane. Macrofagele și microglia pot influența puternic integritatea compartimentului extracelular al acestor tumori. Matricea extracelulară poate juca un rol cheie în reglarea migrării celulelor tumorale, macrofagelor și celulelor gliale.

S-au analizat 46 glioblastoame, 19 gliome anaplastice, 22 gliome de grad scăzut și 3 astrocitoame. S-au identificat ariile tenascin perinecrotice ale glioblastoamelor iar tenascin interstițial s-a exprimat mai radical la distanță de necroză și în matricea extracelulară din gliomele anaplastice și de grad scăzut. Colorațiile cu anticorpi anti-CD68 și anti-tenascin relevă că densitatea macrofage-microgliei este semnificativ mai înaltă în ariile tenascin pozitive ale majorității glioblastoamelor și gliomelor anaplastice. Se concludă că, tenascin poate juca un rol crucial în reglarea traficului celulelor liniei monocitice în gliomele umane (40).

O izoformă particulară de tenascin-C de tip III ripit C este tipic asociată cu vasele gliomelor anaplastice fiind un marker al proliferării vasculare în leziunile țesutului cerebral. Acumularea totală a tenascin-C se găsește în pereții vasculari și în cavernoame. Anticorpii pentru fragmentul tenascin-11 se evidențiază în cavernoame și în vasele din substanța albă din jurul leziunii, dar nu în probele de control. De aici, concluzia că distribuția izoformei tip III ripit-C reprezintă un marker al proliferării vasculare din cavernoamele cerebrale și în acord cu ipoteza unei potențiale creșteri a acestora (41).

Detectarea imunohistochimică a expresiei tenascin-C în 86 gliome demonstrează că proteina crește odată cu malignitatea. În toate tumorile expresia este evidențiată în jurul vaselor care hrănesc tumora. În prezența anticorpului anti-tenascin-C proliferarea este inhibată 30% în toate culturile de celule de glioblastom și, de asemenea, se constată o scădere a migrării celulelor. Concluzia este că, izoformele endogene de tenascin-C din gliom suportă atât proliferarea, cât și migrarea celulelor tumorale, sugerându-se că proteina poate fi un potențial marker de prognostic pentru recurența mai timpurie a tumorii (42).

Tenascin în fibroză. În ficatul normal și fibrotic de la șobolan s-a urmărit expresia tenascin-C. Fibroza hepatică indusă la șobolan de CC14 presupune 3 stadii: stadiul injuriei hepatice (4 săptămâni), stadiul timpuriu (8 săptămâni) și stadiul târziu (12 săptămâni).

În țesutul hepatic normal, tenascin se colorează slab imunohistochimic, iar în primele două stadii de fibrozare, semnalul pentru mRNA și imunocolorarea sa sunt semnificativ crescute. În stadiul târziu al fibrozării, tenascin scade comparativ cu primele două stadii. Prin urmare, tenascin C este un component al matricei țesutului hepatic cu rol în organizarea timpurie a acesteia în timpul fibrogenzei ficatului (43).

Prezența tenascin în dermatofibrosarcomatom și dermatofibrom este dificil de stabilit; folosind anticorpi anti-tenascin s-a stabilit totuși, că proteina se găsește la joncțiunea dermo-epidermică ce acoperă leziunile dermatofibroamelor, dar nu în cele ale dermatofibrosarcomatoamelor (44).

Tenascin-C, glicoproteina oligomerică a matricei extracelulare are proprietăți atât adezive cât și antiadezive pentru celule. Variantele sale majore procesate sunt de 320 și respectiv 220 kD. Proteina se exprimă marcat în embriogeneză, vindecarea rănilor și în tumorogeneză, fiind colocalizată cu fibronectina în procesele de adezivitate celulară.

Linia JJO12 de condrosarcom deține varianta de 220 kD, care cuplează la fibronectină, în timp ce varianta de 320 kD nu cuplează. Varianta de 220 kD scade adezivitatea pentru celule când cuplează la fibronectină, dar contribuie la adezivitate când se cuplează la plastic pe pereții acoperiți cu fibronectină. Se concluzionează, că izoformele mici de tenascin-C intervin structural și în adezivitate, iar izoformele mari se exprimă preferențial în țesuturile maligne intervenind astfel în mobilitatea celulară și metastaze. Evoluția gradată a tumorii este marcată de prezența izoformelor mari sau mici de tenascin-C și astfel poate fi un factor de prognoză sugerând și tentative terapeutice pentru aceste malignități (45, 46).

Tenascin-C s-a detectat și în 33 de cazuri de osteosarcom primar, expresia sa dovedindu-se mai înaltă în metastaze. In vitro, proteina suplimentară induce migrarea mai facilă a celulelor MOS de osteosarcom, de unde sugestia că ea facilitează atât migrarea cât și metastazarea celulelor (47).

Tenascin în fibroza și cancerul pulmonar. Considerată ca o moleculă indispensabilă în organogeneză, tenascin-C se exprimă activ și în procesele de fibrozare și neoplazice pulmonare. Expresia sa crește în plămâni de nou-născuți cu sindrom de insuficiență respiratorie, dar și la copiii cu displazie bronhopulmonară. În plămâni normali expresia tenascin-C este scăzută lângă epiteliul alveolar și bronhoalveolar (+), moderată în intima venelor (+ +) și puternică în jurul condrocitelor (+ + +). Pacienții care au supraviețuit insuficienței respiratorii arată expresia puternică a tenascin-C în peretele alveolelor pulmonare. Expresia crescută a mRNA tenascin-C este evidentă sub epiteliul alveolar și bronhoalveolar în cazurile de insuficiență respiratorie și displazie bronhopulmonară, cazuri în care celulele sunt imunoreactive la actina alfa din mușchii netezi, sugerând un fenotip fibroblastic.

În cele două maladii menționate, tenascin-C se exprimă la nivele înalte în pereții alveolari și bronhiolari având rol determinant (48). În plămâni, proteina se exprimă în focare de leziuni recente ale mugurilor fibrotici încorporați sau intraluminali. Celulele care exprimă mRNA tenascin sunt localizate în și sub epiteliul nou format. Celulele de sub epiteliu sunt puternic pozitive pentru citocheratină regenerând astfel pneumocitele tip II, în timp ce celulele noului epiteliu format sunt puternic pozitive pentru actina alfa din mușchii netezi și aparent, pentru miofibroblaste. În miofibroblaste expresia mRNA tenascin este mai puternică și mai radicală decât în pneumocitele tip II. Expresia slabă a mRNA tenascin s-a constatat în epiteliu bronhiolar de tip metaplazic și în macrofagele alveolare. S-a concluzionat, că proteina este sintetizată activ în leziunile fibrotice timpurii în caz de injurii pulmonare interstițiale. Interacțiunea dintre epiteliu și țesutul conjunctiv subiacent joacă un rol semnificativ în sinteza proteinei, miofibroblastele fiind de asemenea, principalii responsabili de sinteza ei în focarele fibroblastice (49).

În recurența cancerului pulmonar cu celule mari se susține că degradarea tenascin-C este un marker pentru potențialul de recidivă a bolii în stadiul 1 și că metaloproteinaza-2 (MMP-2) poate fi proteaza care reduce tenascin-C în cancerul puomonar (50). De asemenea, expresia crescută a

proteinei este asociată și cu hipertensiunea pulmonară. În cultură de celule musculare netede, tenascin-C este indusă de metaloproteinazele matricei extracelulare amplificând răspunsul proliferativ la factorii de creștere. Dimpotrivă, supresia proteinei duce la apoptoza celulelor musculare netede. S-a demonstrat că arterele pulmonare în cultură, de la șobolan se hipertrofiază progresiv în asociere cu proliferarea celulelor, iar acumularea matricei poate fi regresată prin inhibarea serin-elastazelor sau de către metaloproteinaze. Acest efect este asociat cu reducerea proteinei, cu supresia proliferării celulelor musculare netede și cu inducția apoptozei. Represia selectivă a tenascin prin transfectarea de constructe antisens/ribosomi induce apoptoza celulelor musculare netede și oprirea progresivă a îngroșării vaselor, dar nu induce regresia. Se sugerează că, inhibarea proteinazei reprezintă o nouă strategie de a reduce progresia bolii vasculare (51).

Tenascin și cancerul mamar. Pierderea morfologiei epiteliale și achiziția de caractere mezenchimale sunt tipice pentru celulele carcinomatoase în timpul progresiei tumorale. În celulele carcinomului mamar uman, se constată o suprareglare a tenascin-C și vimentin, strict corelându-se cu malignitatea crescută. Este astfel posibil, ca cele două proteine să contribuie la transformarea epitelială – mezenchimală a celulelor canceroase. În 128 de cazuri de cancer mamar s-a demonstrat că celulele sunt o sursă masivă de tenascin-C și vimentin.

Tenascin-C se corelează pozitiv cu supraexpresia oncoproteinei v-erb-2 și cu suprareglarea receptorului estrogenului.

Coexpresia tenascin-C cu vimentin se evidențiază în liniile HS 578T, SK-BR-3(B) de carcinosarcom, în celulele MDA-MB-231 fibroblast-like și în linia HBL-100 de celule mioepiteliale. În concluzie, se subliniază că tenascin-C și vimentin când se coexprimă în celulele carcinomului mamar reprezintă gene relativ implicate în tranziția epitelialo-mezenchimală în timpul carcinogenezei mamare (52).

Tumorile mamare sunt cele mai comune la câinii femele și pot prezenta în procesul transformării, un model histologic complex cu participarea celulelor epiteliale și fusiforme. O trăsătură frecventă a acestor tumori este metaplazia condroidă sau osoasă a matricei, care apare dominant în ariile celulelor fusiforme proliferante, de origine mioepitelială. În 186 probe de țesut mamar tenascin-C este prezent, expresia sa crescând în remodelare și în leziunile neoplazice; mai marcată apare membrana bazală ca și țesutul stromal din leziunile neoplazice. Matricea este pozitivă în carcinomul anaplastic ca și în ariile proliferative ale celulelor fusiforme.

Expresia tenascin-C în matrice este, de asemenea, abundentă în ariile inițiale metaplastice condroide cu extindere variabilă aproape în toate insulele de cartilaj din tumorile mixte. În ariile secretorii bine diferențiate apar pozitive numai granulele apicale din celulele laminale sugerând un model specific al expresiei tenascin-C în timpul diferențierii secretorii. Deși se sugerează că proteina nu poate fi folosită ca marker al transformării sau malignității în oncologia mamară canină, este clar că această moleculă joacă un rol important în proliferarea și diferențierea acestor tumori (53).

Tenascin și carcinomul colorectal. În variate carcinoame s-a raportat supraexpresia lui anexin II, o proteină care cuplează fosfolipide dependent de calciu. Unul din liganzii săi este tenascin-C, cu calitate antiadezive și considerat marker de prognostic pentru câteva carcinoame. Anexin II se exprimă în linii de carcinom de colon uman, fără însă să existe o corelație între nivelul expresiei lui și puterea de metastazare a acestor linii celulare. În 29,5% din cazuri se observă supraexpresia lui anexin II iar în 49,5%, a tenascin-C. Supraexpresia anexin II se corelează semnificativ cu dimensiunea tumorii, pe când a tenascin-C, cu profunzimea invaziei în vene și cu metastazarea ganglionilor. Coexpresia celor două proteine nu prognozează letalitatea în carcinomul colorectal, deși se poate aprecia că supraexpresia lor în carcinomul avansat de colon se poate corela cu metastazarea tumorilor (54).

În zonele de sub membrana bazală și în țesutul conjunctiv nou format din tumora primară, ca și în țesutul din jurul sinusurilor hepatice de la 30 pacienți cu cancer colorectal, tenascin-C apare pozitiv. Comparativ cu tumorile slab diferențiate, imunoreactivitatea din zonele de sub membrana bazală a glandelor din tumorile avansate sau moderat diferențiate se exprimă mai intens. Depozitarea

tenascin în jurul sinusoidelor hepatice și celulelor tumorale are efect în metastazare și este mai pronunțată la pacienții cu tumori avansate (55).

Activitatea limfocitelor T ar putea fi afectată în mediul tumoral, de imunosupresia indusă de tumoră. Proteina tenascin-C este înalt exprimată în tumori, unde inhibă *in vitro* activarea limfocitelor T, dar se presupune că poate contribui și la imunosupresia tumorilor *in vivo*. S-a identificat o regiune minimală a proteinei și anume domeniul fibonectină-tip III (TNFnIII A-D) care inhibă marcat activarea timpurie și târzie a limfocitelor. Prin urmare, tenascin-C de lungime deplină, care conține această regiune, supresează activitatea limfocitelor T, iar moleculele care nu dețin acest domeniu nu au acest efect. S-au identificat molecule TNFnIII A1A2 care reprezintă regiunea minimă ce inactivează limfocitele, însă inhibarea îndelungată reclamă prezența proteinei tenascin-C în domeniul TNFnIII A3 (56).

Progresia neoplaziilor maligne este însoțită de alterarea compoziției matricei extracelulare. În cancerul laringian în stadiul inițial al creșterii tumorii, se remarcă o producție marcat amplificată de tenascin în interfaza tumoră-gază. În stadiile mai târzii ale progresiei tumorii sunt, de asemenea, puternic marcate un număr apreciabil de vase de sânge din țesutul tumoral, în jurul cărora sunt prezente numeroase celule tumorale proliferante. Din contră, în cancerul hipofaringian, tenascin este marcat evidențiat în fazele timpurii de evoluție a tumorii. În ambele tipuri de cancer, suprareglarea proteinei se corelează puternic cu apariția metastazelor, cu recurență timpurie a tumorii și cu sfârșit letal. Datele imunohistochimice arată că acumularea proteinei tenascin în vasele de sânge tumorale reprezintă un prognostic sumbru pentru cele două tipuri de cancer (57).

Creșterea expresiei tenascin-C s-a observat în țesuturi patologice în care apare angiogeneza. La 10 pacienți cu degenerarea petei galbene a retinei datorată vârstei, dar și în 4 cazuri de coroidite multifocale s-au analizat membranele coroidale neovascularizate. Acestea au fost evaluate imunohistochimic folosindu-se anticorpi monoclonali anti-tenascin-C și anti-factorul plasmatic VIII. Toate membranele s-au dovedit pozitive pentru tenascin-C care s-a exprimat difuz și abundent în matricea extracelulară. În concluzie, proteina intervine în proliferarea celulară și în neovascularizare, fiind un marker al angiogenezei, dar și un eventual factor terapeutic în bolile neurovasculare îndeosebi în neovascularizarea coroidiei (58). Pe de altă parte, s-au localizat și evaluat câteva proteine implicate în vindecarea rănilor corneei transparente, printre care fibronectina, laminina-I, nidogen/eutactin și VCAM-1 la șoarecii deficienți în tenascin-C și la cei tip-sălbatic, neexistând diferențe în rata vindecării sau în neovascularizare. Integrina alfa9 este exprimată la aceste animale fiind suprareglată în timpul migrării celulelor numai după rănilor mai extinse. Tenascin-C nu este necesar dezvoltării sau menținerii integrității corneei și nici pentru reepitelizarea normală a corneei după rănire (59).

Carcinoamele de cap și gât se disting prin infiltrarea limfocitelor în tumori, celule care produc citokine. Moleculele de adeziune, proteinele matricei și citokinele reglează interacțiunile celulă-celulă și celulă-matrice. În 13 carcinoame supraglotice, celulele neoplazice conțineau integrine alfa2beta1, alfa3beta1, alfa4beta1, alfa5beta1 și alfa6beta1, iar epiteliile normale și neoplazice erau alfa5beta1 negative. Stroma tumorilor primare și metastazante era – tenascin și fibronectin pozitive. Majoritatea tumorilor exprimau, de asemenea, gena TGFbeta1 și IFNgamma. TGFbeta1 scade procesele imune, dar crește distribuția integrinelor alfa1beta1, alfa5beta1 și a tenascin; se sugerează că expresia acestora în celulele neoplazice ale carcinomului supraglotic ar putea reprezenta un proces imunologic afectat, capabil să accelereze creșterea și progresia tumorilor (60).

1. Sahlberg C., Aukhil I., Thesleff I., Tenascin-C in developing mouse teeth: expression of splice variants and stimulation by TGFbeta and FGF. *Eur. J. Oral. Sci.*, 2001, 109(2), 114–24.

2. Martinez EF, Machado de Souza SO, Correa L, Cavalcanti de Araujo V. Immunohistochemical localization of tenascin, fibronectin, and type III collagen in human dental pulp. *J. Endod.*, 2000, 26(12), 708–11.

3. Sasano Y, Li H. C., Zhu J. X., Imanaka-Yoshida K, Mizoguchi I, Kagayama M. Immunohistochemical localization of type I collagen, fibronectin and tenascin C during embryonic osteogenesis in the dentary of mandibles and tibias in rats. *Histochem. J.*, 2000, 32(10), 591-8.

4. Jones P. L., Chapados R., Baldwin H. S., Raff G. W., Vitvitsky E. V., Spray T. L., Gaynor J. W., Altered hemodynamics controls matrix metalloproteinase activity and tenascin-C expression in neonatal pig lung. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.*, 2002, 282(1), L26-35.

5. Cifuentes-Diaz C., Failla L., Goudou D., Schachner M., Rieger F., Angaut-Petit D., Abnormal reinnervation of skeletal muscle in tenascin-C-deficient mouse. *J. Neurosci. Res.*, 2002, 67(1), 93–9.
6. Doane K. J., Bhattacharya R., Marchant J., Perturbation of beta (1) integrin function using anti-sense or function-blocking antibodies on corneal cells grown on fibronectin and tenascin. *Cell. Biol. Int.*, 2002, 26(2), 131–44.
7. Matsumoto K., Hiraiwa N., Yoshiki A., Ohnishi M., Kusakabe M., PDGF receptor-alpha deficiency in glomerular mesangial cells of tenascin-C knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, 290(4), 1220–7.
8. Joester A., Faissner A., The structure and function of tenascins in the nervous system. *Matrix. Biol.*, 2001, 20(1), 13–22.
9. Fukamauchi F., Alhara O., Kusakabe M., Internalization and dawn-regulation of muscarinic acetylcholine receptors in cerebellar granule cells of tenascin-gene deficient mice. *Neurochemistry International*, 2000, 36(2), 153–8.
10. Garcion E., Faissner A., French-Constant C., Knockout mice reveal a contribution of the extracellular matrix molecule tenascin-C to neural precursor proliferation and migration. *Development*, 2001, 128(13), 2485–96.
11. Yuasa S., Development of astrocytes in the mouse embryonic cerebrum tracked by tenascin-C gene expression. *Arch. Histol. Cytol.*, 2001, 64(1), 119–26.
12. Soussand J., Jahke R., Simon-Assmann P., Stoeckel M. E., Schimchowitsch S., Tenascin and laminin function in target recognition and central synaptic differentiation. *Neuroreport*, 2001, 12(5), 1073–6.
13. Kusakabe M., Mangiarini L., Laywell E. D., Bates G. P., Yoshiki A., Hiraiwa N., Inoue J., Steindler D. A., Loss of cortical and thalamic neuronal tenascin-C expression in a transgenic mouse expressing exon 1 of the human Huntington disease gene. *J. Comp. Neurol.*, 2001, 430(4), 485–500.
14. Pesheva P., Probstmeier R., Association of tenascin-R with murine brain myelin membranes: involvement of divalent cations. *Neuroscience Letters*, 2000, 283(3), 165–8.
15. Probstmeier R., Braunewell K., Pesheva P., Involvement of chondroitin sulfates on brain-derived tenascin-R in carbohydrate-dependent interactions with fibronectin and tenascin-C. *Brain. Research.*, 2000, 863(1–2), 42–51.
16. Probstmeier R., Nellen J., Gloor S., Wernig A., Pesheva P., Tenascin-R is expressed by Schwann cells in the peripheral nervous system. *J. Neurosci. Res.*, 2001, 64(1), 70–8.
17. Bukalo O., Schachner M., Dityatev A., Modification of extracellular matrix by enzymatic removal of chondroitin sulfate and by lack of tenascin-R differentially affects several forms of synaptic plasticity in the hippocampus. *Neuroscience*, 2001, 104(2), 359–69.
18. Schuster T., Krug M., Stalder M., Hackel N., Gerardy-Schahn R., Schachner M., Immunoelectron microscopic localization of the neural recognition molecules L1, NCAM, and its isoform NCAM180, the NCAM-associated polysialic acid, beta1 integrin and the extracellular matrix molecule tenascin-R in synapses of the adult rat hippocampus. *J. Neurobiol.*, 2001, 49(2), 142–58.
19. Lindholm T., Cullheim S., Carlstedt T., Risling M., Expression of tenascin R and J1 mRNA in motoneurons after a traumatic lesion in the spinal cord. *Neuroreport*, 2001, 12(16), 3513–7.
20. Minamitani T., Ariga H., Matsumoto K. I., Transcription factors Sp1 activates the expression of the mouse tenascin-X gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 267(2), 626–31.
21. Matsumoto K., Takayama N., Ohnishi J., Ohnishi E., Shirayoshi Y., Nakatsuji N., Ariga H., Tumor invasion and metastasis are promoted in mice deficient in tenascin-X. *Genes Cells.*, 2001, 6(12), 1101–11.
22. Eleftheriou F., Exposito J. Y., Garrone R., Lethias C., Binding of tenascin-X to decorin. *FEBS Lett.*, 2001, 495(1–2), 44–7.
23. Lethias C., Eleftheriou F., Parsiegla G., Exposito J. Y., Garrone R., Identification and characterization of a conformational heparin-binding site involving two fibronectin type III modules of bovine tenascin-X. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276(19), 16432–8.
24. Ikuta T., Ariga H., Matsumoto K. I., Effect of tenascin-X together with vascular endothelial growth factor A on cell proliferation in cultured embryonic hearts. *Biol. Pharm. Bull.*, 2001, 24(11), 1320–3.
25. Tucker R. P., Hagios C., Santiago A., Chiquet-Ehrismann R., Tenascin-Y is concentrated in adult nerve roots and has barrier properties in vitro. *J. Neurosci. Res.*, 2001, 66(3), 439–47.
26. Mao J. R., Taylor G., Dean W. B., Wagner D. R., Afzal V., Lotz J. C., Rubin E. M., Bristow J., Tenascin-X deficiency mimics Ehlers-Danlos syndrome in mice through alteration of collagen deposition. *Nat. Genet.*, 2002, 30(4), 421–5.
27. Zagzag D., Capo V., Angiogenesis in the central nervous system: a role for the vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor and tenascin-C. Common molecular effectors in cerebral neoplastic and non-neoplastic “angiogenic diseases”. *Histol. Histopathol.*, 2002, 17(1), 301–21.
28. Riekkari R., Jukkola A., Oikarinen A., Kallioinen M., Radiation therapy induces tenascin expression and angiogenesis in human skin. *Acta. Derm. Venereol.*, 2001, 81(5), 329–33.
29. Wallner K., Shah P. K., Sharifi B. G., Balloon catheterization induces arterial expression of new Tenascin-C isoform. *Atherosclerosis*, 2002, 161(1), 75–83.
30. Asem E. K., Stingley-Salazar S. R., Robinson J. P., Turek J. J., Identification of some components of basal lamina of avian ovarian follicle. *Poultry. Science.*, 2000, 79(4), 589–601.
31. Hakkinen L., Hildebrand H. C., Berndt A., Kosmehl H., Larjava H., Immunolocalization of tenascin-C alpha 9 integrin subunit, and alpha5beta 6 integrin during wound healing in human oral mucosa. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2000, 48(17), 985–98.
32. Belanger I., Beaulieu J. F., Tenascin in the developing and adult human intestine. *Histology and Histopathology*, 2000, 15(2), 577–85.
33. Cella N., Chiquet-Ehrismann R., Hynes N. E., Lactogenic hormones and tenascin-C regulate C/EBP alpha and beta in mammary epithelial cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2000, 76(3), 394–403.

