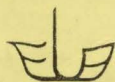


ONCOBIOLOGIE

Sub redacția: **Prof. dr. doc. Dumitru Mișcalencu**
Prof. dr. Florica Mailat
C. P. I dr. Ilinca Nicolae



Editura Universității din București

ONCOBIOLOGIE

**Sub redacția: Prof. dr. doc. *Dumitru Mișcalencu*
Prof. dr. *Florica Mailat*
C. P. I dr. *Ilinca Nicolae***



EDITURA UNIVERSITĂȚII DIN BUCUREȘTI
2003

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

IV 517563

Tiparul s-a executat sub c-da nr. 1084/2003 la
Tipografia Editurii Universității din București

B.C.U. Bucuresti



C20035671

12/15/03

© Editura Universității din București
Șos. Panduri, 90–92, București – 050663; 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

**Oncobiologie / sub. red.: prof. dr. doc. Dumitru Mișcalencu, prof. dr.
Florica Mailat, C.P. I dr. Ilinca Nicolae – București: Editura
Universității din București, 2003**

176 p.

Bibliogr.

ISBN 973-575-797-4

I. Mișcalencu, Dumitru (ed.)

II. Mailat, Florica (ed.)

III. Nicolae, Ilinca (ed.)

616-006.6:57+578

CUPRINS
COLECTIV AUTORI :

Relu Cocoș, biolog UMF Carol Davila, drd. B.C.C.N.T. – <i>VEGF și ANG – Mediatori cheie ai angiogenezei tumorale</i>	5
 Masteranzi (mrd.), B.C.C.N.T. – Biologia Comparată a Celulei Normală și Tumorală	
Teodora Stan, biolog – <i>Proteina retinoblastomului (pRb)</i>	19
Alice Armatu, biolog – <i>Factori de stimulare a coloniilor (CSF)</i>	36
Costică Crețu, biolog – <i>Fibronectina (FN) – glicoproteină de matrice extracelulară</i>	53
Mariana Ciubuc, biolog – <i>ICAM (Molecule de adeziune intercelulară)</i>	77
Georgeta Caraene, biolog – <i>Familia de GTP-ase Rho</i>	91
Anda Dumitrescu, medic rezident Oncologie medicală – <i>Interleukina-10 (IL-10) – citokină antiinflamatoare</i> ..	102
Anda Dumitrescu, medic rezident Oncologie medicală – <i>VCAM (Molecule de adeziune a celulelor vasculare)</i>	124
Adrian Melinaș, biolog (bacteriolog) – <i>Inst. Oncologic – Tenascina (TN)</i>	141
Carmen Ianculescu, biolog – <i>Laminina</i>	151
Monica Manea, biolog – <i>Virusul epstein-Barr (EBV)</i>	163

VEGF ȘI ANG – MEDIATORI CHEIE AI ANGIOGENEZEI TUMORALE

Familia moleculelor VEGF conține în prezent 5 membrii mamalieni: VEGF, PLGF (factorul de creștere placentar), VEGF-B, VEGF-C și VEGF-D. Omologii virali sunt numiți colectiv VEGF-E și sunt codificați de tulpini diferite ale virusului Orf.

Familia VEGF (factorul de creștere a endoteliului vascular)

VEGF este un mitogen al celulelor endoteliale hipoxic-inductibile. El stimulează migrarea celulelor endoteliale, permeabilitatea vasculară și promovează supraviețuirea vaselor nou formate. VEGF este important în dezvoltarea embrionară, deoarece inactivarea țintită, chiar pentru numai una din alelele sale, conduce la letalitate embrionară (1). Intervine și în perioada postnatală timpurie când endoteliul se află într-un proces continuu de proliferare. Deși VEGF este înalt specific pentru celulele endoteliale, a devenit evident faptul că el induce un răspuns și în celulele nonendoteliale; de exemplu, este chemotactic pentru monocite și poate inhiba maturarea celulelor dendritice (2).

Gena umană VEGF-A este organizată în 8 exoni separați de 7 introni. Splicingul celor 8 exoni conduce la formarea a cel puțin 5 specii moleculare diferite de VEGF ce au 121, 145, 165, 189 și 206 aminoacizi care urmează secvenței semnal clivată. Variantele diferite de splicing ale VEGF diferă ca funcție; spre deosebire de VEGF165, VEGF121 este incapabil să se cupleze la receptorul nontirozinkinazic neuropilin-1, iar șoarecii mutați pentru gena VEGF120 murină nu pot compensa pierderea izoformelor lungi, rezultatul fiind cardiomiopatia și moartea (3).

VEGF-B

Gena VEGF-B este localizată pe cromosomul uman 11q13 și generează prin splicing alternativ două forme ARNm. Gena conține 7 exoni. Secvența ce codifică primii 5 exoni este încorporată în ambele forme splicing. Splicingul alternativ permite utilizarea unor cadre de citire diferite care sunt suprapuse în exonul 6. În consecință, cele două izoforme au aceleași reziduuri aminoacidice (în număr de 115) la capătul aminoterminal, prezentând însă capete carboxiterminale diferite (4). După ce secvența semnal de 21 de aminoacizi de la capătul acid este eliminată, cele două polipeptide rezultate sunt VEGF-B167 și VEGF-B186. Masele moleculare aparente ale homodimerilor acestora sunt de 42 kDa și respectiv 60kDa.

Secvențele de aminoacizi ale celor două forme sunt 44% identice, punțile disulfidice prezentând de asemenea modele similare. Cele două subunități sunt unite prin punți disulfidice aflate între reziduurile 2 și 4 de cisteine. Exonul 6 al VEGF-B167 este omolog cu exonul 7 al VEGF165; ambii codifică secvențe proteice bogate în reziduuri de aminoacizi

bazici, care după secreție cuplează factorul de creștere la proteoglicanii heparansulfat de pe suprafața celulară. Spre deosebire, domeniul carboxiterminal al VEGF-B 186 este hidrofob și conține multe reziduuri de serine, treonine și proline. VEGF-B167 și VEGF-B186 diferă în modelul de glicozilare, astfel, în timp ce VEGF-B167 nu este glicozilat, VEGF-B186 conține glicani legați printr-o grupare-oxidril. Mai mult, VEGF-B186 este procesat proteolitic la Arg. 127, dând naștere unui dimer de 34kDa (5).

VEGF-C, o subfamilie a familiei VEGF

În familia VEGF a factorilor de creștere, VEGF-C și ruda sa cea mai apropiată, VEGF-D, constituie un subgrup care este caracterizat prin prezența unor extensii amino/carboxiterminale unice, care flanchează domeniul de omologie VEGF. Domeniul carboxiterminal conține un model repetitiv de reziduuri de cisteine, Cys-X10- Cys- X- Cys-X-Cys, ce se aseamănă cu motivul proteinei inelului Balbianei3, o proteina secretată, componentă a mătășii produsă de glandele salivare ale lui Chironomus tentans. Elementul central (domeniul de omologie VEGF) are o identitate de 30% cu VEGF și este codificat de exonii 3 și 4 din cei 7 exoni prezenți, caracteristică conservată și la alți membri ai familiei VEGF(6). Domeniile de omologie ale VEGF-C și VEGF-D sunt 61% identice. Gena VEGF-C umană a este localizată pe cromosomul 4q34(7). VEGF-C este sintetizat ca o proteină precursoră, care traversează o etapă proteolitică ulterioară, ca mecanism al procesării lanțurilor B și A ale PDGF, sugerându-se ideea unei evoluții comune. Domeniul carboxiterminal este clivat după secreție, dar rămâne cuplat la domeniul aminoterminal prin legături disulfidice rezultând un tetramer disulfidic asociat, compus din polipeptide de 29KDa și 31KDa. Procesarea proteolitică a propeptidei aminoterminală eliberează forma matură, care este formată din două lanțuri polipeptidice de 21KDa ce corespund domeniului de omologie VEGF. Acestea sunt cele mai frecvente izoforme ale VEGF din diferite sisteme biologice.

VEGF-D

VEGF-D este înrudit cu VEGF-C prin prezența extensiilor C- și N-terminale absente la alți membri ai familiei VEGF. În țesuturile umane, ARNm VEGF-D este abundent în inimă, plămâni, mușchi scheletici, colon și intestin subțire. Analiza specificității față de receptori relevă că VEGF-D este ligand pentru ambii receptori VEGF, VEGFR-2 (Flk1) și VEGFR3 (Flt4). Totuși, VEGF-D nu se cuplează la VEGFR1(8).

Faptul că VEGF-D este strâns înrudit cu VEGF-C se datorează domeniului de omologie VEGF specific formei VEGF-D, care este mult mai asemănător cu cel din VEGF-C. Deoarece specificitățile de cuplare la receptori ale VEGF-D și VEGF-C sunt asemănătoare, se poate face omologie între funcțiile biologice ale celor 2 factori. VEGF-C, poate de asemenea, să activeze VEGFR3, fiind posibil ca VEGF-D să fie implicat în reglarea creșterii și diferențierii celulelor endoteliale limfatice in vitro.

VEGFR2 și VEGFR3 sunt puternic exprimați în timpul dezvoltării embrionare a celulelor endoteliale. Mai târziu, VEGFR3 se exprimă limitat în celulele endoteliale limfatice. Deoarece formele mature ale VEGF-C și D pot activa acești receptori, ele pot juca un rol în coordonarea dezvoltării endoteliului vascular. Se cunoaște faptul că, expresia VEGF-C și D la embrion stimulează creșterea endoteliului vascular și limfatic, în timp ce expresia VEGF, care activează numai VEGFR2, stimulează exclusiv dezvoltarea endoteliului vascular.

Expresia genei murine VEGF-D este indusă de factorul transcriptional c-fos, existând o corelație între aceasta și progresia tumorală.

Activitățile biologice ale VEGF, VEGF-B, VEGF-C

Este clar faptul că VEGF este un reglator important al procesului angiogenic, dozarea sa necesitând o reglare spațială, temporală și cantitativă. Mutația ambelor alele VEGF murine mimează efectul observat la șoarecii knockout VEGFR2 ceea ce conduce la absența vascularizației (10). Mutația numai a unei singure alele VEGF cauzează letalitate embrionară determinată de anomalii vasculare severe, fiind poate singurul caz de letalitate embrionară indusă de deleția unei singure alele. Chiar și alterări subtile în expresia VEGF în timpul dezvoltării embrionului, cauzează anomalii severe ce conduc la moartea animalului în perioada embrionară sau postnatală timpurie. Rolul VEGF este de asemenea critic în timpul dezvoltării postnatale timpurii, fapt demonstrat de experimentele mutaționale VEGF, dar și de administrarea anticorpilor anti-VEGFR. Deși inactivarea VEGF este letală în timpul primelor săptămâni de viață extrauterină, inactivarea genei VEGF la animalele mai în vârstă este mai puțin traumatizantă, afectând numai acele structuri care prezintă remodelarea vasculară, cum ar fi plăcile osoase și corpii ovarieni (11). Astfel, VEGF se pare că nu exercită un efect continuu de menținere a funcției vasculare a adultului.

Cea mai relevantă demonstrație a importanței modulării activității VEGF este oferită de modelul retinian. Înmugurirea angiogenică în retina avasculară și hipoxică depinde de expresia VEGF în aceasta. Orice perturbare a expresiei normale distruge modelele de vascularizare. Restaurarea ulterioară a expresiei VEGF nu corectează situația, ci mai degrabă o exacerbează. Cea mai simplă modalitate de modificare a expresiei VEGF se realizează prin expunerea postnatală a șobolanilor la o perioadă scurtă de hiperoxie, care supresează tranzitul VEGF retinian și oprește creșterea vaselor. Când șobolanii sunt aduși la o stare normală, retina subvascularizată devine hipoxică determinând o creștere anormală a VEGF, care promovează o angiogeneza robustă ce se caracterizează însă, prin creștere vasculară hemoragică și vase permeabile ce distrug retina (12). Acest model reflectă capacitatea terapiei cu oxigen de a cauza retinopatii la copiii născuți prematur. Similar, retinopatiile diabetice inițiază distrugerea și pierderea structurii vaselor, urmate de hipoxie retiniană și inducerea VEGF care cauzează răspuns angiogenic anormal cu vase hemoragice (13). Rezultatele arată că inducerea improprie a VEGF, în absența unui întreg program angiogenic, determină formarea unor vase imature.

Promotorii genelor familiei VEGF nu prezintă boxa TATA și astfel transcripția este inițiată de la nivelul unor situri mult mai heterogene (14). În ce privește promotorul VEGF-B, ca și VEGF-C, nu prezintă situri de cuplare pentru factorii reglați hipoxic. Promotorul VEGF-B conține siturile de cuplare pentru factorul de transcriere Egr1, dar îi lipsesc siturile AP-1 care sunt prezente în promotorul VEGF. Anumiți factori de creștere, inclusiv PDGF, EGF, TGF α și citokinele TNF α și IL-1, cresc nivelele VEGF-C, dar nu și nivelele VEGF-B în fibroblastele din plămâni (15). Inducerea VEGF-C de către IL-1 și TNF α poate fi mediată de siturile de cuplare a factorului de transcripție NF-kB din promotorul VEGF-C. În general, nivelele de ARNm VEGF-C sunt hiporeglate de hormonii steroizi. Nivelele ARNm VEGF-B par mai mult sau mai puțin variabile și au numai o reglare tisular specifică.

VEGF-B este exprimat timpuriu în dezvoltare și este distribuit major, fiind abundent în miocitele cardiace, mușchii scheletici și în celulele musculare netede din vasele de calibru mare (16). De asemenea, VEGF-B este exprimat și în sistemul nervos, în special în cortexul

cerebral. La șoarecii adulți, ARNm VEGF-B este abundent în inimă și rinichi unde există și o expresie puternică a VEGF. Când se compară cele două izoforme, ARNm VEGF167 este mult mai prevalent, reprezentând până la 90% din transcriptele țesutului muscular (5).

VEGF-B și VEGF au numai parțial specificități comune de cuplare la receptori, și așa cum a arătat modelul embrionar knockout, nu există un alt factor de creștere care să compenseze pierderea chiar și a unei singure alele VEGF (17). VEGF-B poate modula semnalizarea VEGF prin formarea de heterodimeri cu acesta. Șoarecii knockout VEGF sunt viabili și fertili, fără modificări morfologice evidente, ceea ce arată că VEGF nu joacă un rol important în dezvoltarea vascularizației. Cu toate acestea, acești șoareci prezintă un fenotip cardiac modificat minor.

Inactivarea genei receptorului VEGF-B, VEGFR1, cauzează moartea embrionului în E8,5 (18). Șoarecii cu deficiență VEGFR1 nu formează vase organizate și prezintă o suprad dezvoltare a celulelor endoteliale.

Fenotipul a fost explicat prin creșterea puternică a tranziției mezenchim-hemangioblast la șoarecii VEGFR1 knockout, formarea canalelor vasculare dezorganizate fiind un fenotip secundar. Rolul lui VEGFR1, totuși, rămâne enigmatic; șoarecii homozigoți ce exprimă VEGFR1 fără domeniul tirozinkinazic, dar care prezintă un domeniu extracelular intact și o regiune intramembranară sunt normali, excepția fiind dată doar de migrația redusă a macrofagelor in vitro ca răspuns la VEGF și PLGF.

VEGF-C, spre deosebire de VEGF, este un inductor potent al limfoangiogenezei. Șoarecii transgenici care exprimă VEGF-C sub influența promotorului keratinic14, care direcționează expresia transgenică pentru keratinocitele epidermale, au prezentat hiperplazie selectivă a vaselor limfatice superficiale (19). Fenotipul șoarecilor transgenici VEGF164, hiperexprimat de la același promotor, și-a demonstrat specificitatea pentru vasele de sânge. VEGF-C recombinant matur adăugat exogen a indus proliferarea celulelor endoteliale limfatice și dezvoltarea unor sinusuri limfatice în membrana chorioalantoinică aviană diferențiată.

VEGF-C, totuși, are proprietăți asemănătoare cu VEGF. El acționează asupra celulelor endoteliale stimulând proliferarea și migrarea celulelor endoteliului vascular in vitro, iar in vivo crește permeabilitatea vasculară. S-a arătat astfel că, VEGF-C induce neovascularizarea în modele experimentale in vitro.

PLGF aparține familiei factorilor de creștere ai endoteliului vascular. Acesta se cuplează la receptorul flt-1-VEGF, dar nu și la receptorul KDR/flk-1, receptor care mediază majoritatea acțiunilor angiogenice și proliferative ale VEGF(21). Cuplarea PLGF21125 la acești receptori a fost inhibată de excesul de PLGF2 și de existența formei VEGF165, dar nu de forma VEGF121 și foarte puțin, chiar deloc, de PLGF1. S-a arătat, de asemenea, că PLGF1 poate forma heterodimeri activi cu VEGF ce au activitate identică cu VEGF. Heterodimerii VEGF/PLGF se cuplează la KDR/flk-1 și induc proliferarea celulelor endoteliale la fel de eficient ca și VEGF(22).

PR-39- este o peptidă care a fost izolată inițial din intestinul de porc în condiții inflamatorii. Peptida este prezentă în răni și în inima ischemică, modificările substanțiale se corelează, se pare, și cu alterarea matrixului heparansulfat. PR-39 este secretată ca o propeptidă care suferă clivajul porțiunii N-terminale pentru a genera forma matură, compusă din ultimii 39 aa ai regiunii C-terminale.

S-a observat că această peptidă induce angiogeneza in vitro și in vivo, prin creșterea nivelelor celulare de HIF-1 α , care la rândul său reglează expresia genelor asociate procesului angiogenic (genele pentru VEGF și FLT1). PR-39 dobândește acest efect prin inhibarea degradării HIF-1 α de sistemul ubiquitin-proteozomic.

Pentru a explora mecanismele de acțiune ale PR-39, s-a evaluat abilitatea acesteia de a influența expresia HIF-1 α . Mecanismul prin care PR-39 crește nivelul celular de HIF-1 α este, se pare, inhibiția degradării HIF-1 α

Un studiu ce a folosit inhibitorul proteosomic LLnL (inhibitorii proteosomici pot crește nivelele HIF prin inhibarea degradării din proteosomi) a indicat că, inhibiția degradării HIF-1 α poate fi suficientă pentru activarea expresiei genelor dependente de HIF-1 α . Astfel, expresia peptidei cauzează creșterea nivelelor VEGF. În plus față de expresia VEGF, s-a observat și creșterea expresiei altor gene implicate în răspunsul angiogenic, inclusiv receptorii KDR, FLT-1, FGFR1 (23).

RECEPTORII VEGF

Principalii receptori implicați în inițierea semnalizării ca răspuns la VEGF cuprind o familie de receptori tirozinkinazici ce conține 3 membrii numiți acum: VEGFR1 (cunoscut ca Flt1), VEGFR2 (cunoscut ca KDR sau Flk-1) și VEGFR3 (cunoscut anterior ca Flt4). De asemenea, există receptorii pentru angiopoietine: Tie-1 și Tie-2 (receptorul tirozinkinazic din celulele endoteliale). La aceștia se adaugă receptorii pentru FGFs, ephrine și receptorii neuropilinici.

Receptorii VEGF

Rezultatele au arătat că majoritatea receptorilor tirozinkinazici (RTK) sunt cuplați similar la o cascadă intracelulară de transducție a semnalelor și sunt capabili de inducerea proliferării celulare. Totuși, calea de transducție a semnalelor este mult diferită de cea a căii Ras. Complexitatea este dată de implicarea unui ligand numit Ang-2 care interferează cu activitatea tirozinkinazică a receptorului Tie-2.

VEGF semnalizează prin 2 receptori RTK, numiți VEGFR1 și VEGFR2. Șoarecii cu mutații homozigote în cei 2 receptori VEGF au murit în faza medie a gestației din cauza defectelor vasculare acute. Totuși, fenotipurile sunt diferite. Șoarecii knockout(-/-) VEGFR2, care au murit în E8,5, nu prezentau celule endoteliale și sistem hematopoietic în dezvoltare. Se dovedește astfel că, VEGF se implică mai întâi în determinarea primului progenitor hematoangioblastic și apoi în determinarea celulelor endoteliale. Șoarecii knockout(-/-) VEGFR1 care, de asemenea, mor în E8,5, au progenitori hematopoietici normali și celule endoteliale abundente. Aceste celule migrează și proliferază dar nu se asamblează în tuburi și vase funcționale. Astfel, acești RTK înalt omologi trimit semnale diferite în celulele endoteliale (24).

VEGFR2 mediază funcțiile majore, creșterea și permeabilitatea vasculară specifice VEGF, în timp ce VEGFR1 are un rol negativ, fie prin acțiunea cu un receptor modificat, fie prin supresia semnalizării prin VEGFR2. Șoarecii care exprimă numai o formă trunchiată a VEGFR1 ce nu are domeniu kinazic, par mai degrabă normali, fapt ce este în concordanță cu ideea ca VEGFR1 poate avea rolul specific unui receptor trunchiat.

VEGF-B și PLGF sunt liganzi selectivi pentru VEGFR1. Primele 3 domenii imunoglobulinice ale acestui receptor sunt suficiente pentru cuplarea VEGF-B, comportament ce este în concordanță cu faptul că VEGF competiționează cu VEGF-B pentru cuplarea la VEGFR1. Mutageneza VEGF a sugerat că interacția cu VEGFR1 se face prin intermediul reziduurilor Asp63, Glu64 și Glu67, în timp ce cuplarea la VEGFR2 este mediată primar de Arg82, Lys84 și Hys86 (25). Un alt studiu a arătat că multe reziduuri hidrofobe participă la

formarea interacțiilor de cuplare, singura interacție polară fiind cea dintre Asp63-VEGF și Arg224-VEGFR1. În plus, cele 3 reziduuri acide conservate Asp63, Glu64 și Glu67 sunt prezente și în structura VEGF-E (tulpina NZ2), care nu cuplează VEGFR1 (5).

Semnalizarea VEGF se face via VEGFR2 și VEGFR3. Deși atât forma lungă cât și cea matură ale VEGF-C cuplează VEGFR3, numai VEGF-C matură poate cupla și activa VEGFR2. VEGF-C are aceeași specificitate de receptor ca și omologul său apropiat VEGF-D, care este, de asemenea, procesat într-o manieră similară. Afinitatea de cuplare a receptorului VEGF-C matur recombinat, la VEGFR3 este de aproximativ 3 ori mai mare decât pentru VEGFR2. Receptorii sunt rapid fosforilați după cuplarea la VEGF-C, inducându-se semnalizarea în aval; de exemplu, activarea VEGFR3 conduce la fosforilarea Shc și activarea kinazelor reglate de semnalizarea extracelulară ERK1 și ERK2 (26).

Când primul din cele două reziduuri Cys156 și Cys165 care, la alți membri ai familiei VEGF sunt implicați în formarea punților disulfidice, a fost înlocuit de un reziduu serinic din forma matură VEGF-C, forma mutantă este incapabilă să cupleze sau să activeze VEGFR2. Acest mutant Cys156- VEGFC este incapabil să inducă permeabilitate vasculară, demonstrând că VEGFR3 nu este implicat în acest proces (27).

FACTORII ANGIOGENICI ANGIOPOIETINICI

Chiar dacă rolul VEGF este indispensabil în angiogeneză, acesta poate lucra și în concordanță cu alți factori. Angiopoietinele sunt partenerii cei mai importanți ai VEGF. Angiopoietinele au fost descoperite ca liganzi pentru receptorii Tie, o familie de receptori tirozinkinazici care sunt selectiv exprimați în endoteliul vascular și în linia hematopoietică, ca și receptorii VEGF. Există 4 membri importanți ai familiei angiopoietinice: Ang1, Ang2, Ang3 și Ang4, deși Ang3 și Ang4 pot fi reprezentanți omologi ai aceluiași locus genic murin/uman.

Ang1 stabilizează pereții vasculari

Cele mai importante date asupra Ang1 și receptorului său Tie-2, au rezultat din analiza șoarecilor knockout (28). Spre deosebire de modelele murine embrionare knockout VEGF sau VEGFR-2, embrionii fără Ang1 și Tie-2 dezvoltă o vascularizație normală primară. Totuși, această vascularizație nu suferă o remodelare ulterioară normală. Efectele importante apar la nivelul inimii, cu probleme în joncțiunile dintre endocard și miocard, dar și în formarea și remodelarea vaselor mici și mari. În aceste zone vascularizate, ca și în inimă, analizele ultrastructurale au arătat că celulele endoteliale nu se asociază în mod corespunzător cu celulele de susținere, care sunt celulele ce furnizează Ang1. Datele au condus la ideea că Ang1 nu furnizează un semnal instructiv de direcționare a etapelor de remodelare vasculară, ci mai degrabă are un rol permisiv prin optimizarea manierei de integrare între celulele endoteliale și celulele de susținere (29).

Ang-2 – agonist și antagonist?

Ang-2 a fost clonat pe baza omologiei cu Ang-1 și prezintă o afinitate similară pentru Tie-2, activitatea depinzând de celulele studiate. Hiperexpresia transgenică a Ang-2 în endoteliul embrionar a condus la moartea embrionului din cauza defectelor asemănătoare cu

cele observate la șoarecii knockout Ang-1 și Tie-2, demonstrându-se că Ang-2 poate acționa ca un antagonist Tie-2 in vivo (30). Această caracteristică a devenit și mai evidentă odată cu studierea profilelor de expresie Ang-2. La animalele adulte, Ang-2 a fost indus în endoteliul vaselor ce suferă remodelarea, cum ar fi înmugurirea și regresia vaselor în ovare. Datele au arătat ca Ang-2 poate fi un semnal de destabilizare important, implicat în inițierea remodelării angiogenice. Concluzia este bazată și pe dovezile precedente cum că angajarea Ang-1 la receptorul Tie-2 a fost constitutivă în vascularizația adultului și necesară pentru păstrarea stării sale de inactivitate. S-a propus ideea ca inducția autocrină Ang-2 în celulele endoteliale blochează influența stabilizatoare constitutivă a Ang-1 elaborat paracrini (31). Astfel, celulele endoteliale pot căpăta o stare mult mai modelabilă și destabilizantă. Vasele pot urma două căi: în primul rând ele pot suferi regresie în absența factorilor de creștere, așa cum se întâmplă cu vasele primitive în timpul dezvoltării și în al doilea rând, aceste vase ar putea fi mult mai receptive la modificările angiogenice induse de factorii angiogenici disponibili (VEGF). Starea recapitulează o situație embrionară timpurie în care VEGF acționează anterior implicării Ang-1.

Se pare că Ang-1 întărește joncțiunile interendoteliale din vasele dermale prin recrutarea celulelor perivascularare. Mecanismele ce stau la baza acestui proces nu pot fi generalizate; de exemplu, creșterea permeabilității determinată de VEGF este dependentă de doza acestuia, dar și de micromediul din organul gazdă. Expresia VEGF în adenocarcinomul de colon este mai scăzută când tumora se dezvoltă în ficat, decât atunci când este crescută în regiunea subcutană. De aceea, există posibilitatea ca permeabilitatea vasculară din tumora din ficat să fie mai mică decât cea din tumora subcutană. Paradoxal, rezultatele sunt inverse: permeabilitatea față de albumină este mai mare în tumora subcutană. Indiferent de mecanismele implicate, prezența Ang-1 poate explica de ce nu există o corelație între permeabilitatea vasculară și angiogeneza pentru tumorile crescute în același loc sau în locuri diferite. Tumorile care au o permeabilitate scăzută pot avea o expresie considerabilă a Ang-1 și nu prezintă PLGF. Invers, acelea cu permeabilitate crescută nu au Ang-1 și hiperexprimă un antagonist pentru Ang-1, Ang-2 (32).

Șoarecii transgenici ce hiperexprimă Ang-1 și VEGF în derm, sub controlul promotorului keratinic (K-14), prezintă o arie cu vase numeroase cu morfologie diferită. Vasele dermale ale șoarecilor K-14-VEGF sunt mai lungi, în timp ce șoarecii K-14-Ang-1 au vase cu diametru crescut. În plus, vasele dermale ale șoarecilor K-14-VEGF sunt hiperpermeabile și prezintă adeziune leucocitară crescută.

Vasele dermale ale șoarecilor K-14-Ang-1 nu sunt hiperpermeabile. Mai mult, hiperexpresia Ang-1 face vasele dermale mai rezistente. Hiperpermeabilitatea indusă de VEGF este, în general, o precondiție pentru angiogeneza înmugurativă. Deoarece vasele K-14-Ang-1 nu sunt hiperpermeabile, este probabil ca alte mecanisme să cauzeze creșterea diametrului lor la șoarecii care exprimă Ang-1. Un posibil mecanism este angiogeneza intracapilară, un model de angiogeneza inițiat de dilatarea vaselor. Este, de asemenea, posibil ca la șoarecii K-14-Ang-1, vasele nou formate să fie hiperpermeabile inițial și apoi să devină nepermeabile pe măsură ce își definesc structura. Astfel, expresia timpurie a K-14-Ang-1 și creșterea diametrului vaselor pot fi un defect de dezvoltare (33).

Deși Ang-1 activează receptorul Tie-2 nu induce in vitro proliferarea celulelor endoteliale. De aceea, s-a sugerat că Ang-1, spre deosebire de VEGF care acționează timpuriu în cursul formării vaselor de sânge, joacă un rol important în remodelarea finală a vaselor.

Ang-2 ca și Ang-1 se cuplează la receptorul Tie-2, dar nu transmite un semnal în aval. De aceea, receptorul este ocupat și nefuncțional pentru procesul de activare Ang-1. Astfel, Ang-1 împiedică maturarea vaselor și stabilizarea acestora realizată de Ang-1.

Ang-2 este exprimat majoritar în celulele endoteliale vasculare la nivelul punctelor de regresie și regenerare a vaselor de sânge. De asemenea, s-a arătat că nivelul Ang-2 din celulele endoteliale este crescut de VEGF, FGFB și starea hipoxică, în timp ce Ang-1 scade expresia Ang-2.

Observația a condus la ideea că efectul angiogenic al acestor factori, cel puțin în parte este atins prin reglarea unei bucle autocrine de reglare a nivelului Ang-2 în celulele endoteliale. Se desprinde concluzia că, tumorile există inițial ca o masă celulară tumorală avasculară care apoi polarizează un mecanism angiogenic.

Receptorii angiopoietinici

Au fost identificați 2 receptori pentru angiopoietinele 1 și 2, Tie1 și Tie2. Șoarecii knockout Tie2 mor în E9,5- E10,5. Fenotipul șoarecilor fără Tie2 este diferit de șoarecii knockout VEGFR. Celulele endoteliale sunt prezente într-un număr normal și se asamblează în tuburi, dar vasele sunt imature cu modele de ramificare și organizare corespunzătoare vaselor mari și mici (24). De asemenea, vasele care se formează nu prezintă încapsulare corespunzătoare. În endocard și miocard nu există o asociere directă și complexitate structurală. Mai degrabă, celulele endoteliale aberante rotunde sunt puțin atașate de membrana bazală înconjurătoare, iar în multe zone sunt deconectate de celulele miocardice. Defecte similare în arhitectura vaselor sunt prezente și în alte țesuturi (34).

Tirozinkinazele Tie2 controlează capacitatea celulelor endoteliale de a recruta celulele stromale necesare încapsulării tuburilor endoteliale, stabilizându-se structura vaselor. Al doilea receptor tirozinkinazic, Tie-1, este similar ca structură cu Tie-2 și controlează un alt aspect al integrității vasculare. Șoarecii knockout Tie-1 mor în momente diferite, începând din E14,5 până la naștere, de edem și hemoragie. Se arată că Tie-1 se implică în schimbul de fluide de la nivelul vaselor și în rezistența la stresul hemodinamic (24).

Conceptul că Tie-2 este cuplat la un circuit de transmitere a semnalelor care determină maturarea vasculară și întreținerea integrității vasculare a fost oferit de analiza angiopoietinelor care cuplează la Tie-2 (Ang-1 și Ang-2). Ambii se cuplează la receptorul Tie-2, cuplarea lor la Tie-1 fiind inexistentă. Deși efectele lor asupra Tie-2 sunt diferite, așa cum sunt modelele de expresie la șoareci, Ang-1 induce autofosforilarea Tie-2 în celulele endoteliale în cultură. Ang-2, care se cuplează cu afinitate identică, nu induce fosforilarea receptorului. Mai mult, el poate inhiba competitiv activitatea kinazică Ang-1-indusă a receptorului Tie-2. Astfel, Ang-2 prezintă un semnal negativ pentru Tie-2. Autofosforilarea indusă de Ang-1 a Tie-2 nu afectează celulele endoteliale în cultură, fiind concordantă cu fenotipul knockout Tie-2, care a indicat că Tie-2 nu este necesar pentru proliferarea celulelor endoteliale în timpul vasculogenezei. Astfel, se susține ideea că Ang-1 semnalizează Tie-2 pentru a recruta celulele de susținere, iar Ang-2 inhibă această capacitate. Șoarecii knockout Ang-1 mor de defecte vasculare asemănătoare cu șoarecii knockout Tie-2. Șoarecii transgenici care hiperexprimă ligandul negativ Ang-2 în celule, de asemenea, mor în timpul embriogenezei (24).

Hiperexpresia Ang-2 fenocopiază pierderea expresiei Ang-1. Datele suportă ideea că Ang-1 este ligandul fiziologic major pentru funcțiile Tie-2, îndeplinind funcții de recrutare a celulelor periendoteliale, în timp ce Ang-2 blochează această funcție.

Dece există atunci Ang-2? Fără dubii că fenotipul knockout Ang-2 va furniza datele necesare. Datele arată că Ang-2 influențează remodelarea vasculară și în particular angiogeneza. Ang-1 este exprimat în embrion și în animalul adult. Totuși, modelele de

expresie la adult arată că Ang-2 se exprimă selectiv: în ovar, uter și placentă. Expresia Ang-2 în aceste țesuturi a fost comparată cu cea a Ang-1 și VEGF.

În foliculii timpurii, vasculatura este inactivă, Ang-1 este exprimat, iar VEGF și Ang-2 sunt puțin exprimate sau deloc. În foliculii preovulatorii și în corpul galben postovulatoriu, unde angiogeneza este în desfășurare, VEGF și Ang-2 sunt hiperreglate, în timp ce expresia Ang-1 persistă. Expresia Ang-2 este focală și punctuală. În cele din urmă, în foliculii non-reproductivi care prezintă regresie vasculară, Ang-2 este la nivele înalte, uniforme, în absența expresiei VEGF. Se sugerează un model de control al angiogenezei. Circuitul Ang-1/Tie-2 mediază maturarea vasculară și menținerea structurii acestor vase via interacțiilor celulă-celulă și celulă-matrix. În consecință, Ang-1 poate menține celulele endoteliale într-o stare de inactivare. Expresia focală a Ang-2 blochează calea Ang-1/Tie-2 și conduce la slăbirea vascularizației, expunând celulele endoteliale la semnale activatoare angiogenice VEGF. Prezența VEGF determină migrarea și proliferarea celulelor endoteliale, producându-se noi capilare. Se poate aprecia că prezența Ang-1 poate schimba echilibrul local Ang-1/Ang-2 în favoarea Ang-1. Astfel, există o colaborare între VEGF, Ang-1 și Ang-2. Regresia vasculară este asociată cu expresia înaltă a Ang-2 în absența unui semnal de supraviețuire VEGF, astfel mascând semnalul Ang-1 și producând detașarea de matrix a celulelor.

VEGF și Ang-2 în angiogeneza tumorală

Este clar că multe tumori se dezvoltă prin angiogeneză coordonată, în special tumorile epiteliale mamare care sunt separate inițial de vasele înconjurătoare de o membrană bazală. Aceasta trebuie distrusă înainte ca celulele tumorale să aibă acces la sistemul vascular (inițial, apar mase mici avasculare care numai ulterior induc activitatea angiogenică).

Inducerea Ang-2 și VEGF se corelează cu procesele descrise. Astfel că, imediat după cooptarea tumoral indusă, vasele gazdă exprimă nivele autocrine înalte de Ang-2. Ang-2 este unul din markerii timpurii, dar și un marker general ce marchează cooptarea vaselor, și nu a celulelor tumorale. Sub influența Ang-2 autocrin, vasele cooptate încep să se dezintegreze imediat după expresia Ang-2, printr-un proces apoptotic. Pe măsură ce vasele dispar, tumora devine secundar avasculară și hipoxică, inducând-se puternic expresia VEGF tumoral derivat. Nivelele crescute de VEGF se corelează cu încetarea regresiei vaselor cooptate. Efectul amintit este suplinit de apariția angiogenezei înmugurative de la nivelul vaselor cooptate.

Expresia Ang-2 este corelată cu destabilizarea vaselor, care, în aparență, conduce la regresia vaselor lipsite de VEGF tumoral indus, dar care ulterior dezvoltă angiogeneza VEGF indusă. Posibilitatea ca Tie-2 de pe suprafața vaselor tumorale să fie blocați continuu de Ang-2, explică fenotipul imatur al vaselor tumorale.

Structura și funcția vaselor tumorale

Vasele tumorale sunt anormale structural și funcțional. Spre deosebire de vasele normale, ele sunt înalt dezorganizate, subțiri și dilatate, cu diametrul inegal, puternic ramificate și bogate numeric. Acestea se datorează dezechilibrului dintre reglatorii angiogenici, cum ar fi VEGF și angiopoietinele. În consecință, fluxul sanguin tumoral este haotic, variabil și conduce la apariția de regiuni hipoxice și acide în tumori. Condițiile în cauză diminuează eficacitatea terapeutică, modulează producerea de inhibitori și stimulatori angiogenici și selectează celulele puternic malignizante și metastazante. În plus, starea

hipoxică poate selecta expansiunea clonală a celulelor care și-au pierdut capacitatea de a răspunde apoptotic la această stare (35). Deși celulele cu fibre alpha-actină pozitive din musculatura netedă, înconjoară vasele tumorale, ele nu funcționează ca celule contractile normale, făcând din acțiunea terapeutică o problemă. În ce privește structura lor, vasele tumorale sunt, de asemenea, anormale: pereții lor prezintă numeroase „deschideri”, joncțiuni interendoteliale largi și membrane bazale discontinue sau absente. Aceste defecte fac vasele tumorale hiperpermeabile. Totuși, există o heterogenitate mare în ce privește capacitatea de răspuns la tratament. Permeabilitatea vasculară și angiogeneza depind de tipul de tumoră și de organul gazdă, deoarece fiecare organ are diferite celule stromale care produc o clasă heterogenă de molecule pro- și antiangiogenice. Permeabilitatea tumorală scăzută determină hiperexpresia Ang1 și/sau hiperexpresia VEGF/PLGF. Astfel, vasele cu permeabilitate înaltă nu au Ang1 sau hiperexprimă Ang-2.

Heterogenitatea este caracterizată și la nivelul markerilor de suprafață celulară. Citokinele și moleculele angiogenice secretate de celulele imune și canceroase modulează expresia moleculelor de adeziune celulară și a altor markeri de suprafață celulară de pe endoteliul din tumori. De exemplu, VEGF și TNFalpha hiperreglează, în timp ce FGFb și TGFbeta1 hiporeglează moleculele de adeziune celulară (36).

CĂILE DE SEMNALIZARE ÎN ANGIOGENEZĂ

VEGF induce creșterea puternică a tirozinfosforilării proteinelor asociate adeziunilor focale, p125FAK și paxillin (36). Efectul VEGF este rapid și dependent de concentrația acestuia. Dependența de concentrație a tirozinfosforilării p125FAK/paxillin este similară cu cea observată în cazul efectelor VEGF asupra mitogenezei celulelor endoteliale.

Tirozinfosforilarea p125FAK/paxillin este dependentă de timpul administrării VEGF și de concentrația acestuia. Este posibil ca declinul tirozinfosforilării să fie datorat distrucției citoscheletului actinic la concentrații înalte de VEGF. Este notabil faptul că s-a raportat o activitate de dezorganizare a fibrelor actinice la liniile celulare Balb/c3T3 (37).

Situl major de autofosforilare a p125FAK este Tyr397, care este necesar pentru asocierea p125FAK cu domeniile de omologie Src2 ale kinazelor Src și pentru asocierea subunității p85alpha a PI3K. Studiile au arătat că VEGF nu stimulează PI3K și p85alpha și că, angajarea integrinelor conduce la activarea MAPK. Faptul că un inhibitor specific al căii ce implică MAPK nu are efect asupra tirozinfosforilării p125FAK VEGF indusă arată că reglarea căii p125FAK poate fi disociată de activarea PI3K și MAPK.

Au fost identificate o serie de proteine de semnalizare celulară care mediază funcțiile VEGF: NCK, fosfolipazaC, MAPK, kinaza PI3K, kinaza de adeziune focala (FAK) și paxillin (o proteină de 68 KDa localizată în adeziunile focale).

S-a desprins o cale complexă de semnalizare intracelulară: cuplarea VEGF la KDR determină autofosforilarea receptorului și recrutarea NCK la suprafața celulară. NCK este o proteină adaptoare ce conține un domeniu de omologie Src2 (SH2) și două domenii de omologie Src3 (SH3). În celulele inactive mitogenic, NCK interacționează via domeniului SH3 secund cu kinaza activată de p21 (PAK). Recrutarea NCK indusă de VEGF la suprafața celulară permite și asocierea PAK. Kinaza PAK este activată, ulterior se activează și kinaza de adeziune focală, evenimente urmate de adeziunea complexelor focale.

Există câteva aspecte ale semnalizării care trebuiesc clarificate. Nu este clar dacă NCK se cuplează direct la KDR activat, sau dacă interacționează printr-o proteină intermediară.

Multe oncogene induc factorul de creștere endotelial. PI3K este o cale comună de semnalizare pentru oncogene și genele supresor tumorale și este implicată în reglarea VEGF. Examinarea efectului LY294002, un inhibitor selectiv PI3K, asupra expresiei factorilor HIF2alpha și HIF1alpha (factori hipoxic inductibili) și răspunsul lui VEGF la hipoxie a arătat că LY294002 a inhibat HIF1alpha și fosforilarea în stare de hipoxie. Totuși, expresia HIF2alpha nu a fost afectată. Expresia bazală și hipoxiinductibilă a VEGF a fost redusă cu 50%.

Hiperexpresia V12-ras a cauzat o creștere a expresiei HIF1/2 alpha. Efectul este blocat de inhibitorul PI3K, demonstrându-se existența unui mecanism sinergic între ras și inducția genelor mediată hipoxic.

Descreșterea expresiei nu a fost dependentă de interacțiile cu gena VHL, deoarece liniile celulare de carcinom renal cu mutații VHL (von Hippel- Lindau) și expresie constitutivă înaltă, au prezentat de asemenea, hiperreglarea HIF1alpha după tratament cu LY294002 (38).

In vitro, VEGF a stimulat celulele endoteliale să crească într-o manieră dependentă de NO și a promovat formarea de rețele vasculare dependente de NO într-un gel de collagen. În schimb, inhibarea producției NO de către inhibitori eNOS (nitric oxid sintetaza endotelială) a inhibat semnificativ activitatea mitogenică indusă de VEGF. Șoarecii transgenici fără genă eNOS prezintă vascularizare și angiogeneză dependente de endoteliu, foarte mult scăzute. De asemenea, se observă și scăderea hipertensiunii arteriale. Stresul hemodinamic, hipoxia și citokinele sunt stimulii asociați cu creșterea expresiei NOS. Astfel, s-a arătat că: (1) expresia prelungită a VEGF a indus expresia crescută a NOS; (2) inhibiția donorului NO a inhibat expresia NOS indusă de VEGF; (3) activarea receptorului KDR mediază hiperreglarea eNOS indusă de VEGF; (4) activarea căii PKC, în mod specific, PKCalpha, gamma și epsilon, sunt implicate în creșterea nivelelor NOS. Astfel, inhibarea activității PLCgamma, o moleculă de semnalizare din aval implicată în activarea PKC și PI3K, a blocat complet expresia eNOS indusă de VEGF. Totuși, inhibarea PI3K cu wortmannin nu a afectat semnificativ hiperreglarea eNOS, sugerând că PKC este calea dominantă de semnalizare (39).

Căile de semnalizare au fost relevate și de studiile pe diferite linii celulare. Expresia Flt1 este prezentă în liniile celulare T-47D, MCF7, MDA-MB231 și MDA-MB-435, excepție făcând linia Sk-Br-3. Neuropilinul este exprimat în liniile MCF7 și MDA-MB-231. VEGF nu stimulează tirozinfosforilarea și activarea ERK1 și ERK2. În schimb, VEGF acționează într-o manieră autocrină și stimulează semnalizarea celulară. De asemenea, stimulează în linia celulară T-47D, căile ERK1,2 și PI3K. Se poate spune că VEGF stimulează semnalizarea în celulele T-47D prin căile PI3K/Akt și ERK1,2. Substratele pentru Akt sunt GSK-3, p70S6kinaza și FKHL1. Stimularea GSK-3 este detectabilă numai după tratamentul cu heregulin, în timp ce tratamentul cu VEGF nu stimulează calea respectivă. Nu există modificări în fosforilarea Thr421 și Ser424 din p70S6k. Singura modificare apare în FKHL1, un membru al familiei Forkhead, care este implicat în transcripția proteinelor asociate apoptozei. Astfel, FKHL1 este substratul Akt după stimularea celei VEGF (40).