34. Satta J., Melkko J., Pollanen R., Tuukkanen J., Paakko P., Ohtonen P., Mennander A., Soini Y., Progression of human aortic valve stenosis is associated with tenascin-C expression. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2002, 39(1), 96–101.
35. Jian B., Jones P. L., Li Q., Mohler E. R. 3rd, Schoen F. J., Levy R. J., Matrix metalloproteinase-2 is associated with tenascin-C in calcific aortic stenosis. *Am. J. Pathol.*, 2001, 159(1), 321–7.
36. Imanaka-Yoshida K., Matsuura R., Isaka N., Nakano T., Sakakura T., Yoshida T., Serial extracellular matrix changes in neointimal lesions of human coronary artery after percutaneous transluminal coronary angioplasty: clinical significance of early tenascin-C expression. *Virchows. Arch.*, 2001, 439(2), 185–90.
37. Imanaka-Yoshida K., Hiroe M., Nishikawa T., Ishiyama S., Shimojo T., Ohta Y., Sakakura T., Yoshida T., Tenascin-C modulates adhesion of cardiomyocytes to extracellular matrix during tissue remodeling after myocardial infarction. *Lab. Invest.*, 2001, 81(7), 1015–24.
38. Sato I., Shimada K., Quantitative analysis of tenascin in chordae tendineae of human left ventricular papillary muscle with aging. *Ann. Anat.*, 2001, 183(5), 443–8.
39. Salmenkivi K., Haglund C., Arola J., Heikkilä P., Increased expression of tenascin in pheochromocytomas correlates with malignancy. *Am. J. Surg. Pathol.*, 2001, 25(11), 1419–23.
40. Kulla A., Liigant A., Piirsoo A., Rippin G., Asser T., Tenascin expression patterns and cells of monocyte lineage: relationship in human gliomas. *Modern Pathology*, 2000, 13(1), 56–67.
41. Viale G. L., Castellani P., Dorcaratto A., Pau A., Sehrbunt E., Siri A., Biro A., Zardi L., Occurrence of Glioblastoma – associated Tenascin-C Isoform in Cerebral Cavemomas and Neighboring Vessels. *Neurosurgery*, 2002, 50(4), 838–42.
42. Herold-Mende C., Mueljer M. M., Bonsanto M. M., Schmitt H. P., Kunze S., Steiner H. H., Clinical impact and functional aspects of tenascin-C expression during glioma progression. *Int. J. Cancer.*, 2002, 98(3), 362–9.
43. Yao D. K., Li S., Kong X.T., Ye T. J., Fan J. G., Zhong L., Wang G. L., Tian L. Y., Wu W. S., Li M. S., Dynamic expression of tenascin in rat liver during liver fibrogenesis induced by CCl₄ (4). *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, 2002, 10(1), 40–2.
44. Kahn H. J., Fekete E., From L., Tenascin differentiates dermatofibroma from dermatofibrosarcoma protuberans: comparison with CD34 and factor XIIIa. *Hum. Pathol.*, 2001, 32(1), 50–6.
45. Ghert M. A., Jung S. T., Qi W., Harrelson J. M., Erickson H. P., Block J. A., Scully S. P., The clinical significance of tenascin-C splice variant expression in chondrosarcoma. *Oncology*, 2001, 61(4), 306–14.
46. Ghert M. A., Qi W. N., Erickson H. P., Block J. A., Scully S. P., Tenascin-C splice variant adhesive/anti-adhesive effects on chondrosarcoma cell attachment to fibronectin. *Cell. Struct. Funct.*, 2001, 26(3), 179–87.
47. Tanaka M., Yamazaki T., Araki N., Yoshikawa H., Yoshida T., Sakakura T., Uchida A., Clinical significance of tenascin-C expression in osteosarcoma: tenascin-C promotes distant metastases of osteosarcoma. *International Journal of Molecular Medicine*, 2000, 5(5), 505–10.
48. Kaarteenaho-Wiik R., Kinnula V. L., Herva R., Soini Y., Pollanen R., Paakko P., Tenascin-C is highly expressed in respiratory distress syndrome and bronchopulmonary dysplasia. *J. Histochem Cytochem*, 2002, 50(3), 423–31.
49. Paakko P., Kaarteenaho-Wiik R., Pollanen R., Soini Y., Tenascin mRNA expression at the foci of recent injury in usual interstitial pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2000, 161(3 Pt1), 967–72.
50. Cai M., Onoda K., Takao M., Kyoko I. Y., Shimpo H., Yoshida T., Yada I., Degradation of tenascin-C and activity of matrix metalloproteinase –2 are associated with tumor recurrence in early stage non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer. Res.*, 2002, 8(4), 1152–6.
51. Cowan K. N., Jones P. L., Rabinovitch M., Elastase and matrix metalloproteinase inhibitors induce regression, and tenascin-C antisense prevents progression of vascular disease. *Journal of Clinical Investigation*, 2000, 105(1), 21–34.
52. Dandachi N., Hauser-Kronberger C., More E., Wiesener B., Hacker G. W., Dietze O., Wirl G., Co-expression of tenascin-C and vimentin in human breast cancer cells indicates phenotypic transdifferentiation during tumour progression : correlation with histopathological parameters, hormone receptors, and oncoproteins. *J. Pathol.*, 2001, 193(2), 181–9.
53. Faustino A. M., van Garderen E., Schalken J. A., Nederbragt H., Tenascin expression in normal, hyperplastic and neoplastic canine mammary tissues. *J. Comp. Pathol.*, 2002, 126(1), 1–8.
54. Emoto K., Yamada Y., Sawada H., Fujimoto H., Ueno M., Takayama T., Kamada K., Naito A., Hirao S., Nakajima Y., Annexin II overexpression correlates with stromal tenascin-C overexpression: a prognostic marker in colorectal carcinoma. *Cancer*, 2001, 92(6), 1419–26.
55. Gulubova M. V., Vlaykova T., Tenascin immunoreactivity in the large bowel and the liver in patients with colorectal cancer. *Histochem. J.*, 2001, 33(2), 111–20.
56. Puente Navazo M. D., Valmori D., Rugg C., The alternatively spliced domain TnFnIII A1A2 of the extracellular matrix protein tenascin-C suppresses activation-induced T lymphocyte proliferation and cytokine production. *J. Immunol.*, 2001, 167(11), 6431–40.
57. Juhász A., Bardos H., Repassay G., Adany R., Characteristic distribution patterns of tenascin in laryngeal and hypopharyngeal cancers. *Laryngoscope*, 2000, 110(1), 84–92.
58. Nicolo M., Piccolino E. C., Zardi L., Giovannini A., Mariotti C., Detection of tenascin-C in surgically excised choroidal neovascular membranes. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 2000, 238(2), 107–11.
59. Iglesia D. D., Gala P. H., Qiu T., Stepp M. A., Integrin expression during epithelial migration and re-stratification in the tenascin-C-deficient mouse cornea. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2000, 48(3), 363–76.
60. Vitolo D., Ciocci L., Ferranti P., Cicerone E., Gallo A., De Vincentils M., Baroni C. D., Alpha 5 integrin distribution and TGFβ1 gene expression in supraglottic carcinoma: their role in neoplastic local invasion and metastasis. *Head and Neck*, 2000, 22(1), 48–56.

GALECTIN-3

Lectinele sau aglutininele cunoscute și ca fitohemaglutinine au fost descoperite în ricin (*Ricinus communis*) în urmă cu 100 de ani. Lectinele au situsuri de legare pentru glucide pe fiecare subunitate, aglutinând celulele. Legarea la glucide este de tip hidrofob.

Concavalina A este o proteină din fasole, iar fitohemaglutinina din grâu aglutinează hematiile (proprietate generală a lectinelor). Lectinele pot fi mitogeni; stimulează diviziunea celulelor animale, moleculele sale legându-se la receptori celulari specifici, cum sunt cei ai insulinei (1).

Galectin-3 aparține familiei lectinelor animale care cuplează beta-galactozide. Anterior a fost numit BP-epsilon, CPB35, Mac-2, L-29 sau L-34 și asociat cu creșterea, transformarea și metastazarea celulelor. Se exprimă în variate țesuturi și organe, dar lipsește semnificativ în hepatocitele normale (2).

Structura sa primară etalează 3 domenii: o secvență de amino-acizi lider care conține un loc de fosforilare a cazein-kinazei I-serină, precedată de un motiv bogat în Pro-Gly sensibil la collagenază și o jumătate COOH-terminal ce conține locul care cupleză carbohidratul. O mutantă a cDNA ce cauzează deleția a 11 aminoacizi din regiunea N-terminal, care duce la pierderea fosforilării serinei 6 a fost introdusă în celulele carcinomului uman BT-549 fără galectin-3. Deleția duce la abolirea secreției de galectin-3 trunchiat, la pierderea localizării nucleare și la reducerea funcțiilor mediate de carbohidrat, în comparație cu proteina de tip-sălbatic.

Când proteina fluorescentă verde fuzionează la secvența lider-galectin-3 și este transfectată tranzitoriu în celulele BT-549, distribuția celulară uniformă a acesteia se schimbă principalmente în model nuclear. S-au creat alte două mutații punct în serina 6 cu pierderea fosforilării ei ser6----Ala și ser6----Glu dar nu s-au observat diferențe în localizarea celulară între transfectantele tip-sălbatic și cele ser6-mutante. Se atribuie un rol structural pentru secvența lider NH₂-terminal galectin-3 în determinarea țintei sale celulare și în funcțiile biologice independente de fosforilare (3).

Galectin-3 este o proteină ce cuplează galactozid-beta, fiind secretată de numeroase celule; lipsindu-i o secvență semnal nu se poate transfera din reticulul endoplasmatic în complexul Golgi și în căile secretorii clasice. Atașarea primilor 120 aminoacizi ai secvenței N-terminal din galectin-3 de hamster, la proteina citoplasmatică cloramfenicol acetiltransferază (CAT) suportă secreția rapidă a proteinei de fuziune din celulele COS transfectate tranzitoriu în condițiile în care proteina CAT nu este secretată. Se demonstrează că trunchierea progresivă a capătului N-terminal reduce gradat la nivel foarte scăzut, secreția proteinei de fuziune, comparativ cu produsul de start. Deleția reziduurilor aminoacizilor 89-96 abolește secreția detectabilă.

Mutageneza prolinei cu alanina în secvența YP(90) SAP(93) GAY în două proteine de fuziune CAT competente să secrete, reduce enorm sau abolește secreția lor, pe când mutageneze similare ale inelelor perechi de prolină prezente oriunde în segmentul N-terminal al galectin-3 nu are efect. Deci, această secvență este o determinantă esențială pentru secreția proteinei de fuziune galectin-3-CAT. Secvența scurtă de reziduuri 89-96 este insuficientă pentru secreția directă a proteinei de fuziune cu CAT și este activă numai în contextul unei mari porțiuni din secvența N-terminal a galectin-3 (4).

Galectin-3 intervine *in vitro* în activarea celulelor, în modularea adezivității lor, în inducția pre mRNA și în reglarea apoptozei. Au fost generați șoareci deficienți în galectin-3 (gal-3(-/-)) prin țintirea genei sale. Aceste animale ca răspuns la tratamentul cu tioglicolat, dezvoltă mai puține infiltrări de celule inflamatorii în cavitatea peritoneală, decât cele de tip sălbatic gal-(3+/+).

Celulele inflamatorii care apar datorită tioglicolatului sunt semnificativ mai puține la șoarecii gal-3(-/-) decât la cei gal-3(+/-). În plus, fenotiparea celulelor este dramatic diferită; astfel,

macrofagele la șoarecii gal-3(+/+) arată morfologie normală și o bună diseminare, pe când la cei gal-3(-/-) acestea sunt fusiforme. De asemenea, macrofagele peritoneale de la animalele gal-3(-/-) sunt mai pregătite să sufere apoptoza, decât cele gal-3(+/+), în cazul în care animalele au fost tratate cu stimuli apoptotici; aceasta sugerează că expresia galectin-3 în celulele de inflamație poate duce la supraviețuirea mai îndelungată a acestora, prelungind astfel inflamația. De aici, concluzia că galectin-3 este un reglator pozitiv al răspunsului inflamator în cavitatea peritoneală (5).

Se propune ca glicoproteinele matriciale precum fibronectina, laminina, collagen IV printre altele, produse non-limfoide din cortexul și medula timică ar putea constitui un aranjament macromolecular care ar permite migrarea timocitelor diferențiate.

Printre moleculele cu proprietăți adezive și nonadezive în migrarea intratimică a limfocitelor T se propune și galectin-3, lectină solubilă secretată de celulele micromediului timic și care cuplează galactozid-beta, fiind un candidat ca proteină de adeziune pentru scăderea interacțiunii timocitului cu micromediul timic (6).

Lectinele endogene sunt proteine/glicoproteine care recunosc selectiv zaharide liganzi și diferă de imunoglobuline și de enzimele care utilizează carbohidrați. Expresia acestor molecule se detectează imunohistochimic cu anticorpi monoclonali neblocați (A1D6: anti-galectin-3, MR-15-2-2, anti-receptorul 175 kD manoză).

Alternativ, (neo) glicoconjugatele biotimilate ce sunt recunoscute de o lectină, pot fi angajate ca probă convențională pentru a demonstra cuplarea specifică a epitopilor zaharuri la domeniile ce recunosc carbohidratul lectinelor endogene (7).

Cu raze X s-au stabilit structurile cristaline ale domeniului N-terminal al sialoadezinei și domeniul extracitoplasmatic al receptorului manoză-6 fosfat dependent de cation. Aceste structuri sunt primele exemple din familia lectinelor tip I și P care permit înțelegerea faptului cum funcționează acest receptor cheie transmembranar. În plus, structura lui galectin-7 și a domeniului de recunoaștere a carbohidratului din galectin-3 arată o nouă structură cuaternară a galectinelor. Structura lui tachylectin-2, primul exemplu de proteină cu 5 cute simetrice beta propulsor, elucidează rolul acestei lectine în apărarea gazdei (8).

Organizarea domeniului proteinei de cuplare Mac-2 (M2BP) și oligomerizarea ei în structurile lineare și inelare.

M2BP este prezentă în ser și matricea extracelulară sub formă de oligomeri lineari sau inelari care interacționează cu galectin-3, fibronectina, colageni, integrine și cu alte glicoproteine cu moleculă mare. Domeniul 1 al M2BP are omologii cu domeniul SRC-R bogat în cisteină. Domeniile 2 și 3 sunt legate de domeniile dimerizării BTB/POZ și IVR ale proteinei Drosophilei kelch. S-a studiat cu microscopul electronic scanning și prin ultracentrifugare, domeniul N-terminal M2-BP-1 al M2BP recombinat și un fragment constând din domeniile putative 2, 3 și 4 (M2BP-2,3,4).

Oligomerii inelari formați de proteina intactă sunt constituiți din segmente de circa 14 nm compuse din 2 monomeri M2BP de 92 kD. Deși inelele variază în dimensiuni, predomină decamerii. Variații oligomeri lineari prezenți sunt probabil precursori inelari, predominând dimerii. M2BP-1 arată o cută nativă, nu oligomerizează și este inactivă în starea atașată la celulă. Agregate heterogene M2BP-2, 3, 4, au structuri inelare pline cu proteină și rețin potențialul de adeziune la celule indicând cutare nativă. Se crede că inelele oferă un model de interacțiuni multivalente cu molecule țintă sau cu complexe de liganzi (9).

Galectin-3 este o proteină de aproximativ 30.000 g.m. care cuplează galactoză/lactoză și se distribuie diferit în nucleu și citoplasmă în funcție de starea proliferativă a celulei.

Permeabilizate cu digitonină, fibroblastele 3T3 de la șoareci relevă că galectin-3 este exportat din nucleu rapid și selectiv. În fracția nucleară se găsesc izoformele sale fosforilate și nefosforilate, dar numai primele sunt exportate din nucleu, presupunând că fosforilarea este o condiție pentru exportul nuclear. Rata exportului scade în funcție de temperatură, dar și prin adausul de aglutinină din grâul germinat. Exportul poate fi inhibat de adausul de leptomicină B, un drog care disturbă interacțiunea dintre semnalul de export nuclear bogat în leucină și receptorul său CRM-1 (regiunea 1 de menținere a cromosomului). Acest semnal putativ se găsește în reziduu 241-249 al secvenței

galectin-3 murin. Filtrarea în gel a materialului exportat arată că galectin-3 poate fi găsit în cel puțin două complexe de înaltă greutate moleculară (de aproximativ 650 kD și 60 kD) ambele putând fi disturbate de lactoză (10).

În tulpina LG 1 de fibroblaste diploide umane, galectin-3 se poate detecta în nucleul și citoplasma celulelor tinere proliferative. În celulele senescente însă, proteina predomină în citoplasmă, celulele pierzându-și în cultură competența proliferativă. Incubarea celulelor tinere cu leptomicina B duce la acumularea galectin-3 în nucleu.

În celulele senescente, galectin-3 rămâne numai în citoplasmă, chiar și în prezența drogului, sugerând că această localizare se datorează absenței importului nuclear.

În heterodicarionii derivați prin fuziunea celulelor LG 1 tinere cu cele senescente, fenotipul predominant în ambii nuclei este cel cu galectin-3. Se conchide că, celulele senescente ar putea fi lipsite de factorii specifici reclamați pentru importul nuclear de galectin-3 (11).

Interacțiunea unei proteine noi citoplasmatică bogată în cisteină și histidină cu galectin-3 într-o manieră independentă de carbohidrat.

Proteina ar interveni în traficul intracelular al proteinei solubile care cuplează galactozidul beta – respectiv galectin-3. Noua proteină conține neobișnuit de multe reziduuri de cisteină și histidină arătând omologii de secvențe semnificative cu câteva fragmente care cuplează ionii metalici prezenți în proteinele cunoscute. Celulele 3T3 murine permeabilizate arată localizarea noii proteine marcat perinuclear și citoplasmatic (12).

Galectin-3 în țesuturi normale și în demielinizare.

Galectin-3 este o proteină de 30 kD care cuplează beta-galactozidul și aparține familiei galectin a lectinelor animale. Este prezentă în condrocitele diferențiate ale cartilajului epifizar al oaselor lungi de la fetuși și nou-născuți de șoarece. Concentrația cea mai mare se găsește în citoplasma matură și în condrocitele timpurii hipertrofiate, iar cea mai mică în condrocitele târzii care suferă maturarea terminală și apoptoza. Proteina se găsește, de asemenea, în osteoblastele și osteocitele aflate în metafază, și în cortexul diafizelor, dar și în osteoclastele și mononuclearele din cavitățile măduvei osoase.

Galectin-3 nu este detectată extracelular, fiind restrictată în citoplasma condrocitelor și în celulele măduvei osoase, dar ocazional este detectată în nucleul condrocitelor hipertrofiate din zona calcifierii și în osteoblastele tinere. Se consideră astfel că, galectin-3 este un marker al liniilor condrogenice și osteogenice deși ar putea fi implicat în procesul formării osului endocondral, posibil, ca un reglator al supraviețuirii condrocitului (13). Fiind o proteină endogenă care cuplează carbohidrați mamalieni are afinitate pentru epitopi din grupul carbohidrați ABH și polilactozamine glicani de pe suprafața celulelor și pentru glicoproteinele matricei extracelulare. Intervine în diferențierea, morfogeneza, adeziunea și proliferarea celulelor, procese pe care le reglează.

Proliferarea progenitorilor măduvei osoase depinde de factorii celulelor stem care le modulează adeziunea la stroma medulară. Galectin-3 de 32 kD se exprimă în timpul dezvoltării, în celulele umane mieloide și este puternic suprareglat pe suprafața celulelor mieloide târzii, mature.

În celulele mieloide timpurii care prezintă CD34+, galectin-3 se exprimă foarte puțin; în schimb ele exprimă exclusiv o proteină de 70 kD. Galectin-3 exogen uman recombinat cuplează puternic la celulele mieloide timpurii și accentuează G-CSF guvernând proliferarea in vitro (14).

Galectin-3 este un agregat de trei proteine de 31.000 g.m. și puncte izoelectrice între 7 și 8,5. Se asociază la plasmalema celulei fibrilare din cristalin și interacționează cu proteina de membrană intrinsecă MP20 identificată ca o componentă a joncțiunii membranare dintre celulele fibrilare. Galectin-3 din cristalin este o nouă achiziție care se adaugă la lista în creștere a proteinelor cu proprietăți adezive ale acestuia. Localizarea sa pe membrana celulei fibrilare și asocierea ei cu MP20, formând joncțiunea, este în acord cu un potențial rol în dezvoltarea și menținerea aderenței intime în arhitectura țesutului cristalinului (15).

Galectin-3/MAC-2 este un marker de diferențiere și activare a monocitelor/macrofagelor/microgliilor murine și umane. Laolaltă cu MAC-1 mediază fagocitoza mielinei, marchează o stare de activare in vivo a macrofagelor implicate în degenerarea și fagocitarea mielinei

din nervii periferici agresați, de șoarece. Din contră, nivele înalte de MAC-1, dar extrem de scăzute de galectin-3/MAC-2 sunt exprimate in vivo în sistemul nervos central agresat, unde degenerarea și fagocitarea mielinei progresează extrem de lent.