FGF are o cale diferită de semnalizarea VEGF, iar eNOS/NO nu se cunoaște ca făcând parte din calea de semnalizare în aval a receptorului FGF.

INHIBITORII ANGIOGENICI ȘI ABORDĂRILE TERAPEUTICE

TSP1 este un inhibitor natural al angiogenezei care limitează densitatea vasculară chiar și în țesuturile normale. S-a arătat că inhibarea angiogenezei in vitro și in vivo, dar și inducerea apoptozei, necesită activarea secvențială a CD36, p59tyr, proteazei asemănătoare

caspazei3 și proteinkinazei activate mitogenic p38. S-a detectat apoptoza crescută la marginile tumorii tratate cu TSP1. Inhibitorii angiogenici (angiostatin, endostatin, TSP1) pot induce apoptoza în celulele derivate din endoteliul vascular. Astfel, ei pot inhiba angiogeneza prin distrugerea celulelor endoteliale microvasculare care formează vase noi de sânge. Atât in vitro cât și in vivo, TSP1 induce semnalele stimulative angiogenice.

Efectul inhibitor angiogenic in vitro este măsurat prin receptorul transmembranar CD36, care este esențial pentru inhibarea neovascularizării in vivo, indusă de TSP1. Astfel, au fost identificate mai multe proteine implicate: kinaza p59tyr din familia SRC, protează asemănătoare caspazei3 și MAPKp38. Cascada de semnalizare care mediază efectul antiangiogenic al TSP1 in vivo este responsabilă și de inducerea apoptozei (41).

Primul pas în inhibarea angiogenezei in vitro este cuplarea TSP1 la receptorul transmembranar CD36. CD36 semnalizează prin p59tyr, iar JNK și p38MAPK sunt activate adesea de cascadele de semnalizare apoptotice. În celulele endoteliale p38MAPK a fost activată de TSP1, activarea fiind mediată de CD36. De asemenea, inducerea p38MAPK necesită prezența p59tyr.

VEGF a fost asociat cu stimularea angiogenezei și recurența timpurie în cancerul mamar primar. În prezent sunt evaluate mai multe medicamente, unul dintre acestea este SU5416, care acționează ca un inhibitor al activității tirozinkinazice a receptorului VEGF. S-au raportat rezultate încurajatoare la pacienții cu cancer colorectal tratați cu SU5416 în combinație cu 5-fluorouracil/leucovorin. 37% din pacienți au răspuns parțial sau complet la tratament, tumorile acestora reducându-se cu mai mult de 50% față de procentul inițial. 44% din pacienți au prezentat tumori stabile și numai 7% nu au răspuns la tratament(42).

Rezultate similare au fost relevate de studiile care au utilizat Ac anti VEGF în combinație cu 5 fluorouracil/leucovorin în cancerul colorectal metastazic.

Un alt inhibitor angiogenic este antitrombina care circulă într-o formă în care bucla C-terminală reactivă nu este deplin expusă și nu poate lega proteaze țintă. Heparina induce expunerea buclei reactive și crește afinitatea trombinică de 10 ori. Antitrombina inhiba proliferarea celulelor endoteliale indusă de VEGF, dar și activitatea angiogenică la șoareci.

ZD4190 este un inhibitor puternic al activității RTKaVEGF (în special KDR). Inelul quinazolic al ZD4190 interacționează cu situl de cuplare a adeninei din kinază, în timp ce inelul anilino este ascuns în buzunarul hidrofob adiacent. S-a demonstrat expansiunea zonei condrocitice hipertrofiată și inhibiția angiogenezei, după tratamentul cu agenți de sechestrare a VEGF. Administrarea orală zilnică a ZD4190 la șobolani, inhibă activitatea tumorală. Administrarea s-a făcut (100mg/kg/zi de ZD4190) și la șoareci cu tumori prostatice xenografice PC3, timp de 10 săptămâni (43).

KDR are afinitate mai scăzută de legare la VEGF decât Flt1, dar este mult mai exprimat pe celulele endoteliale în cultură și are capacitate mai mare de semnalizare. Un Ac antiKDR perturbă angiogeneza și invazia tumorală în modele maligne keratinocitice, iar activarea KDR crește vascularizația și proliferarea tumorală și induce angiogeneza.

Produsul genic NZ7VEGF, derivat dintr-un virus Orf (VEGF_E) ce cuplează numai la KDR, de asemenea, induce mitoză endotelială.

Activitatea antitumorală a ZD4190 poate fi atribuită efectelor asupra permeabilității vasculare.

TGF α -EGFR este o cale autocrină implicată în dezvoltarea și progresia cancerelor epiteliale umane, prin producerea de factori angiogenici (VEGF și FGFb). ZD1839 este un inhibitor selectiv al funcției tirozinkinazice a EGFR. Evaluarea activităților antiangiogenice și antitumorale a ZD1839 în liniile de cancer de colon (GEO, SW480 și CaCo2), mamare (ZR-75-1 și MCF7), ovariene (OVCAR-3) și gastrice (KATOIII și N87), care coexprimă

TGF α și FGFR, a arătat reducerea semnificativă a nivelelor de VEGF, FGFB, TGF α in vitro. De asemenea, s-a redus și angiogeneza, proces puternic inhibat de combinarea ZD1839 cu paclitaxel în tumorile xenografice GEO. Astfel, 6 din 16 șoareci cu tumori palpabile GEO nu mai arată prezența tumorilor, la sfârșitul tratamentului cu ZD1839 și paclitaxel. Rezultatele arată că efectul antitumoral al ZD1839 este acompaniat de inhibarea producției de factor autocrin și paracrin, care susțin și facilitează angiogeneza locală (44). De asemenea, blocarea căii EGFR cu Ac specifici (Ac monoclonali C225) are un efect antitumoral, inhibându-se secreția unor factori paracrini de creștere: TGF α , VEGF, FGFB și IL8.

1. Olofsson B., Jeltsch M., Eriksson Ulf, Alitalo K., *Current Biology of VEGF-B and VEGF-C*, 1999, Curr. Opin. in Biotechnology, 10: 528-535.
2. Gabrilovich D. I., Chen H. L., *Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells*, Nat. Med., 1996, 2:1096-1103.
3. Soker S., Takashima S., *Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor*, Cell, 1998, 92:735-745.
4. Oloffson B., Pajusola K., *Genomic organization of the mouse and human genes for vascular endothelial growth factor B (VEGF B) and characterization of a second splice isoforms*, J. Biol. Chem., 1996, 271:19310-19317.
5. Oloffson B., Korpelainen E., *Vascular endothelial growth factor B(VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1998, 95:11709-11714.
6. Chilov D., Kukuk E., *Genomic Organization Of Human and Mouse Gene For Endothelial Growth Factor*, J. Biol. Chem., 1997, 272:25176-25183.
7. Paavonen K., Horelli-Kuitunen, 1996, *Novel human vascular endothelial growth factor genes VEGF-B and VEGF-C localize to chromosomes 11q13 and 4q34, respectively*, Circulation, 93: 1079-1082.
8. Achen M. G., Jeltsch M., *Vascular endothelial growth factor D is a ligand for the tyrosine kinase VEGF receptor 2 and VEGF receptor 3*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1998, 95:548-553.
9. Orlandi M., Marconcini L., *Identification of a c-fos-induced gene that is related to platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1996, 93:11675-11680.
10. Carmeliet P., *Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF gene allele*, Nature, 1996, 380, 435-439.
11. Gerber H. et al., *VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation*, Nature Med. 5, 623-628, 1999.
12. Aliello L. P. et al., *Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy of prematurity*, Arch. Ophthalmolog., 114, 1219-1228, 1996.
13. Alon T. et al., *Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implication for retinopathy of prematurity*, Nature Med. 1, 1024-1028, 1995.
14. Rocchiginni M., Lestingi M., *Human FIGF: cloning, gene structure, and mapping to chromosome Xp22.1 between the PIGA and GRPR genes*, Genomics 1998, 47:207-216.
15. Ristimaki A., Narko K., *Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial factor*, C. J. Biol. Chem., 1998, 273:8413-8418.
16. Olofsson B., Pajusola K., *Vascular endothelial factor B, a novel growth factor for endothelial cells*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1996, 93:2576-2581.
17. Ferreira N., Carver-Moore K., *Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene*, Nature, 1996, 380; 439-442.
18. Fong G-H., Rossant J., *Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of the vascular endothelium*, Nature, 1995, 376:66-70.

19. **Jeltsch M., Kaipainen A.**, *Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice*, Science 1997, 276: 1423-1425.
20. **Oh S., Jeltsch M. M.**, *VEGF and VEGF-C specific induction of angiogenesis and limphoangiogenesis in the differentiated avian chorioallantoic membrane*, Dev. Biol. 1997, 188;96-109.
21. **Migdal M. et al.**, *Neuropilin-1 is a placenta growth factor-2 receptor*, J. Biol. Chem., 273, 22272-22278, 1998.
22. **Olofsson B., Jeltsch M.**, *Current Biology of VEGF-B and VEGF-C*. Current Opinion in Biotechnology, 1999, 10 :528-536.
23. **PR 39**, a peptide regulator of angiogenesis, Nat. Med., 6, 49-55, 2000.
24. **Douglas Hanahan**, *Signaling vascular morphogenesis and maintenance*, Science, 277, 48-49, 1997.
25. **Keyt B. A., Nguyen H. V.**, *Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors*, J. Biol. Chem. 1996, 271: 5638-5646.
26. **Taipale J., Makinen T.**, *Vascular endothelial growth factor receptor-3*, Curr. Topics Microbiol. Immunol., 1999, 237: 85-95.
27. **Joukov V., Kumar V.**, *A recombinant mutant vascular endothelial growth factor -C that has lost vascular endothelial growth factor receptor-2 binding, activation, and vascular permeability activities*, J. Biol. Chem., 1998, 273: 6599-6602.
28. **Sato T. N. et al.**, *Distinct roles of the receptor tyrosine kinase Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation*, Nature, 376, 70-74, 1995.
29. **Suri C., et al.**, *Requisite role of Angiopoietin-1, a ligand for the Tie-2 receptor, during embryonic angiogenesis*, Cell., 87, 1171-1180, 1996.
30. **Holash J., Wigand S.**, *New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF*, Oncogene, 18, 5326-5362, 1999.
31. **Yancopoulos D. G., Davis S.**, *Vascular-specific growth factor and blood vessel formation*, Nature, 407, 242-248, 2000.
32. **Carmeliet P. et al.**, *Leaky vessels! Call Ang-1!*, Nature Medicine 6, 132, 2000.
33. **Korhonen J. et al.** *Enhanced expression of the tie receptor tyrosine kinase in endothelial cells during neovascularization*, Blood 80, 2548-2555, 1992.
34. **Migdal M., Huppertz B.**, *Neuropilin-1 is a placenta growth factor-2 receptor*, J. Biol. Chem., 1998, 273; 22272-22278.
35. **Carmeliet P., Jain R. K.**, 2000, *Angiogenesis in cancer and other diseases*, Nature, vol. 407, 249-255.
36. **Husna Abedi, Ian Zachary**, *Vascular Endothelial Growth Factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells*, 1997, The Journal of Biological Chemistry, vol. 272, no. 24, p. 15442-15451.
37. **Enomoto T., Okamoto T.**, 1994, Biochem. Biophys. Res. Commun, 202, 1716-1723.
38. **Blancher C., Moore J. W., Robertson N.**, 2001, *Effects of ras and von Hippel-Lindau (VHL) gene mutations on hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha, HIF-2alpha, and vascular endothelial growth factor expression and their regulation by the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling pathway*, Cancer Res., 61 (19), 7347-7355.
39. **Ben-Quan S., David Y.**, *Vascular endothelial factor governs endothelial nitric-oxide synthase expression via a KDR/Flk-1 receptor and a protein kinase C signaling pathway*, J. Biol. Chem., 274, 33057-33063, 1999
40. **Daniel J., Miralem T.**, *Role of vascular endothelial growth factor in the stimulation of cellular invasion and signaling of breast cancer cells*, Cell Growth and Differentiation, 12, 129-135, 2001.
41. **Guidi A. J. et al.**, *Thrombospondin-1*, Nature Medicine, 6, 41-48, 2000.
42. **O'Reilly M. S., Holmgren M. S.**, 1994, *Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma*, Cell, 79, 315-328.
43. **Stephen R., Oglivie D.**, *ZD4190: An orally active inhibitor of vascular endothelial growth factor signaling with broad-spectrum antitumor efficacy*, Cancer Research 60, 970-975, 2000.
44. **Fortunato C., Rosa C.**, 2001, *Inhibition of growth factor production and angiogenesis in human cancer cells by ZD1839 (Iressa), a selective epidermal growth factor tyrosine kinase inhibitor*, Clinical cancer research, vol. 7, 1459-1465.

PROTEINA RETINOBLASTOMULUI (pRb)

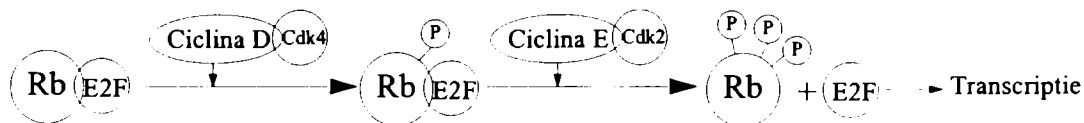
Gena retinoblastomului și produsul ei

Gena RB a fost localizată pe cromosomul 13 și clonată în 1986. Această genă, care se întinde peste aproximativ 200 perechi kilobaze de DNA în genom, conține 27 de exoni, care se combină pentru a forma un mRNA de 4,6 kilobaze. Așa cum a prezis ipoteza lui Knudson, ambele alele ale acestei gene sunt inactivate de mutație în formele sporadice și ereditare ale retinoblastomului. Tipic, aceste mutații sunt mutații punctiforme sau deleții mici sau inserții în genă, care rezultă în cadrul de citire și terminare prematură a produsului proteic. Cele mai multe mutații sunt în regiunile de codificare de 3 Kb și implică cel mai mult modificări cromosomale mari. Unul din trei cazuri sunt mutații punctiforme. Mutațiile se produc în situsurile acceptor și donor și dau naștere la terminarea prematură a transcrierii. A fost notată și o mutație în promotorul genei RB. Delețiile totale sau rearanjamentele genei RB sunt mult mai rare.

În ciuda faptului că indivizii purtători ai mutațiilor germinale ale genei RB sunt tipic susceptibili doar la retinoblastoame și osteosarcoame, mutațiile somatice în gena RB s-au găsit într-un spectru larg de tipuri tumorale umane. În particular, mutațiile în această genă au fost detectate în 50 până la 85% în carcinoamele pulmonare ale celulelor mici și în 10 până la 30% în carcinoamele de sân, de vezică urinară și prostată. În contrast, mutațiile RB în carcinomul de colon sunt extrem de rare. Incidența tumorilor, cum ar fi carcinomul pulmonar al celulelor mici și carcinomul de sân la indivizi cu mutații germinale în gena RB, sunt aproape inexistente. Există o diferență semnificativă în definirea tipurilor tumorale care apar datorită unei mutații germinale într-o genă supresoare tumorală și a celor datorită unei mutații somatice în aceeași genă. O explicație posibilă pentru aceasta este aceea că gena RB este o limitatoare a ratei de creștere în câteva tipuri celulare sau tumori, mai mult decât în altele și că mutația acestei gene este mai critică atunci când reprezintă un eveniment timpuriu, de inițiere a retinoblastomului, decât când reprezintă un eveniment târziu în alte tipuri tumorale.

Produsul proteic al genei RB, sau pRb (p105), este o fosfoproteină nucleară de aproximativ 110KD, prezentă în toate tipurile celulare. Această proteină servește ca un factor negativ de reglare în proliferarea celulară. Când funcționează normal, celulele exprimă pRb într-o formă hipofosforilată sau activă în faza G₀/G₁. Devine inactivă prin fosforilarea câtorva reziduuri serină/treonină de către o CDK (kinaza dependența de ciclină) în timpul progresiei prin G₁ și este reactivată de o fosfatază la sfârșitul mitozei. Reintroducerea genei RB sau microinjectarea proteinei Rb purificate, determină reținerea celulelor în faza G₁ a ciclului celular. Celulele în fazele S și M ale ciclului celular progresează la G₁ înainte de inhibarea creșterii de către Rb. Funcția de inhibare a creșterii, a acestei proteine, operează într-o fereastră bine definită în G₁. Proteina Rb reprezintă subiectul fosforilării într-un mod specific ciclului celular. Fosforilarea proteinei Rb crește la trecerea celulei din faza G₁ în faza S. Când celula trece prin faza M, această proteină devine rapid defosforilată și apare ca o

formă hipofosforilată în G1 timpuriu. Fosforilarea lui Rb marchează intrarea în punctul de restricție și se produce în două faze: fosforilarea inițială este mediată de complexe ciclina D/Cdk4,6, pe când fosforilarea totală a lui Rb necesită complexul ciclina E/Cdk2.



Fosforilarea produsului genei RB în punctul de restricție este evenimentul cheie care se produce ca răspuns la stimularea factorilor de creștere.

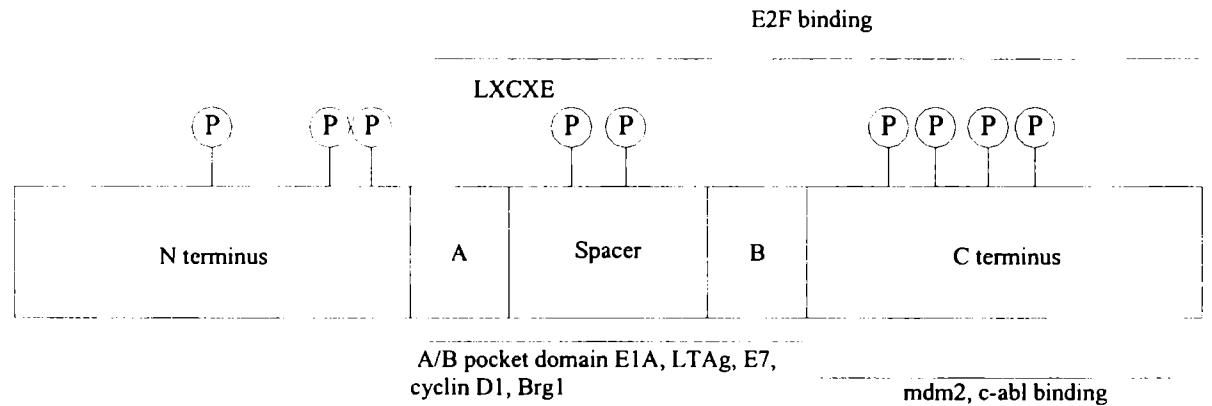
Proteina Rb are mai mult de 10 locuri de fosforilare, în principal în regiunile C și N terminal. Diferențierea mai multor tipuri celulare este însoțită de o creștere a formei hipofosforilate a Rb.

Efectele supresive ale creșterii prin introducerea genei RB și produsului genei, pot fi micșorate prin introducerea genei ciclului D1, care codifică o subunitate a unei kinaze dependentă de ciclina specifică lui G1, Cdk4. Micșorarea supresiei creșterii mediate de Rb, de către ciclina D1, este însoțită de hiperfosforilarea proteinei pRb. Aceste date conduc la ipoteza general acceptată că, doar forma hipofosforilată a lui Rb este inhibitorie a creșterii și că, fosforilarea lui Rb de către kinaza dependentă de ciclina specifică lui G1, este critică pentru progresia celulelor în faza S. O mare parte din funcționarea lui Rb ca un reglator negativ al ciclului celular a fost elucidată prin studii care identifică proteine celulare care se leagă la pRb. În celulele pauzative sau dorminde, forma hipofosforilată a Rb există într-un complex cu factorul de transcripție E2F, complex ce funcționează ca un represor transcripțional. Factorul de transcripție E2F1 este un factor de transcripție fundamental helix-loop-helix care se leagă la pRb într-o regiune indicată ca un domeniu “buzunar”. Acest domeniu cavităar al pRb este necesar și suficient pentru supresia creșterii de către această proteină. În plus, mutații Rb derivați din tumori produse spontan, indică acest domeniu. Semnificativ, E2F1 se leagă preferențial la forma hipofosforilată a pRb și mutațiile de sens greșit ale Rb identificate în tumori umane care nu au activitate supresivă a creșterii, nu izbutesc să lege la E2F1.

E2F este un heterodimer alcătuit dintr-o moleculă E2F și o moleculă DP (polipeptida DRTF1). Sunt șase membrii ai familiei E2F (E2F1 până la 6) și doi ai familiei DP (DP1 și 2). Proteina E2F1 funcționează ca un activator transcripțional, amplificând expresia genelor ce conțin secvențe consens E2F1 5'TTT(C/G) (C/G) CGC 3' în regiunile lor reglatorii. Când se leagă la proteina celulară DP1, complexul E2F1/DP1 activează transcripția unui număr de gene considerate necesare pentru terminarea fazei S a ciclului celular, cum ar fi dihidrofolat reductaza, timidinkinaza, b-myb și ciclina E. Supraexpresia genei E2F1 în celulele din cultură poate induce celulele din faza Go să intre în faza S a ciclului celular. Când se leagă la pRb, complexul E2F1/DP1 nu reușește să activeze transcripția din gene ce conțin elemente de răspuns la E2F și, în schimb, represează activ expresia lor. Fosforilarea lui pRb de către kinaze dependente de ciclina anulează inhibarea lui E2F1/DP1 de către pRb și permite activarea transcripțională a genelor esențiale pentru terminarea fazei S. Aceste gene includ ciclina E, ciclina A, Cdc2, Cdk2, Cdc6, Orc1, Mcm2-6, DNA-polimeraza α și E2F1 însuși. E2F1 induce, de asemenea, expresia lui p19^{ARF}, care rezultă în stabilizarea lui p53. Activarea transcripțională a lui E2F1, ca și ciclului E, constituie un mecanism feed-forward: activitatea adițională a ciclului E/Cdk2 asigură fosforilarea completă a Rb, astfel încât întreg E2F este într-o formă activă transcripțional liberă, care, pe rând, are ca rezultat producerea de mai mult E2F și ciclina E. Un mecanism adițional asigură progresia din faza S: fosforilarea lui E2F de către ciclina A/Cdk2 în faza S afectează activitatea de legare a DNA a lui E2F.

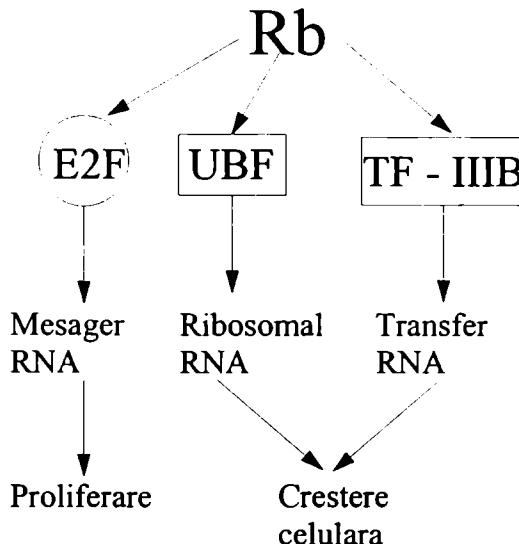
În plus la pRb, există două proteine adiționale înrudite cu pRb, p107 și p130. Speciile de la 1 la 3 ale lui E2F interacționează cu pRb și controlează exclusiv tranziția din G1 în S, pe când membrii E2F4 și -5 interacționează cu membrii familiei Rb, p107 și p130, pentru controlul altor tranziții în ciclul celular (de la G₀ la G₁). Nivelele lui E2F-1,-2,-3 sunt reglate transcripțional și induse târziu în G₁, pe când nivelele lui E2F-4,-5 rămân constante în timpul ciclului celular.

Alte proteine care interacționează cu pRb și sunt influențate în supresia creșterii mediată de această proteină, sunt oncogenă c-abl, oncogenă mdm2 și proteina Brg1 DNA helicaza/histon acetiltransferaza. În plus, câteva oncoproteine din virusuri se leagă la pRb. Proteina EBNA-5 de la virusul Epstein-Barr, proteina E7 de la virusul uman papiloma, proteina E1A a adenovirusului și SV 40 T antigen mare sunt toate capabile de a sechestra pRb și deci de a elibera E2F pentru activarea transcripțională. Mutațiile în proteinele virale care elimină activitatea de transformare sunt asociate cu o pierdere a abilității de a interacționa cu pRb.



Anumite protooncogene nucleare când sunt activate cu o putere similară distrug abilitatea lui pRb de a regla ciclul celular datorită excesului în molecule promotoare ale ciclului celular sau afinității alterate a efectorilor pentru interacția și supresia pRb.

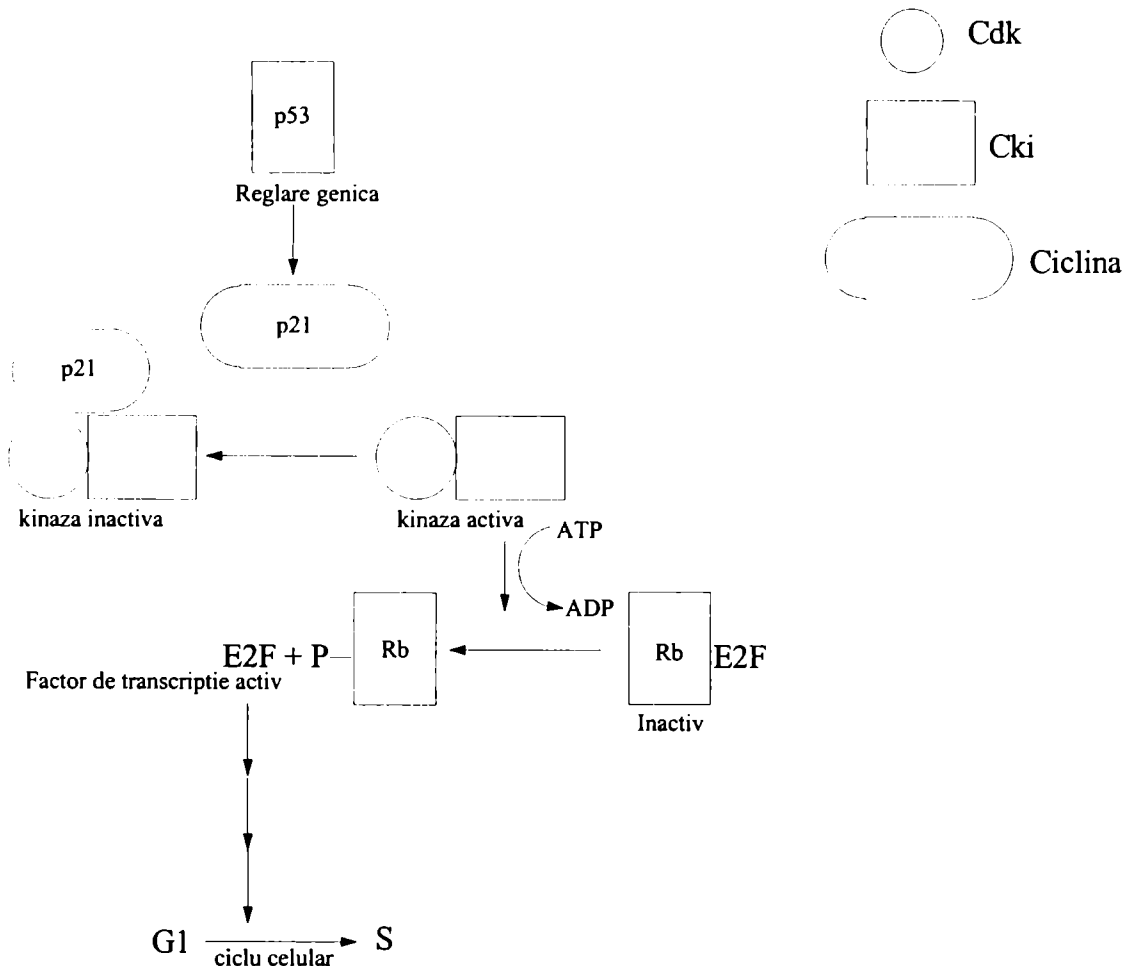
Rb inhibă transcripția prin RNA ribosomal și de transfer, prin legarea cu factori de transcripție UBF (factor de cuplare amonte) și TF-IIIB (factor de transcripție-IIIB) (1)



Ciclul celular și proteina Rb

Atunci când semnalele pentru stimularea creșterii ajung în nucleu, sunt traduse în acțiuni celulare de un complex de proteine care mediază progresia celulei prin diferite faze ale ciclului celular: G₀, o stare dormindă non-ciclică; G₁, prepararea pentru replicarea DNA; S, sinteza DNA de duplicare a întregului genom; G₂, prepararea pentru diviziunea nucleară și celulară; și M, mitoză. Ciclul celular este controlat de activarea specifică stadiului a membrilor familiei kinazelor dependente de ciclina (CDK), toate kinaze serină/treonină, și interacțiunea lor cu diferite ciclina activatoare sau proteine inhibitoare ce suprasează CDK, numite CKI. Când sunt activate, proteinele CDK fosforilează alte proteine implicate în reglarea ciclului celular. Kinaza dependentă de ciclina D fosforilează și deci inactivează proteina supresoare a retinoblastomului (pRb), prevenind acțiunea acesteia de a sechestra factorul de transcripție E2F. E2F este apoi disponibil pentru suprareglarea genelor cu elemente promotor E2F, urmând ca celula să intre în faza S.

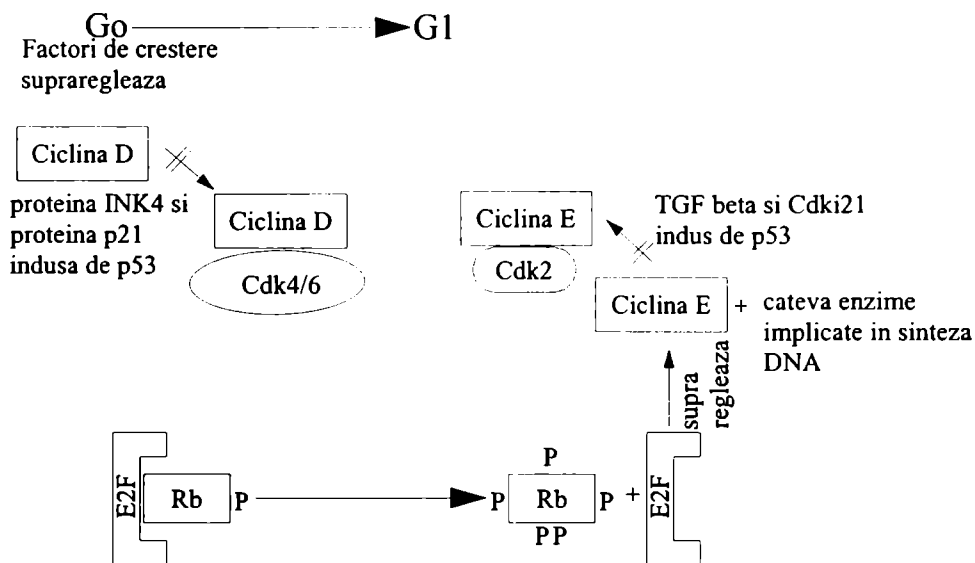
Ciclinale activatoare ale CDK sunt clasificate în acord cu faza ciclului celular în care sunt exprimate. Deci, sunt ciclina G₁ (D și E) care mediază tranziția de la G₁ la faza S, ciclina S (A) pentru replicarea DNA, și ciclina G₂ sau M (B) pentru progresia în/și prin mitoză. Supraexpresia anumitor membri ai familiei ciclinelor a fost asociată cu carcinogeneza, de exemplu, expresia ridicată a ciclina D1 a fost observată în tumorile esofagiene umane, conducând la sugestia că ciclina normală reprezintă o clasă de protooncogene.



În plus la reglarea pozitivă sau activarea CDKurilor de către ciclone, CDKurile sunt reglate negativ de proteine inhibitorii ale kinazei dependentă de ciclină (CKI). Acești factori se leagă la CDK, prevenind fosforilarea lor de către kinaza activatoare de CDK (CAK), care facilitează interacțiunile ciclinelor, sau interacționează direct cu complexele ciclina – CDK. Proteina INK 4p16 (inhibitor al Cdk4) determină oprirea în G1 prin legarea specifică la Cdk4 și blocarea activității sale. Prin stimularea și interacțiunea dintre Cdk2 și proteina CKI p27 are loc blocarea formării complexului ciclina E-Cdk2. Alternativ se suprareglează alt CKI, p15, care țintește Cdk4 și Cdk6 și previne inactivarea lui pRb.

Proliferarea celulară este inițiată de semnalizarea exogenă de la un mitogen care induce expresia membrilor familiei ciclonei D și trece celula din faza latentă Go în faza timpurie G1. Proteinele ciclone D formează un complex cu Cdk4 și 6, pe care le activează. Expresia acestui complex este maximizată în G1 târziu și persistă atâta timp cât continuă semnalizarea mitogenică. Activarea Cdk se produce când o kinază activatoare CDK înrudită structural (CAK) fosforilează CDK pe un rest specific de treonină. Evenimentele fosforilării facilitează interacțiunea lui CDK cu un membru al familiei ciclonei D, urmând să interacționeze cu ținte precum pRb. Hiperfosforilarea lui pRb de către complexul ciclina-Cdk, previne legarea pRb la factorul de transcripție E2F, care pe rând, se suprareglează pe sine și ciclina E. Ciclina E, când se asociază cu Cdk2, diminuează influența uneia din țintele sale: pRb, angajând celula în faza S. În timpul fazei S, ciclina E este rapid înlocuită prin degradare, eliberând Cdk2 pentru interacțiunea cu ciclina A, care reglează progresia prin faza S. Complexul ciclina A-Cdk2 inactivează E2F și deci subreglează transcripția genelor responsive de E2F, incluzând ciclina E. În final, ciclonele A și B în combinație cu Cdk1 controlează intrarea în mitoză, după care nivelul ciclonele scade; ciclul poate fi repetat cu stimulare mitogenică continuă și suprareglarea ciclonei D. În absența stimulării, nivelele ciclonei D scad, în timp ce nivelul CKIp27 crește și celula rămâne în Go.

Stimularea celulei cu un factor de creștere determină suprareglarea ciclonei D1, care interacționează cu kinaza dependentă de ciclina (Cdk) 4/6. Aceste complexe hiperfosforilează pRb îl inactivează și eliberează factorul de transcripție E2F. E2F eliberat suprareglează expresia ciclonei E, care formează un complex cu Cdk2 și promovează inhibarea activității Rb și determină celula să progreseze prin faza S. Ciclonele sunt reglate negativ de inhibitorii kinazelor dependente de ciclone (CKI): proteinele INK4p15, p16 și p27 și p21 indusă de p53 sau TGF-β.(2)



Retinoblastomul

Retinoblastomul este o tumoră a retinei și cea mai frecventă tumoră oculară la copii. Este o tumoră malignă ce se dezvoltă din foița neurosenzorială a retinei.

Vârsta apariției ei este în majoritatea cazurilor înainte de 2 ani, după vârsta de 4 ani devine foarte rară, iar după 7 ani, excepțională.

Afecțiunea se întâlnește în mod egal la ambele sexe, putând să fie localizată uni- sau bilateral. Formele unilaterale sunt cele mai frecvente. Formele bilaterale se întâlnesc în aproximativ 20-25% din cazuri, dar sunt mai frecvente în cazurile familiale (60-65%). În cazurile de bilateralitate este vorba de formarea simultană, multiinsulară a tumorii, în cei doi ochi și nu de metastazare.

Deși cazurile sporadice sunt cele mai frecvente, se știe că există un factor ereditar în geneza tumorii. Se disting deci, forme ereditare și cazuri sporadice ce rezultă 90% printr-o mutație somatică netransmisibilă la descendenți și în proporție de 10% printr-o mutație germinală transmisibilă.

Knudson a observat că aproape 40% din aceste cancere s-au produs la copiii foarte mici, cu o vârstă medie de aproape 14 luni. Aceste tumori sunt mai comun bilaterale, producându-se deci, în ambii ochi. Dacă tumorile sunt detectate timpuriu și înlăturate chirurgical, acești pacienți au o incidență înaltă a sarcoamelor osteogenice, mai târziu în viață. Unii dintre acești pacienți provin din familii cu antecedente de retinoblastom, indicând o predispoziție ereditară. Incidența crescută a tumorilor multiple la acești pacienți sugerează, de asemenea, o componentă ereditară în aceste cancere.

Knudson notează că 60% din retinoblastoame nu corespund acestui model. În aceste cazuri, nu s-a detectat o istorie familială și prima apariție a retinoblastomului s-a produs, de obicei, la copiii mai mari, cu o vârstă medie de 30 de luni.

Există un singur locus genetic responsabil atât pentru formele ereditare, cât și pentru formele sporadice ale acestei tumori, iar formarea tumorii necesită două evenimente genetice în acest locus, cunoscut ca „gena de susceptibilitate a retinoblastomului”, sau RB. Pacienții din primul grup, cu tumori bilaterale apărute timpuriu, moștenesc o copie defectivă a acestei gene și o alela normală. Cu o foarte înaltă frecvență (95%), mutațiile apar în alela normală și tumorile apar foarte timpuriu în viață. Rezultatul net al mutațiilor secundare (somatice) este etalarea mutațiilor originale (ale liniei germinale). Pacienții din al doilea grup, cu o singură tumoră unilaterală, moștenesc două alele RB normale sau de tip sălbatic.

Gena mutantă implicată în geneza retinoblastomului se manifestă dominant și are o penetranță incompletă, redusă, explicată prin faptul că prima mutație genetică moștenită face ca toate celulele primitive ale retinei să fie apte de a se transforma neoplazic, dar pentru apariția tumorii este necesară și a doua mutație, care poate să nu aibă loc.

Cazurile de retinoblastom familial au un risc crescut de dezvoltare a cancerului osos, dar nu și a altor tipuri de cancere. Pe de altă parte, dacă una din primele alele Rb a fost inactivată, există o probabilitate înaltă ca cea de-a doua deleție să se producă în altă copie. Prima mutație trebuie să genereze instabilitate genetică astfel încât să crească probabilitatea generării celui de-al doilea eveniment.

Un individ normal are celule cu două alele RB (homozigote), în timp ce un purtător are doar o copie (heterozigot). Pierderea alelei rămase, readuce celula la starea homozigotă, o stare diferită de cea pentru individul normal.

Au fost identificate 3 familii separate ale retinoblastomului, fiecare cu o deleție a cromosomului 13q4 diferită. Prin tehnici de bandare și analize citogenetice s-au evidențiat în retinoblastom aberații cromosomiale. Cel mai frecvent, s-a evidențiat o deleție a unei scurte

porțiuni a brațului lung al cromosomului 13. Uneori se constată o translocare a brațului lung al cromosomului 13 către brațul scurt sau o deleție a cromosomului 14. Câteva cazuri de retinoblastom au fost observate la copiii purtători ai unei trisomii 21.

Micoscopic, masa tumorală este formată din celule nediferențiate, rotunde, mici, cu puțină citoplasmă, cu nucleii mari, bogați în cromatină, intens bazofili, cu frecvente mitoze și cu zonă importantă de necroză în care în mod secundar se depune calciu. Aceste celule, denumite retinoblaste, sunt celule nediferențiate, derivate direct din celulele retinei embrionare.

În zona de creștere activă se pot găsi diferențieri structurale sub forma rozetelor sau cu aspect de floare.

Histologic, retinoblastoamele se prezintă sub trei aspecte:

- retinoblastoame nediferențiate, sunt cele mai maligne și cele mai radiosensibile
- retinoblastoame diferențiate sau retinocitoame – au o malignitate mai redusă și se împart în două grupe: cu rozete și cu aspect de floare
- retinoblastoame infiltrante – se caracterizează prin absența masei tumorale și printr-o infiltrație difuză a retinei.

Prognosticul afecțiunii este foarte grav, nu numai că ochiul afectat este definitiv pierdut din punct de vedere funcțional, ci și din cauza exteriorizării tumorii și metastazării sale, care duc în scurt timp la moartea bolnavului.

Formele bilaterale sunt cele mai grave și cu atât mai mult cu cât ele sunt diagnosticate mai tardiv.

De asemenea, invadarea coroidii, a nervului optic și a LCR sunt de prognostic sumbru.

Din punct de vedere histopatologic, formele diferențiate au un prognostic mai bun.

Tratament

Tumorile unilaterale descoperite într-un stadiu precoce, beneficiază de tratament conservator.

În tumorile bilaterale și cu invazie cerebrală se face chimioterapie și intervenție chirurgicală decompresivă.

În metastaze se folosește iradierea cu betatron asociată cu chimioterapie. (3)

Funcțiile familiei pRb și implicațiile sale în carcinogeneză

Membrii familiei proteinelor cavitare cuprind supresorul tumoral (pRb) și rudele sale, p107 și p130. Aceste proteine reglează negativ proliferarea celulară și modulează procese biologice fundamentale care includ dezvoltarea embrionară, diferențierea, reînnoirea țesutului homeostatic și apărarea împotriva cancerului. Proteinele cavitare cu multidomenii acționează prin legarea proteinelor stimulative ale creșterii, dintre care cele mai relevante sunt factorii de transcripție E2F/DP. Aceste interacțiuni proteină-proteină sunt reglate, pe rând, de evenimentele de fosforilare atent orchestrate pe multiple reziduuri de serină și treonină ale pRb, p107 și p130, evenimente care sunt îndeplinite, cel puțin în parte, prin kinaze dependente de ciclone care formează elementele cheie ale mașinării ciclului celular. (4)

Gena supresoare a retinoblastomului (RB) și rudele sale apropiate p107 și p130 sunt cel mai bine cunoscute pentru funcția lor în progresia ciclului celular. În ultimii ani a fost elucidat un nou rol pentru aceste proteine: reglarea diferențierii terminale a mai multor țesuturi și tipuri celulare. Rb și membrii familiei sale sunt implicați în stadiile multiple ale

procesului de diferențiere, incluzând ieșirea ireversibilă din ciclul celular, protecția împotriva apoptozei, inducerea genelor specifice tipurilor celulare și menținerea stării postmitotice. Joacă, de asemenea, un rol critic în asigurarea progresiei ordonate prin toate aceste stadii ale diferențierii. (5)

Proteinele Rb (p105, p107, p130) sunt cruciale în procesul diferențierii terminale a anumitor celule prin asocierea lor și represia factorilor transcripționali E2F. S-a examinat expresia proteinelor p130 și p107 ca și reglarea lui E2F în timpul diferențierii spontane a liniei celulelor intestinale Caco-2. A fost notată inducerea unui complex E2F lent migrator în celulele Caco-2 postconfluente; proteina p130 a fost componentul predominant al acestui complex E2F, cu o contribuție minoră din partea Cdk2. S-a identificat și un mic component legat a lui p107. În celulele Caco-2 nu s-a observat pRb legată la E2F. Adicional asocierii crescute cu p130, fosforilarea E2F4 a scăzut remarcabil în celulele Caco-2 diferențiate, în timp ce nivelele proteinei E2F au rămas neschimbate. Reglarea funcționării lui E2F poate fi un factor important ce contribuie la blocarea ciclului celular și la diferențierea spontană a celulelor Caco-2. Această reglare a lui E2F are loc mai probabil prin asocierea crescută cu p130 ca și prin scăderea fosforilării. (6)

S-a realizat un experiment care a avut drept scop determinarea expresiei modelelor proteinei retinoblastomului și familiei factorului transcripțional E2F în epitelul cornean și în keratinocitele corneene în situ în timpul dezvoltării și diferențierii corneei.

Exprimarea modelelor pRb și proteinelor familiei E2F variază cu diferențierea celulară corneană, dar este mai vizibilă p107 și p130. Localizarea nucleară a lui p130 pare a fi corelată cu diferențierea terminală în epiteliu și intrarea într-o stare latentă a keratinocitelor. În contrast, p107 este citoplasmatică în resturile celulelor epitelului corneean.

E2F este un factor de transcripție heterodimeric alcătuit din 1 până la 5 subunități (E2F1 până la E2F5) și o subunitate DP. E2F reglează expresia câtorva gene promotoare ale creșterii, și deci, poate fi o țintă a acțiunii antiproliferative a interferonilor (IFN). S-a investigat mecanismul prin care IFN- α supresează transcripția genei E2F1. Studii de transfecție relevă că promotorul E2F1 a fost divizat funcțional în două părți: secvența de activare amonte (UAS) și un element reglator negativ aval (locurile de legare E2F). Când celulele au proliferat, transcripția genei E2F1 a fost condusă în primul rând de UAS, în timp ce situsurile E2F nu au fost implicate în activare. IFN- α reduce marcat activitatea promotorului E2F1, dar introducerea mutației non-legare la situsurile E2F abrogă complet inhibarea. E2F4 liber este specia predominantă legată la situsurile E2F în ceulele proliferate. IFN- α induce suprareglarea lui E2F4 în același timp cu defosforilarea lui pRb și p130, care rezultă în formarea complexelor E2F4/pRb și E2F4/p130 pe promotorul E2F1, complexe care funcționează ca represori transcripționali, inhibând expresia mRNA E2F1. E2F4 este un reglator critic al E2F1. (7)

Factorul de transcripție E2F joacă un rol pivotant în activarea oportună a expresiei genelor în timpul progresiei ciclului celular la mamifere, pe când Rb și proteinele înrudite cotrolează creșterea celulară, printre altele, datorită abilității de a bloca activarea lui E2F. Modelul lui E2F și al polipeptidelor înrudite cu pRb se reface ca răspuns la modificările promotorilor, într-o manieră dinamică izbitoare la fel ca și progresul celulelor de la silențiozitatea din G1, în faza S. Represia fiecărui promotor în celulele dorminde este asociată cu refacerea lui E2F4 și p130 și cu nivelele scăzute ale acetilării histonelor. Mai târziu, în G1, aceste proteine sunt înlocuite de E2F1 și E2F3, împreună cu acetilarea histonelor H3 și H4 și activarea genelor. Represia și activarea genelor corespunzătoare lui E2F se pot produce prin heterodimeri E2F distincți, care dirijează refacerea secvențială a enzimelor capabile de dezacetilarea și apoi acetilarea miezului histonelor.