În encefalomielită s-a urmărit expresia G3/M-2, care apare suprareglată împreună cu MAC-1 și F4/80 în măduva spinării și nervii optici de la șoareci, în ariile cu mielina în degeneare și în cele demielinizate, unde mielina este fagocitată de microgii și macrofage. Astfel, encefalomielita implică o stare de activare a microgii și macrofagelor care exprimă G-3/M-2 cu MAC-1. Răspunsul in vivo la injurie și provocare autoimună în sistemul nervos central, diferă în privința expresiei G-3/M-2, în modelul activării microgii și macrofagelor și corespunde apariției degenerării și fagocitării mielinei (16).

Galectin-3 în infecții și parazitoze.

Lectinele animale joacă roluri importante într-o varietate de procese biologice via recunoașterii glicoconjugatelor lor. Cum s-a menționat galectin-3 este o lectină care cuplează galactozidul-beta, expresia sa fiind asociată cu variate patologii printre care infecția limfocitelor T cu HTLV I și a liniei limfoblastice MOLT-3 cu HIV. În cazul infecției cu HIV se sugerează că expresia crescută a galectin-3 ar putea fi legată de expresia genei virale reglatoare tat. Expresia proteinei tat induce suprareglarea galectin-3 în câteva linii celulare umane. În experimentele de cotransfecție, secvența 5' reglatoare a genei galectin-3 este semnificativ suprareglată prin expresia vectorilor ce codifică proteina Tat dependent de activarea factorului de transcriere care cuplează Sp.1 (17).

Celulele carcinomului hepatocelular (HCC) exprimă nivele semnificative de galectin-3 (76% sunt pozitive), expresie independentă de o infecție anterioară cu virusul hepatitei B. Totuși, 5 din 7 pacienți cu HBV arată galectin-3 pozitiv. Expresia lui poate apare prin transactivarea promotorului lectin de către proteina HBV-X. Este posibil ca expresia dereglată a galectin-3 să ducă la transformarea tumorală, invazivitate, sau oferă condiții pentru supraviețuirea celulelor tumorale.

Galectin-3 se exprimă abundent în ficatul cirotic la periferia nodulilor regenerativi. Expresia sa în hepatocitele rapid proliferante din ficatul cirotic poate fi rezultatul indicelui mitotic înalt. Dar este posibil ca celulele proliferante care exprimă galectin-3 să se afle în procesul transformării indicând astfel un eveniment neoplazic timpuriu (2).

Trypanosoma cruzi se cuplează la laminina asociată cu proteina galectin-3 care la rândul ei datorită cuplării cu beta-galactozidul poate fi inhibată de o lactoză. Co-imunoprecipitarea arată că galectin-3 cuplează proteine de 45, 32 și 30 kD de la suprafața parazitului, proces inhibat de lactoză. De asemenea, anticorpii policlonali și unul monoclonal anti-galectin-3 imunoprecipită proteina de 64 kD de la suprafața parazitului, iar anticorpus monoclonal anti-mucină din parazit recunoaște proteina de 45 kD de la suprafață. Proteinele 45, 32, 30 kD în această ordine, interacționează cu galectin-3 pentru a amplifica adeziunea parazitului la laminină (18).

Galectin-3 în cancer

Deoarece datele sunt contradictorii în privința relației galectin-3 cu cancerizarea și metastazarea, prezentăm proteina vizavi de elaborarea ei și de relațiile cu alte molecule ale matricei extracelulare.

Galectin-3 subreglat în cancer.

Expresia acestuia scade în carcinoamele de colon, mamare, ovariene și endometriale în comparație cu țesuturile normale corespunzătoare. În pielea normală din jurul a 10 carcinoame bazocelulare imunocolorarea galectin-3 apare predominant în stratul spinos al epidermului iar celulele carcinomatoase din cele 10 probe arată o semnificativă scădere a sa. Se concludă că galectin-3 este subreglat într-o varietate de cancere umane inclusiv în carcinomul bazocelular (19).

Galectin-3 și galectin-1 sunt două proteine ce cuplează beta-galactozidul, sugerând că joacă un rol însemnat în dezvoltarea cancerului. Astfel, galectin-1 s-a detectat în 8 cazuri de neoplazie intraepitelială prostatică în 20 adenocarcinoame primare și în 12 metastaze. Expresia lui este însă semnificativ scăzută în carcinomul primar și în metastaze, comparativ cu țesutul normal și

țesutul premalign. De aici concluzia că, pierderea expresiei sale poate fi asociată cu progresia cancerului de prostată (20).

Determinarea nivelului diferențierii are valoare de prognostic în carcinoamele scvamoase de cap și gât (HNSCC). S-a folosit o neoglicoproteină pentru a monitoriza prezența locurilor de cuplare a antigenului Thomassen-Friedenreich (Ag.T) și s-a măsurat imunohistochimic prezența a două galectine ca și a liganzilor accesibili pentru lectinele endogene. De asemenea, s-a monitorizat și prezența calciclinei, o proteină cu relevanță în progresia ciclului celular sau în exocitoză.

Principalele modificări în legătură cu pierderea diferențierii sunt legate de modificarea nivelului expresiei locului de cuplare galectin-3/galectin-3 și a locului de cuplare a T.Ag/T.Ag. Analizele s-au efectuat pe 31 carcinoame orale, 20 laringiene și 10 leziuni hipofaringiene. Se sugerează că galectin-3 ar putea acționa ca un loc acceptor pentru Ag.T. Deoarece nivelele diferențierii indică rata recurenței în HNSCC, iar galectin-3 și Ag.T și respectiv locurile lor de cuplare sunt implicate în procesele de dediferențiere, sunt necesare investigații asupra rolurilor galectinelor în progresia acestor tumori și în analiza recurenței (21).

Tipurile celulare epitelial sau scvamos din HNSCC arată cantități semnificativ mai scăzute de galectin-1, galectin-3 și Ag.T și locurilor lor de cuplare, decât partenerii normali. Tumorile laringiene diferă foarte semnificativ de toate celelalte tipuri de tumori.

Pierderea diferențierii în HNSCC este însoțită în primul rând de pierderea expresiei galectin-3 și a locurilor sale reactive și numai ulterior de a Ag.T. și locurilor lui de cuplare. Ganglionii limfatici negativi se pot distinge de cei pozitivi pe baza pierderii expresiei galectin-3.

Modificările care apar în expresia galectin-3 și a locurilor reactive galectin-1, sunt relativ marginale în comparație cu cele observate pentru galectin-3 dependente de Ag.T. Se concluează că, pe de o parte, scăderea extinderii expresiei locurilor galectin-3 și galectin-3 reactive și a Ag.T și locurilor sale de cuplare, și pe de altă parte extensia mai scăzută a locurilor galectin-1 și galectin-1 reactive, se corelează semnificativ cu un nivel crescut de agresivitate a tumorilor HNSCC, detectabil clinic (22).

Suprareglarea galectin-3 în cancer.

Cum menționam, galectin-3 este o lectină beta-galactozid specifică și cuplând la locurile glucidice ale lamininei este implicată în malignitatea tumorală. S-au evidențiat imunohistochimic 117 leziuni primare și 15 metastaze hepatice de cancer colorectal folosind anticorpii monoclonali TIB 166. Mucoasa normală era puternic pozitivă pentru galectin-3, dar mai slabă în leziunile primare de cancer. Expresia galectin-3 în leziunile primare crește semnificativ corelat cu progresia stadiului clinic, cu metastaza hepatică, cu invazia venoasă și cu metastazarea nodulilor limfatici. Astfel, leziunile metastazice arată nivele suprareglate ale proteinei, comparativ cu leziunile primare. În privința supraviețuirii, pacienții cu galectin-3 puternic pozitiv au prognoză semnificativ mai sumbră decât cei cu galectin-3 negativ (23).

Cancerul tiroidian este cea mai frecventă malignitate endocrină. Se urmărește dacă molecula CD44v6 înrudită cu lectina și galectin-3 a căror expresie este alterată în timpul creșterii reglate și transformării maligne a celulei, ar putea fi markeri potențiali pentru diagnosticul stabilit pe baza citologiei convenționale.

Tireocitele normale nu exprimă galectin-3 și CD44v6. Expresia CD44v6 este neglijabilă în tiroidite, dar este variabil detectată în leziunile benigne și în cele maligne proliferative. Galectin-3 este detectabil invariabil în cancere. Cele două molecule sunt coexprimate la nivelul mRNA și proteinelor în aproape toate leziunile maligne. Se sugerează că ele pot fi considerate markeri potențiali pentru identificarea preoperatorie a tireocitelor maligne.

Imunodetectarea acestor molecule pe probe citologice obținute din biopsii este o metodă de selectare pe bază moleculară a acelor leziuni nodulare ale tiroidei care urmează să fie operate chirurgical (24).

Imunohistochimic toate malignitățile celulelor foliculare tiroidiene (carcinomul papilar, folicular și anaplastic) exprimă galectin-3 difuz și la nivele înalte și numai în unul din trei carcinoame a celulelor de origine parafoliculară din mедуlă, proteina este exprimată mai slab și focal. Dimpotrivă, adenomul benign, gușa și țesutul tiroidian normal nu exprimă galectin-3. Astfel, acesta este un marker al celulelor maligne foliculare tiroidiene (25).

S-a caracterizat nivelul expresiei galectin-1, galectin-3 și locurilor de cuplare, la 74 RCC (celulele carcinomului renal), nivelul lamininei, un ligand natural pentru galectine, și de asemenea nivelul expresiei Ag.T. și locurilor lui de cuplare. Concentrația mică a locurilor de cuplare pentru galectin-1 sau concentrația mare heterogenă a galectin-3 se pot asocia cu progresia nefavorabilă pentru pacienții cu tumori de gradul II sau gradul III. Dimpotrivă, Ag.T și locul de cuplare al acestuia nu arată schimbări în două grupe de tumori cu manifestare clinică diferită. Deci, modificarea expresiei galectin-1 și galectin-3, dar nu a Ag.T este paralelă cu agresivitatea crescută a tumorilor. De aici concluzia că, galectinele reprezintă o familie de molecule cu rol important în progresia carcinoamelor renale (26).

Expresia galectinelor în 38 carcinoame de celule tranziționale ale vezicii urinare, tumori de diferite grade histologice și stadii clinice și în 5 probe de uroteliu normal relevă că nivelele de mRNA galectin-1 sunt înalt crescute în majoritatea tumorilor de grad înalt, comparativ cu tumorile de grad scăzut și cu nivelele din vezica normală. Tumorile conțin astfel mai mult galectin-1. Nivelele mRNA galectin-3 sunt, de asemenea, crescute în majoritatea tumorilor comparativ cu uroteliu normal, dar sunt comparabile cu unele tumori de diferite grade histologice (27).

Variabilitatea galectin-3 în funcție de linia celulară sau clonă.

În 84 astrocitoame și 7 probe netumorale s-a urmărit expresia galectin-3 și a locului său de cuplare. Substanța albă din creierul netumoral exprimă galectin-3 și locul său de cuplare. Nivelul expresiei galectin-3 scade semnificativ în majoritatea tumorilor atât de grad scăzut cât și de grad înalt. Totuși, unele clone tumorale care exprimă cantități mari de galectin-3 apar cu nivele crescute de malignitate.

În cursul progresiei malignității, nivelele locurilor de cuplare accesibile galectin-3 nu se modifică semnificativ. În concluzie, se arată că tumorile astrocitice umane sunt foarte heterogene în expresia nivelurilor galectin-3. Dacă nivelele înalte determină invazivitatea potențială a celulelor tumorale, prezența chiar a unui număr mic, dar activ proliferant de clone celulare tumorale care exprimă nivele înalte de galectin-3 într-o tumoră heterogenă poate duce la invazivitate (28).

Galectin-3 se exprimă constitutiv în 15 din 16 linii de gliome, dar nu în astrocitele normale sau reactive, oligodendrocite, celule gliale progenitor O-2A și linia de precursori oligodendrocitici Oli-neu. Se exprimă însă, și într-o linie de oligodendrogliome, dar nu în tumora neuroectodermală primitivă și nici în 4 linii de neuroblastom. În toate liniile care se exprimă, predomină lectina, dacă nu chiar excesiv, localizată intracelular și poartă un domeniu de carbohidrat activ (văzut pe celulele C6 de gliom de șobolan). În contrast cu astrocitele primare, celulele gliomului aderă slab sau deloc la substraturile cu galectin-3 reflectând, probabil, un model neobișnuit de glicozilare.

Expresia galectin-3 se corelează astfel selectiv cu transformarea celulelor gliale în sistemul nervos central, servind ca un marker pentru linii de celule gliale tumorale și pentru tumori gliale (29).

S-a studiat expresia locurilor de cuplare a galectin-1 și galectin-3 biotilate, în epiteliul uman normal scvamos și în carcinomul uman din regiunea orofaringiană și laringiană, în relație cu expresia citokeratinelor LP-34+ prin procedeul marcării duble. Locurile tisulare accesibile pentru galectin-1 sunt localizate în toate păturile epiteliale normale și în celulele tumorale. Din contră, galectin-3 cuplează suprabazal în epiteliul normal și celulele tumorale care arată semne de keratinizare. Se demonstrează astfel, diferența în localizarea locurilor accesibile pentru cele două galectine. Galectin-3 arată afinitate pentru ariile cu extindere crescută a diferențierii celulelor (30).

Galectin-3 în metastazarea celulelor tumorale.

Abilitatea celulelor maligne de a forma agregate multicelulare, via asocierii celulelor homo- sau heterotipice și adezivitatea lor la endoteliu sunt procese importante dacă nu chiar critice, în timpul stadiilor inițiale ale metastazării cancerului.

Antigenul Thomsen-Friedenreich (Ag.T-TF) carboxihidrat asociat tumorii și galectinele (lectine care cuplează cu beta galactozidul), sunt implicate în adezivitatea celulelor tumorale și în invazia tisulară.

S-a demonstrat implicarea Ag.T în agregarea homotipică a celulelor carcinomului mamar uman MDA-MB-435 și adezivitatea celulelor acestuia la endoteliu. Peptidul P-30 specific Ag.T

(HGRFILPWWYAFSPS) selectat din bacteriofag inhibă, de asemenea, agregarea homotipică spontană a acestor celule canceroase până la 74%, în funcție de doză. Deoarece Ag.T are beta galactoză ca zahar terminal, s-a urmărit profilul expresiei care leagă beta-galactozidul cu expresia lectinelor în aceste celule.

Expresia abundentă a galectin-1 și galectin-3 (35S) metionină/cisteină în această linie, sugerează interacțiunea posibilă dintre galectine și Ag.T. Ambele galectine participă la aderența celulelor la endoteliu. La locurile de contact cu celulele tumorale se constată agregarea galectin-3 pe celulele endoteliale în acord cu posibilitatea sa de a interacționa cu Ag.T pe celulele canceroase. Totuși, galectin-1 se acumulează masiv la contactul celulă-celulă, predominant pe celulele tumorale.

Ag.T specific P-30 inhibă cu 50% această adeziune, arătând că el participă la adeziunea la endoteliu a celulelor carcinomului mamar uman (31).

Galectin-3 este o proteină ce cuplează carbohidrați, cu specificitate pentru epitopii grupelor sanguine 1 și 11ABH și pentru polilactozamine-glicani din glicoproteinele de la suprafața celulei, galectin-3 fiind proteina celulară majoră non-integrină care cuplează laminina. Fiind prezentă în unele sisteme tumorale cu metastază s-a pus întrebarea dacă induce morfogeneza celulelor endoteliale. Se susține că galectin-3 afectează chemotaxisul și morfologia celulelor și stimulează formarea capilarelor HUV-EC-C in vitro și angiogeneza in vivo. Morfogeneza celulelor endoteliale este un proces dependent de carbohidrat. Deci, recunoașterea carbohidratului de la suprafața celulelor endoteliale poate induce o cascadă de semnalizare care duce la diferențierea celulelor endoteliale și la angiogeneza (32).

Galectinele, o familie de lectine mamaliene cu specificitate pentru beta-galactozide, sunt implicate și în mecanismul reglării creșterii și adeziunii celulare. Se admite o relație între nivelele expresiei lor și nivelele malignității gliomelor umane. În timpul progresiei malignității tumorilor astrocitice umane, nivelele expresiei galectin-1 și galectin-3 se schimbă semnificativ în timp ce nivelul galectin-8 rămâne neschimbat. Aceste 3 proteine sunt implicate în invazia astrocitelor tumorale din parenchimul cerebral, deoarece nivelele expresiei lor sunt mai înalte în porțiunile invazive ale glioblastomelor xenogrefate decât în părțile lor mai puțin invazive.

Galectin-3 și galectin-1, și mai puțin galectin-8 stimulează marcat migrarea celulelor glioblastomului in vitro. Deoarece benzile pentru transcriptele galectin-2, 4 și 9 umane sunt aparent mai puțin frecvente și intense în 8 linii de glioblastoame umane, acest sistem oferă posibilitatea definirii funcțiilor unor galectine (33).

Galectin-3 este implicat în creșterea și diferențierea celulei, în rezistența la apoptoză și în progresia tumorii. S-a urmărit dacă acesta poate proteja contra apoptozei indusă de pierderea ancorajului celulei. Sensibilitatea celulară la ancoraj se asociază cu reglarea ciclului celular. Celulele epiteliale mamare BT549 care supraexprimă galectin-3 răspund la pierderea adezivității lor prin inducția stopării în faza ciclului celular (G1), fără apoptoză detectabilă. Oprirea ciclului celular în faza G1 mediată de galectin-3 implică subreglarea nivelelor ciclului pentru G1-S (ciclina E și ciclina A) și suprareglarea nivelelor proteinelor lor inhibitoare (p21 (WAF1/CIP1) și p27Kip1). După pierderea ancorajului celulei, proteina Rb hipofosforilată în celulele care supraexprimă galectin-3 induce expresia ciclului D1 (în faza G1 timpurie) și activitatea ei kinazică asociată. Galectin-3 ar putea fi un determinant critic pentru supraviețuirea celulelor canceroase diseminate, independent de ancorajul celular în timpul circulației metastazice (34).

Galectin-3 se exprimă rar în țesutul tiroidian normal, dar este abundent în citoplasma celulelor neoplazice îndeosebi în carcinoamele foliculare și papilare decât în adenoame. Leziunile primare de carcinom papilar cu metastaze, conțin concentrații semnificativ mai înalte decât tumorile nemetastazice. Totuși, expresia lui scade semnificativ în leziunile metastazice din ganglionii limfatici în comparație cu leziunile lor primare. Se crede că proteina "lucrează" pe diferite căi, în diferite stadii ale proliferării neoplaziilor tiroidei. Se presupune că în stadiile târzii ale progresiei tumorale expresia sa scăzută ar putea facilita eliberarea celulelor canceroase din leziunile primare, pentru invazie și metastazare (35).

Cuplarea galectinelor cu alte molecule matriciale în cancer.

Supraexpresia galectin-3 în linii de carcinom mamar uman nu impune diferențe privind aspectele creșterii și proliferării celulei dar celulele care îl supraexprimă comparativ cu cele care îl exprimă puțin, relevă o semnificativă amplificare a adeziunii directe sau via expresiei crescute a integrinelor specifice (alfa 4 și beta 7) la laminină, fibronectină și vitronectină. De asemenea, se remarcă o remodelare a elementelor citoscheletale asociate cu diseminarea celulelor, respectiv a microfilamentelor, ca și o supraviețuire amplificată după expunerea la diferiți stimuli apoptotici (citokine, radiații). În concluzie, supraexpresia galectin-3 poate juca un rol în invazia celulelor tumorale și metastază prin influența specifică a adeziunii celulelor la matrice, ceea ce conferă avantaj selectiv de supraviețuire și rezistență la apoptoză (36).

În relația celulă-matrice s-au studiat relațiile lamininei cu galectin-1 și galectin-3. Locurile de cuplare dintre laminină și aceste două lectine au fost analizate în 16 leiomiome și 10 leiomiosarcome uterine. Concentrația locurilor de cuplare a galectin-3 este semnificativ mai slabă în leiomiosarcom decât în leiomiom. Deși, semnificativ mai înaltă concentrația lamininei este heterogen distribuită în leiomiosarcom decât în leiomiom. În contrast, nivelele expresiei galectin-1 și a locurilor sale de cuplare, rămân similare pentru cele două tipuri de tumori. Nivelele expresiei galectin-3 și a locurilor lui accesibile de cuplare pot fi utile în diferențierea leiomiomului de leiomiosarcom (37).

Galectin-3 joacă un rol în adeziunea la elastină a celulelor mamare canceroase. Receptorul celular al elastinei – proteina elastin/laminină de 67 kD – poate avea proprietăți galectin-like. S-a analizat adeziunea celulelor carcinoame mamare în substrat acoperit cu elastină, în condițiile în care se elimină participarea la adeziune a integrinei. Proba de adeziune s-a făcut atât în absența cât și în prezența galectin-3 recombinat și purificat. Concentrațiile înalte de galectin-3 conectează celule carcinoame mamare la substratul acoperit cu elastină, proteina arătând o interacțiune specifică de cuplare cu elastina purificată, în manieră dependentă de lactoză. Galectin-3 endogen din celulele carcinomului mamar este asociat cu tropoelastina. Celulele canceroase care exprimă pe suprafața lor galectin-3, arată proliferarea amplificată pe elastină comparativ cu cele care nu îl exprimă. Se sugerează că galectin-3 poate regla interacțiunea dintre celule și elastină (38).

Malformațiile renale la copii sunt comune, fiind cauzate de insuficiența renală cronică. Rinichii displazici sunt un model unic de interacțiune epiteliolo mezenchimală perturbată care duce la formarea de nefroni ramificați malformați, amiași de celule mezenchimale nediferențiate și metaplazice. S-a stabilit că epiteliul displazic uman exprimă PAX-2 – un factor de transcriere –, BCL-2 – un factor de supraviețuire – și galectin-3 – o moleculă de adeziune și semnalizare celulară. Aceste gene sunt implicate în oncogeneză, iar expresia lor persistentă poate duce la proliferarea chisturilor displazice ceea ce explică masiva creștere în unele displazii renale multichistice. S-a detectat apoptoza marcată în țesutul nediferențiat din jurul epiteliului displazic, ceea ce oferă un potențial mecanism pentru explicația regresiei rinichilor displazici. Totuși, acești rinichi nu pot avea funcții excretorie dar reprezintă modele de creștere și involuție tisulară. Elucidarea leziunilor moleculare din malformațiile renale pot duce la noi terapii care să amplifice diferențierea celulelor progenitor (39).

Deși 3 linii de carcinom de prostată exprimă galectin-1 și galectin-3, numai galectin-1 se exprimă pe suprafața celulelor. Linia LNCaP nu exprimă galectine. Din celulele acestei linii transfectate cu galectin-1 s-au izolat 4 clone care exprimă pe suprafața lor exclusiv galectin-1. Cinetica cuplării cu proteinele matriciale apare accelerată în liniile transfectate dar, în general, cuplarea nu este amplificată. În urma tratării cu EDTA (pentru eliminarea integrinelor) cuplarea unei clone cu galectin-1 la laminină și fibronectină a crescut față de linia de control. Se propune astfel, ca galectinele pot contribui la proprietățile adezive ale unor celule de cancer prostatic (40).

Recunoașterea proteinelor glicoconjugatului celular lectină-carbohidrat este operativă în transferul informației biochimice. Cum s-a menționat, galectinele constituie o familie de lectine care cupleză galactozidele endogene conservate la locul de cuplare. Membrii acestei familii sunt implicați în adeziunea celulelor și reglarea creșterii acestora. Expresia de suprafață a galectin-1 (homodimeric) și galectin-3 (monomeric himeric) și a locurilor accesibile de cuplare pe diferite linii tumorale, arată că accesibilitatea ligandului pentru cele două galectine diferă în tipurile de linii tumorale.

Cuplarea celulelor tumorale la lamininele și fibronectinele plasmatice sau placentare este în general redusă după tratarea celulelor sau matricei cu galectine. Galectin-3 este mai eficient decât galectin-1 în privința afectării potenței lamininei, decât este matricea. Cuplarea galectin-1 pe de altă parte, este mai eficientă pentru blocarea asocierii celulei la fibronectină, după preincubarea cu suspensii celulare.

Diferențe sunt și în biodistribuția galectinelor unde un omolog aviar al galectin servește drept control pentru a distinge efectele spațiale și de cuplare a carbohidratului. Din 180 carcinoame ce includ și 60 leziuni metastazice, analiza histopatologică a ganglionilor limfatici mamari atât negativi cât și pozitivi, arată o corelație fie a cuplării crescute a galectin-1 și reducerea expresiei galectin-3, fie o cuplare redusă a ambelor proteine cu apariția de leziuni ganglionare.

Considerându-se lectina care cuplează heparină expresia redusă a proteinei poate fi asociată cu un statut pozitiv al ganglionilor în cancerul mamar, rezultat ce reflectă cerințele dependente de tipul celular și de ligandul galectin, în timpul cascadei metastazice (41).

1. Lehninger L. A., *Biochemistry*, sec. Ed., Worth Publishers, Inc., New York, N.Y., 10016, vol. II, p. 327, 1975.
2. Hsu D. K., Dowling C. A., Jeng K. C., Chen J. T., Yang Ry, Liu F. T., Galectin-3 expression is induced in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *International Journal of Cancer*, 81(4), 519–26, 1999.
3. Gong H. C., Honjo Y., Nangia-Makker P., Hogan V., Mazurak N., Bresalier R. S., Raz A., The NH2 terminus of galectin-3 governs cellular compartmentalization and functions in cancer cells. *Cancer Research*, 59(24), 6239–45, 1999.
4. Menom R. P., Hughes R. C., Determinants in the N-terminal of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *European Journal of Biochemistry*, 264(2), 569–76, 1999.
5. Hau D. K., Yang R. Y., Pan E., Yu L., Salomon D. R., Fung-Leung W. P., Liu F. T., Targeted disruption of the galectin-3 gene results in alternated peritoneal inflammatory responses. *American Journal of Pathology*, 156(3), 1073–83, 2000.
6. Villa-Verde D. M., Calado T. C., Ocampo J. S., Silva-Monteiro E., Sawino W., The conveyor belt hypothesis for thymocyte migration: participation of adhesion and de-adhesion molecules. *Brayilian Journal of Medical and Biological Research*, 32(5), 569–72, 1999.
7. Fronkova V., Holikova Z., Liu F. T., Homolka J., Rijiken D. C., Andre S., Borin N. V., Smetana K. Jr, Gabius H. J., Simultaneous detection of endogenous lectins and their binding capacity at the single-cell level a technical note. *Folia Biologica*, 54(4), 157–62, 1999.
8. Rini J. M., Lobsonov Y. D., New animal lectin structures. *Current Opinion in Structural Biology*, 9(5), 578–84, 1999.
9. Muller S. A., Sasaki T., Bork P., Wolpensinger B., Schulthess T., Timpl R., Engel A., Engel J., Domain organization of Mac-2 binding protein and its oligomerization to linear and ring-like structures. *Journal of Molecular Biology*, 251(4), 801–13, 1999.
10. Tsay Y. G., Liu Ny, Voss P. G., Patterson R. J., Wang J. L., Export of galectin-3 from nucleu of digitonin-permeabilized mouse 3T3 fibroblasts. *Experimental Cell Research*, 252(2), 250–61, 1999.
11. Openo K. P., Kadrofske M. M., Patterson R. J., Wang J. L., Galectin-3 expression and subcellular localization in senescent human fibroblasts. *Experimental Cell Research*, 255(2), 278–90, 2000.
12. Manon R. P., Strom M., Hughes R. C., Interaction of a novel cysteine and histidine-rich cytoplasmic protein with galectin-3 in a carbohydrate-independent manuer. *FEBS Letters*, 470(3), 227–31, 2000.
13. Colnot C., Sidhu S. S., Poirier F., Balmain N., Cellular and subcellular distribution of galectin-3 in the epiphyseal cartilage and bone of fetal and neonatal mice. *Cellular and Molecular Biology*, 45(8), 1191–202, 1999.
14. Le Marer N., Galectin-3 expression in differentiating human myeloid cells. *Cell Biology International*, 24(4), 245–51, 2000.
15. Gonen T., Donaldson P., Kistler J., Galectin-3 is associated with the plasma membrana of lens fiber cells. *Investigative Ophtalmology and Visual Science*, 41(1), 199–203, 2000.
16. Reichert F., Rotshenker S., Galectin-3/MAC-2 in experimental allergic encephalomyelitis. *Experimental Neurology*, 160(2), 508–14, 1999.
17. Fogel S., Guitant M., Legrand A., Monsigny M., Hebert E., The tat protein of HIV-1 induces galectin-3 expression. *Glycobiology*, 9(4), 383–7, 1999.
18. Moody T. H., Ochieng J., Villalta F., Novel mechanism that Trypanosoma cruz, uses to adhere to the extracellular matrix mediated by human galectin-3. *FEBS Letters*, 470(3), 305–8, 2000.
19. Castronovo V., Liu F. T., van den Brule F. A., Decreased expression of galectin-3 in basal cell carcinoma of the skin. *International Journal of Oncology*, 15(1), 67–70, 1999.
20. Ellerhorst J., Troncoso P., Xu X. C., Lee J., Lotan R., Gelectin-1 and galectin-3 expression in human prostate tissue and prostatic cancer. *Urological Research*, 27(5), 362–7, 1999.
21. Delorge S., Saussez S., Pelc P., Devroedde B., Marchant H., Burchert M., Zeng F. Y., Danguy A., Salmon I., Gabius H. J., Kiss R., Hassid S., Correlation of galectin-3/galectin-3-binding sites with low differentiation status in head and neck squamous cell carcinomas. *Otolaryngology head and Neck Surgery*, 122(6), 834–41, 2000.

22. Choufani G., Nagy N., Saussez S., Marchant H., Bisschop P., Burchert M., Danguy A., Louryan S., Salmon I., Gabius H. J., Kiss R., Hassid S., The levels of expression of galectin-1, galectin-3, and the Thomsen-Friedenreich antigen and their binding sites decrease as clinical aggressiveness increases in head and neck cancers. *Cancer*, 86(11), 2553–63, 1999.
23. Nakamura M., Infusa H., Adachi T., Aga M., Kurimoto M., Nakatani Y., Wakano T., Nakajima A., Hida J. I., Miyake M., Shindo K., Yasutomi M., Involvement of galectin-3 expression in colorectal cancer progression and metastasis. *International Journal of Oncology*, 15(1), 143–8, 1999.
24. Gasbarri A., Martegani M. P., Del Prete F., Lucante T., Natali P. G., Bartolazzi A., Galectin-3 and CD44v6 isoforms in the preoperative evolution of thyroid nodules. *Journal of Chemical Oncology*, 17(11), 3494–502, 1999.
25. Inohara H., Honjo Y., Yoshii T., Akahani S., Yoshida J., Hattori K., Okamoto S., Sawada T., Raz A., Kubo T., Expression of galectin-3 in fine-needle aspirates as a diagnostic marker differentiating benign from malignant thyroid neoplasms. *Cancer*, 85(11), 2475–84, 1999.
26. Francois C., van Velthoven R., De Lathouwer O., Moreno C., Peltren A., Kaltner H., Salmon I., Gabius H. J., Danguy A., Decaestecker C., Kiss R., Galectin-1 and galectin-3 binding pattern expression in renal cell carcinomas. *American Journal of Clinical Pathology*, 112(2), 194–203, 1999.
27. Cindolo L., Benvenuto G., Salvatore P., Pero R., Salvatore G., Mirone V., Prezioso D., Altieri V., Bruni C. B., Chiariotti L., Galectin-1 and galectin-3 expression in human bladder transitional-cell carcinomas. *International Journal of Cancer*, 84(1), 39–43, 1999.
28. Gordower L., Decaestecker C., Kacem Y., Lemmers A., Gusmare J., Burchert M., Danguy A., Gabius H., Salmon I., Kiss R., Camby I., Galectin-3 and galectin-3-binding site expression in human adult astrocytic tumors and related angiogenesis. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 25(4), 319–30, 1999.
29. Kuklinski S., Pesheva P., Heimann C., Urschnee S., Gloor S., Graeber S., Herzog V., Pietsch T., Wiestler O. D., Probstmeier R., Expression pattern of galectin-3 in neural tumor cell lines. *Journal of Neuroscience Research*, 60(1), 45–57, 2000.
30. Plzack J., Smetana K. Jr., Betka J., Kodet R., Kaltner H., Gabius H. J., Endogenous lectins (galectin-1 and -3) as probes to detect differentiation-dependent alterations in human squamous cell carcinomas of the oropharynx and larynx. *International Journal of Molecular Medicine*, 5(4), 369–72, 2000.
31. Glinesky V. V., Huflejt M. E., Glinesky G. V., Deutscher S. L., Quinn T. P., Effects of Thomsen-Friedenreich antigen-specific peptide P-30 on beta-galactoside-mediated homotypic aggregation and adhesion to the endothelium of MDA-MB-435 human breast carcinoma cells. *Cancer Research*, 60(10), 2584–8, 2000.
32. Nangia-Makker P., Honjo Y., Sarvis R., Akahani S., Hogan V., Pienta K. J., Raz A., Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *American Journal of Pathology*, 156(3), 899–909, 2000.
33. Camby I., Belot N., Rorive B., Lefranc F., Maurage C. A., Lahm H., Kaltner H., Hadari Y., Ruchoux M. M., Brotchi J., Zick Y., Salmon I., Gabius H. J., Kiss R., Galectins are differentially expressed in pilocytic astrocytomas, astrocytomas, anaplastic astrocytomas and glioblastomas significantly modulate tumor astrocyte migration. *Brain Pathol.*, 11(1), 12–26, 2001.
34. Kim H. R., Lin H. M., Biliran H., Raz A., Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells. *Cancer Research*, 59(16), 4146–54, 1999.
35. Kawachi K., Matsushita Y., Yonezawa S., Nakano S., Shirao K., Natsugoe S., Sueyoshi K., Aikou T., Sato E., Galectin-3 expression in various thyroid neoplasms and its possible role in metastasis formation. *Human Pathology*, 31(4), 428–33, 2000.
36. Matarrese P., Fusco O., Tinari N., Natioli N., Liu F. T., Semeraro M. L., Malorni W., Iacobelli S., Galectin-3 overexpression protects from apoptosis by improving cell adhesion properties. *International Journal of Cancer*, 85(4), 545–54, 2000.
37. Schwarz G. Jr., Rummelink M., Decaestecker C., Gielen I., Budel V., Burchert M., Darro F., Danguy A., Gabius H. J., Salmon I., Kiss R., Galectin fingerprinting in tumor diagnosis. Differential expression of galectin-3 and galectin-3-binding sites, but not galectin-1, in benign and malignant uterine smooth muscle tumors. *American Journal of Clinical Pathology*, 111(5), 623/31, 1999.
38. Ochieng J., Warfield P., Green-Jarvis B., Fentie I., Galectin-3 regulates the adhesive interaction between breast carcinoma cells and elastin. *Journal of Cellular Biochemistry*, 75(3), 505–14, 1999.
39. Wolf A. S., Winyard P. J., Gene expression and cell turnover in human renal dysplasia. *Histology and Histopathology*, 15(1), 159–66, 2000.
40. Ellerhorst J., Nguyen T., Cooper D. N., Lotan R., Lotan R., Differential expression of endogenous galectin-1 and galectin-3 in human prostate cancer cell lines and effects of overexpressing galectin-1 on cell phenotype. *International Journal of Oncology*, 14(2), 217–24, 1999.
41. Andre S., Kojima N., Fink C., Kaltner H., Kayser K., Gabius H. J., Galectin-1 and -3 and their ligand in tumor biology. Non-uniform properties in cell-surface presentation and modulation of adhesion to matrix glycoproteins for various tumor cell lines, in the distribution of free and liposome-bound galectins and in their expression by breast and colorectal carcinomas with/without metastatic propensity. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 125(8–9), 461–74, 1999.

AGRIN

Agrin este un proteoglican heparan sulfat, proteină a matricei extracelulare, ce deține numeroase domenii asociate cu membrana bazală a câtorva structuri.

A fost identificat inițial în complexul oligomeric de proteine sarcolemale în asociere cu distrofina, produsul proteic al genei distrofiei musculare Duchenne, ceea ce a determinat o campanie de cercetări asupra moleculelor matriciale dintre terminațiile nervoase și fibrele musculare. În consecință, s-au adus numeroase contribuții privind joncțiunile neuromusculare. Agrin este, de asemenea, implicat în complexe de matrice extracelulare și a altor organe, în structura sistemului nervos central, în relațiile dintre celulele nervoase, în rinichi și plămâni. Majoritatea datelor privește rolul său în joncțiunile neuromusculare intervenind, în principal, în organizarea sinapselor mediind agregarea receptorilor postsinaptici ai acetilcholinei (AChR) la nivelul acestor joncțiuni în timpul dezvoltării și în procesul regenerării la vertebrate.

La nivelul funcțiilor neuromusculare, agrin se exprimă în neuron, fibra musculară și celula Schwann. Cel derivat din neuroni este factorul agregant al receptorului postsinaptic al acetilcholinei.

Sinapsele sunt stații esențiale de releu pentru transmiterea informației interneuronale și între neuroni și alte celule. Formarea ordonată și strict reglată a acestor structuri este crucială pentru funcționarea sistemului nervos. Studiul intensiv al sinapselor dintre nervi și mușchi urmărește elucidarea procesului de cuplare a isoformelor specifice neuronilor, pe de o parte și cuplarea proteinei membranei bazale agrin, la receptorii de pe suprafața miotubulilor, pe de altă parte.

Agrin activează un complex receptor care include kinaza specific-musculară și componente adiționale încă neidentificate. Activarea receptorului duce la agregarea AChR și a altor proteine ale aparatului post-sinaptic, proces cu aspecte unice care îl disting de alte TK-R. Autofosforilarea domeniului kinazic care induce frecvent recrutarea adaptorului și molecule de semnalizare, nu este suficientă pentru agregarea AChR.

Aparent, interacțiunea domeniului extracelular cu componenta neidentificată este, de asemenea, reclamată pentru acest proces. Agrin cuplează la un complex proteinic secundar de pe suprafața mușchiului, cunoscut ca un complex glicoproteinic asociat cu distrofina. Acest complex formează unul din capetele unei legături moleculare dintre matricea extracelulară și citoschelet.

În timp ce multe componente ale mecanismului care determină diferențierea postsinaptică sunt cunoscute, tabloul căii moleculare ce determină redistribuirea proteinei sinaptice este mai incomplet (1).

Molecula agrin

Agrin este o moleculă de aproximativ 95nm lungime care constă dintr-un domeniu globular, un domeniu N-terminal ce cuplează la laminină, un bastonaș central foramat predominant din domeniul follistatin-like și 3 alte domenii globulare C-terminale laminin-like. În puține cazuri HSPG (heparan sulfat proteoglican) emerge din porțiunea centrală a proteinei miez. Agrin cuplează la regiunea centrală a domeniului spiralat tricatener de oligomerizare, cu brațul lung al lamininei-1, care mediază asamblarea subunității moleculei native de laminină.

În premieră se semnalează interacțiunea proteină-proteină a matricei extracelulare ce implică domeniul spiralat cu rolul lamininei-1. Agrin se asociază la membrana bazală pe cale polarizată (2).

Transcrierea alternativă a mRNA agrin controlează abilitatea proteinei de a induce formarea AChR la joncțiunea neuromusculară. Folosind o genă reporter transfectabilă, s-a demonstrat că exonul

Y, un exon agrin alternativ, este controlat de o secvență reglatoare aval de intron. Porțiunile acestor secvențe intronice au proprietatea unui amplificator care poate activa funcția alternativă a unui exon heterolog când este plasat aval de intron. Regiunea reglatoare este complexă structural conținând câteva elemente diferențiate capabile de alternanță activă.

Elemente amplificatoare individuale diferă în specificitatea lor tip-celulă și aparent nu sunt sinergice astfel că, împreună cele două elemente induc o alternanță mai scăzută a codificărilor decât luate separat. Prin mutageneză s-au identificat nucleotidele esențiale din aceste elemente reglatoare, elemente similare cu cele cunoscute ca amplificator de alternanță intronică. Acest amplificator, exon Y și componentele sale, aparțin unui sistem aparent combinațional implicat în controlul multipleror elemente reglatoare, dar ca și un contributor amplificator implicat major în reglarea exonului Y, controlând în final proprietățile proteinei agrin (3).

Cuplarea agrinului la suprafața celulelor musculare poate induce schimbări radicale în topografia și fiziologia sarcolemei ducând la organizarea componentelor postsinaptice opuse nervului terminal.

Codificarea alternativă a mRNA agrin dă câteva izoforme care variază în expresia celulară, profilul de dezvoltare și structurare a AChR. Neuronii și celulele musculare exprimă câteva din aceste izoforme. Astfel, s-au analizat efectele splicingului AgyZ în locurile Z și Y ale agrin. Izoformele cuplează diferit la suprafața miotubulilor, Ag 0,0 și Ag 4,0 arătând nivele de cuplare mai înalte decât Ag 4,8. Formele artificiale Ag0,8 arată nivele similare cu Ag 4,8.

Vizualizarea cuplării agrin după incubarea acută relevă că fiecare izoformă asociată cu suprafața celulelor apare într-un model distinct. Cuplarea la miotubuli a Ag4,8 al agrin timp de 4 ore induce agregarea lui AChR. Locurile de cuplare pe suprafața celulei, ca și insertul a 8 aminoacizi reprezintă factorul dominant care influențează nivelul de cuplare a agrin la plasmalemă. Unele din aceste izoforme se redistribuie la agregatele AChR după stimularea proteinei (4).

Agrin direcționează agregarea moleculară postsinaptică respectiv AChR, activitate ce rezidă în întregime în porțiunea C-terminal a proteinei, porțiune care constă din 3 domenii globulare (G1, 2 și 3) laminin-like și din 4 ripituri EGF-like.

Transcrierea alternativă a mRNA variază în domeniul G2 cu inserție a 4 aminoacizi și în G3 la inserția a 8-, 11- sau 19 aminoacizi. În cultură s-a măsurat activitatea acestora la nivelul AChR; astfel domeniul G3 arată activitate detectabilă iar domeniile G1 și G2 când sunt legate fizic la G3 îi amplifică activitatea, ca și ripiturile EGF-like. Agregatele induse de două domenii concatenate G3(8) sunt semnificativ mai mici decât toate celelalte forme de agrin studiate. Prin urmare, domeniile G sunt unități funcționale care interacționează independent de organizarea lor specifică, pentru a realiza agregările AChR (5).

Joncțiunile neuromusculare la broască sunt formate din cele trei componente (neuronul motor, mușchi și celulele Schwann) sunt o unică structură în care se observă detalii fine privind relațiile dintre cele trei componente. Procesele celulelor Schwann care se extind din sinapsă și vin în contact intim cu fibra musculară se colorează pozitiv cu anticorpi anti-agrin, ca și matricea extracelulară din jurul celulei Schwann și a proceselor sale. Suprafața fibrei musculare subiacente proceselor celulelor Schwann este lipsită de agregate AChR.

Au fost clonate și secvențiate cDNA care codifică porțiunea C-terminal a agrin de la Rana pipiens. cDNA din creier și mușchi relevă că, asemenea altor specii, în țesutul cerebral se constată transcripte pentru agrin care conțin inserții B8, B11 sau B19. Spre deosebire de alte specii, locul exact al inserțiilor B de la broască este ușor alterat la acest nivel din secvența codon. Se propune ipoteza că celulele Schwann ar produce agrin care nu are inserții în regiunea B și că acesta nu direcționează agregarea AChR in vivo în condiții și concentrații fiziologice (6).

Date privind agregarea AChR cu agrin

Formarea joncțiunii neuromusculare reclamă o serie de interacțiuni reciproce inductive între neuronul motor și celula musculară, interacțiuni care culminează cu juxtapoziția precisă a nervului terminal presinaptic înalt specializat și cu o endoplasma postsinaptică complexă de pe sarcolemă.

Deși agrin derivat din nerv s-a crezut că joacă un rol cheie în timpul formării joncțiunii neuro-musculare, mecanismele moleculare care subliniază acțiunea proteinei arată că aceasta acționează via R-TK MuSK (receptorul tirozin-kinazei specifică mușchiului) (7). Acest receptor este necesar pentru formarea joncțiunii neuromusculare, unde acesta se fosforilează când este expus la izoforme de agrin sintetizate de neuroni.