A fost descris un nou produs E2F care interacționează specific cu Rb în celulele dormante, numit E2F3b, codificat de un mRNA unic transcris dintr-un promotor intronic în cadrul situsului E2F3. RNA E2F3b diferă de RNA E2F3, caracterizat anterior și care a fost numit acum E2F3a, prin utilizarea unui exon de codificare unic. În contrast cu produsul E2F3a care este strâns reglat de către creșterea celulară, produsul E2F3b este exprimat echivalent în celulele latente și proliferante. Spre deosebire de proteinele E2F4 și E2F5, care sunt exprimate, de asemenea, în celulele latente și formează complexe cu proteina p130, proteina E2F3b se asociază cu Rb și reprezintă complexul predominant E2F-Rb în celulele latente. Specificitatea descrisă anterior a funcției Rb, ca un represor transcripțional în celulele latente, coincide cu asocierea lui Rb cu acest nou produs a lui E2F. (8)

În sistemul nervos central mamalian, neuronii se retrag din ciclul celular imediat după diferențierea lor din celulele neuroepiteliale proliferative. Chiar și atunci când neuronii postmitotici rămân în latență mitotică permanentă, exprimă un număr de reglatori ai ciclului celular necesari pentru progresia ciclului. Studiile au fost focalizate pe expresia și funcțiile membrilor familiei proteinelor retinoblastomului (Rb) (p105, p107, p130) și necdin, toți aceștia fiind supresori ai creșterii, care interacționează cu oncoproteine virale și proteinele familiei E2F. Aceste molecule sunt exprimate diferențial în progenitorii proliferativi neuronali și neuronii postmitotici în dezvoltarea neuroepiteliului *in vivo* și în celulele carcinomului diferențiat *in vitro*. În timpul neurogenezei, disfuncția proteinelor Rb determină diferențiere slabă neurală însoțită de moarte celulară (apoptoza). Proteinele familiei Rb sunt esențiale atât pentru mitoză terminală a progenitorilor neurali, cât și pentru supraviețuirea neuronilor nascenti. Sunt, de asemenea, indispensabile pentru menținerea stării postmitotice a neuronilor diferențiați terminal. Necdinul este exprimat exclusiv în celulele postmitotice și poate contribui la oprirea lor mitotică permanentă. Acești reglatori ai ciclului celular acționează coordonat în generarea, supraviețuirea și moartea neuronilor postmitotici. (9)

Studii recente indică că proteinele Rb sunt implicate în procesele de diferențiere celulară. p130 înrudită cu pRb se acumulează în timpul diferențierii *in vitro* a celulelor progenitoare mieloide, 32Dc13, în granulocite, ca răspuns la factorul stimulator de colonii al granulocitelor (G-CSF). Această diferențiere granulocitică dependentă de G-CSF este blocată de oncoproteina adenovirusului E1A, care se leagă și inactivează familia pRb a proteinelor cavitare, incluzând p130. Supraexpresia forțată a lui p130, dar nu a lui pRb, inhibă proliferarea celulară mieloidă care este concomitent asociată cu diferențierea morfologică granulocitică caracterizată de segmentarea nucleară. Simpla oprire a ciclului celular în G1 indusă de lipsa citokinelor, supraexpresia ectopică a CDKI p27, sau inhibarea activităților E2F prin DP1 dominant negativ nu sunt suficiente pentru diferențierea granulocitară. Activitatea lui p130 de a promova diferențierea în celulele mieloide necesită atât domeniul „buzunar”, cât și domeniul spacer. P130 înrudită cu pRb joacă un rol critic în diferențierea celulelor mieloide și sugerează că, cuplarea ieșirii din ciclul celular cu programul de diferențiere celulară poate fi realizată specific de p130. (10)

Încă de la descoperirea sa, gena RB1 și proteina corespunzătoare, pRb au constituit un punct focal în cercetarea cancerului. Izolarea factorului de transcripție E2F reprezintă cheia înțelegerii curente a funcției RB1 în reglarea ciclului celular și în supresia tumorală. Devine din ce în ce mai evident că circuitele reglatoare care guvernează ciclul celular sunt foarte complexe și înalt întrepărunse. Câteva aspecte ale funcției RB1, de exemplu rolul în diferențiere, nu pot fi ușor explicate prin modelele curente ale interacțiunii pRb-E2F. Un motiv este acela că pRb are ținte diferite din E2F, de exemplu molecule MyoD-like.

PRb1, proteina cunoscută de legare a pRb cavitare, posedă activitatea de represie transcripțională și se asociază cu complexe p130-E2F și pRb-E2F specific în timpul opririi

creșterii. Supraexpresia lui pRB1 inhibă expresia genelor dependente de E2F și supresează creșterea celulară. (11)

Pierderea pRb într-o anumită măsură în tumorile pituitare nu este asociată cu pierderea heterozigoției unui marker intragenic RB1. Pentru a putea defini mecanismul responsabil de pierderea exprimării pRb, s-a investigat starea de metilare a insulei CpG care conține în interior regiunea promotor a genei RB1, precum și analiza secvențială a regiunii promotor esențiale și a exonilor codificatori pentru domeniul cavitat de legare al proteinelor. Metilarea insulei CpG în regiunea promotor RB1 s-a detectat în 6 din 10 tumori care nu exprimau pRb. În contrast, 18 din 20 de tumori și toate cele 6 tumori pituitare postmortem normale histologic care exprimau pRb au fost nemetilate. Nu s-au găsit mutații inactivatoare în interiorul regiunii promotor RB1 în 4 tumori nemetilate care nu exprimau pRb. Unul sau mai mulți exoni, alcătuind regiunea de codificare pentru domeniul cavitat de legare a proteinei, suferă deleții homozigote în 3 din 4 tumori. Acest studiu descrie un tip tumoral adițional retinoblastomului, în care metilarea promotorului RB1 este asociată cu pierderea expresiei pRb. În plus la metilarea regiunii promotor RB1, deleția din interiorul domeniului cavitat de legare este asociată cu o pierdere a expresiei pRb detectabile. Reactivarea genelor supresoare tumorale, inactivate prin metilare, reprezintă o țintă terapeutică promițătoare în adenoamele pituitare. (12)

Transcripția RNA polimerazei III (Pol III) este supusă represiei de către proteina retinoblastomului Rb, atât in vitro cât și in vivo. P107 și p130 sunt două proteine strâns înrudite care manifestă 30 până la 35% identitate cu polipeptida Rb și prezintă câteva din funcțiile sale. Cele două proteine pot repressa transcripția Pol III în transfecția tranzientă sau când sunt adăugate la extracte celulare. Imunoprecipitarea care folosește componente recombinanți demonstrează că o subunitate a TFIIB interacționează fizic cu p107 și p130. TFIIB endogen este asociat stabil cu p107 și p130. Dezbinarea acestei interacții in vivo, prin folosirea oncoproteinei E7 a papilomavirusului uman, are drept rezultat o creștere marcată a transcripției Pol III. TFIIB este țintit pentru represie nu doar de către pRb, ci și de către rudele sale p107 și p130. (13)

Modificarea condițiilor redox intracelulare cu dietilmaleat (DEM), un agent al depleției glutationului, induce o oprire a creșterii independentă de p53, mediată prin acumularea mRNA și proteinei p21. Același tratament a indus defosforilarea pRb, care este:

- foarte rapidă, fiind deja observată după 5 minute de expunere a celulelor la DEM;
- complet reversibilă;
- dependentă de efectele prooxidante ale DEM.

Defosforilarea lui pRb este independentă de acumularea lui p21 indusă de DEM; nivelele lui p21 încep să crească mult mai târziu după tratamentul cu DEM și de aceea activitățile kinazei dependentă de ciclină nu sunt încă induse atunci când pRb este deja defosforilată ca urmare a tratamentului cu DEM.

Creșterea tumorală este reglată prin balanța dintre proliferare, oprirea creșterii și moartea celulară programată (apoptoză). Majoritatea studiilor care se ocupau cu oncogeneza s-au focalizat pe reglarea proliferării celulare. Controlul opririi creșterii și apoptoze joacă un rol cheie în dezvoltarea cancerului uman și în tratamentul acestuia. Câteva din cele mai studiate proteine, importante pentru controlul opririi creșterii și apoptozei sunt p53, p21 bcl-2 și bax. Alterările proteinei p53 pot conduce la transformarea malignă și lipsa răspunsului terapeutic, mult mai probabil ca un rezultat al apoptozei dependente de p53 defectiv. P21 este implicată în oprirea ciclului celular și, probabil, în inducerea apoptozei dependentă de p53. Proteinele aparținând familiei bcl-2 sunt, de asemenea, importante pentru apoptoza normală. Supraexpresia proteinei bcl-2 este menită să reducă capacitatea apoptotică, în timp ce proteina bax este necesară pentru inducerea apoptozei. S-a examinat exprimarea lui p53, p21,

bcl-2, bax, pRb și ciclina D în țesuturi provenite din 93 de cancere de colon primare pentru evaluarea rolului lor în progresia acestora. S-a determinat o asociere înalt semnificativă între acumularea lui p53 și reglarea inferioară a lui p21. S-a găsit o strânsă asociere între absența sau reducerea lui p21 și dezvoltarea metastazelor și deces datorită bolii canceroase. Ciclina D1, proteinele bcl-2 și bax nu au influențe prognostice independent. Nivelele proteinelor bcl-2 și bax au arătat o relație inversă. Rezultatele indică că nivelele reduse ale proteinei p21 joacă un rol important în progresia cancerului de colon. Evaluarea exprimării lui p21 în cancerul de colon primar în timpul operației poate fi un instrument valoros în detectarea pacienților cu risc crescut de a dezvolta metastaze. (14)

În fibroblastele pasive, expresia forțată a lui bcl-2 ridică nivelele atât ale lui p27 cât și ale lui p130. Bcl-2 încetinește progresia G1 în celulele deficiente în pRb, dar nu în lipsa lui p27 sau p130. Abilitatea lui p130 de a forma complexe represive cu E2F4 este implicată, deoarece retardarea prin bcl-2 a fost accentuată prin coexpresia E2F4. O potențială țintă relevantă a lui p130/E2F4 este gena E2F1, deoarece expresia bcl-2 întârzie acumularea lui E2F1 în timpul progresiei G1. Bcl-2 întârzie intrarea în ciclul celular prin creșterea nivelelor p27 și p130 și menține complexe represive ale lui p130 cu E2F4. (15)

Proteina morfogenetică 2 a osului (BMP-2) acționează ca un agent anti proliferativ pentru un număr de celule diferite. BMP-2 inhibă creșterea celulelor din cancerul de sân uman MDA MB 231. Factorul de creștere epidermal (EGF) stimulează sinteza DNA și intrarea acestor celule în faza S. BMP-2 inhibă sinteza DNA indusă de EGF prin reținerea celulelor în faza G1 a ciclului celular și crește nivelul lui p21. Expunerea celulelor MDA MB231 la BMP-2 stimulează asocierea lui p21 cu ciclina D și E, rezultând inhibarea activităților kinazice asociate acestora. În final, tratamentul cu BMP-2 determină hipofosforilarea proteinei retinoblastomului, un reglator cheie al progresiei ciclului celular. Aceste date furnizează un mecanism pentru efectul antiproliferativ al BMP-2 în celulele cancerului de sân. (16)

Papillomavirusurile umane (HPV) sunt agenții etiologici ai unor malignizari la om, inclusiv cancerul cervical. Potențialul lor tumorigenic este legat de expresia genelor E6/E7 care pot interfera cu controlul ciclului celular normal, prin țintirea lui p53, p21 WAF1, p27KIP și pRb. Keratinocitele cu HPV (HPK) pozitiv nontumorigenic și tumorigenic expun diferențe izbitoare în răspunsul genelor reglatoare ale ciclului celular față de TGFβ1. Tratamentul cu acest agent conduce la o inducție eficientă a lui p53 și a genelor inhibitorilor de creștere p15INK4 și p21WAF1 doar în keratinocitele nontumorigene și a fost asociat cu o reducere eficientă a expresiei oncogenelor virale E6/E7, cu creșterea nivelelor de pRb, expunând hipofosforilare și oprirea permanentă a creșterii în faza G1. În contrast, HPK tumorigene manifestă doar o creștere modestă a nivelelor proteice p53 și o reducere substanțială a inducerii genelor p15INK4 și p21WAF1, care a fost legată de un grad mai mic al represiei oncogenelor virale. HPK tumorigene își reiau rapid creșterea celulară după o oprire tranzitorie în G1, concomitent cu reparația pRb hiperfosforilată. Progresia celulelor HPV pozitiv la un fenotip malign este asociată cu o rezistență înaltă la inhibarea creșterii prin transformarea TGFβ1. Acest fapt este legat în celulele tumorigene, de o lipsă a reținerii persistente în G1, inducție inefficientă a câtorva gene de control ale ciclului celular implicate în inhibarea creșterii, și represia inefficientă a oncogenelor virale promoatoare ale creșterii E6/E7. (17)

Oncoproteina E7 a lui HPV16 neutralizează câteva puncte de control ale ciclului celular, favorizând intrarea celulelor silențioase în faza S. Această activitate este mediată de asocierea lui E7 cu proteinele cavitate și ulterior cu activarea factorilor de transcripție E2F. Abilitatea de a induce apoptoza este o proprietate comuna E7-urilor aparținând atât tipurilor de HPV benigne cât și maligne. Apoptoza indusă de E7 este mediată de inactivarea lui pRb,

pe când neutralizarea altor 2 proteine înrudite cu pRb, p107 și p130, nu este suficientă pentru a determina apoptoza. Anumite mutații punctiforme în regiunea conservată 1 (CR1) a lui E7 HPV16 desființează inducerea apoptozei fără a altera abilitatea de stimulare a fazei S.

Destabilizarea pRb mediată de E7 nu este necesară pentru abilitatea sa de a conduce celulele dorminde în faza S și de a induce apoptoza. Expresia proteinelor E7 în NIH3T3, care nu au o p19ARF funcțională, nu conduce la acumularea de p53, indicând că E7 are efect asupra căilor adiționale celulare de a promova apoptoza. (18)

Expresia ectopică a inhibitorilor CDK (CKI) pINK4a și p27kip1 în fibroblastele Rat1 induce defosforilare și activarea proteinelor familiei retinoblastomului (pRb, p107 și p130), asocierea lor cu proteinele E2F și oprirea ciclului celular în G1. Acțiunea inhibitoare a creșterii p16, se crede a fi mediată esențial, prin activarea pRb. Proteina E1A 12S a adenovirusului 5 se asociază cu proteinele familiei pRb prin reziduuri în regiunile lor conservate (CR) 1 și 2, în particular prin motivul LXCXE în CR2. Aceste interacțiuni sunt necesare pentru E1A pentru a preveni oprirea în G1 privind coexpresia CKI-urilor.

Mutația fiecăreia din cele două motive conservate adiacente la LXCXE în CR2, GFP și SDDDEE, afectează abilitatea lui E1A de a învinge oprirea în G1 prin p16 sau p27. Aceste mutații nu afectează asocierea lui E1A cu pRb, p107 și p130 și nici abilitatea sa de a deprimă activitatea transcripțională a lui E2F-1. Unul din mutații lui E1A este defectiv în derepresarea câtorva gene țintă ale lui E2F endogen în prezența lui p16 sau p27. CR2 posedă o funcție esențială care poate fi necesară pentru derepresia totală a genelor reglate de E2F în contextul lor cromatinic natural. (19)

Domeniul cavitărilor al lui pRb îi este necesar pentru a opri ciclul celular. Acest domeniu a fost definit la origine ca regiune a proteinei care este necesară și suficientă pentru interacțiunea pRb-urilor cu adenovirusul E1A și virusul simian S40 Tag mare. Aceste oncoproteine, și alte proteine de legare a pRb care sunt codificate de o varietate de virusuri ale plantelor și animalelor, folosesc motivul LXCXE conservat, pentru a interacționa cu pRb. Secvențe similare au fost identificate în proteine multiple celulare de legare a pRb, sugerând că virusurile au evoluat să țină un loc de legare a pRb înalt conservat care este critic pentru funcționarea sa. S-a întocmit un grup de mutații pRb în care aminoacizi conservați, predestinați să facă legături închise cu o peptidă LXCXE, au fost alterați în ciuda conservării locului de legare al peptidei de-a lungul evoluției, mutații pRb care nu au acest loc sunt capabili să inducă oprirea ciclului celular într-o linie celulară tumorală deficientă în pRb. Această oprire în G1 este depășită prin complexe ciclina D-cdK4, dar este rezistentă la inactivarea prin E7. Mutații fără locul de reglare LXCXE sunt capabili să inducă oprirea în G1 a celulelor HeLa în ciuda exprimării lui E7 HPV-18 sau DP, și păstrează abilitatea de a interacționa cu CtIP și HDAC1, corepresori transcripționali care conțin secvențe LXCXE-like. Mutații pRb sunt capabili să activeze represia transcripției. Oncoproteinele virale depind de locul de legare LXCXE a lui pRb pentru interacțiunea la un grad mai înalt decât proteinele celulare care sunt critice pentru oprirea ciclului celular sau represia transcripției. Mutația acestui locus permite pRb să funcționeze ca un regulator al ciclului celular, fiind în același timp rezistent la inactivarea de către oncoproteinele virale. (20)

Cancerul pulmonar este a doua cauză de deces după bolile cardiovasculare și este principala cauză a morții de cancer în Occident. Radiografia toracelui și citologia sputei au permis detectarea stadiului I al cancerului, dar nu au avut impact asupra supraviețuirii. Aceasta se datorează potențialului metastazic timpuriu al tumorilor primare mici. Este foarte important să se detecteze cancerul pulmonar în cel mai timpuriu stadiu, studiind și identificând leziunile genetice care ar putea indica o nouă țintă pentru terapia genică. Gena

pRb2 (p130) pare a fi unul dintre markerii candidați și țintește modul de abordare terapeutic genic. Terapia genică efectivă necesită atât un material genetic care să fie utilizat terapeutic, cât și metoda de a-l oferi. (21)

P130 și p107 sunt cunoscute ca proteine cavitare datorită unicului domeniu structural și funcțional alcătuit din subdomeniile A și B separate printr-o regiune spacer care este înalt conservată în fiecare proteină. Aceste proteine expun proprietăți unice supresive ale creșterii care sunt specifice tipului celular, sugerând că ele se pot completa reciproc. Studii recente pe 235 de cancere pulmonare, folosind tehnici imunohistochimice, sugerează un rol independent pentru p130 în dezvoltarea și/sau progresia carcinoamelor pulmonare umane. S-a găsit o relație inversă semnificativă statistic între aspectul histologic (gradul potențialului malign) și expresia lui p105, p107 și p130 în carcinoamele celulelor squamoase, sugerând că o creștere în gradul potențialului malign are ca rezultat scăderea semnificativă a expresiei proteinei. Acest fenomen a fost evident, în mod particular, pentru pRb2 (p130) care are procentajul cel mai înalt al nivelelor nedetectabile în toate probele examinate și corelația inversă cea mai strânsă cu gradul potențialului malign histologic și expresia PCNA în cele mai multe tipuri de tumori agresive, sugerând un rol important pentru p130 în patogeniza și progresia câtorva cancere pulmonare. S-a explorat expresia proteinei p130 în materiale citologice FNAB de la 30 de pacienți cu cancer pulmonar, folosind tehnici imunohistochimice, comparând expresia proteinei cu tipul tumoral. Din 30 de neoplasme, 27 manifestă o colorație pozitivă pentru p130. În particular s-a detectat p130 în 9 carcinoame squamoase, 11 adenocarcinoame, 5 BAC și 2 SCC. Imunohistochimia reprezintă o metodă sensibilă pentru detectarea expresiei p130 în probe citologice, putând fi folosită în evaluarea preoperatorie a probelor citologice, și îmbunătăți diagnosticul și evaluarea prognostică a pacienților cu cancer pulmonar. (22)

Deleția sau hiperfosforilarea proteinei retinoblastomului este raportată în progresia diferitelor tumori. Pentru a înțelege mai bine rolul pRb în leucemia celulelor T adulte/limfom (ATL), s-a examinat exprimarea și starea de fosforilare a pRb în 3 linii celulare ATL și 43 de probe clinice, 8 probe de sânge periferic și 35 de probe de noduli limfatici de la pacienți cu ATL. Adițional au fost evaluate imunohistochimic 30 de secțiuni de noduli limfatici. S-a observat că pRb, în liniile celulare ATL, a fost hiperfosforilată, dar în 39 din 43 probe clinice, pRb a fost exclusiv în forma hipofosforilată. 4 probe de sânge periferic au fost negative pentru pRb. Imunohistochimic se dezvăluie faptul că nodulii limfatici ai tuturor celor 30 de pacienți testați au fost pozitivi pentru pRb la diferite nivele de colorare: slab, mediu și puternic. Expresia slabă poate fi esențial negativă pentru funcția pRb, deoarece pacienții respectivi trăiesc semnificativ mai puțin decât cei cu expresie medie. Surprinzător, pacienții cu expresie puternică arată o prognoză semnificativ mai gravă decât cei cu expresie medie. Deși doar absența expresiei pRb a fost anterior considerată a fi indicativul pierderii Rb funcțional, s-a raportat că supraexpresia pRb este corelată cu progresia bolii la pacienții cu cancer de vezică avansat sau limfom folicular. PRb controlează proliferarea tumorală nu doar ca un reglator al ciclului celular, ci și prin alte mecanisme, posibil, prin inhibarea apoptozei, așa cum a fost sugerat prin recente descoperiri într-o linie celulară de osteosarcom, Saos-2. PRb poate juca un rol esențial pentru progresia ATL, în forma sa hipofosforilată precum și ca promotor al ciclului celular în forma hiperfosforilată, negativă sau redusă excesiv. (23)

Proteinele asociate ciclului celular, p16, pRb, p21 și p53 sunt importante în reglarea punctului de control G1-S și alterările lor funcționale joacă un rol cheie în carcinogeneza și proliferarea celulară. S-a examinat imunohistochimic expresia acestor proteine prin folosirea țesuturilor de la 35 pacienți cu cancer esofagian primar. În 35 cazuri, expresia acestor proteine a fost detectată în 4 (11,4%), 25 (71,4%), 11 (31,4%) și 20 (57%). Interesant, 24 din 25 cancere pozitive Rb au p16 negativă, pe când 3 din 10 cancere negative Rb au nivele crescute

de p16. În 11 cazuri cu p21 pozitive, au fost metastaze ale nodulilor limfatici în 9 (81,8%). Aceste rezultate sugerează că anormalitățile proteinei p16 pot fi strâns asociate cu carcinogeneza sau proliferarea celulară în cancerul esofagian. (24)

Tumorile paratiroidiene prezintă deleții care afectează gena retinoblastomului și supraexpresia ciclului D1 (Cyc D1). S-au evaluat alterările din componentele căii pRb în adenoamele și tumorile agresive paratiroidiene, incluzând modelele expresiei lui pRb, Cyc D1 și p16/INK4. Perechile de DNA normal și tumoral au fost analizate pentru pierderea heterozigotiei la situsul Rb în 6 adenoame și 5 tumori agresive. Expresia lui pRb, Cyc D1 și p16 a fost studiată în 4 adenoame și 5 tumori agresive. Absența heterozigotiei RB s-a găsit în 1 din 6 adenoame și în 1 din două tumori agresive. Analizele imunohistochemice dezvăluie pRb nedetectabil în 4 din 5 tumori agresive și prezența pRb în toate adenoamele. Expresia CycD1 s-a găsit în 3 din 4 tumori agresive, dar este nedetectabilă în adenoame. Alterările în calea pRb sunt comune în formele agresive de neoplasme paratiroidiene.