MuSK este asociată cu agregatele de AChR vizibile timpuriu în dezvoltarea endoplăcii motoare. MuSK și AChR contribuie la formarea joncțiunii neuromusculare. Aceste două proteine sunt, de asemenea, coordonate legate pe suprafața miotubulilor cultivați, unde sunt colocalizate în agregate sponatane induse de agrin.

În timp ce MuSK este normal restrictată pe endoplaca motoare în mușchiul adult, denervarea duce la expresia ei extrajoncțională, deși la 14 zile după denervare o concentrație detectabilă rămâne localizată pe endoplaca motoare.

MuSK extrajoncțională apare prima la 3 zile după denervare și este acut redusă după reinervare. În mușchiul adult paralizat este marcat alterată expresia MuSK în sensul creșterii ei. În consecință expresia MuSK este înalt reglată de inervație, de activitatea musculară și de agrin, în timp ce disturbanța ei este precis coordonată cu a AChR (8).

În timpul formării joncțiunii neuromusculare, proteina membranei bazale-agrin – inițiază agregarea AChR pe suprafața miotubulilor.

După incubarea cu agrin, kinaza MuSK se fosforilează deși ea însăși nu cuplează la agrin. Utilizarea anticorpilor specifici MuSK arată corelația dintre fosforilarea MuSK și agregarea AChR, ca și abilitatea diferitelor variante și fragmente trunchiate ale agrin. Numai formele de agrin care sunt inductori potenți ai AChR pot determina fosforilarea MuSK.

Concentrații picomolare de agrin sunt suficiente pentru a induce fosforilarea MuSK. Cantități similare sunt necesare pentru agregarea AChR, ca și pentru fosforilarea lor pe reziduul tirozină. Exclusiv cuplarea agrin la complexul MuSK-R răspunde de inițierea agregării AChR (9).

Izoformele neurale ale agrin pot stimula în fibrele musculare electric active, transcrierea subunităților genei epsilon AChR, ceea ce conduce la formarea joncțiunii neuromusculare. Se pune problema dacă aceasta implică neuregulinele (NRG) care stimulează in vitro transcrierea subunităților genei AChR prin activatorul receptor-erb-B. Inducția transcrierii genei epsilon AChR este inhibată în miotubuli cultivați care hiperexprimă o mutantă inactivă a erb-BR, ceea ce demonstrează implicarea NRG/Erb-B în expresia AChR indusă de agrin.

Extrakte din suprafața miotubulilor cultivați induc fosforilarea tirozinei erb-BR sugerând că celulele musculare exprimă activitate biologică NRG-like pe sarcoplasmalema lor. NRG musculare au domenii Ig-like reclamate pentru mobilizarea lor pe HSPG din matricea extracelulară. În regiunile extrasinaptice ale fibrelor musculare inervate in vivo, agrin neural ectopic induce colocalizarea masivă a AChR NRG derivat din mușchi și a HSPG. Deci, domeniul Ig al NRG, cuplează la HSPG agrin dar și la perlecan. În concluzie, agrin neuronal poate induce transcrierea genei AChR prin agregarea HSPG muscular pe suprafața fibrei musculare, care ulterior servește pentru cuplarea focală locală a NRG derivate din mușchi în scopul reglării expresiei genei AChR la nivelul joncțiunii neuromusculare (10).

Cum s-a menționat, agrin inițiază formarea sinapsei neuromusculare, însă, calciul intervine în semnalizarea lui via MuSK R-TK și în cascada intracelulară, conducând la fosforilarea AChR și la agregare. Îndepărtarea calciului extracelular blochează complet MuSK indusă de agrin dar și neuramidaza în miotubuli în cultură. Calciul extracelular este astfel solicitat, atât pentru formarea complexului de semnalizare MuSK, cât și pentru reglarea intracelulară a fosforilării și agregării AChR în membrana postsinaptică (11).

La nivelul joncțiunii neuromusculare mamaliene, inervația induce și menține stabilitatea metabolică a AChR. Introducerea cDNA agrin neural în mușchiul solear denervat de șobolan adult determină creșterea proteinei, care agregă AChR pe fibrele musculare, al căror timp de viață crește într-o manieră dependentă de doză, de la 1 la 10 zile. Stimularea electrică a mușchiului crește

stabilitatea AChR, astfel încât la concentrații suficient de înalte agrin neural poate stabiliza AChR la nivelele caracteristice din joncțiunile neuromusculare inervate (12).

La șoarecii mutați *src* (-/-), *fyn* (-/-) și *yes* (-/-) zona sinapsei neuromusculare se dezvoltă, axonii motori găsindu-și căile de distribuire, iar transcripția specifică sinapsei este normală. Se demonstrează astfel că, aceste kinaze nu sunt necesare în formarea timpurie a sinapsei.

În linii de celule musculare lipsite de *src* și *fyn*, dar cu agrin neural și laminin-1 s-a indus agregarea normală a AChR, iar agrin a indus tirozin-fosforilarea subunității beta. Totuși, AChR din miotubulii *src* (-/-) și *fyn* (-/-) sunt mai puțin stabili decât cei din celulele de tip-sălbatic. În concluzie, stabilitatea agregatelor AChR indusă de agrin necesită prezența *src* și *fyn*, mai curând ca activități de adaptor, decât ca activități kinazice (13).

Agrin în regenerarea sinapselor

S-au transferat regiunile extrajoncționale ale mușchiului solear de la șobolan adult, cu cDNA agrin neural, pentru a induce formarea de miofibrile în aparatul postsinaptic-like care conține agregate AChR. După o săptămână, aproximativ 30% din agregate conțin o mixtură de AChR-epsilon și AChR-gamma, iar restul de 70% conține numai AChR-gamma.

Dacă mușchii transfecți sunt reinervați în regiunea joncțională originală în ciuda absenței terminațiilor axonale, aparatul conține gradual numai AChR-epsilon.

Se concluează că, la aparatul postsinaptic al joncțiunii neuromusculare ectopice, format dintr-un nerv nonself implantat în regiunea joncțiunii mușchiului denervat, agrin secretat de axonul terminal joacă un rol direct în schimbarea AChR-gamma/AChR-epsilon care atestă maturitatea aparatului postsinaptic. Agrin și acetilcolina sunt singurii factori derivați din nerv și reclamați pentru această schimbare.

În concluzie, la joncțiunea neuromusculară ectopică se detectează agrin după implantarea unui nerv străin în regiunea extrajoncțională a mușchiului solear adult denervat, factor unic derivat din nerv și suficient nu numai pentru a cauza agregarea proteinei în stadiul timpuriu al formării aparatului postsinaptic, dar și pentru apariția schimbărilor în conformația fibrelor musculare și în distribuția organitelor care apar pe măsură ce aparatul postsinaptic atinge maturitatea (14).

Se sugerează că agrin și acetilcolina derivată din activitatea musculară indusă de axonii transplantați sunt suficienți pentru a determina în fibra musculară adultă denervată, procese care reglează dimensiunea și distribuția joncțiunilor neuromusculare ectopice (14, 15, 16).

Agrin în asociere cu alte molecule ale matricei extracelulare

S-a menționat că agrin este un proteoglican heparan sulfat (HSPG) reclamat pentru formarea și menținerea joncțiunilor neuromusculare. În timpul dezvoltării el este secretat de neuronii motori pentru a determina în fibra musculară, agregarea locală a AChR și a altor proteine care împreună formează aparatul postsinaptic.

După eliberarea din neuronul motor, agrin cuplează cu membrana bazală a mușchiului în dezvoltare și rămâne asociat cu structura sinaptică de-a lungul vieții mușchiului adult.

Agrin de lungime deplină din miotubuli de pui cuplează la membrană. Primii 130 amino-acizi NH₂-terminal sunt necesari pentru cuplarea la miotubulii cultivați. Agregările AChR care sunt determinate de lungime deplină sunt reduse. Fragmentele de 130 aminoacizi din NH₂-terminal de agrin sunt suficiente pentru a cupla la matrice, cuplare care este mediată de laminina-1. Asemenea fragmente cuplează la izoformele de laminină-2 și laminină-4 din membrana bazală a fibrei musculare. Pe miotubulii cultivați, proteina se colocalizează cu laminina și este îmbogățită în agregatele de AChR. Se sugerează că, cuplarea agrin cu laminina oferă bazele localizării în membrana bazală sinaptică și în alte membrane bazale (17).

Agrearea AChR de către agrin eliberat de neuron este o treaptă timpurie critică în formarea joncțiunii neuromusculare. Laminina, un component al membranei bazale musculare, induce de asemenea, AChR. Inducția acestuia în miotubulii C2 este specifică lamininei-1 și nu lamininei-2 (merozinei) sau lamininei-11 (o iziformă specifică sinapsei) care nu sunt active.

Laminina-1 induce agregarea AChR pe o cale independentă de cea folosită de agrin neural. Efectele lamininei-1 și agrin sunt strict aditive și apar în momente diferite. Agregarea indusă de laminina-1 nu reclamă prezența MuSK (receptor al TK) care este parte a complexului receptor pentru agrin. Laminina-1 nu induce fosforilarea tirozinei din MuSK în miotubulii C2, dar induce agregarea AChR în miotubulii da la șoareci MuSK (-/-) care nu răspund la agrin. Comparativ cu agrin, laminina-1 nu induce fosforilarea AChR, ceea ce demonstrează că fosforilarea tirozinei din acest receptor nu este necesară pentru agregarea din miotubuli. Astfel, laminina-1 acționează printr-un mecanism independent de cel folosit de agrin și poate fi o cale suplimentară pentru agregarea AChR în timpul sinaptogenezei (18).

Rapsin este o proteină citoplasmatică de 43kD care aglutinează AChR nicotinic în membrana postsinaptică. S-a urmărit efectul formării AChR nicotinic mediat de rapsin, asupra stabilității metabolice a acestui receptor.

Transfectarea în fibroblastele QT-6 care poartă pe suprafață AChR (cu subunitățile alfa, beta, epsilon și delta) detectați cu 125 I-alfa bungarotoxin, a dus la degradarea lor cu half-life de 16,4+/-1,1ore. Cotransfectate, rapsin și AChR determină extinderea lor, iar half-life crește la 20,6+/-1,0 ore.

Anticorpul mab35 anti-AChR determină creșterea degradării AChR asociat cu miastenia gravis: 80,8+/-2,5% din AChR marcați sunt degradați timp de peste 12 ore. Cotransfecția rapsin cu AChR reduce pierderea acestor receptori la 66,4+/-3,8%, având în vedere că rapsin reduce pierderile de AChR normal de la 53,2+/-2,1 la 44,2+/-2,2%.

Liniile de celule musculare din miotubulii de tip-sălbatic arată puțini AChR dar tratate cu agrin neural numărul lor crește de 30 ori. Agregările de receptori sunt însoțite de reduceri ale degradării AChR (în prezența și absența anticorpului anti-mab35) similare în magnitudine cu cele produse de hiperexpresia rapsin în celule QT-6.

În miotubulii deficienți în rapsin (-/-), tratamentul cu agrin neural nu determină nici agregarea AChR și nici degradarea lor. Astfel, agrinul neural poate degrada AChR tratat, prin inducția agregării lor dependentă de rapsin (19).

La joncțiunea neuromusculară, agregatele de AChR sunt ancorate la sarcolemă prin asocierea cu rapsin și alte proteine din aparatul postsinaptic. În miotubulii C2 în cultură, înainte și după tratarea cu agrin care induce agregarea AChR s-a urmărit interacțiunea AChR cu proteina rapsin. Când AChR sunt izolați în detergent din extracte de miotubuli C2 netratați, aceștia se asociază cu rapsin și mai puțin cu utrofin, distroglican beta, și kinazele src, dar nu sintrofin. Tratamentul cu agrin crește asocierea AChR cu MuSK, un TK-R ce este parte a complexului agrin-R, fără să afecteze alte interacțiuni. Miotubulii deficitari în rapsin, care nu formează agregate proteice ca răspuns la agrin, relevă faptul că rapsin este necesar pentru asocierea AChR cu utrofin și distroglican beta. Este, de asemenea, necesar și pentru creșterea indusă de agrin în asociere cu MuSK, dar nu pentru interacțiunile cu MuSK și kinazele src. În miotubuli rapsin (-/-), agrin determină fosforilarea normală a tirozinei din MuSK total sau asociat cu AChR, în timp ce fosforilarea subunității beta constitutivă a AChR indusă de agrin este puternic redusă. În premieră se semnaleză că miotubulii aneuronali conțin complexe proteice AChR preasamblate care pot funcționa în asamblarea aparatului postsinaptic și, de asemenea, că rapsin, pe lângă rolul său în fosforilarea AChR, mediază și interacțiunea proteinelor selectate cu AChR servind ca o legătură între acești receptori și complexul glicoproteic distrofin/utrofin (20).

Densitățile înalte de AChR și canalelor de sodiu din crestele și plăcile cutelor postsinaptice asigură semnalizarea neuromusculară. Agregarea ambelor canale ionice este mediată de agrin. În cazul AChR, agrin activează MuSK inițiind un proces care reclamă prezența rapsin și, probabil, fosforilarea receptorului.

Sub multe aspecte, interacțiunile dintre agrin, MuSK și efectorii lor din aval sunt atipice comparativ cu sistemul de semnalizare convențional TK-R.

Recent s-au elucidat noi aspecte privind structura rapsin implicat în agregarea receptorului, și rolul sintrofinului în țintirea canalului de sodiu. Probabil, cel mai surprinzător rezultat privind sinaptogeneza la șoarecii fără distrofin și utrofin este unul negativ în ciuda faptului că au joncțiuni neuromusculare aproape normale (21).

Agregarea AchR indusă de agrin pe miotubulii în cultură este blocată de anticorpi anti-subunitatea integrin betal și parțial blocată de anticorp anti-subunitatea integrin alfa (v). Acest proces este blocat și de oligonucleotidul antisens la integrina alfa (v) și la un peptid ce blochează locul de cuplare al acesteia. Celulele non-musculare care expun subunități ale integrinelor alfa (v) și beta 1 aderă la agrin. Deci, integrinele alfa (v) și beta 1 sunt componente sau modulatori ai căilor de transducție a semnalelor agrin (22).

Cel puțin două forme ale neuregulin (NRG) sunt concentrate imunohistochimic în joncțiunea neuromusculară a mușchiului de șobolan adult. O formă este NRG beta3, proteină secretată în membrana bazală ce ocupă spațiul sinaptic, iar cealaltă – NRGa – este localizată în sarcolemă. NRG din mușchi inclusiv NRGa sunt concentrate în aparatul postsinaptic-like indus pentru a forma regiunea extrajoncțională a mușchiului solear prin expunerea la agrin neural.

Aparatul postsinaptic indus de agrin include, de asemenea, agregate de receptor NRG erb.B2 și erb B3 ca și aparatul postsinaptic al joncțiunii neuromusculare. Se sugerează un mecanism prin care agrin neural induce expresia subunității AChR epsilon în aparatul postsinaptic-like și că această proteină are funcții similare în joncțiunea neuromusculară (23).

L-selectin, o moleculă de adeziune leucocitară care mediază mișcarea leucocitelor pe endoteliu, joacă un rol critic în recrutarea leucocitelor la locurile inflamatorii.

L-selectin reacționează cu proteoglican condroitin sulfat și heparan sulfat (HSPG) care se exprimă în tubii distali ai rinichilor. De asemenea, versicanul este un ligand de tipul condroitin sulfatului. Dimensiunea moleculelor de HSPG este de aproximativ 600 kD având o proteină miez de 160 și respectiv 180 kD. Cuplarea la L-selectin este mediată de domeniul lectină al L-selectinei în manieră dependentă de calciu și reclamă lanțuri de heparan sulfat, dar nu de acid sialic (24).

Agrin în ontogeneză

În dezvoltarea sistemului nervos al puilor s-a studiat distribuția și proprietățile substratelor de agrin, un HSPG din matricea extracelulară. Comparând distribuția agrin cu distribuția lamininei-1 (LA), merozinei (LA-2), neurofilamentelor și moleculelor de adeziune pentru celulele nervoase (NCAM) prezente de-a lungul dezvoltării, agrin s-a dovedit a fi un constituent al tuturor membranelor bazale.

Din ziua a 4-a embrionară (E4) agrin este abundent în căile axonale ale sistemului nervos central și anume în nervul optic, calea tectobulbară, substanța albă a măduvei spinării și păturile moleculare ale creierului mare și cerebelului. Abundența lui scade către stadiul E13. În timpul dezvoltării sistemului nervos agrin este constituent al membranei bazale a celulelor Schwann. Expresia lui maximă se constată în timpul stadiilor timpurii și medii ale dezvoltării creierului.

În creierul de șoarece și om agrin există ca un proteoglican heparan sulfat. Cel purificat însă nu susține creșterea axonilor, ci mai curând inhibă extensia celor retinali asupra substratelor mixtate de agrin și merozin. În ciuda faptului că este folosit ca substrat, proteina inhibă creșterea axonilor; parțial temporal și spațial el se suprapune cu creșterea sugerând că intervine ca suport în dezvoltarea căilor axonale, posibil ca un component de cuplare pentru factorii de creștere și proteinele de adeziune celulară (25).

Cum s-a menționat, agrin este implicat în formarea aparatului postsinaptic al joncțiunii neuromusculare. În afară de neuronii motori spinali el se exprimă și în multe alte populații de neuroni din sistemul nervos central. În perioada dezvoltării timpurii postnatale la șoarece, s-a urmărit expresia și codificarea alternativă în cortexul somatosenzitiv in vivo și in vitro, a celulelor disociate.

Nivelul de vârf al expresiei genei agrin în dezvoltarea cortexului coincide cu formarea fibrelor aferente talamice și a sinapselor talamocorticale și intracorticale. În timpul dezvoltării sunt reglate nivelele expresiei izoformelor sale “active” și “inactive”. Variațiile expresiei genei agrin se văd și în timpul formării sinapselor între neuronii somatosenzitivi.

Schimbările pe care le exprimă gena agrin in vivo și in vitro sunt în acord cu rolul proteinei în formarea sinapselor în sistemul nervos central (26).

Agrin în rinichi

Ca barieră în calea urinei, membrana bazală glomerulară (GBM) joacă un rol cheie în funcția renală. Permeabilitatea ei pentru o moleculă dată este înalt dependentă de dimensiunea, forma și sarcina electrică.

În anii '80 s-a demonstrat permeabilitatea selectivă în relație cu proprietățile electrostatice covalente, cuplând heparan sulfati din membrana bazală glomerulară. Deoarece identificarea perlecanului ca un HSPG, ipoteza că acesta ar putea fi un determinant crucial al permeabilității membranei bazale a căpătat interes crescut.

Pe lângă perlecan membrana bazală conține și alte specii de HSPG dintre care una este chiar agrin. Expresia locală înaltă a acestuia în membrana bazală glomerulară împreună cu receptorul său la interferența celulă-matrice sugerează că HSPG contribuie pe căi multiple la funcția glomerulară (27).

Agrin este un HSPG prezent în concentrații înalte în lamina bazală sinaptică la joncțiunea neuromusculară, dar imunoreactivitatea agrin-like este detectată și în afara acestor joncțiuni. Se demonstrează că proteina este un component major HSPG din membrana bazală glomerulară umană, iar perlecan este, de asemenea, un HSPG deja caracterizat în membrana bazală. Anticorpii anti-agrin și anti-unui HSPG glomerular încă nidentificat, produc o puternică reacție a laminei bazale glomerulare și joncțiunii neuromusculare, reacție diferită de cea observată folosind anticorpi anti-perlecan. Ambii anticorpi recunosc o moleculă de 200-210 kD după glicozilare, care migrează în SDS-PAGE.

În imuno-electronmicroscopie agrin arată o distribuție lineară de-a lungul laminei bazale glomerulare, fiind prezent pe toată lățimea acesteia. Distribuția proteinei perlecan este însă diferită de cea a agrin, deoarece este prezent pe partea endotelială a membranei bazale și dispus nelinear. În comparație cu perlecan, agrin-like arată o molaritate de 6 ori mai înaltă în extractul glomerular. Deci, agrin este o componentă majoră a membranei bazale glomerulare cu rol în ultrafiltrarea renală și interacțiunea celulă-matrice (28).

Agrin uman este abundent în membrana bazală la adult. Domeniul său N-terminal de la om este înalt similar cu cel de la pui, sugerând astfel funcții similare în cuplarea lamininei. Trei secvențe SGXG suportă glicozilarea serinei legată la proteina miez, două din acestea fiind particular favorabile pentru atașarea heparan-sulfatului (HS).

Nivelele mRNA agrin în țesuturile fetal și adult la om arată o remarcabilă suprareglare în rinichi și plămâni în care s-au detectat transcripse trunchiate, lipsite de regiunea care codifică domeniul de cuplare la laminină. Nivelele înalte ale transcrierii în plămâni și rinichi corespund cu acumularea în membrana bazală a alveolelor și respectiv glomerulilor sugerând o funcție asociată filtrării (29).

S-a determinat specificitatea a 2 anticorpi monoclonali de hamster și un antiser policlonal de oaie anti-proteoglican heparan sulfat (HSPG) izolați din membrana bazală a glomerulilor de la șobolan.

Anticorpii specifici recunosc proteinele miez de 150, 105 și 70 kD ale membranei bazale. Agrin este un HSPG major din membrana bazală glomerulară de la șobolan. S-a testat dacă anticorpii recunosc proteina, utilizându-se colorația celulelor ovariene de hamster chinezesc transfectate cu constructe care codifică ½ de C-terminal sau de lungime deplină de agrin de la șobolan. Antiserul policlonal de oaie a colorat celulele transfectate cu constructe de lungime deplină, pe când cel de tip-sălbatic și celelalte transfectante cu construct care codifică o parte din C-terminal al agrin, nu sunt recunoscute.

Anticorpul monoclonal anti C-terminal agrin colorează celulele transfectate cu oricare din cele două structuri, dar nu pe cele de tip-sălbatic. Deci, anticorpul monoclonal de hamster și antiserul de oaie recunosc epitopii de pe ½ lui N-terminal agrin. Anticorpul monoclonal anti C-terminal al agrin colorează aproape exclusiv membrana bazală glomerulară, pe când cei anti-N-terminal al agrin recunosc toate membranele bazale glomerulare inclusiv pe cele ale tuburilor renale.

Se crede că agrin de lungime deplină se exprimă predominant în membrana bazală a glomerulului renal, în timp ce izoformele sale trunchiate lipsite de partea C-terminal, s-ar datora transcrierii alternative incomplete și/sau procesării post-transcripționale (30).

O izoformă de agrin care nu induce specializări postsinaptice cuplează cu înaltă afinitate la distroglican, un component al complexului distrofin-glicoproteină.

Transcriptele care codifică această izoformă sunt exprimate într-o varietate de țesuturi neuromusculare. O astfel de izoformă se găsește abundent în plămâni, rinichi și creier, puțin în mușchii scheletici și deloc în ficat.

Distroglicanul se exprimă înalt în toate țesuturile examinate, cu excepția ficatului. Agrin cuplează la distroglicanul din plămâni, rinichi și mușchii scheletici cu o constantă de disociere într 1,8 și 2,2 nM, pe când afinitatea la distroglicanul din creier este de 4,6 nM. Deci, izoforma exprimată în țesuturile non-musculare este un partener de cuplare cu înaltă afinitate la distroglican și ar putea fi importantă pentru integritatea mecanică a țesuturilor (31).

Analiza biopsiilor pacienților cu diabet arată o reducere semnificativă a agrin din membrana bazală glomerulară renală, comparativ cu controlul. Expresia lui este, de asemenea, redusă în podocitele în cultură tratate cu 25 nM D-glucoză.

O prezență evidentă a proteinei s-a constatat în stadiile timpurii ale diferențierii glomerulare din rinichi fetală. Nu se poate vorbi de o dereglare selectivă a HSPG în boala diabetică dar poate exista hiporeglarea producției de agrin (32).

Agrin este un proteoglican heparan sulfat prezent în leziunile Alzheimer

HSPG joacă un rol important în formarea și persistența plăcilor senile și a nodurilor neurofibrilare în demența de tip Alzheimer.

S-au făcut analize imunohistochimice comparative ale expresiei HSPG agrin, perlecan, glypican-1 și sindecan 1-3 în leziunile neocortexului și hipocampului în demența Alzheimer.

S-au folosit anticorpi anti-proteine de bază a diferitelor specii de HSPG și lanțuri laterale a anti-glicozaminoglicanilor (GAG) și s-a constatat că HSPG agrin asociate membranei bazale este larg exprimat în plăcile senile, în agregatele neurofibrilare și în vasele de sânge cerebrale, pe când expresia altor HSPG asociate membranei bazale, precum perlecan, lipsesc din plăcile senile și aglomerările neurofibrilare exprimându-se numai în vasele cerebrale.

Glipican și 3 diferiți sindecani, specii asociate membranei celulare, se exprimă de asemenea, în aceste structuri, deși cu o frecvență mai scăzută decât agrin. Deci, parte din lanțurile GAG a HSPG agrin, sindecan și glypican, dar nu din perlecan poate juca un rol important în formarea acestor structuri. În plus, se speculează ideea că agrin poate conține 9 domenii care inhibă proteazele, putând proteja agregatele proteice din cele trei structuri contra degradării proteolitice extracelulare, ducând astfel la persistența acestor depozite (33).

Deși este un HSPG major din creier, funcția agrin este încă obscură; totuși se sugerează rolul lui posibil în boala Alzheimer. Proteina agrin cuplează peptidul amiloidogenic A beta (1-40) în starea sa fibrilară via unui mecanism ce implică lanțuri HSPG ale agrin. Molecula poate accelera formarea fibrilelor A beta și protejează peptid amiloidogenic de proteoliza in vitro. Prezența lui în plăcile senile și în depozite amiloide cerebrovasculare, ca și imunocolorarea capilarelor cu agrin, arată alterări patologice în creierul afectat de această boală. Se sugerează că agrin poate fi un factor important în progresia agregării peptidului A beta și/sau în persistența sa în această afecțiune a creierului (34).

Agrin este larg exprimat în neuroni și membrana bazală a microvaselor sistemului nervos central de rozătoare și păsări, unde induce diferențierea sinapselor nerv-mușchi.

Boala Alzheimer se caracterizează prin pierderea sinapselor și schimbării în arhitectura microvasculară și, de asemenea, prin formarea de rețele neurofibrilare și plăci senile.

Agrin se exprimă în neuronii din multe arii cerebrale. Imunoreactivitatea robustă se exprimă uniform în membrana bazală microvasculară. În creierul cu Alzheimer, proteina se exprimă concentrat în plăci difuze, ca și în aglomerări neurofibrilare.

Pacienții cu Alzheimer au alterări microvasculare caracterizate prin subțierea și fragmentarea membranei bazale. Virtual, toată proteina agrin din creierul normal este solubilă în 1% SDS. Din contră o fracție mare din creierul bolnavilor este insolubilă condiție ce sugerează că el este strâns asociat cu beta-amiloid. Deci, agrin anormal din boala Alzheimer este strâns asociat cu depozitele de beta-amiloid. Se sugerează că expresia alterată a proteina în microvasculatură și parenchimul cerebral, contribuie la patogenia bolii Alzheimer (35).

În concluzie, principala funcție a agrin este aceea de a determina structurile postsinaptice în relația cu fibra musculară, dar și în relația dintre celulele nervoase în sistemul nervos central. În continuare relatăm câteva idei care susțin complexitatea relațiilor agrin cu alte molecule din matricea extracelulară, cât și relații de blocare a formării structurilor postsinaptice. Agrinul se exprimă și în numeroasele populații de neuroni din sistemul nervos central sugerând că această moleculă joacă un rol și în formarea sinapselor interneuronale. Specific neuronului, agrin nu este necesar pentru formarea și dezvoltarea timpurie a contactelor sinaptice funcționale dintre neuroni sugerându-se că mecanismele de sinaptogeneză interneuronale din sistemul nervos central sunt distincte de cele care reglează formarea sinapsei la joncțiunile neuromusculare (36).

Factorul neural agrin induce agregarea receptorului acetilcholinei (AChR) și a altor molecule sinaptice pe miotubulii cultivați, activitate mimată experimental de tratamentul cu neuramidază sau calciu. Neuramidaza și calciu activează pe calea transducției semnalului agrin. Efectele lor asupra agregării AChR sunt adiționale la cele ale agrin la concentrații scăzute și cosaturate la concentrații înalte. Asemenea agrin, neuramidaza și calciu determină fosforilarea rapidă a tirozinkinazei specifice mușchiului și subunității AChR-beta. Se argumentează că acești 3 agenți acționează direct pe componentele aceluiși complex al semnalului de transducție.

Se sugerează că acizii sialici de pe componentele complexului inhibă interacțiunea necesară pentru semnalul transducției și că dezinhibarea poate duce la activare. Într-un asemenea model agrin ar putea activa semnalul de transducție prin anularea stimulării inhibiției (37).

Sinapsa neuromusculară se formează ca răspuns la agrin secretat de nervul terminal motor și inducând agregarea AChR și altor elemente ale aparatului postsinaptic asupra sarcolemei subiacente. Formarea sinapsei și menținerea ei este reglată de factori adiționali încă neidentificați.

Factorul neurotrofic derivat din creier (BDNF) și neurotrofina-4 (NT-4) inhibă agregarea AChR indusă de agrin pe miotubulii cultivați, dar NGF și NT-3 nu au efect.

Celulele musculare exprimă ligandul endogen TrkB de lungime deplină, receptor cunoscut pentru BDNF și NT-4. Activarea directă a acestui receptor de către anticorpii anti-TrkB mimează inhibarea BDNF/NT-4 agregării AChR indusă de agrin, inhibare ce pare a fi un mecanism intrinsec pentru reglarea agregării AChR, deoarece neutralizarea liganzilor TrkB endogeni duce la nivelele elevate ale acestor agregate, chiar în absența agrin.

Concentrația înaltă de agrin poate opri inhibarea BDNF/NT-4 agregării AChR. Deci, există o interrelație între agrin și neurotrofină, proces care poate regla formarea structurilor specializate postsinaptice. Se sugerează și un mecanism pentru supresia formării acestora în regiuni non-joncționale (38).

Agrin joacă un rol cheie în direcționarea diferențierii joncțiunii neuromusculare la vertebrate. El se exprimă în numeroase populații de neuroni cerebrali. În funcție de concentrație și saturație induce expresia genei imediat timpurii c-fos în culturi de neuroni corticali. Este activ în neuroni corticali, în concentrație picomolare fiind dependent de calciu și inhibat de heparină și staurosporină.

Un răspuns similar la agrin pentru activarea c-fos se constată și în neuronii hipocampali și cerebeloși. Numai neuronii cu activitate înaltă în agrin sunt eficienți asupra celulelor musculare cultivate (39).

În timpul sinaptogenezei, în joncțiunea neuromusculară scheletală la vertebrate, AChR formează agregate de înaltă densitate ca răspuns la agrin derivat din nerv. Proteina stimulează fosforilarea tirozinei MuSK (TK-R specific muscular) și a subunității AChR beta și TK inhibitori, iar o mutantă TK-deficientă a MuSK previne agregarea AChR.

Pentru a se evalua rolul fosforilării tirozinei subunității AChRbeta în agregarea receptorului, s-au înlocuit toate 3 reziduurile tirozinei din subunitate cu reziduul fenilalanina și s-au exprimat mutații receptorului în miotubulii cultivați. După tratamentul cu agrin, miotubulii transfectați au format agregate AChR ce conțin receptori cu subunitate mutantă beta. Astfel, AChR pot fi recrutați în structurile specializate induse de agrin, de către interacțiunea proteină-proteină; care nu depinde de fosforilarea tirozinei acestei subunității (40).

S-a arătat că agrin derivat din neuron este factor agregant pentru AChR. Folosindu-se cDNA recombinat, s-a transfectat o linie clonală stabilă C2C12 cu cDNA agrin antisens. Analiza mRNA arată că expresia agrin în celulele transfectate este abolită de DNA de transfecție, când celulele deficiente în proteină au fost induse pentru a forma miotubulii și apoi cocultivate cu cDNA agrin transfectat fibroblastelor, iar agregatele AChR se formează în cocultură. În plus, aceste agregate deficiente în agrin din miotubuli sunt, de asemenea, induse de agrin exogen și AChE se colocalizează cu agregatele AChR.

Miotubulii deficienți în agrin ar putea răspunde și la agregarea AChR indusă de neuroni după cocultivarea cu celulele neuroblastomului. Astfel, miotubulii deficienți în agrin își păstrează abilitatea de a agrga AChR, agregare indusă sau neuroindusă de agrin.

Se sugerează că, formarea structurilor specializate postsinaptice în timpul dezvoltării și regenerării este mediată de agrin derivat din neuroni și nu din cel derivat din mușchi (41).

1. Agregarea AChR la locul formării joncțiunii neuromusculare este critică pentru dezvoltarea și funcționarea sinapsei. Agregarea receptorului poate fi indusă de agrin pe sarcolemă și de concentrația indusă de câmpul electric al unei molecule (non receptor) la polul catodic al celulei.

2. Se raportează interacțiunea dintre cuplarea agrin și câmpurile electrice în ce privește distribuția receptorilor și locurile lui de cuplare.

3a. Pretratarea celulelor cu agrin blochează complet dezvoltarea agregatelor de receptori induși de câmpul electric.

3b. Agregarea receptorilor indusă de câmpul electric precede cu cel puțin 30' agregarea indusă de acesta, a locurilor de cuplare a agrin.

3c. Câmpul electric previne agregarea receptorului indusă de agrin în ciuda prezenței locurilor de cuplare pentru agrin și pentru receptorul liber difuzabil.

4. Se sugerează că alte componente ale membranei, nici locul de cuplare a agrin și nici receptorul lui nu sunt reclamate pentru agregarea receptorului indus de agrin. De asemenea, câmpurile electrice și agrin cauzează agregarea via mecanismelor moleculare comune (42).

1. Hoch W., Formation of the neuromuscular function. Agrin and its unusual receptors. *European Journal of Biochemistry*, 1999, 265(1), 1–10.

2. Denzer A. J., Schulthess T., Fauser C., Schumacher B., Kammerer R. A., Engel J., Ruegg M. A., Electron microscopic structure of agrin and mapping of its binding site in laminin-1. *EMBO Journal*, 1998, 17(2), 335–43.

3. Wei N., Lin C. Q., Modafferi E. F., Gomes W. A., Black D. L., A unique intronic splicing enhancer controls the inclusion of the agrin Y exon. *Rna*, 1997, 3(11), 1275–88.

4. Deyst K. A., McKechnie B. A., Fallon J. R., The role of alternative splicing in regulating agrin binding to muscle cells. *Brain Research-Developmental Brain Research*, 1998, 110(2), 185–91.

5. Cornish T., Chi J., Johnson S., Lu Y., Campanelli J. T., Globular domains of agrin are functional, units that collaborate to induce acetylcholine receptor clustering. *Journal of Cell Science*, 1999, 112(Pt.8), 1213–23.

6. Werle M. J., Jones M. A., Stanco A. M., Aggregates of acetylcholine receptors are not observed under anti-agrin staining schwann cell processes at the frog neuromuscular function. *Journal of Neurobiology*, 1999, 40(1), 45–54.

7. Glass D. J., Yancopoulos G. D., Sequential roles of agrin, MuSk and rapsyn during neuromuscular junction formation. *Current Opinion Neurobiology*, 1997, 7(3), 379–84.
8. Bowen D. C., Park J. S., Bodine S., Stark J. L., Valenzuela D. M., Stitt T. N., Yancopoulos G. D., Lindsay R. N., Glass D. J., Di Stefano P. S., Localization and regulation of MuSk at the neuromuscular junction (NMJ). *Development Biology (Orlando)*, 1998, 199(2), 309–19.
9. Hopz C., Hoch W., Tyrosine phosphorylation of the muscle-specific kinase is exclusively induced by acetylcholine receptor aggregating agrin fragments. *European journal of Biochemistry*, 1998, 253(2), 382–9.
10. Meier T., Massicullii F., Moore C., Schoumacher F., Eppenberger U., Denzer A. J., Jones G., Brenner H. R., Agrin can mediate acetylcholine receptor gene expression in muscle by aggregation of muscle-derived neuregulins. *Journal of Cell Biology*, 1998, 141(3), 715–26.
11. Borges L. S., Lee Y., Ferns M., Dual role for calcium in agrin signaling and acetylcholine receptor clustering. *J. Neurobiol.*, 2002, 50(1), 69–79.
12. Bezakova G., Rabben I., Sefland I., Fumagalli G., Lomo T., Neural agrin controls acetylcholine receptor stability in skeletal muscle fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2001, 98(17), 9924–9.
13. Smith C. L., Mittaud P., Prescott E. D., Fuhrer C., Burden S. J., Src, Fyn, and Yes are not required for neuromuscular synapse formation but are necessary for stabilization of agrin-induced clusters of acetylcholine receptors. *J. Neurosci.*, 2001, 21(9), 3151–60.
14. Cohen I., Rimer M., Lomo T., Mc Mahan U. J., Agrin induced postsynaptic – like apparatus in skeletal fibres in vivo. *Molecular and Cellular Neurochemistry*, 1997, 9(4), 237–53.
15. Rimer M., Mathiesen I., Lomo T., Mc Mahan U. J., Gamma – AChR/ epsilon – AchR switch at agrin-induced postsynaptic – like apparatus in skeletal muscle. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 1997, 9(4), 245–63.
16. Mathiesen I., Rimer M., Ashtari O., Cohen I., Mc Mahan U. J., Lomo T., Regulation of the size and distribution of agrin – induced postsynaptic-like apparatus in adult skeletal muscle by electrical muscle activity. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 1999, 13(3), 207–17.
17. Denyer A. J., Brandenberger R., Gesemann M., Chiquet M., Ruegg M. A., Agrin binds to the nerve-muscle basal lamina via laminin. *Journal of Cell Biology*, 1997, 137(3), 671–83.
18. Sugiyama J. E., Glass D. J., Yancopoulos C. D., Hall ZW., Laminin – induced acetylcholine receptor clustering: an alternative pathway. *Journal of Cell. Biology*, 1997, 139(1), 181–91.
19. Phillips W. D., Vladeta D., Han H., Noakes P. G., *Molecular and Cellular Neurosciences*, 1997, 10(1–2), 16–26.
20. Fuhrer C., Gautam M., Sugiyama J. E., Hall Z. W., Roles of rapsyn and agrin in interaction of postsynaptic proteins with acetylcholine receptors. *Journal of Neuroscience*, 1999, 19(15), 6405–16.
21. Colledge M., Froehner S. C., Signals mediating ion channel clustering at the neuromuscular junction NMJ. *Current Opinion in Neurobiology*, 1998, 8(3), 357–63.
22. Martin P. T., Sanes J. R., Integrins mediated adhesion to agrin and modulate agrin signaling. *Development*, 1997, 124(9), 3909–17.
23. Rimer M., Cohen I., Lomo T., Burden S. J., Mc Mahan U. J., Neuregulins and erbB receptors at neuromuscular junctions and at agrin-induced postsynaptic – like apparatus in skeletal muscle. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 1998, 12(1–2), 1–15.
24. Watanabe N., Kawashima H., Li Y. F., Miyasaka M., Identification and characterization of ligands for L-selectin in the kidney. III. Characterization of L-selectin reactive heparan sulfate proteoglycans. *Journal of Biochemistry*, 1999, 125(4), 826–31.
25. Halfter W., Schurer B., Yip J., Yip L., Tsen G., Lee J. A., Cole G. J., Distribution and substrate properties of agrin, a heparan sulfate proteoglycan of developing axonal pathways. *Journal of Comparative Neurology*, 1997, 383(1), 1–17.
26. Li Z., Massengill J. L., O'Dowd D. K., Smith M. A., Agrin gene expression in mouse somatosensory cortical neurons during development in vivo and in cell culture. *Neuroscience*, 1997, 79(1), 191–201.
27. Groffen A. J., Veerkamp J. H., Monnens L. A., Vanden Hewel L. P., Recent insights into the structure and functions of heparan sulfate proteoglycans with human glomerular basement membrane. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 1999, 14(9), 2119–29.
28. Groffen A. J., Ruegg M. A., Dijkman H., van de Valden T. J., Buskens C. A., van den Born J., Assmann K. J., Monnens L. A., Veerkamp J. H., van den Henvel L. P., Agrin is a major heparan sulfate proteoglycan in the human glomerular basement membrane. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1998, 46(1), 19–27.
29. Groffen A. J., Buskens C. A., van Kappevelt T. H., Veerkamp J. N., Monnens L. A., van den Henvel L. P., Primary structure and high expression of human agrin in basement membranes of adult lung and kidney. *European Journal of Biochemistry*, 1998, 254(1), 123–8.
30. Raats C. J., Bakker M. A., Hoch W., Tambrer W. P., Groffen A. J., van den Henvel D. P., Borden J. H., van den Born J., Differential expression of agrin in renal basement membranes as revealed by domain-specific antibodies. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(28), 17832–8.
31. Gesemann M., Brancaccio A., Schumacher B., Ruegg M. A., Agrin is a high-affinity binding protein of dystroglycan in non – muscle tissue. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(1), 600–5.
32. Yard B. A., Kahlert S., Engelleiter R., Resch S., Waldherr R., Groffen A. J., van den Heuvel L. P., van der Born J. H., Berden J. H., Kroger S., Hafner M., van der Woude F. J., Decreased glomerular expression of agrin in diabetic nephropathy and podocytes, cultured in high glucose medium. *Exp. Nephrol.*, 2001, 9(3), 214–22.

33. Verbeek M. M., Otte-Holler I., van den Boru J., van den Heuvel L. P., David G., Wesseling P., de Waal R. M., Agrin is a major heparan sulfate proteoglycan accumulating in Alzheimer's disease brain. *American Journal of Biology*, 1999, 155(6), 2115–25.
34. Cotman S. L., Halfter W., Cole G. J., Agrin binds to beta-amyloid (Abeta), accelerates Abeta fibre formation, and is localized to Abeta deposits in Alzheimer's disease brain. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 2000, 15(2), 183–98.
35. Donahue J. E., Berzin T. M., Rafei M. S., Glass D. J., Yancopoulos G. D., Fallon J. R., Stopa E. G., Agrin in Alzheimer's disease: altered solubility and abnormal distribution within microvasculature and brain parenchyma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(11), 6468–72.
36. Li Z., Hilgenberg L. G., O'Dowd D. K., Smith M. A., Formation of functional synaptic connections between cultured cortical neurons from agrin-deficient mice. *Journal of Neurobiology*, 1999, 39(4), 547–57.
37. Grow W. A., Ferns M., Gordon H., Agrin- independent activation of the agrin signal transduction pathway. *Journal of Neurobiology*, 1999, 40(3), 356–65.
38. Wells D. G., Mckechnie B. A., Kelkar S., Fallon J. R., Neurotrophins regulate agrin-induced postsynaptic differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(3), 112–7.
39. Hilgenberg L. G., Hoover C. L., Smith M. A., Evidence of an agrin in cortical neurons. *Journal of Neuroscience*, 1999, 19(17), 7384–93.
40. Meyer G., Wallace B. G., Recruitment of a nicotinic acetylcholine receptor mutant lacking cytoplasmic tyrosine residues in its beta subunit into agrin-induced aggregates. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 1998, 11(5-6), 324–33.
41. Pan S., Ivg Y. P., Yang J. F., Ip N. Y., Tsim K. W., Agrin – deficient myotube retains its acetylcholine receptor aggregation ability when challenged with agrin. *Journal of Neurochemistry*, 1997, 69(6), 2555–63
42. Sabrina F., Stallberg J., Common molecular mechanism in field – and agrin – induced acetylcholine receptor clustering. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 1997, 17(2), 207–25.

NETRIN-1

Proteinele familiei netrin/UNC-6 (omolog al netrin) sunt molecule de ghidare conservate la toate speciile examinate (1).

Netrinele, proteine înrudite cu lamininele (2) direcționează extinderea axonilor și migrarea celulelor în timpul dezvoltării neuronale (3). Aceste proteine joacă un rol pivotal în ghidarea unei varietăți de proiecții axonale, în timpul dezvoltării neuronale, atât la vertebrate cât și la nevertebrate (4).

Netrin-1 este o proteină bifuncțională (1,3,5) care are funcție chemoatractantă pentru anumite clase de axoni aflați în dezvoltare și chemorespingătoare pentru alte clase (1,6). Mai multe studii susțin că răspunsurile de atracție și de respingere ale netrin sunt mediate de două clase de receptori: receptorii din familia DCC (Deleted in Colorectal Cancer) și receptorii din familia UNC-5 (1,3).