S-a analizat expresia imunohistochimică a pRb în probele obținute de la 62 pacienți cu cancer endometrial. S-a folosit sistemul de detectare a avidin-biotin-peroxidazei cu pretratament cu microunde și anticorp monoclonal de șoarece antiNCL-RB1 uman. S-a observat o colorare nucleară heterogenă pentru pRb, în general în celulele glandulare în 59 din cele 62 cazuri, în timp ce componentele stromale nu au fost reactive. Într-un caz în stadiul I al adenocarcinomului endometrial, un mic procent de celule glandulare (5%) s-a colorat pozitiv cu anticorp anti-Rb, în timp ce alte două tumori (stadiul II al carcinomului adenosquamos și stadiul III al adenocarcinomului) au pRb negativ. În cazurile cu leziuni concomitente hiperplazice și neoplazice, imunoreacția pRb a fost heterogenă în celulele endometriale hiperplazice și în endometrul neoplazic adiacent. 8 cazuri de carcinom care prezintă mutația punctiformă a codonului 12 al genei K-ras au hiperexprimat imunohistochimic pRb, în timp ce nici una din cele 3 probe pRb negativ nu a avut o alterare a genei K-ras. pRb este exprimată în cele mai multe neoplasme endometriale, dar lipsa imunoreactivității ei poate corespunde cu rearanjamente ale genei retinoblastomului într-un subset de carcinoame endometriale avansate. (25)

Carcinomul nasofaringian (NPC) este un cancer endemic în China de Sud și Africa de Nord și patogeneza sa nu este încă bine definită la nivel molecular. Implicarea p53 și a genelor retinoblastomului (RB/p105) în NPC a fost bine studiată; lipsesc date mutaționale privind gena RB2/p130 în tumorile primare și în particular în NPC. RB2/p130 poate fi rearanjată într-o linie celulară nasofaringiană. S-a secvențiat gena RB2 pentru mutațiile din exonii 19-22. Mutațiile în gena RB2 au fost detectate în 3 din 10 NPC umane primare din Africa de Nord (30%). Aceste rezultate împreună cu datele anterioare care arată înlocuirea genetică a lui RB2, restabilesc o cale de creștere normală în linia celulară Hone-1 de NPC, întăresc ipoteza că modificările genei RB2 pot fi implicate în dezvoltarea și/sau progresia cancerului nasofaringian și sugerează că acestea poate fi considerată o genă supresoare tumorală și un candidat pentru noile descoperiri terapeutice genice pentru NPC. (26)

Factorul de creștere tumorală $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) inhibă progresia ciclului celular a mai multor tipuri de celule, prin stoparea lor în faza G1/S. Inhibă complexe active ciclului Cdk și conduce la inhibarea fosforilării lui Rb. În celulele cancerului gastric, SNU16, tratamentul cu TGF β induce expresia amplificată a p21 (WAF/CIP1), care inhibă activitatea kinazică a ciclului D și E asociate CDK-urilor și blochează fosforilarea p130. TGF β amplifică stabilitatea p130, sugerând că hipofosforilarea acesteia și creșterea stabilității contribuie la stoparea în G1 mediată de ea în celulele cancerului gastric. P21 și p130 sunt ținte majore ale TGF β în celulele cancerului gastric și o cale p21-G1/Cdk-p130/E2F ce mediază inhibarea creșterii prin TGF β în aceste celule. (27)

Transformarea melanocitelor normale în celulele melanomului metastazic este caracterizată prin pierderea dependenței asupra factorilor de creștere externi necesari pentru viabilitatea și proliferarea melanocitelor normale. Evenimentele moleculare care conduc la creșterea autonomă a celulelor melanomului nu sunt bine definite, dar probabil, includ activitatea susținută a kinazelor dependente de ciclina (CDK2, CDK4 și CDK6) ca rezultat al pierderii inhibitorilor CDK și hiperreglării persistente a câtorva ciclina (D1, A și E), reglatori pozitivi ai CDK-urilor. CDK-urile fosforilează și deci inactivează proteinele supresoare ale tumorilor familiei retinoblastomului numite proteine cavitate. Inactivarea proteinelor cavitate eliberează factori de transcripție E2F de complexe supresive care induc expresia continuă a genelor țintă ai căror produși susțin progresia ciclului celular. În melanocitele normale, factorul de creștere extern supresează activitatea tuturor celor 3 proteine cavitate, permițând activității E2F să se acumuleze și să susțină transcrierea genelor țintă necesare pentru proliferarea celulelor. În contrast, în celulele melanomului din leziunile avansate, toate trei proteinele cavitate sunt înalt fosforilate și inactive, chiar în absența mitogenilor din mediu, iar activitatea E2F este înalt constitutivă. Hiperfosforilarea cronică sau inactivarea pRb, p107 și p130 este, probabil, unul din evenimentele cheie în convertirea melanocitelor normale dependente de factorii de creștere, în celule ale melanomului cu creștere autonomă. Toate proteinele cavitate sunt reglate de activitatea Cdk-urilor, astfel că este probabil ca agenții care inhibă această clasă de enzime vor fi eficienți în tratarea pacienților cu melanom. (28)

Aberațiile diferitelor componente ale căii pRb, cum ar fi proteinele retinoblastomului și ciclina D1, Cdk4 și inhibitorii kinazelor dependente de ciclina p16 sau p15, au fost raportate într-o varietate de tumori umane. S-a raportat frecvent inactivarea situsurilor Cdkn2a/Cdkn2b - codificatori ai inhibitorilor kinazelor dependente de ciclina p16/p15, într-un subset de limfoame de șoarece induse de 2',3'-dideoxicitidină și 1,3-butadienă, indicând implicarea căii pRb în limfomageneză. Pentru a investiga dacă alterarea altor componente ale căii pRb reprezintă un mecanism alternativ fundamental dezvoltării limfoamelor induse de aceste substanțe chimice, s-a examinat starea genelor RB1, Ccnd1 și Cdk4, gene care codifică proteinele retinoblastomului, ciclina D1 și respectiv Cdk4. Nu au fost detectate alterări masive ale genelor RB1, Ccnd1 și Cdk4 prin analiza Southern în tumorile examinate. Prin analize ale conformației s-au detectat mutații punctiforme în domeniul aminoterminal al lui Cdk4 care este important pentru asocierea cu produșii genei Cdkn2a. Aceste rezultate indică faptul că mecanismul fundamental al dezvoltării limfoamelor induse de 2',3'-dideoxicitidina și 1,3-butadiena implică inactivarea inhibitorilor p16/p15, dar nu alterări ale genelor RB1, Ccnd1 și Cdk4.

Alterările genelor asociate ciclului celular contribuie, probabil, la patogeneza limfomului Burkitt (BL), și în plus la translocația genei c-myc. Mutații ale genei RB2 s-au descoperit recent în liniile celulare BL și în tumorile primare. S-a testat expresia și organizarea genomică a genei în relație cu trăsăturile proliferative ale unei serii de probe BL colectate din regiuni endemice și sporadice. Expresia p130, p107 și proteinelor necesare proliferării celulare (ciclina A și B) s-a evidențiat imunohistochimic. Au fost analizate structurile a 19 exoni din 22 ai genei RB2, ce codifică pentru domeniul B și C terminus, prin analiza PCR. Produșii PCR direcți au fost secvențiați pentru identificarea mutațiilor actuale. Rezultatele sugerează că BL este alcătuit dintr-o mixtură de tipuri moleculare cu modele genetice și fenotipice distincte, probabil rezultate prin mecanisme patogenetice diferite. În BL endemic, gena RB2 suferă mutație în cele mai multe cazuri și proteina este limitată la citoplasmă. În BL asociat SIDA, au fost detectate nivele înalte ale expresiei nucleare a tipului sălbatic p130, p107 și proteinelor asociate proliferării celulare. BL sporadice au fost caracterizate în principal de valorile nucleare scăzute ale tipului sălbatic p130 și, invers, de valorile crescute ale p107. Proliferare celulară crescută datorată alterărilor diferite ale

controlului creșterii celulare de către proteinele înrudite cu Rb, poate fi primul pas în limfogenază, în timp ce modificările genetice adiționale, incluzând mutația de sens greșit a lui c-myc, se pot produce ulterior. (29)

Proliferarea celulelor musculare netede (SMC) care rezultă în formarea neointimei este implicată în patogeneza plăcilor aterosclerotice și justifică ratele înalte ale restenozei care se produce după angioplastia coronară, un tratament comun pentru bolile arterelor coronare. Leziunile endoteliale orientează semnalele proliferative intense către SMC ale subintimei, stimulând reintrarea lor în ciclul celular din starea G₀, rezultând formarea neointimei și ocluzia vasculară. Proliferarea celulară este controlată negativ de reglatorii creșterii sau genele supresoare ale tumorii, sau ambele, cum sunt membrii familiei genei retinoblastomului (Rb/p105, p107, Rb2/p130). P130 inhibă proliferarea SMC in vitro și in vivo. S-a folosit modelul de restenoză al arterei carotide de șobolan pentru a demonstra că transducția arterială localizată a p130, mediată de adenovirus în timpul angioplastiei, reduce semnificativ hiperplazia și previne restenoza. Aceste rezultate sugerează că p130 poate fi o țintă importantă pentru terapia genică vasculară. (30)

1. Mendelsohn S., Howley R., Israel J., Liotta R., *The molecular basis of cancer*, 210-225, 2001.
2. McKinnell R., Parchment R., Perantoni A., Pierce G. B., *The biological basis of cancer*, 115-130, 2000.
3. Roger J. B. King, *Cancer Biology*, 92-100, 1999.
4. Muller H., Helin K., *The E2F transcription factors: key regulators of cell proliferation*, *Biochimica Et biophysica Acta*, 1470 (1): M1-12, 2000.
5. Lipinski M. M., Jacks T., *The retinoblastoma gene family in differentiation and development*, *Oncogene*, 18 (55): 7873-82, 1999.
6. Ding Q., Wang Q., Dong Z., Evers B. M., *Characterization and regulation of E2F activity during Caco-2 cell differentiation*, *American Journal of Physiology*, 278(1):C110-7, 2000.
7. Furukawa Y., Iwase S., Kikuchi J., Nakamura M., Yamada H., Matsuda M., *Transcriptional repression of the E2F1 gene by interferon-alpha is mediated through induction of E2F4/pRb and E2F4/p130 complexes*, *Oncogene*, 18 (11):2003-14, 1999.
8. Leone G., Nuckolls F., Ishida S., Adams M., Sears R., Jakoi L., Miron A., Nevins J. R., *Identification of the novel E2F3 product suggests a mechanism for determining specificity of repression by Rb proteins*, *Molecular & Cellular Biology*, 20 (10): 3626-32, 2000.
9. Yoshikawa K., *Cell cycle regulators in neural stem cells and postmitotic neurons*, *Neuroscience Research*, 37 (1): 1-14, 2000.
10. Mori A., Higashi H., Hoshikawa Y., Imamura M., Asaka M., Hatakeyama M., *Granulocytic differentiation of myeloid progenitor cells by p130, the retinoblastoma tumor suppressor homologue*, *Oncogene*, 18 (46): 6209-21, 1999.
11. Lay A., Marcellus R. C., Corbeil Hb., Branton P. E., *Rb1 induces growth arrest by repression of E2F-dependent transcription*, *Oncogene*, 18 (12): 2091-100, 1999.
12. Simpson D. J., Hibberts N. A., McNicol A. M., Clayton R. N., Farrell W. E., *Loss of pRb expression in pituitary adenomas is associated with methylation of the RB1 CpG island*, *Cancer Research*, 60 (5): 1211-6, 2000.
13. Sutcliffe J. E., Cairns C. A., McLees A., Allison S. J., Tosh K., White R. J., *RNA polymerase III transcription factor III B is a target for repression by pocket proteins p107 and p130*, *Molecular & Cellular Biology*, 19 (6):4255-61, 1999.
14. Bukhlom I. K., Nesland J. M., *Protein expression of p53, p21 (WAF1/CIP1), bcl-2, Bax, cyclin D1 and pRb in human colon carcinomas*, *Virchows Archiv*, 436(3):224-8, 2000.
15. Vairo G., Soos T. J., Upton T. M., Zalvide J., De Caprio J. A., Ewen M. E., Koff A., Adams J. M., *Bcl-2 retards cell cycle entry through p27 (Kip1), pRB relative p130, and altered E2F regulation*, *Molecular & Cellular Biology*, 20(13): 4745-53, 2000.

16. Gosh-Choudhury N., Woodruff K., Qi W., Celeste A., Abboud S. L., Gosh-Choudhury G., *Bone morphogenetic protein-2 blocks MDA MB 231 human breast cancer cell proliferation by inhibiting cyclin-dependent kinase-mediated retinoblastoma protein phosphorylation*, Biochemical & Biophysical Research Communications, 272 (3):705-11, 2000.
17. Hasskarl J., Butz K., Whitaker N., Ullmann A., Durst M., Hoppe-Seyler F., –“Differential cell cycle response of nontumorigenic and tumorigenic human papillomavirus-positive keratinocytes towards transforming growth factor-beta 1”, Journal of Molecular Medicine, 78 (2): 94-101, 2000.
18. Caldeira S., de Villiers EM., Tommasino M., *Human papillomavirus E7 proteins stimulate proliferation independently of their ability to associate with retinoblastoma protein*, Oncogene, 19(6):821-6, 2000.
19. Parreno M., Garriga J., Limon A., Mayol X., Beck G. R. Jr., Moran E., Grana X., *E1A blocks hyperphosphorylation of p130 and p107 without affecting the phosphorylation status of the retinoblastoma protein*, Journal of Virology, 74 (7): 3166-76, 2000.
20. Dick F. A., Sailhamer E., Dyson N. J., *Mutagenesis of the pRB pocket reveals that cell cycle arrest functions are separable from binding to viral oncoproteins*, Molecular & Cellular Biology, 20(10):3715-27, 2000.
21. Claudio P. P., Caputi M., Giordano A., *The RB2/p130 gene: the latest weapon in the war against lung cancer*, Clinical Cancer Research 6(3):754-64, 2000.
22. Minimo C., Bibbo M., Claudio P. P., DeLuca A., Giordano A., *The role of pRb2/p130 protein in diagnosing lung carcinoma on fine needle aspiration biopsies*, Pathology, Research & Practice, 195 (2): 67-70, 1999.
23. Nakayama K., Yamada Y., Koji T., Hayashi T., Tomonaga M., Kamihira S., *Expression and phosphorylation status of retinoblastoma protein in adult T-cell leukemia/lymphoma*, Leukemia Research, 24 (4): 299-305, 2000.
24. Kato H., Yoshikawa M., Fukao Y., Tajima K., Masuda N., Tsukada K., Kuwano H., Nakajima T., *An immunohistochemical study of p16, pRb, p21 and p53 proteins in human esophageal cancers*, Journal of Molecular Medicine, 72 (5):76-85, 2000.
25. Semzuck A., Schneider-Stock R., Miturski R., Skomra D., Tomaszewski J., Roessner A., Jakowich J. A., *RB protein expression in human endometrial carcinomas-an immunohistochemical study*, Pathology, Research & Practice, 196 (1): 41-6, 2000.
26. Claudio P. P., Howard C. M., Fu Y., Cinti C., Califano L., Micheli P., Mercer E. W., Caputi M., Giordano A., *Mutations in the retinoblastoma – related gene RB2/p130 in primary nasopharyngeal carcinoma*, Cancer Research, 60(1):8-12, 2000.
27. Yoo Y. D., Choi J. Y., Lee S. J., Kim J. S., Min B. R., Lee Y. I., Kang Y. K., *TGF-beta-induced cell cycle arrest through the p21 (WAF1/CIP1) – G1 cyclin/Cdks-p130 pathway in gastric carcinomas cells*, International Journal of Cancer, 83 (4): 512-7, 1999.
28. Halaban R., *Melanoma cell autonomous growth: the Rb/ E2F pathway*, Cancer & Metastasis Reviews, 18 (3); 333-43, 1999.
29. Cinti C., Leoncini L., Nyongo A., Ferrari F., Lazzi S., Bellan C., Vatti R., Zamparelli A., Cevenini G., Tosi G. M., Claudio P. P., Maraldi N. M., Tosi P., Giordano A., *Genetic alteration of the retinoblastoma – related gene RB2/p130 identify different pathogenetic mechanism in and among Burkitt's lymphoma subtypes*, American Journal of Pathology, 156(3):751-60, 2000.
30. Claudio P. P., Fratta L., Farina F., Howard C. M., Stassi G., Numata S., Pacilio C., Davis A., Lavitrano M., Volpe M., Wilson G. M., Trimarco B., Giordano A., Condorelli G., *Adenoviral RB2/p130 gene transfer inhibits smooth muscle cell proliferation and prevents restenosis after angioplasty*, Circulation Research, 85(12):2091-100, 1999.

FACTORI DE STIMULARE A COLONIILOR (CSF)

În procesul de proliferare și diferențiere din măduva osoasă, interacțiunile intercelulare prin factori solubili reprezintă un dispozitiv principal prin care se menține homeostazia cantitativă și calitativă a hematopoiezei. Se cunosc peste 20 de proteine secretate în micromediul medular sau extramedular, capabile să acționeze pe celula stem, progenitori și precursori hematopoietici și să exercite funcții proproliferative, de diferențiere sau de menținere a viabilității acestor celule.

1. Factorul de stimulare a coloniilor granulocitare (G-CSF)

A fost izolat pentru prima dată de Welte și colaboratorii în 1985 dintr-o linie de carcinom de vezică urinară. În prezent, G-CSF (CSF β) este una dintre puținele citokine aprobate de "Food and Drug Administration" în practica clinică, în transplantul medular autolog și în stări neutropenice.

Surse. Sub acțiunea lipopolizaharidelor (LPS), IFN- γ și TNF α , G-CSF este produs de monocite și macrofage. Prin stimularea cu IL-1, TNF α și LPS este activată producția și în alte tipuri de celule (fibroblaști, celule endoteliale, celule medulare stromale și astrocite).

Structură. G-CSF este o moleculă de 19,6 KDa în forma glicozilată, cea neglicozilată fiind de 18 KDa; deține două punți disulfidice. La om, molecula activă are 174 aminoacizi fiind derivată dintr-un precursor de 204 aminoacizi. G-CSF prezintă o semnificativă omologie secvențială cu alte citokine, ca IL-6 și oncostatin M care exercită o varietate de activități pe numeroase celule țintă printre care și celulele mieloide.

Analiza prin difracția cu raze X a G-CSF uman arată că este organizat într-o structură de mănunchi de patru α -helixuri, asemănător cu alte citokine ca GM-CSF, IL-2, IFN și hormoni de creștere. Zona de interacțiune cu receptorul este situată spre capătul C-terminal al secvenței.

Gena pentru G-CSF se află pe cromosomul 17q21-q22. Mai multe elemente acționează în amonte de genă, iar proteinele nucleare care se fixează pe secvența promotoare sunt:

- GPE – 1 în apropierea regiunii TATA ce conține secvența consens CK-1 prezentă și la alte citokine. Proteinele cu motiv "leucine zipper" care se leagă la GPE 1 au fost identificate ca NF-kB, NF-IL-6, etc. Pare implicat în producerea G-CSF de monocitele stimulate cu endotoxine;
- GPE 2 – situs octameric de fixare pentru factori de tipul OTF (factori de transcripție octameric);
- GPE 3 – specific G-CSF. Deleția la acest nivel îi diminuează transcripția spontană a G-CSF în celulele tumorale (4).

Receptori. Au fost identificate mai multe tipuri de receptori de mare afinitate pentru G-CSF pe neutrofilele mature și pe precursorii lor hematopoietici. Sunt prezenți și pe celulele

placentare și endoteliale, iar expresia lor pe celulele de carcinom ar putea media un efect autocrin sau paracrin de stimulare a creșterii. Efectul G-CSF pe celulele țintă este declanșat de legarea de receptor, cu medierea proliferării și diferențierii neutrofilelor. Numărul de receptori G-CSF exprimați membranar este relativ redus, între 30-1000 molecule/celulă dar receptorul leagă G-CSF cu înaltă afinitate ca homodimer și poate transduce în celule, semnale de proliferare și diferențiere.

Ligandul induce formarea homodimerizării lanțurilor G-CSF-R; receptorul este activ sub această formă de homodimer pentru a induce semnalul de activare în neutrofile. Receptorul G-CSF este un membru al familiei de receptori hematopietinici care includ IL-2R (lanțurile β și γ), IL-3R, GM-CSF-R și IL-6R (lanțul β).

La om există doi receptori – unul cu 813 aminoacizi și omologie de 62% cu cel de șoarece, altul de 759 aminoacizi. Ambii sunt exprimați membranar și se diferențiază prin lungimea cozii citoplasmice. Regiunea citoplasmică a G-CSF-R nu conține secvențe pentru activități enzimatică ca tirozin kinaze sau fosfataze. Dimerizarea receptorului G-CSF prin legarea de ligandul său, este forma activă care transduce semnalul în celulele țintă specifice. Rezultatul semnalizării constă în reglarea specifică a proliferării și diferențierii neutrofilelor. Mecanismul de semnalizare este încă neelucidat.