Gena pentru netrin a fost recent identificată la om și a fost denumită NTN 1L ("netrin-1-like") (7). Această genă, cartată pe cromozomul 17 p. 12–13, codifică o proteină de 604 aminoacizi care prezintă 98% identitate cu proteina netrin-1 de la șoarece și 50% identitate cu proteina UNC-6 de la *Caenorhabditis elegans* (2). Clonarea cDNA care codifică netrin demonstrează că acesta este omologul UNC-6, o proteină înrudită lamininei care este necesară pentru migrarea circumferențială a axonilor la *Caenorhabditis elegans* (8).

Netrin-1 este larg exprimată atât în sistemul nervos în dezvoltare cât și în țesuturile mezodermale (9). Transcriptele NTN 1L au fost detectate în toate țesuturile normale adulte studiate, în timp ce în aproximativ 50% din tumorile de creier și în neuroblastoame s-a detectat o expresie redusă sau chiar absența expresiei NTN 1L. Se susține că pierderea expresiei NTN 1L sau mutațiile acesteia pot contribui la dezvoltarea câtorva tipuri de cancer (2).

S-a demonstrat că netrin-1 continuă să fie exprimată în măduva spinării de la șobolanul adult la un nivel similar cu acela din sistemul nervos central embrionar. Hibridizarea *in situ* demonstrează că celulele din substanța albă a măduvei spinării adulte exprimă netrin-1. Studii de colocalizare utilizând markerul Neu N relevă expresia netrin-1 în multiple clase de interneuroni spinali și motoneuroni. Se observă că proteina netrin-1 este exprimată și de unele tipuri de celule gliale. Astfel, markerii utilizați pentru identificarea tipurilor de celule gliale indică faptul că netrin-1 este exprimată de oligodendrocite dar nu și de astrocite (10).

Se cunoaște faptul că netrinele funcționează ca factori de ghidare axonală și în dezvoltarea sistemul nervos periferic. Studii care utilizează PCR (Polymerase Chain Reaction) competitiv și analize imunohistochimice demonstrează localizarea netrin-1 în nervul sciatic de la șobolanul adult. De asemenea, datele imunohistochimice relevă faptul că celulele Schwann constituie sursa majoră a proteinei netrin-1 în nervii periferici (11).

Funcții ale netrin-1

Formarea conexiunilor între axoni și țintele lor în timpul dezvoltării este dependentă de factorii de ghidare extracelulară care susțin creșterea axonilor către țintele lor. Astfel de molecule sunt netrinele, factori care acționează la distanță atât pentru atragerea cât și pentru respingerea unei game largi de tipuri neuronale. De asemenea, netrinele sunt implicate în controlul migrării celulelor nervoase.

Aceste acțiuni sunt mediate, cum menționam, de receptori specifici reprezentați de DCC sau neogenin, în cazul receptorilor atractanți și de UNC-5 în cazul celor respingători. S-a demonstrat, *in vitro*, că interacția netrin-DCC reglează apoptoza celulelor epiteliale, sugerând rolul potențial al netrinelor în acest proces în dezvoltarea sistemului nervos (1).

Netrinele au fost identificate ca factori difuzabili cu acțiune la distanță pentru axonii în dezvoltare. Dovezi recente susțin că aceste molecule funcționează, de asemenea, ca factori locali în vecinătatea suprafeței celulelor care le produc. Această funcție locală a netrinelor contribuie la ghidarea creșterii axonilor și la medierea interacțiunii celulă-celulă, atât în timpul dezvoltării cât și la adult (3). Astfel, în măduva spinării de la adult s-a demonstrat că majoritatea moleculelor de netrin-1, sunt atașate la membrană sau la matricea extracelulară. Fraționarea substanței albe a măduvei spinării de la adult demonstrează că netrin-1 este absentă în fracțiunile care conțin mielina compactă, dar este bogată în cele care conțin mielină periaxonală și axolemă, sugerând faptul că proteina poate fi localizată periaxonal. Aceste constatări îi susțin funcția locală asociată suprafeței celulare, funcție care determină menținerea interacțiilor corespunzătoare inter-neuronale precum și a celor dintre axoni și oligodendrocite (10).

Netrin-1 – efecte asupra populațiilor de neuroni motori. În timpul dezvoltării, creșterea axonilor motori către linia ventrală a tubului neural este stopată prin moleculele chemorespingătoare difuzabile prezente la acest nivel. Moleculele care candidează pentru această acțiune chemorespingătoare includ semaphorin-D și netrin-1. Răspunsurile variate, calitative și cantitative, pot constitui baza deflecției de la linia mediană și a segregării ulterioare a traiectoriilor axonilor motori. Pentru a verifica aceasta idee s-au cocultivat pe geluri de colagen, agregate celulare care secretă netrin-1 sau semaphorin D, la distanță de explantele tisulare care conțin diferite subpopulații de neuroni motori. Axonii motori craniali și aceia ai nucleilor trigemen, facial și glosofaringian au fost respinși atât de netrin-1 cât și de semaphorin D. Spre deosebire de aceștia, axonii motori spinali care proiectează ventral și axonii nucleului abducens nu au fost afectați de netrin-1. Neuronii spinali și abducens motori, de asemenea, răspund la semaphorin D. Axonii neuronilor oculomotori care proiectează ventral nu au fost respinși de netrin-1 și de semaphorin D. Capacitatea de a reacționa diferențial la netrin-1 și semaphorin D poate contribui în timpul dezvoltării, la generarea căilor axonale motorii dorsale și ventrale (12).

Netrin-1 – rol în migrarea circumferențială. Netrin-1, factor difuzibil cu acțiune la distanță, exercită efecte chemoattractante sau chemorespingătoare asupra dezvoltării axonilor către sau de la linia medulară mediană (13).

Moleculele semnal eliberate de placa ventrală, incluzând netrin-1, sunt implicate în inițierea chemoatracției și extinderii axinale în timpul creșterii acestora către țintele lor, în diferite sisteme de traversare a liniei mediane (14).

a. Netrin-1 – efecte asupra axonilor comisurali. Proteina netrin-1 induce creșterea axonilor spinali comisurali *in vitro*, și de asemenea, s-a demonstrat că este necesară și pentru ghidarea axonilor în dezvoltarea măduvei spinării (15).

La vertebrate, axonii comisurali inițiază calea circumferențială către linia mediană a plăcii ventrale din măduva spinării de la embrion. Celulele plăcii ventrale secretă netrin care inițiază creșterea axonilor în creierul de la embrionul de pui.

Expresia genei pentru netrin-1 a fost examinată în diferite țesuturi embrionare de la pui, în special, în creier în diferite stadii de dezvoltare. Transcriptul netrin-1 a fost mai puternic exprimat în creierul de pui în stadiile timpurii ale dezvoltării (la embrionii E3-E7), perioadă care corespunde intervalului de emergență și generare completă a axonilor comisurali.

În scopul de a studia dacă netrin-1 poate acționa ca un factor global pentru a ghida toți axonii din SNC aflați în migrare circumferențială, localizarea expresiei mRNA la embrionul de șobolan a fost examinată prin hibridizare *in situ*. Astfel, la embrionul de șobolan E18, netrin-1 mRNA a fost detectat în celulele neuroepiteliale ale liniei mediane ventrale de-a lungul întregului ax rostrorocaudal. Aceste rezultate sugerează că netrin-1 funcționează ca factor global în migrarea circumferențială direcționată ventral către linia mediană (8).

b. Netrin-1 – efecte asupra precursorilor cerebeloși S-au utilizat explante pentru a studia acțiunea netrin-1 în migrarea mai multor precursori cerebeloși și procerebeloși. Astfel, s-a demonstrat că netrin-1 exercită un puternic efect chemoattractant, în intervalul E12–E14, asupra migrării neuronilor de la marginea rombică inferioară, neuroni care dau naștere nucleilor procerebeloși.

Netrin-1 inițiază migrarea neuronilor postmitotici de la nivelul marginii rombice inferioare și hiperreglează expresia TAG-1 (moleculă de adeziune aparținând superfamiliei Ig, glicoproteină a sistemului nervos) în acești neuroni. În prezența proteinei neuronii aflați în migrare nu sunt izolați ci sunt asociați cu fascicule groase de neurite, asociere tipică pentru calea neurotrofică de migrare. Marginea rombică superioară, care conține progenitori ai celulelor granulare aflați în migrare tangențială, nu răspunde la netrin-1.

În cerebelul postnatal, netrin-1 respinge atât fibrele paralele cât și celulele granulare. În perioada de dezvoltare, modelele de expresie ale sale precum și ale receptorilor săi sunt în conformitate cu noțiunea că molecula secretată la nivelul liniei mediane, acționează ca un factor chemoatractant pentru neuronii procerebeloși, aflați în migrare circumferențială. Modelul de expresie al netrin-1 în cerebelul postnatal sugerează că el poate regla migrarea tangențială a celulelor granulare premigratoare postmitotice (13).

c. Netrin-1 – efecte asupra neuronilor olivari În timpul migrării circumferențiale, nucleii neuronilor olivari inferiori translochează până ating placa ventrală unde se opresc, în timp ce axonii lor traversează linia mediană.

S-au realizat experimente care sugerează că placa ventrală poate fi implicată în migrarea neuronilor olivari inferiori. Au fost studiați șoareci deficienți în producerea netrin-1 și s-a observat că numărul acestor neuroni este remarcabil redus. Câțiva dintre aceștia sunt localizați ectopic, de-a lungul căii de migrare, în timp ce alții sunt localizați medio-ventral și formează un complex olivar inferior atrofic, întrucât cei mai mulți dintre subnuclei lipsesc. Totuși, axonii care au pericarionii localizați în complexul olivar din apropierea plăcii ventrale, reușesc să ajungă la ținta lor – cerebelul – însă stabilesc o proiecție ipsilaterală în locul proiecției contralaterale normale.

Aceste rezultate stabilesc o necesitate pentru netrin-1 în migrarea neuronilor olivari inferiori și sugerează că proteinele pot funcționa ca un factor specific de ghidare pentru pașii inițiali ai migrării de la marginile rombice și ulterior poate funcționa în dezvoltarea proiecțiilor normale încrucișate ale neuronilor olivari inferiori (14).

Netrin-1 – rol în ghidarea neuronilor hipocampali. Interacția între neuronii aflați în creștere și țintele lor este un element central în dezvoltarea conexiunilor aferente și eferente ale sistemului hipocampal. Prin urmare, conurile de creștere trebuie să recunoască factorii care determină ghidarea axonilor către ariile țintă (16).

Se consideră că netrinesele și semaforinele sunt factori importanți pentru formarea circuitelor neuronale în telencefal. S-a examinat rolul netrin-1 în dezvoltarea conexiunilor hipocampale și s-a demonstrat că netrin-1 și receptorul său DCC sunt exprimate în fimbrie în perioada de dezvoltare și în proiecțiile neurale. De asemenea, s-a demonstrat că netrin-1 inițiază creșterea axonilor hipocampali *in vitro*, via receptorilor DCC.

Prin utilizarea anticorpilor anti-TAG-1, L1 și DCC, s-a observat că hipocampul șoarecilor deficienți în netrin-1 prezintă o orientare greșită a tracturilor și erori în găsirea căii de migrare. Axonii comisurali hipocampali la aceste mutante, nu reușesc să traverseze linia mediană dar formează o proiecție aberantă masivă către septumul ipsilateral. De asemenea, s-a observat că atât proiecțiile entorino-hipocampale cât și proiecțiile de asociație CA3–CA1 arată, la acești șoareci mutanți, un model alterat al terminațiilor cu specificitate de strat. Înregistrările optice cu Ca²⁺ Fura 2 AM (colorant fluorescent) relevă o activitate neuronală spontană redusă în septumul de la șoarecii mutanți netrin-1.

Se concludă că netrin-1 este necesar nu numai pentru formarea conexiunilor încrucișate în telencefal dar, de asemenea, pentru țintirea specifică de strat a proiecțiilor ipsilaterale și pentru controlul nivelelor normale ale activității neurale spontane (17).

Alte studii analizează efectele Sema3C și ale netrin-1 asupra explantelor aflate în cocultură, din cortexul entorinal din girusul dentat, regiunile CA1 și CA3 ale cornului Amonn și septul medial. Se demonstrează că atât semaforinele cât și netrinesele joacă roluri importante în interacțiile dintre neuroni și țintele acestora în sistemul hipocampal. Sema 3C este implicat în controlul proiecțiilor

septohipocampale în timp ce netrin-1 este implicat în atragerea neuronilor comisurali de la girusul dentat și CA3 la țintele din hipocampusul contralateral (16).

Netrin-1 – rol în ghidarea axonilor cortico-fugali. Axonii care părăsesc cortexul cerebral la embrionii de mamifere au drept țintă intermediară eminența ganglionară, precursorul embrionar al ganglionilor bazali (GE).

S-a dovedit că axonii cortico-fugali pot fi ghidați prin factori difuzabili sau factori care au originea în GE lateral și sulcul situat între crestele laterale și mediale ale GE (ISS); există, de asemenea, dovezi care susțin implicarea netrin-1 în medierea acestor efecte. Astfel, mRNA netrin-1 s-a detectat prin hibridizare *in situ*, în explante ale GE și ISS din telencefalul de la embrioni de șoarece E12.5 și E13.5 constatându-se că netrin-1 poate mima efectul de inițiere a creșterii acestor țesuturi țintă, *in vitro*. De asemenea, creșterea axonilor cortico-fugali este orientată către o sursă ectopică de netrin-1 *in vitro* și blocarea antiserului anti-netrin-1 abolește specific creșterea axonilor corticali stimulată de explante ale GE lateral și ISS, în coculturile de colagen.

Aceste date sugerează un rol pentru netrin-1 în atracția la distanță, la nivelul GE, a axonilor neuronilor corticali timpurii (18).

Netrin-1 – rol în ghidarea celulelor mitrale. Precursorii neuronilor olfactivi migrează de la zona subventriculară via RMS (Rostral Migratory Stream). S-a demonstrat, prin metode imunohistochimice, că celulele aflate în migrare exprimă receptori pentru netrin, neogenin și că netrin este exprimat în celulele mitrale. Anticorpul anti-integrină inhibă producția protruziunilor și translocația celulelor, în timp ce anticorpul anti-DCC alterează primar direcția protruziunilor. Astfel, interacția DCC, probabil, cu netrin-1 contribuie la direcționarea migrării prin reglarea formării protruziunilor direcționate, în timp ce integrinele participă la producerea protruziunilor (19).

S-a studiat expresia spațio-temporală a netrin-1 și în sistemul olfactiv de la șobolan în diferite stadii de dezvoltare și în timpul regenerării care urmează bulbectomiei unilaterale, detectându-se o expresie înaltă a DCC în axonii olfactivi primari care se extind către telencefal. Această expresie este tranzitorie începând din ziua embrionară 16 până la naștere. De asemenea, din ziua embrionară 14 și până la naștere, DCC a fost detectat în mezenchimul care înconjură epiteliul olfactiv. În aceeași perioadă netrin-1 a fost detectat de-a lungul traiectoriei nervilor olfactivi iar modelul de expresie al acestei proteine în mezenchimul nazal se suprapune peste cel al DCC. Netrin este prezentă și în timpul primelor două săptămâni de viață postnatală, iar o expresie redusă a proteinei persistă încă la șobolanii adulți, în regiunea dorso-medială a epiteliului olfactiv.

În timp ce bulbectomia unilaterală induce o hiperreglare tranzitorie a netrin-1 în lamina propria, în mod particular în regiunea dorso-medială a neuroepiteliului, expresia DCC nu a fost detectată la axonii olfactivi în regenerare. În dezvoltarea bulbului olfactiv, creșterea axonilor celulelor mitrale a fost asociată cu prezența DCC, în timp ce netrin-1 a fost absent de-a lungul acestei căi axonale.

Aceste date susțin că netrin-1 via DCC exprimat de axoni, poate juca un rol în inițierea creșterii sau în ghidarea axonilor olfactivi primari către primordiul bulbului olfactiv. Menținerea expresiei netrin-1 în mezenchimul nazal al șobolanilor adulți, și de asemenea, hiperreglarea sa regională ulterior bulbectomiei, sugerează că netrin-1, chiar în absența DCC, poate fi implicat în procesul creșterii axonilor receptori olfactivi nou diferențiați, probabil prin utilizarea altor receptori (5).

Netrin-1 – rol în ghidarea axonilor celulelor retinale ganglionare. Formarea nervului optic la șoarece implică interacții la nivelul discului optic între netrin și receptorul său – DCC – receptor exprimat în axonii celulelor retinale ganglionare (RGC-Retinal Ganglion Cell).

Deficiența fie a netrin-1, fie a receptorului său provoacă alterări în găsirea căii de către celulele retinale ganglionare la nivelul discului optic, ceea ce conduce la hipoplazia acestuia. Se demonstrează astfel că, la șoarecii deficienți în netrin-1 sau DCC, axonii RGC se extind în hipotalamusul ventral după traiectorii angulare neobișnuite. De asemenea, în hipotalamusul de la acești șoareci mutanți se observă o reducere severă a proiecțiilor axonale posterioare ale neuronilor care secretă hormoni de eliberare a gonadotropinelor. Dincolo de defectele căilor axonale, se observă că neuronii care elaborează hormon antidiuretic și oxitocină sunt prezenți ectopic în hipotalamusul ventromedial.

În concluzie, netrin-1 și DCC, probabil prin interacții directe, guvernează atât formarea căilor axonale, cât și poziția neuronilor în timpul dezvoltării hipotalamice, iar pierderea funcțiilor ambelor proteine afectează atât sistemul vizual cât și sistemul neuroendocrin. Localizarea proteinei netrin-1, de asemenea, relevă faptul că, spre deosebire de partea caudală a sistemului nervos central, ghidarea neuronilor din regiunea liniei mediane ventrale a hipotalamusului nu necesită expresia netrin la nivelul liniei mediane (20).

Netrin-1 – rol în migrarea celulelor gliale. Mielinizarea determinată de oligodendrocite este esențială pentru funcționarea normală a sistemului nervos central al vertebratelor. Celulele precursorale ale oligodendrocitelor (OpC) sosesc inițial în regiuni restrânse ale neuroepiteliului și migrează distanțe relativ lungi către destinațiile lor finale. Semnalele care ghidează migrarea rămân în continuare necunoscute dar studii recente sugerează că precursorii gliali utilizează factori moleculari similari cu aceia care ghidează axonii către țintele lor în dezvoltarea sistemului nervos central.

În dezvoltarea nervului optic, OpC-urile migrează din diencefal către chiasma optică și în final ajung la retină iar această migrare este ghidată de netrin-1 și de semaphorin 3a (21, 22). OpC-urile care populează nervul optic în timpul dezvoltării embrionare, exprimă receptori semaphorin – neurophilin-1, -2, de asemenea, DCC și pe o suprafață mai redusă, UNC 5H1.

Există dovezi care susțin că Sema 3A și netrin-1 exercită efecte chemotactice opuse – atrăgătoare și respingătoare – asupra OpC-urilor embrionare. De asemenea, Sema 3F are efect dual, chemoatrăgător și mitogenic asupra OpC-urilor embrionare. Localizarea Sema 3A, Sema 3F și netrin-1 este în conformitate cu rolul acestor liganzi în migrarea OpC-urilor nervului optic embrionar. Aceste rezultate sugerează că migrarea OpC-urilor în nervul optic embrionar este modulată de o balanță de efecte mediate de membri ai familiilor semaphorin și netrin (22).

Netrin-1 – rol în regenerare. Ghidarea axonilor în timpul dezvoltării sistemului nervos este reglată de interacțiile lor cu factorii atrăgători, respingători sau trofici. Mecanisme similare reglează regenerarea axonală după lezare.

Utilizând PCR competitiv și analize imunohistochemice, se demonstrează localizarea netrin-1 în interiorul nervului sciatic la șobolanul adult. Expresia netrin-1 mRNA și a proteinei a fost comparată între nervul sciatic normal și nervul sciatic în regenerare, la două săptămâni după lezarea sau transecția nervului și repararea înjuriei.

Datele PCR susțin că netrin-1 mRNA este exprimat la nivele reduse în nervii periferici normali și, de asemenea, la două săptămâni după lezarea nervului prin strivire. După două săptămâni de la transecția și repararea nervului se observă o creștere de aproximativ 40 de ori a nivelelor mRNA netrin-1. Analizele imunohistochemice evidențiază faptul că celulele Schwann reprezintă sursa majoră a proteinei netrin-1 în nervii periferici.

Rezultatele acestor studii sugerează că nivelele mRNA netrin-1 sunt profund afectate în timpul înjuriei și regenerării nervilor periferici. Localizarea netrin-1 în celulele Schwann sugerează că această proteină este strategic situată pentru a influența regenerarea axonului în nervii periferici, de la adult (11).

Alte studii au examinat expresia receptorilor DCC și UNC 5H2 în celulele ganglionare retinale de șobolan, în urma transecției nervului optic precum și după grefarea unui nerv periferic la nervul optic transectat. Hibridizarea *in situ* relevă că atât mRNA DCC cât și mRNA UNC 5H2 sunt exprimați în celulele retinale ganglionare adulte. S-a observat, de asemenea, că și netrin-1 este exprimat constitutiv de către aceste celulele.

Analizele cantitative utilizând hibridizarea *in situ* demonstrează că, atât DCC cât și UNC 5H2 au fost hiporeglate în RGC, după axotomie. În prezența unui nerv periferic greșit, receptorii sunt hiporeglați similar în celulele retinale ganglionare supraviețuitoare indiferent de rolul lor în regenerarea axonală. Prin analize Northern blot s-a evidențiat expresia netrin-1 atât în nervul optic cât și în nervul sciatic iar prin analize Western blot s-a evidențiat prezența proteinei în ambii nervi. Analizele imunohistochemice relevă faptul că netrin este intim asociat cu celulele gliale ale nervului

optic. Aceste date sugerează că netrin-1, precum și receptorii DCC și UNC 5H2 pot contribui la reglarea capacității regenerative a celulelor ganglionare retinale de la adult (23).

Receptorii netrin-1

Receptorii membranari DCC și UNC 5H s-au dovedit a fi cruciali pentru ghidarea axonilor și migrația neuronală ca urmare a acțiunii netrin-1 (24).

Receptorul DCC

Receptorul DCC transmembranar a fost descris ca receptor pentru netrin-1, considerându-se a fi implicat în efectele atractante induse de acesta (5, 25). Se susține că DCC este implicat în medierea atât a efectelor atractante, cât și a celor respingătoare induse de netrin-1(26).