Efecte biologice. G-CSF stimulează specific proliferarea și diferențierea progenitorilor neutrofilelor. Prelungește supraviețuirea neutrofilelor mature și stimulează capacitatea funcțională a acestora.

Administrarea la om a 1-60 μg G-CSF/kg/zi stimulează proliferarea tuturor stadiilor granulocitopoiezei și rezultă rapid (24 ore), în manieră dependentă de doză, creșterea de aproximativ 15 ori a neutrofilelor în sângele periferic, comparativ cu valorile bazale. Funcția de stimulare a proliferării coloniilor hematopietice de către G-CSF fondează utilizarea lui în condiții patologice asociate cu mielosupresia (25). În prezența IL-3 asigură expansiunea megacariocitelor in vitro, iar în prezența SCF induce proliferarea celulei stem hematopietice multipotente, cu expansiunea coloniilor de blaști in vitro și a CFU-S in vivo.

G-CSF inhibă apoptoza indusă de TGF β într-o linie de leucemie mieloidă murină, în timp ce IL-3 și SCF au efect slab iar GM-CSF nu acționează, fapt datorat expresiei diferite a receptorilor pentru citokine (18).

Acțiunea se centrează pe sistemul granulocitar neutrofilic prin trei efecte majore: reducerea duratei de tranzit a neutrofilelor în compartimentul medular postmitotic, stimularea proliferării progenitorilor neutrofilelor și, în sângele periferic, deplasarea neutrofilelor din zona marginală în cea axială a fluxului sangvin, ducând la creșterea numerică a neutrofilelor în sânge și ameliorarea stărilor neutropenice.

Deficiențele în producția G-CSF sau în răspunsul la această citokină sunt urmate de neutropenie cronică și sensibilitate la infecțiile bacteriene.

2. Factorul de stimulare a coloniilor de granulocite-macrofage (GM-CSF)

GM-CSF (CSF-2, CSF- α) a fost pus în evidență în 1984 de către Gasson și colaboratori, fiind una din primele citokine reglatoare ale hematopoiezei care a fost purificată și clonată.

Surse. Secreția este indusă în prezența unor citokine sau factori inflamatori, în celulele B, T, monocite, macrofage, celulele endoteliale.

Structură. Proteina precursor conține un semnal N-terminal de 17 aminoacizi, prin clivarea sa rezultă molecule mature de 127 aminoacizi. Greutatea moleculară este variabilă (14-35 KDa), proteina fiind glicozilată în diferite grade, însă grupările glicozidice nu

influențează activitatea biologică. Intramolecular, prezintă două punți disulfidice care îi conferă conformația activă.

Gena codificantă a GM-CSF uman este localizată pe brațul lung al cromosomului 5 în locusul 5q23-31, localizare foarte apropiată de gena care codifică pentru IL-3. O regiune în promotorii genelor codificante pentru IL-4, IL-5, G-CSF și GM-CSF prezintă un grad mare de omologie și este denumită CLE 0 (element conservat al limfokinei 0); se discută apartenența la familia oncogenelor etc. Au fost identificate două proteine care interacționează cu CLE 0 – NF-CLE 0a și NF-CLE 0b care au rol de reglator pozitiv și respectiv negativ. Deși CLE 0 a genei pentru G-CSF este omoloagă cu cea pentru IL-4, IL-5 și GM-CSF, nu este recunoscută de CLE 0a și CLE 0b, fapt explicat prin fenomenul de redundanță a acțiunii citokinelor și prin exprimarea preferențială a unor factori, de exemplu, GM-CSF și nu G-CSF. (17)

Receptorul. Este identificat pe progenitorii mieloizi și pe alte celule imune și non-imune, receptorul hematopoietinic având în componență două subunități asociate necovalent. Subunitatea α (85 kDa) are afinitate scăzută de legare pentru GM-CSF și formează împreună cu subunitatea β (130 kDa) un receptor cu afinitate înaltă. Catena β intră și în structura IL-3-R și IL-5-R, ceea ce stă la baza fenomenului de redundanță a activității biologice exercitată de aceste citokine și poate explica competiția de legare între acestea pentru același component comun β c al receptorului. O formă solubilă a GM-CSF-R α a fost detectată în serul uman iar o altă moleculă de acest tip cu un domeniu citoplasmatic procesat alternativ, a fost identificată în lichidele biologice.

Transducerea semnalului implică cascada kinazelor ca legătură între stimularea GM-CSF, interacțiunea cu receptorul și răspunsul celular (6). Dimerizarea $\alpha\beta$ induce fosforilarea Jak antrenând fosforilarea reziduurilor tirozinice ale mai multor substrate: STAT-5, Ras/Raf/MAPK, Vav, Pim-1, Pi3K. Fosforilarea tirozinei proteinelor prin tirozin kinază (PTK) este implicată ca un intermediar în reglarea proliferării și diferențierii celulelor țintă. De asemenea, MAP-kinaza este calea de transducere a semnalizării comune pentru GM-CSF, IL-3, IL-5 și factorul Steel. Alte molecule implicate în transducerea semnalului de către GM-CSF în neutrofile sunt angrenate în calea proteinei G, a proteinkinazei C ϵ și fosfolipazei D (4).

Efecte biologice. GM-CSF este stimulatorul principal al proliferării coloniilor granulocitare – monocite, macrofage și eozinofile în măduva hematopoietică. Efectele sunt directe dar se pot datora și inducției secreției altor citokine (IL-3, IL-5, G-CSF). În prezența EPO și IL-3 este activator al expansiunii coloniilor eritroide și megacariocitare. Este necesar pentru dezvoltarea și multiplicarea progenitorilor celulelor dendritice. În neutrofile și eozinofile este stimulată producția de radicali superoxizi, leucotriene și metaboliți ai acidului arahidonic, cu amplificarea mecanismelor defensive nespecifice. Stimulează citotoxicitatea dependentă de anticorpi (ADCC) împotriva celulelor tumorale; chemotaxia neutrofilelor, eozinofilelor, macrofagelor (crește expresia moleculelor de adeziune Mo-1, amplifică producerea de histamină, crește sinteza IL-1, TNF α).

Sub acțiunea GM-CSF endoteliocitele proliferază mai intens, iar pentru unele celule de adenocarcinom, carcinom și sarcom osteogenic este un posibil factor de creștere.

3. Factorul de stimulare a coloniilor de macrofage (M-CSF)

Prima clonare a M-CSF (CSF-1) a fost efectuată în 1987 de către Wong și colaboratori pe baza unor molecule de cca. 70 kDa izolate din urină. O proteină mai mică a fost purificată ulterior de Kawasaki și colaboratorii dintr-o linie de carcinom pancreatic uman. Deși

utilizarea clinică nu a fost oficial aprobată, există încercări cu M-CSF recombinant uman în terapia cancerului, în special a unor hemopatii maligne dar și a infecțiilor fungice.

Surse M-CSF se găsește în concentrații mai mari în diferite lichide biologice (plasmă, urină) și în măduva hematogenă. Este sintetizat de macrofage activate de citokine sau lipopolizaharide, limfocite T și B, precum și de celulele endoteliale, fibroblaști, keratinocite, osteoblaști, astrocite, celule stromale medulare și celule epiteliale secretoare din uter. Secreția se atribuie și unor celule tumorale de leucemie acută mieloidă și limfoidă, adenocarcinom pulmonar, mamar, uterin și ovarian.

Structură Există două forme de M-CSF, ambele exprimate inițial ca preproteină care prin proteoliză generează factori solubili. Din forma de 554 aminoacizi rezultă o proteină de 223 KDa secretată extracelular. Prin clivarea precursorului de 256 aminoacizi se formează dimeri solubili cu subunități de 160 aminoacizi. Moleculele membranare pot să interacționeze juxtacrin cu receptorul M-CSF-R de pe aceeași celulă sau de pe celulele învecinate. Factorii solubili sunt proteine homodimerice, cu subunități unite printr-o punte disulfidică. Greutatea moleculară este de 40-90 KDa, în funcție de gradul de glicozilare.

O particularitate importantă este prezența în miezul proteic a unui lanț de 18 KDa de condroitin sulfat (Ser 276-277); se presupune că există două izoforme: fără condroitin sulfat și cu condroitin sulfat, aceasta din urmă fiind esențială în organele hematopoietice primare (4).

Gena codificantă se află pe locusul 1p13-21, și este formată din 10 exoni. La nivel molecular, mecanismul expresiei genei CSF în celulele leucemice este reglat posttranscripțional, fiind implicate și unele oncogene. Secvența bogată în adenină și uracil de la capătul 3' al ARNm este sensibilă la clivare dar poate fi prelungită prin expresia c-ras prin mecanisme transcripționale și posttranscripționale. ARNm al M-CSF care nu este bogat în secvențe AU la capătul 3' nu este afectat în celulele transfectate ras. Există ipoteza că fiecare genă codificantă pentru citokine este afectată prin mutații în zona reglatoare, însă este probabilă și existența unui factor comun care dereglează expresia mai multor citokine (18).

Receptorul. Există un singur tip de receptor detectat pe suprafața monocitelor și macrofagelor tisulare. Receptorul apare și pe trofoblastul uman fiind, probabil, implicat în dezvoltarea placentei. Este codificat de protooncogenul c-fms (situat pe cromosomul 5, regiunea 5q21-32) și aparține unei familii de tirozin kinaze care includ receptorii factorilor α și β ai proliferării, derivați din trombocite (PDGFR) și protooncogenul c-kit, receptorul factorului Steel. În structura receptorilor oncogenici ai citokinelor cu activitate tirozinkinazică intrinsecă (EGFR, PDGFR, SCFR, VEGF-VPF/ FLK1) numeroase reziduuri din domeniul intracelular sunt determinante pentru funcționare: Lys 616 al situsului de legare a ATP este precedat de o secvență GXGXXG; legarea CSF se realizează în primele trei domenii extracelulare, în timp ce pentru dimerizare este important al patrulea domeniu. Regiunea extracelulară (493 aminoacizi) este organizată în cinci domenii Ig-like, în timp ce domeniul transmembranar deține doar 25 aminoacizi, iar cel intracelular 435 aminoacizi.

Interacțiunea receptorului cu ligandul mediază efectele biologice pleiotrope ale M-CSF de supraviețuire, proliferare și diferențiere a monocitelor și macrofagelor. Legarea M-CSF inițiază homodimerizarea receptorului și transducerea semnalului pe calea tirozin kinazelor, autofosforilarea tirozinei din secvența receptorului și fosforilarea unor proteine celulare. Interacțiunea ligandului cu receptorul este urmată de internalizarea complexului ligand receptor urmată de scăderea expresiei receptorului. Căile semnalizării hematopoietice includ cascada Ras/Raf-1/MAPK și calea Jak-STAT. Calea Jak-STAT a semnalului intracelular este utilizată de receptor pentru a induce transcripția genelor. Diferențierea celulelor mioeloide indusă de

CSF-1 este însoțită de activarea factorului inductor al diferențierii (DIF) care se asociază cu elementul ADN, cale inexistentă în semnalizarea indusă de G-CSF.

În dezvoltarea embrionară la șoarece, după implantarea oului, c-fms și c-kit sunt exprimate în embrion înaintea implantării. ARNm pentru M-CSF și SCF sunt detectabili în celulele oviductului, uterului în timpul ovulației, al migrării oocitului și al implantării embrionului (4).

Efecte biologice. Efectele se manifestă pe sistemul mononuclear macrofagic, fiind stimulată nu numai proliferarea coloniilor monocitare, dar și multiplicarea, diferențierea, viabilitatea și funcționalitatea macrofagelor mature. Este indusă sinteza citokinelor proinflamatorii – TNF α , IL-1 și amplificată capacitatea de fagocitoză.

Echilibrul funcțional osteoclaste-osteoblaste este asigurat de producția normală de M-CSF; excesul citokinei duce la osteoporoză prin dezechilibru funcțional în favoarea osteoclastelor (21).

Existența unei mutații spontane (op) la nivelul genei M-CSF în linia fibroblastică murină L929 permite observarea intervenției complexului M-CSF/M-CSFR în homeostazie și anume, absența incisivilor și prezența osteoporozei la homoziții op/op. Adiția unei timidine este incompatibilă cu translația ARNm, cu consecința dezvoltării anormale a macrofagelor (4).

Deficiențele în producția M-CSF sau în răspunsul la această citokină sunt urmate de diminuarea progenitorilor hematopoietici în măduva osoasă, compensată de hematopoieza extramedulară, osteoporoză, scăderea frecvenței macrofagelor periferice, scăderea fertilității la femelele de șoarece.

4. Eritropoietina (EPO)

Este principalul stimulator al proliferării și factor de maturare al progenitorilor eritroizi BFU-E și CFU-E.

Surse. În perioada fetală, principala sursă este ficatul. La adult, rinichiul devine organul principal de producție (fibroblaștii din interstițiul peritubular al regiunii cortexului renal, mai precis la nivelul aparatului juxtaglomerular), ponderea hepatocitului fiind de 10-15%. Alte celule producătoare ar fi macrofagele din măduva hematopoietică.

Structura. EPO este o proteină glicozilată de 193 aminoacizi și greutate moleculară de 30,4 kDa, glicozilarea fiind esențială pentru solubilitatea moleculei și acțiunea in vivo, în timp ce stabilitatea moleculei este dată de prezența a două punți disulfidice. Forma precursor conține o secvență N-terminală hidrofobă de 27 aminoacizi care este scindată în timpul maturării sale. Hipoxia sau tratamentul cu cobalt a unor linii celulare de hepatom (Hep 3B) secretante de EPO, crește de 50 de ori secreția, în timp ce sinteza ARNm doar de 10 ori. Unele cercetări au sugerat rolul prostaglandinelor în activarea sintezei de EPO prin creșterea sintezei AMPc; altele indică rolul Ca^{2+} . Se pare că există un complex posttranscripțional semnificativ în reglarea genei reprezentat de o proteină ribonucleară care este factor reglator negativ. IL-1 și TNF α inhibă sinteza de EPO, probabil la nivel transcripțional.

Gena codificantă a EPO este unică, situată pe cromosomul uman 7q11-22.

Receptorul. Este situat la nivelul progenitorilor eritroizi, hematii, megacariocite și celule endoteliale, fiind o proteină de 508 aminoacizi și 55 kDa cu trei porțiuni – extracelulară, transmembranară și citoplasmatică (categoria receptorilor hematopoietinici), activă în stare homodimeră. Interacțiunea EPO cu receptorul determină mai multe evenimente

intracelulare, probabil responsabile de activarea proliferării celulelor seriei roșii determinând fosforilarea unei componente asociate de 130 kDa, creșterea influxului de Ca^{2+} și activarea transcripției protooncogenelor ras și myc. În transducția semnalului un rol important îl au factorii Jak 2, STAT-5 și MAPK.

Efecte biologice. În principal, EPO determină intensificarea eritropoiezei prin stimularea proliferării și diferențierii progenitorilor eritroizi. Sub acțiunea sinergică a EPO cu IL-3 și GM-CSF se inițiază proliferarea și expresia receptorilor EPO. Acest complex de factori, în special EPO, stimulează apariția și proliferarea unităților de colonii eritroide cu formarea de eritrocite mature și reticulocite, inclusiv stimularea directă a sintezei de hemoglobină. Eritropoieza începe în cursul embriogenezei și se caracterizează prin producția de eritrocite nucleate (reticulocite) care conțin hemoglobină fetală (HbF). Celulele progenitor eritroide suferă diferențierea hematopoietică ca răspuns la acțiunea stimulatorie a EPO. Spre sfârșitul gestației, hematopoieza se realizează în ficat, splină și parțial în măduva hematogenă care devine la adult locul major al hematopoiezei și respectiv al eritropoiezei. Hematiile produse prin acest proces sunt anucleate și conțin hemoglobină A (HbA). În eritropoieza definitivă cele mai multe celule au forme imature, sunt orientate spre linia eritroidă și sunt rezidente în măduva hematogenă (18).

EPO și receptorul său sunt indispensabili pentru eritropoieză; EPO nu este esențială pentru generarea celulelor progenitor eritroide, ci pentru supraviețuirea unităților formatoare de eritrocite (CFU-E) declanșând proliferarea și diferențierea progenitorilor în eritrocite mature. Astfel, în faza G_1 a ciclului celular, EPO se cuplează la receptorul de pe CFU-E stimulând diviziunea celulară.

In vitro s-au observat efecte ale EPO asupra megacariocitopoiezei, evidențiindu-se creșterea formării de colonii și stimularea maturării megacariocitelor.

5. Factorul celulei stem (SCF)

Este o glicoproteină izolată inițial ca oncoproteină din virusul sarcomului felin Hardy-Zuckerman 4 (HZ4) ale cărei funcții sunt necesare pentru o hematopoieză constitutivă normală. A fost descoperit în 1990 de cercetători care au observat că șoarecii cu mutația w (Dominant White Spotting) sau/SI (Steel) prezintă tulburări de hematopoieză, melanogeneză și spermatogeneză. Prima mutație corespunde locusului c-kit, o protooncogenă care codifică un receptor membranar cu activitate tirozinkinazică. Pentru locusul SI s-au evidențiat mai multe acțiuni, astfel fiind denumit în diverse moduri: SCF, ligandul c-kit (KL), MGF (factorul de creștere al mastocitelor), factorul Steel (SLF).

Surse. SCF este secretat de fibroblaști, neuroni, ovocite, celule Sertoli, macrofage, hepatocite, secreția fiind diferențiată în funcție de tipul celular.

Structura. La om, SCF este o proteină membranară tip I alcătuită din 273 aminoacizi. Primele 25 de resturi de aminoacizi constituie peptidul semnal care este clivat enzimatic cu formarea proteinei mature, aceasta prezentând un domeniu extracelular care prin clivaj proteazic eliberează forma solubilă. Proteina este ancorată de suprafața celulară prin domeniul transmembranar urmat de secvența citoplasmatică, alcătuită din 36 de aminoacizi și implicată în transducerea semnalului. Lanțul polipeptidic se constituie ca un monomer care formează structuri dimerice glicozilate, legate necovalent.

Gena care codifică SCF uman se află localizată pe brațul lung al cromosomului 12q22-24.

Receptorul. Structural, receptorul uman a fost caracterizat prin analogie cu cel murin, fiind înrudit cu factorul de creștere derivat din plakete (PDGF) și cu factorul de stimulare al coloniilor de macrofage (M-CSF). A fost identificat doar pe celulele stem pluripotente hematopoietice, pe progenitorii mieloizi, eritroizi, limfoizi B și mastocitari, și se prezintă ca o tirozinkinază de 145 aminoacizi codificată de protooncogenă c-kit. Face parte din superfamilia de receptori imunoglobulinici, prezentând în regiunea extracelulară 5 domenii Ig-like.

Legarea SCF declanșează dimerizarea moleculei receptorului c-kit care generează transducerea semnalului stimulator. Legarea factorului Steel de c-kit induce rapid fosforilarea resturilor de tirozină din domeniul kinazic al receptorului c-kit. Receptorul autofosforilat se asociază prin intermediul domeniului SH2 cu fosfatidil inozitol 3 kinaza (PI-3K) și fosfolipaza C γ 1 (PLC γ 1), expresia membranală a receptorului fiind reglată negativ prin activarea PKC și pozitiv prin inhibarea acestei enzime. De asemenea, activarea c-kit antrenează fosforilarea Vav (P95^{Vav}) – codificată de o protooncogenă exprimată doar pe celulele hematopoietice – ce conține un domeniu SH2 și două domenii SH3 (1).

Efecte biologice. Celulele țintă ale SCF sunt celulele stem pluripotente și celulele precursor angajate spre linia mieloidă. Exerciță numeroase acțiuni în hematopoieză, potențat de prezența altor factori: EPO pe linia eritroidă, IL-3, IL-6, IL-11, GM-CSF, G-CSF pe linia mieloidă, IL-3, IL-6, IL-11 pentru expansiunea megacariocitelor, IL-3 pentru mastocite. Asociat cu IL-7 stimulează proliferarea progenitorilor limfocitelor B, cu IL-2 și IL-7 induce proliferarea timocitelor. Are un nivel înalt în placentă și în sistemul nervos central al adultului, jucând un rol important în chimiotactismul axonilor. În general este considerat factor de creștere pentru mastocite întrucât stimulează eliberarea histaminei, a leucotrienelor dependent de IgE, precum și sinteza mediatorilor lipidici și protidici.

Administrarea SCF înaintea tratamentelor radioterapeutice are efect radioprotectiv prin creșterea aportului de celule progenitoare CD34+ aflate în faza S a ciclului celular.

Mutațiile c-kit sunt asociate la șoareci cu hipopigmentare locală fără inducerea dezordinii hematologice. Administrarea SCF combinat cu G-CSF protejează șoarecii contra dozelor letale de *Candida albicans* (4).

Deficiențele în producția SCF sau în răspunsul la această citokină sunt urmate de apariția anemiei macrocitare, scăderea frecvenței mastocitelor și melanocitelor, precum și sterilitate la șoareci.

6. Trombopoietina (TPO)

Ipoieza conform căreia numărul de trombocite din sânge este controlat de un factor reglator umoral a fost propusă de Kelemen în 1958, iar factorul a fost denumit trombopoietină. Recent s-a identificat și receptorul sintetizat de protooncogenă mpl, trombopoietina fiind denumită și ligand Mpl sau factor de proliferare a megacariocitelor. Descoperirea TPO a pornit de la studiul oncogenei v-mpl, parte a genomului virusului leucemiei mieloproliferative (MPLV). Omologul celular al genei codifică un receptor hematopoietic de citokine implicat în diferențierea liniei megacariocitice (26).

Surse. Se cunoaște puțin despre sursele fiziologice ale producției de TPO. S-a identificat ARNm al transcripției TPO umană în ficat, rinichi, splină și celulele stromale din măduva hematogenă.

Structura. Caracterizarea TPO umană a fost posibilă prin obținerea proteinei recombinante produsă în cultură de celule. TPO este o proteină alcătuită dintr-un lanț polipeptidic de 332 aminoacizi cu masa moleculară de 35 kDa. În regiunea N-terminală există un domeniu omolog cu eritropoietina ce conține patru cisteine conservate, unite prin două punți disulfidice. Domeniul C-terminal conține 6 situsuri de glicozilare, cele două domenii N și C terminale fiind separate de un dipeptid Arg-Arg.

Gena codificatoare a TPO umană are structură similară cu gena EPO, ceea ce presupune că aceste gene au evoluat dintr-o secvență ancestrală comună prin duplicarea genei. Există o singură genă codificantă a TPO localizată pe cromosomul 3q26-27.