Dezvoltarea carcinomului de colon este asociată cu mutații la nivelul unui set specific de gene. Una dintre aceste gene funcționează ca o genă supresor tumorală și codifică receptorul DCC al netrin-1 (27). Ea are un nivel înalt de expresie la nivelul creierului și codifică o proteină transmembranară care aparține superfamiliei de imunoglobuline (28).

Examinarea expresiei DCC în dezvoltarea telencefalului la șoarece relevă faptul că proteina DCC este exprimată, în timpul dezvoltării, în populații axonale specifice care se extind de la bulbul olfactiv, neocortex, hipocamp și complexul epitalamus/habenular. În dezvoltarea bulbului olfactiv și a neocortexului, expresia DCC s-a evidențiat, în mod particular, în timpul stadiului de găsimă a țintei de către axonii aflați în dezvoltare, după care expresia lui se reduce rapid.

Analizele knockout și mutaționale ale genei DCC relevă expresia DCC în comisurile axonale, în particular, în corpul calos, comisura hipocampală și comisura anterioară. De asemenea, s-a observat că DCC este exprimat în comisura habenulară, în fasciculul retroflex precum și în stria medularis (29). O expresie înaltă a DCC a fost detectată la șobolan și la nivelul neuronilor olfactivi care se extind către telencefal (5).

Șoarecii fără DCC expun defecte severe în extinderea axonilor comisurali către placa ventrală, demonstrând astfel că sistemul de ghidare netrin-DCC este responsabil în mare parte de direcționarea proiecțiilor axonale către linia mediană ventrală, în dezvoltarea măduvei spinării. S-a observat, de asemenea, că acești șoareci mutați nu prezintă o parte din comisurile majore ale telencefalului cum ar fi corpul calos și comisura hipocampală.

Utilizând analize imunohistochimice a fost detectată expresia receptorului DCC în sistemul nervos periferic, la nivelul nervilor spinali segmentari, sciatic precum și în dezvoltarea neuronilor ganglionilor senzitivi și a proiecțiilor lor axonale. În sistemul nervos enteric, DCC a fost detectat peste tot în fazele timpurii ale dezvoltării (30).

Mecanismul funcționării sistemului netrin-DCC în extinderea axonilor

După cum s-a menționat, receptorul pentru netrin-1, DCC, este implicat în medierea atât a răspunsurilor chemoatractante cât și a celor chemorespingătoare induse de netrin-1, dar mecanismele de semnalizare intracelulare care transduc aceste efecte sunt relativ puțin elucidate.

Se susține că GTP-azele Rho sunt necesare pentru creșterea indusă de netrin-1 a axonilor comisurali către țintele lor. Utilizând celule de neuroblastom – N1E-115 – s-a demonstrat că activitățile GTP-azelor Rac1 și cdc 42 sunt implicate în extinderea neuritelor indusă de receptorul DCC. Spre deosebire de acestea, hiporeglarea GTP-azei Rho A crește abilitatea receptorului de a induce creșterea neuritelor. În fibroblastele 3T3 Swiss, DCC țintește reorganizarea actinei prin activarea Rac1 dar nu și prin activarea cdc 42 sau RhoA. Interacțiunea receptorului DCC cu netrin-1 conduce la o creștere de 4 ori a activității Rac1.

Aceste rezultate susțin implicarea GTP-azelor, precum Rac1, cdc42 și Rho A ca elemente esențiale în mecanismele de semnalizare a axonilor la netrin-1 în timpul dezvoltării (26).

Receptorul DCC a fost detectat în filopodiile conurilor de creștere care aparțin neuronilor comisurali spinali de la embrionul de șobolan. Expresia ectopică a DCC produce o creștere, dependentă de netrin-1, în numărul de filopodii. Urmărind funcțiile DCC, alți autori au caracterizat expresia netrinelor și a receptorilor netrin în celulele HEK293T și NG108-15 și au demonstrat că aceste celule exprimă netrin-1, dar nu DCC.

Coexpresia DCC și cdc42 sau Rac1 dominant negativ, blochează creșterea în numărul filopodiiilor. Adiția netrin-1 la celulele care exprimă DCC provoacă o activare persistentă a cdc42 și Rac1. Netrin-1, via DCC, influențează motilitatea celulelor prin activarea cdc42 și Rac1 care sunt implicate în reglarea extinderii membranare pe baza actinei (31).

În neuronii comisurali, DCC interacționează constitutiv cu adaptorul SH3/SH2 Nck. Această interacție este directă și necesită domeniul SH2 al Nck-1. De asemenea, atât DCC cât și Nck-1 se asociază cu citoscheletul de actină, relație mediată de DCC. Nck dominant negativ inhibă abilitatea DCC de a induce creșterea neuritelor în celulele N1E-115 și de a activa Rac 1 în fibroblaste ca răspuns la netrin-1. Aceste studii furnizează dovezi pentru implicarea Nck mamalian într-o nouă cale de semnalizare care este inițiată de factorii de ghidare extracelulară și care se finalizează cu modificări în citoscheletul de actină, modificări responsabile de ghidarea axonală (32).

Alte studii demonstrează că DCC cuplat la netrin-1 activează kinazele MAP (MAPK – mitogen-activated protein kinase), prin intermediul acțiunii kinazelor ERK-1 și ERK-2 (extracellular signal-regulated kinase), atât în celulele transfectate cât și în neuronii comisurali. Această activare este asociată cu recrutarea ERK-1/2 la complexul receptor DCC. Inhibarea ERK-1/2 antagonizează creșterea precum și orientarea axonilor dependentă de netrin. Astfel, activarea MAPK prin DCC contribuie la semnalizarea intracelulară a netrin și astfel la extinderea și ghidarea axonilor (25).

Mecanismul funcționării sistemului netrin-DCC în inducerea apoptozei

Este cunoscut faptul că gena DCC este o genă supresor tumorală care codifică o proteină receptor pentru netrin-1. Pierderea expresiei receptorului DCC în tumori nu este limitată la carcinomul de colon. Deși nu există o creștere în frecvența formării tumorii la șoarecii hemizigoți DCC, restabilirea expresiei DCC supresează tumorigenicitatea. Mecanismul de acțiune DCC este neelucidat dar s-a demonstrat că receptorul induce apoptoza în absența cuplării ligandului și blochează apoptoza când este cuplat cu netrin-1 (27).

Receptorii netrin-1: UNC 5H (UNC 5H1, UNC 5H2, UNC 5H3) acționează în sensul inducerii apoptozei atunci când ligandul nu e disponibil dar acest efect este blocat de prezența netrin-1. Receptorii UNC 5H sunt clivați, *in vitro*, de caspaze la nivelul domeniilor lor intracelulare, clivaj ce presupune că ar conduce la expunerea unui fragment care cuprinde un domeniu necesar pentru inducerea morții celulare *in vivo*.

Aceste dovezi susțin că prezența netrin-1 în timpul dezvoltării sistemului nervos central este crucială pentru menținerea supraviețuirii axonilor care exprimă UNC 5H și DCC, în special în zona ventrală a trunchiului cerebral. Prin urmare, netrin-1 funcționează în dezvoltarea sistemului nervos central atât ca factor de ghidare cât și ca factor de supraviețuire, via receptorilor săi DCC și UNC 5H (24).

Mecanismul funcționării netrin-1- DCC ca sistem bifuncțional

Mecanismele de semnalizare citoplasmatică care țintesc răspunsurile conurilor de creștere la factorii de ghidare sunt în cea mai mare parte necunoscute. Studii anterioare au demonstrat că nivelul și modelele temporale ale Ca²⁺ citoplasmatic pot regla rata extinderii conului de creștere *in vivo* și *in vitro*. Nivelele Ca²⁺ mediază comportamentul conurilor de creștere care aparțin neuronilor cultivați de la *Xenopus*, comportament indus de un gradient extracelular al netrin-1.

Răspunsul indus de netrin-1 depinde de influxul Ca²⁺ prin canalele membranei plasmatică și de eliberarea Ca²⁺ din depozitele citoplasmatică, eliberare indusă de Ca²⁺. Reducerea semnalelor Ca²⁺ prin blocarea acestor două surse de Ca²⁺ convertește răspunsul indus de netrin-1 din atracție în respingere.

Activarea eliberării Ca^{2+} din depozitele interne indusă de Ca^{2+} , cu un gradient de ryanodină, în absența netrin-1, a fost suficientă pentru a ținti fie răspunsurile atractante fie cele respingătoare, în funcție de concentrația de ryanodină utilizată. Aceste rezultate susțin că semnalele Ca^{2+} citoplasmatic mediază ghidarea conului de creștere prin intermediul netrin-1 și modelele diferite ale elevării Ca^{2+} țințesc răspunsurile de chemoatracție și de chemorespingere (33).

S-a observat că în cultură conurile de creștere ale neuronilor spinali embrionari de la *Xenopus* manifestă răspunsuri de chemoatracție către sursa de netrin-1 și de chemorespingere în prezența unui analog competitiv al cAMP sau a unui inhibitor al proteinkinazei A. Ambele tipuri de răspuns sunt abolite prin depleția Ca^{2+} extracelular și prin adăugarea anticorpilor anti-receptor DCC. Astfel, conurile de creștere ale nervilor răspund la același factor de ghidare cu comportamente opuse, în funcție de semnalele care stabilesc nivelul cAMP citosolic (6).

Cercetări recente au identificat un rol cheie pentru nivelele nucleotidelor ciclice intracelulare în reglarea naturii răspunsului la netrin a axonului aflat în creștere, fie că este de atracție fie că este de respingere (1).

Alte studii demonstrează că laminin-1 din matrixul extracelular, convertește atracția mediată de netrin, în respingere. Experimentele s-au realizat la *Xenopus* unde conurile de creștere ale neuronilor retinali manifestă chemoatracție către factorul netrin-1, in vitro, și sunt ghidate de localizarea acestuia, către capătul nervului optic. Un fragment peptidic solubil al laminin-1 – (YIGSR) – mimează conversia indusă de laminin a răspunsurilor de atracție în răspunsuri de respingere. Nivelele reduse ale cAMP, de asemenea, conduc la o transformare a atracției induse de netrin-1 în respingere iar nivelele cAMP se reduc în prezența laminin-1 sau a YIGSR.

La capătul bogat în laminin al nervului optic, unde axonii părăsesc globul ocular, laminin-1 este limitată la suprafața retinală. Chemorespingerea prezentă în regiunea unde laminin și netrin sunt coexprimate poate ajuta la conducerea axonilor în regiunea în care este prezentă numai netrin, furnizând astfel un mecanism care conduce axonii la părăsirea suprafeței retinale.

În conformitate cu această idee, peptidele YIGSR, aplicate la retina în dezvoltare, provoacă direcționarea greșită a axonilor către capătul nervului optic. Aceste constatări susțin că moleculele matricei extracelulare nu au doar rol în promovarea creșterii axonilor ci și în modificarea comportamentului conurilor de creștere la răspunsul factorilor de ghidare difuzabili (34).

Receptorul UNC-5

Inițial, s-a postulat că răspunsurile chemoatractante sau chemorespingătoare ale netrin-1 ar fi dependente de receptorii săi – DCC sau UNC 5H- considerându-se că DCC ar media răspunsurile atractante induse de netrin-1(1,5,25) în timp ce UNC 5H ar media răspunsurile respingătoare induse de aceeași moleculă (1,35).

Alte studii susțin că ambii receptori sunt implicați atât în medierea răspunsurilor atractante cât și a celor respingătoare ale netrin-1 (26), considerându-se că cele două tipuri de răspuns sunt dependente de concentrația Ca^{2+} (33), de nivelele cAMP (6) și de expresia laminin-1 (6, 34).

La *Caenorhabditis elegans* (35) UNC-5 și omologul său mamalian RCM sunt receptori necesari pentru a media efectele respingătoare ale netrin/UNC-6 asupra conurilor de creștere axonale (36). UNC-5 și RCM sunt fosforilate la Tyr.

O tirozinază Src activată induce fosforilarea RCM la multiple reziduuri ale tirozinei și creează astfel potențiale situsuri de cuplare pentru proteinele de semnalizare citoplasmatică. Astfel, capătul NH₂ terminal al domeniului SH2 al tirozinfosfatazei Shp2 cuplează specific la Tyr (568) a unei fosfopeptide RCM. De asemenea, că Shp2 se asociază cu RCM într-o manieră dependentă de netrin, în celulele transfectate și coimunoprecipitate cu RCM din lizatul de creier embrionar de la șoarece. Un receptor RCM mutant – Y 568F – nu cuplează Shp2 și este mai înalt fosforilat la Tyr decât receptorul de tip sălbatic.

Aceste rezultate sugerează că fosforilarea stimulată de netrin a Tyr (568) recrutează Shp2 la membrana celulară unde potențial poate modifica fosforilarea și funcționarea RCM (36).

Netrin UNC-6 respinge axonii motori prin activarea receptorului UNC-5 singur sau în combinație cu UNC-40/DCC receptor. Într-un screening genetic realizat pe mutantele de *Caenorhabditis elegans* care expun defecte parțiale în proiecțiile axonilor motori, s-a izolat gena *max-1* (genă necesară pentru ghidarea axonilor motori).

Mutațiile, care conduc la pierderea funcțiilor genei *max* și la defecte de ghidare axonală cu penetranță completă dar variabilă. Mutațiile ale *unc-5* și *unc-6* dar nu ale *unc-40* amplifică dominant fenotipurile mutante ale *max-1*, în timp ce hiperexpresia *unc-5* sau *unc-6* dar nu a *unc-40* diminuează necesitatea pentru *max-1*.

Proteinele MAX-1 conțin domeniile PH, MyTH4 și domeniile FERM și par a fi localizate în procesele neuronale. MAX-1 uman și UNC 5H2 colocalizează în regiuni subcelulare discrete ale celulelor transfectate. De aici, un posibil rol al MAX-1 în respingerea axonilor indusă de netrin prin modularea căii de semnalizare a receptorului UNC-5 (35).

1. Livesey F. J., Netrins and netrin receptors. *Cell. Mol. Life Sci.*, 56(1–2), 62–8, 1999.
2. Meyerhardt J. A., Caca K., Eckstrand B. C., Hu G., Lengauer C., Banavali S., Look A. T., Fearon E. R., Netrin-1: interaction with deleted in colorectal cancer (DCC) and alteration in brain tumors and neuroblastomas. *Cell Growth & Differentiation*, 10(1):35–42, 1999.
3. Kennedy T. E., Cellular mechanism of netrin function: long-range and short-range actions. *Biochem. Cell Biol.*, 78(5):569–75, 2000.
4. Seaman C., Cooper H. M., Netrin-3 protein is localized to the axon of motor, sensory, and sympathetic neurons. *Mech. Dev.* 101(1–2): 245–28, 2001.
5. Astic L., Pellier-Monnin V., Saucier D., Charrier C., Mehlen P., Expression of netrin-1 and netrin-1 receptor, DCC, in the rat olfactory nerve pathway during development and axonal regeneration. *Neuroscience*, 109(4):643–56, 2002.
6. Ming G. L., Song H. J., Berminger B., Holt C. E., Tessier-Lavigne M., Poo M. M., cAMP-dependent growth cone guidance by netrin-1. *Neuron*, 19(6): 125–35, 1997.
7. Wang H., Copeland N. G., Gilbert D. J., Jenkins N. A., Tessier-Lavigne M., Netrin-3, a mouse homolog of human NTN2L, is highly expressed in sensory ganglia and shows differential binding to netrin receptors. *J. of Neuroscience*, 19(12):4938–47, 1999.
8. Sim H. J., Cho K. H., Chung H. S., mRNA expression of netrin-1, an axon guidance protein in chick and rat embryos. *Molecules & Cells*, 9(3):245–51, 1999.
9. Puschel A. W., Divergent properties of mouse netrin. *Mechanisms of Development*, 83(1–2):65–75, 1999.
10. Manitt C., Colicos M. A., Thompson K. M., Rousselle E., Peterson A. C., Kennedy T. E., Widespread expression of netrin-1 by neurons and oligodendrocytes in the adult mammalian spinal cord. *J. Neurosci.*, 21(11):3911–22, 2001.
11. Madison R. D., Zomorodi A., Robinson G. A., Netrin-1 and peripheral nerve regeneration in the adult rat. *Experimental Neurology*, 161(2):563–70, 2000.
12. Varela-Echavarría A., Tucker A., Puschel A. W., Guthrie S., Motor axon subpopulations respond differentially to the chemorepellents netrin-1 and semaphorin D. *Neuron*, 18(2):193–207, 1997.
13. Alcantara S., Ruiz M., De Castro F., Soriano E., Sotelo C., Netrin 1 acts as an attractive or as a repulsive cue for distinct migrating neurons during the development of the cerebellar system. *Development*, 127(7): 1359–72, 2000.
14. Bloch-Gallego E., Ezam F., Tessier-Lavigne M., Sotelo C., Floor plate and netrin-1 are involved in migration and survival of inferior olivary neurons. *J. of Neuroscience*, 19(11): 4407–20, 1999.
15. Gallo M. J., Tessier-Lavigne M., Biochemical characterization of netrin-synergizing activity. *J. of Biol. Chem.*, 275(11):7832–8, 2000.
16. Steup A., Lohrum M., Hamscho N., Savastan N. E., Ninnemann O., Nitsch R., Puschel A. W., Skutella T., Sema 3C and netrin-1 differentially affect axon growth in the hippocampal formation. *Molecular&Cellular Neurosciences*, 15(2):141–55, 2000.
17. Barallobre M. J., Del Rio J. A., Alcantara S., Borrell V., Aguado F., Ruiz M., Carmona M. A., Martin M., Fabre M., Yuste R., Tessier-Lavigne M., Soriano E., Aberrant development of hippocampal circuits and altered neural activity in netrin 1-deficient mice. *Development*, 127(22):4797–810, 2000.
18. Metin C., Deleglise D., Serafini T., Kennedy T. E., Tessier-Lavigne M., A role for netrin-1 in the guidance of cortical efferents. *Development*, 124(24):5063–74, 1997.
19. Murase S., Horwitz A. F., Deleted in colorectal carcinoma and differentially expressed integrins mediate the directional migration of neural precursors in the rostral migratory stream. *J. Neurosci.*, 22(9):3568–79, 2002.
20. Deiner M. S., Sretavan D. W., Altered midline axon pathways and ectopic neurons in the developing hypothalamus of netrin-1 and DCC-deficient mice. *J. of Neurosciences*, 19(22): 9900–12, 1999.
21. Tsai H. H., Miller R. H., Glial cell migration directed by axon guidance cues. *Trends Neurosci.*, 25(4):173–5, 2002.
22. Spassky N., de Castro F., Le Bras B., Heydon K., Queraud-LeSaux F., Bloch-Gallego E., Chedotal A., Zalc B., Thomas J. L., Directional guidance of oligodendroglial migration by class 3 semaphorins and netrin-1. *J. Neurosci.*, 22(14): 5992–6004, 2002.

23. Ellezam B., Selle-Navarro I., Manitt C., Kennedy T. E., McKerracher L., Expression of netrin-1 and its receptors DCC and UNC-5H2 after axotomy and during regeneration of adult rat retinal ganglion cells. *Exp. Neurol.*, 168(1):105–15, 2001.
24. Llambi F., Causeret F., Bloch-Galego E., Mehlen P., Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *EMBO J.*, 20(11):2715–22, 2001.
25. Forcet C., Stein E., Pays L., Corset V., Llambi F., Tessier-Lavigne M., Mehlen P., Netrin-1-mediated axon outgrowth requires deleted in colorectal cancer-dependent MAPK activation. *Nature*, 417(6887):443–7, 2002.
26. Li X., Saint-Cyr-Proulx E., Aktories K., Lamarche-Vane N., Rac1 and cdc42 but not RhoA or Rho kinase activities are required for neurite outgrowth induced by the Netrin-1 receptor DCC (deleted in colorectal cancer) in N1E-115 neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.*, 277(17):15207–14, 2002.
27. Mehlen P., Rabizadeh S., Snipas S. J., Assa-Munt N., Salvesen G. S., Bredsen D. E., The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature*, 395 (6704):801–4, 1998.
28. Teyssier J. R., Rousset F., Garcia E., Cornillet P., Laubriet A., Upregulation of the netrin receptor (DCC) gene during activation of B lymphocytes and modulation by interleukins. *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 283 (5):1031–6, 2001.
29. Shu T., Valentino K. M., Seaman C., Cooper H. M., Richards L. J., Expression of the netrin-1 receptor, deleted in colorectal cancer is largely confined to projecting neurons in the developing forebrain. *J. of Comparative Neurology*, 416(2):201–12, 2000.
30. Seaman C., Anderson R., Emery B., Cooper H. M., Localization of the netrin guidance receptor, DCC, in the developing peripheral and enteric nervous system. *Mech. Dev.*, 103(1–2):173–5, 2002.
31. Shekarabi M., Kennedy T. E., The netrin-1 receptor DCC promotes filopodia formation and cell spreading by activating cdc42 and Rac1. *Mol Cell Neurosci*, 19(1):1–17, 2002.
32. Li X., Meriane M., Triki I., Shekarabi M., Kennedy T. E., Larose L., Lamarche-Vane N., The adaptor protein Nck-1 couples the netrin-1 receptor DCC (deleted in colorectal cancer) to the activation of the small GTP-ase Rac1 through an atypical mechanism. *J. Biol. Chem.*, 30 July, 2002, in press.
33. Hong K., Nishiyama M., Henley J., Tessier-Lavigne M., Poo M., Calcium signaling in the guidance of nerve growth by netrin-1. *Nature*, 403(6765):93–8, 2000.
34. Hopker Vh., Shewan D., Tessier-Lavigne M., Poo M., Holt C., Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. *Nature*, 401(6748):69–73, 1999.
35. Huang X., Cheng H. J., Tessier-Lavigne M., Jin Y., MAX-1, a novel PH/MyTH4/FERM domain cytoplasmatic protein implicated in netrin-mediated axon repulsion. *Neuron*, 34(4):563–76, 2002.
36. Tonq J., Killeen M., Steven R., Binns K. L., Culotti J., Pawson T., Netrin stimulates tyrosine phosphorylation of the UNC-5 family of netrin receptors and induces Shp2 binding to the RCM cytodomain. *J. Biol. Chem.*, 276(44): 40917–25, 2001.

VERIFICAT
2017

Tiparul s-a executat sub c-da nr. 996/2002 la
Tipografia Editurii Universității din București

VERIFICAT
2007

ISBN 973-575-729-X

Lei 78000