Receptorul. Este exprimat în țesuturi hematopoietice (splină, măduvă hematogenă), celule progenitor hematopoietice CD34+, megacariocite, trombocite și celule endoteliale. Receptorul uman Mpl a fost caracterizat și clonat în 1992 și este un nou membru al familiei receptorilor hematopoietinici alături de lanțul β al IL-3R și GM-CSFR. Prezintă omologie secvențială cu receptorul EPO, fiind constituit dintr-o regiune extracelulară de 463 aminoacizi care conține două motive conservate comune cu receptorii hematopoietinici -4 cisteine conservate la capătul N-terminal și pentapeptidul WSX_{AA}WS în apropierea regiunii transmembranare (22 aminoacizi) urmat de un segment citoplasmatic de 66 aminoacizi.

Gena receptorului uman Mpl este localizată pe cromosomul 1q34.

Efecte biologice. Megacariocitopoieza este procesul prin care celulele stem multipotente hematopoietice suferă diferențierea spre celulele progenitor, megacariocitele care se maturează și dau naștere la trombocite. Mai mulți factori de proliferare hematopoietici ca IL-3, IL-6, IL-11, GM-CSF, și EPO sunt implicați în megacariocitopoieză. TPO stimulează atât proliferarea cât și maturarea spre producția de trombocite, activitate accentuată prin sinergismul cu factorii amintiți precedent. Administrat la om, crește numărul de trombocite de 5-10 ori peste valorile bazale și menține crescută timp de două săptămâni producția acestora. Comparativ, IL-3, IL-6 și IL-11 stimulează de două ori numărul de trombocite circulante față de valorile normale.

Deficiențele în producția TPO sau în răspunsul la această citokină sunt urmate de scăderea numărului megacariocitelor și a plachetelor circulante.

7. Interleukina-3 (IL-3)

Interleukina 3 acționează pe numeroase celule țintă din sistemul hematopoietic astfel că a fost denumită factor stimulator al multiplelor colonii de celule hematopoietice (factor al proliferării mastocitelor, CSF megacariocitar, CSF al eozinofilelor, multi-CSF).

Surse. IL-3 este produsă de limfocitele T activate (predominant subpopulația T CD4+), mastocitele activate și celulele stromale din măduva hematogenă. Stimularea limfocitelor T prin antigene specifice sau lectine duce la apariția producției de IL-3 la 12-20 ore de incubare, subsetul TCD4+ producând de 10-100 de ori mai multă citokină decât subsetul TCD8+. În situații rare este detectată în circulație, după stimularea antigenică a șoarecilor imunizați, în cursul transplantului sau după injecția cu anticorpi anti-CD3.

Structura. Prezintă similitudine structurală cu alte interleukine și factori de proliferare hematopoietici. Este constituită dintr-un lanț polipeptidic de 14 kDa (133 aminoacizi) puternic glicozilat. Genele codificatoare ale IL-3 și GM-CSF la om sunt strâns unite și plasate pe cromosomul 5q21-23, o regiune care conține genele pentru mai mulți factori de proliferare hematopoietici, ceea ce susține evoluția comună ancestrală.

Receptorul. IL-3R este un heterodimer constituit din două lanțuri care fac parte din superfamilia receptorilor hematopoietici. Aceste lanțuri sunt :

- lanțul α care leagă specific IL-3 cu slabă afinitate și este omolog cu lanțurile α ale receptorilor GM-CSF și IL-5;
- lanțul β care este comun la om cu receptorii GM-CSF și IL-5. Ca atare cele trei citokine posedă un lanț β comun (β_c). IL-3 poate lega cu slabă afinitate fie lanțul α , fie lanțul β . În schimb, complexul $\alpha\beta$ constituie receptorul de înaltă afinitate.

Competiția între IL-3, IL-5 și GM-CSF pentru lanțul β_c are loc pe celulele care exprimă receptori pentru mai mult de una dintre aceste trei citokine. Astfel, lanțul β_c poate interacționa cu unul din cele trei lanțuri α specifice (IL-3, IL-5, GM-CSF și ligandul specific generează complexe receptor-ligand specifice cu înaltă afinitate). Există o ierarhie legată de capacitatea acestor citokine de a interacționa cu receptorii lor heterodimerici de înaltă afinitate. De exemplu, la concentrații echivalente pe eozinofile, GM-CSF leagă componenta β_c mai mult decât IL-3 și IL-3 mai mult decât IL-5. Această ierarhizare ar fi legată fie de densitatea expresiei lanțului α specific, fie de abilitatea diferențiată a lanțului α de a se asocia cu lanțul β_c sau de afinitatea diferită a receptorului heterodimeric.

Dacă implicațiile competiției celor trei citokine pentru componenta β_c rămân neelucidate până în prezent, este clar că interacțiunea ligand-receptor are efect asupra celulelor țintă și că expresia unui număr limitat de lanțuri β_c previne posibila hiperstimulare a semnalizării intracelulare a celulei țintă.

Transducerea semnalului este mediată prin lanțul β_c al IL-3R. Domeniul citoplasmatic al lanțului α este scurt și prezintă relativă omologie cu lanțul α al GM-CSFR, ceea ce sugerează că domeniul citoplasmatic al lanțului α nu este esențial pentru generarea semnalului de proliferare, ci doar pentru legarea ligandului.

Lanțul β al IL-3R are un domeniu citoplasmatic lung și este responsabil de transducerea semnalului ca urmare a interacțiunii ligandului cu dimerul $\alpha\beta_c$, receptor de înaltă afinitate. În ciuda absenței activității tirozinkinazice intrinseci, unul din primele evenimente observate după legarea ligandului este inducția fosforilării reziduurilor tirozinice ale substratelor intracitoplasmatic, sugerată de capacitatea retrovirusurilor care exprimă oncogene cu o activitate tirozinkinazică (v-abl, v-src, v-fms) de a induce proliferarea liniilor dependente de IL-3 în absența factorului de creștere. Evenimentul central al semnalizării constă în transformarea conformațională a lanțului β în urma interacțiunii cu lanțul α specific care angajează mecanisme dependente de activarea tirozinkinazei Jak2 și MAP kinazei.

În cazul privării de IL-3 în culturile de celule, P53 este importantă în activarea apoptozei, însă mecanismul este încă neclar. Se pare că P53 acționează asupra caspazelor; în celulele leucemice mieloide M1, supraexpresia genei p53 induce activarea cascadei caspazelor, iar incubarea acestor celule cu IL-6 poate inhiba acest proces mediat de P53. Supraexpresia P53 induce transcripția proteinei proapoptotice Bax, ca și DR5, un receptor de

suprafață implicat în activarea caspazelor. Supraexpresia P53 în cancerul colorectal duce la inducerea unor gene inductibile de către P53 (PIGS). Dintre cele 14 gene identificate, unele codifică enzime implicate în producerea sau reglarea speciilor de oxigen reactiv (ROS). Inducerea acestor enzime generează ROS, denaturarea oxidativă a mitocondriei, eliberarea proteinelor din aceasta și activarea caspazelor (13).

Activarea Ras (prin complexul intermediar Shc-grb2-SOS sau Vav) pe calea Raf / MAPK crește expresia protooncogenelor c-myc și c-fos corelate cu proliferarea celulară și durata de supraviețuire a celulelor țintă. Fosfatazele HCP (fosfataza celulei hematopoietice) sunt implicate de Jak-2 și joacă un rol reglator negativ. Se pare că IL-3, GM-CSF și EPO induc sinteza unei molecule CIS (citokină ce induce proteina care conține SH2) care se fixează pe tirozinele fosforilate ale părții distale a receptorului putând avea un efect reglator negativ asupra acestuia (4).

Efecte biologice. IL-3 este factorul major al controlului proliferării și diferențierii celulelor precursor hematopoietice.

Asupra progenitorilor hematopoietici:

- induce formarea coloniilor de granulocite, macrofage, eozinofile și megacariocite;
- acționează asupra stadiilor precoce ale diferențierii eritrocitelor și induce formarea globulelor roșii în prezența eritropoietinei;
- induce formarea de colonii mixte (GEMM) și celule blastice;
- stimulează proliferarea și diferențierea mastocitelor la șoareci și a bazofilelor la om;
- stimulează sinteza histaminei;
- crește activitatea arginazei și ornitindecarboxilazei;
- induce expresia Thy-1 pe precursorii hematopoietici precoce;
- induce expresia receptorilor IL-1 pe celulele medulare umane;
- blochează diferențierea celulelor NK la șoareci.

Asupra celulelor mature:

- modifică morfologia și activitatea fagocitară a macrofagelor;
- induce expresia LFA-1, CD11a și a Ag CMH II la suprafața macrofagelor;
- acționează sinergic cu LPS la producerea IL-1, IL-6, TNF α de către macrofage;
- facilitează citotoxicitatea monocitelor ca răspuns la un stimul secundar;
- modulează producerea histaminei de către bazofile, ca răspuns la agenții degranulanți;
- stimulează activitatea funcțională a eozinofilelor precum fagocitoza și producția de superoxizi.

IL-3 sinergic cu M-CSF generează macrofage mature, sinergic cu G-CSF generează neutrofile mature. Stimulează proliferarea și activitatea funcțională a mastocitelor, redundant cu IL-4, IL-9 și IL-10 și asigură supraviețuirea subpopulației de mastocite asociate suprafeței mucoaselor. În ansamblu, cel mai proeminent efect al IL-3 se produce în etapele inițiale ale diferențierii hematopoietice. Celulele țintă ale acțiunii IL-3 includ celulele progenitor ale fiecărei linii derivate din celulele stem pluripotente hematopoietice, cu excepția celulelor progenitor ale liniei limfoide (4,18).

Deficiențele în producția IL-3 sau în răspunsul la această citokină sunt urmate de apariția sindroamelor limfoproliferative pre-B (translocația 5;14).

FACTORI DE STIMULARE A COLONILOR

CITOKINA	SURSA	BIOCHIMIE	GENA	RECEPTOR	EFECTE
G-CSF (CSF β)	Macrofae activate, celule endoteliale, fibroblaști	Monomer glicoproteic de 19kDa; structură de mănunchi de 4 α -helixuri. Glicozilarea nu este necesară pentru activitate, dar contribuie la stabilitatea moleculei. Prezintă două punți disulfidice.	17q21-22	Hematopoietinic Activ sub formă de dimer. Exprimat pe celulele blastice, PMN, monocite.	Stimulează specific proliferarea și diferențierea progenitorilor neutrofilelor. Prelungește supraviețuirea neutrofilelor mature și le stimulează capacitatea funcțională prin creșterea capacității fagocitare.
GM-CSF (CSF α , CSF 2)	Limfocite T activate, macrofae, celule endoteliale, fibroblaști	Structură de mănunchi de 4 α -helixuri situate antiparalele; 14kDa; două situsuri de glicozilare	5q23-31	Hematopoietinic două lanțuri distincte: α care formează complexul heterodimeric $\alpha\beta$ al receptorului de înaltă afinitate și β comun cu al receptorului IL-3 și IL-5 (fenomen de redundanță a activității biologice)	Are efect direct asupra proliferării celulelor progenitor mieloid și diferențierii subpopulațiilor mature de granulocite și macrofae. Stimulează celulele dendritice în procesarea antigenului.
M-CSF (CSF 1)	Celule endoteliale, fibroblaști, celule stromale medulare, celule epiteliale timice și keratinocite	Structură de mănunchi de 4 α -helixuri antiparalele Homodimer de 26kDa stabilizat prin punți disulfidice.	1p13-21 *c-fms pe 5q21-32	Apartine superfamiliei de receptori imunoglobulinici cu activitate tirozin-kinazică intrinsecă. Este codificat de protooncogena c-fms.	Reglează producția de monocite; dezvoltă și menține macrofagele în ficat, rinichi, splină, timus și ganglioni limfatici. Stimulează funcția macrofagului matur.
SCF (Factor Steel, factor de creștere a mastocitelor)	Celule endoteliale, keratinocite, celule din creier, plămâni, gonade, timus, splină, piele, etc.	Structură de mănunchi de 4 α -helixuri. Homodimer, glicozilat.	12q22-24 *c-kit pe 4q11-21	Apartine superfamiliei de receptori imunoglobulinici cu activitate tirozin-kinazică intrinsecă. Este codificat de protooncogena c-kit.	Acționează pe celulele stem pluripotente și pe celulele precursor angajate pe linia mieloidă. Reglator al funcției mastocitelor. Determină proliferarea melanocitelor fără a influența producția de melanină. Previne apoptoza celulelor germinale și intervine în spermatogeneză.

Multi CSF (IL-3)	Linfocite T activate (predominant CD4+), mastocite activate și celule stromale din măduva hematogenă	Proteină de 14 kDa puternic glicozilată.	5q21-23	Heterodimer constituit din două lanțuri care fac parte din familia receptorilor hemato-poietinici: lanțul α cu slabă afinitate (omolog cu lanțurile α ale GM-CSFR, IL-5R și EpoR) necesar pentru legarea ligandului și lanțul β comun cu GM-CSFR, IL-5R și TpoR necesar pentru transducerea semnalului..	Este factorul major al controlului proliferării și diferențierii celulelor precursor hematopoietice. Crește durata de supraviețuire a acestor linii celulare. Crește expresia HLA II pe macrofage.
EPO	La făt în ficat și la adult în fibroblaștii aparatului juxtaglomerular	Proteină de 34 kDa puternic glicozilată. Structură de mă-nunchi de 4 α -helixuri, acțiunea ca monomer. Reglarea sintezei este controlată de hipoxia renală.	7q11-22	Hematopoietinic.	Stimulează formarea și proliferarea unităților de colonii entroide (CFU-E) cu formarea de eritrocite mature și reticulocite; stimulează sinteza de hemoglobină. Induce formarea de colonii megacariocitare și le stimulează maturarea.
TPO	Ficat, rinichi, splină, celule stromale din măduva hematogenă.	Proteină de 35 kDa, structură de 4 α -helixuri, asemănătoare cu EPO.	3q26-27 *c-mpl pe 1q34	Hematopoietinic. Codificat de protooncogen c-mpl.	Este principalul factor regulator fiziologic al megacariocitopoiezei stimulând proliferarea cât și maturarea spre producția de trombocite.

Eepresia factorilor de stimulare a coloniilor în diverse tipuri de cancer

Există mai multe mecanisme prin care o celulă malignă își asigură în mod autonom creșterea, independent de factorii stimulatori exogeni. Aceste procese sunt întâlnite izolat sau în asocieri în diferite tumori, fiind reprezentate de:

- producția endogenă de factori de creștere și stimularea autocrină;
- alterări ale receptorului membranal pentru factori de creștere și alterarea mecanismelor de semnalizare intracelulară;
- lipsa de reacție față de factorii inhibitori.

Citokinele sunt proteine sau glicoproteine care intervin în numeroase procese celulare; pot fi produse de celule localizate în zone îndepărtate de regiunea asupra căreia își exercită influența (stimulare endocrină) sau în zone învecinate (stimulare paracrină). De asemenea, factorii de creștere pot fi produși de o celulă în folosul propriu, conform ipotezei autocrine: o celulă anormală începe să producă citokine care vor susține creșterea aberantă prin legarea la un receptor specific localizat pe suprafața celulei sau în rețeaua intracelulară (în acest ultim caz, secreția extracelulară a factorilor de creștere nu este necesară, din moment ce există un circuit intracelular, proces denumit “stimulare juxtacrină”).

Dacă celula este continuu sub stimul proliferativ, poate eluda mecanismele de control al creșterii. Odată ce factorul de creștere se leagă de receptorul specific, acesta se activează și semnalul de transducere trece din membrană în citoplasmă cu producere de mesageri secundari și terțiari ce influențează factorii implicați în proliferare. Dereglările în punctele de transducere a semnalului duc la pierderea controlului asupra creșterii celulei; de aceea unele gene codifică factori de creștere, receptori pentru factorii de creștere sau proteine ce intervin în transducție și corespund protooncogenelor. Astfel, activarea lanțului de semnalizare a citokinelor poate urma calea normală a dezvoltării și progresiei prin ciclul celular sau, prin alterarea sa poate duce la apariția tumorilor.

La pacienții cu leucemie acută mieloidă (LAM) s-au detectat receptori specifici pentru G-CSF și GM-CSF utili pentru proliferare. Blaștii leucemici de la pacienții cu subtipul LAM 3 prezintă receptori pentru G-CSF în număr mare. S-a observat că nu numai celulele tumorale din leucemia acută sau cronică mieloblastică exprimă receptori pentru G-CSF, ci și celulele din cancerul bronșic cu celule mici.

Genele reglatoare ale GM-CSF, CSF-1, CSF-1R de pe cromosomul 5 sunt frecvent deletate la pacienții cu neoplazii mioide, însă nivelele CSF-1R și CSF-1 se corelează și cu agresivitatea altor tipuri de carcinoame ca de pildă a cancerului ovarian sau carcinomului endometrial.

Integrarea provirusului la extremitatea genei CSF-1R duce la creșterea expresiei receptorului în celulele multipotente și în final, la leucemie mieloidă. Două substituții în pozițiile 301 și 374 din domeniul extracelular al receptorului CSF-1 sunt vitale pentru transformare; mimează efectul ligandului rezultând astfel un receptor activat permanent în absența ligandului.

S-au studiat trei linii de carcinom de prostată: DU145, PC-3 și LNCa P și s-a constatat că toate produc GM-CSF și M-CSF, iar primele două și SCF. Fiecare exprimă receptori pentru aceste citokine, ceea ce a dus la concluzia că ar exista o buclă para-/ autocrină ce modulează activitatea celulelor din acest tip de cancer (21).

Receptorul c-kit este exprimat puternic în leucemia acută mieloblastică, mastocitoame, carcinoame anaplastice. Coexpresia SCF sugerează instalarea unei bucle autocrine de creștere pentru tumori. Dovada unui metabolism alterat al SCF este dată în mastocitozele cutanate (2).

Cancerile producătoare de CSF sunt mai puțin frecvente; un exemplu este cancerul de tiroidă în care sunt produși G-CSF și GM-CSF. De asemenea, producția de CSF poate fi marker al stadiilor imature ale hepatocitelor din carcinomul hepatocelular.

Unele linii de carcinom al cavității bucale și cancer pulmonar cu leucocitoză și cașexie produc cantități mari de CSF evidențiind așa-numitul sindrom paraneoplazic.

Pe linie mieloidă, două din trei cazuri de LAM cu proliferare autonomă in vitro demonstrează că proliferarea este combinată cu producția de CSF. Consecința expresiei genei CSF în celulele leucemice nu este clară; probabil CSF insuficient, este produs pentru a menține creșterea in vitro, celulele rămânând dependente de CSF exogen pentru stimularea proliferării.

Unele populații de celule pot exprima CSF pe plasmalemă fără a elibera molecule, contactul celulă-celulă fiind suficient pentru stimularea blaștilor leucemici.

Megacariocitopoieza normală și leucemică sunt stimulate de GM-CSF prin creșterea expresiei antigenului specific CD41 și a antigenelor mioide CD34, CD33, CD13. Localizarea genei GM-CSF aproape de cea a IL-3 conduce la ipoteza înrudirii ancestrale a acestora, însă pentru că nu există o aparentă omologie între aceste proteine se sugerează totuși, că nu ar fi descendenții unei gene ancestrale și nici rezultatul unei duplicații genice.

Concentrații mari de M-CSF au fost detectate în cursul unor neoplazii precum și în boli autoimune și infecții. În afară de posibilul rol de stimulator autocrin sau paracrin al expansiunii unor adenocarcinoame, M-CSF ar putea servi ca marker suplimentar de diagnostic și prognostic în carcinomul ovarian și endometrial, în lupusul eritematos și purpura imună trombocitopenică.

Limfoamele T ca EL-4 sau LBRM 33 produc IL-3, iar principala linie tumorală nonT capabilă să producă IL-3 constitutiv este WEHI 1, fapt explicat prin inserția unui element retroviral la capătul 5' al genei pentru IL-3, aproape de promotorul acesteia (4).

Utilizarea factorilor de stimulare a coloniilor în tratamentul cancerului

Aplicarea CSF în chimioterapie este comună. În organism există o rețea flexibilă a interacțiunilor între reglatorii pozitivi (citokine și interleukine) și negativi (TNF și TGFβ). Malignitatea poate fi redusă în unele tipuri de celule leucemice prin inducerea diferențierii de către citokine, punându-se astfel bazele pentru uzul clinic al citokinelor în terapie. Unele CSF supresează apoptoza inducând multiplicarea și diferențierea celulelor normale și leucemice. Un exces de citokine poate crește rezistența celulelor tumorale la terapia citotoxică. Statutul ciclului celular este intim reglat în acord cu funcția celulelor stem aflate în stare dormantă pentru autoreînnoirea populației de progenitori imaturi. Sunt menținute în G0/G1 pentru a exprima eficient variate gene. Inhibarea fosforilării proteinei Rb și a activității E2F prin efectele factorilor de creștere negativi precum TGF și IFN este importantă pentru oprirea ciclului celular al celulelor stem. Derepresia de către kinazele dependente de ciclone activate la rândul lor de către citokine este asociată cu expansiunea celulelor progenitoare (11).

Din 1991 s-a aprobat tratamentul cu G-CSF și GM-CSF, iar în prezent medicii preferă să folosească aceste citokine decât să micșoreze doza de chimioterapice. RhG-CSF sunt utile

clinic în formă glicozilată (lenograstim) și neglicozilată (filgrastim) însă forma glicozilată pare a fi cea mai eficientă (19).

Factorii endogeni mieloizi au demonstrat abilitatea de a fi administrați pacienților imunosupresați. Acești agenți sunt asociați cu scăderea în infecțiile asociate, antibioterapia timpul spitalizării și mortalitatea. Sunt comercializați GM-CSF (sargramostim, leukine) care duc la proliferarea și diferențierea progenitorilor liniei mieloide în timp ce G-CSF (filgrastim, neupogen) acționează selectiv pe granulocite. Se sugerează că GM-CSF crește recuperarea compartimentului neutrofilelor, prevenirea infecțiilor, scăderea duratei diareei, stimularea formării celulelor dendritice și prevenirea infecțiilor acționând ca un agent adjuvant în prevenirea dezvoltării neoplazice (3).

Un număr de studii au comparat filgrastimul cu sargramostimul. Cel puțin pentru GM-CSF tolerabilitatea este dependentă de gradul de glicozilare a proteinei; de exemplu proteina neglicozilată, molgramostim disponibilă în Europa, pare a fi asociată cu o mare toxicitate (23).

GM-CSF și G-CSF sunt utilizate după transplantul de măduvă osoasă pentru a accelera refacerea țesutului, tratamentul fiind urmat de mai puține infecții și reducerea zilelor de spitalizare (25). Celulele hematopoietice CD34+ din sângele periferic mediază reconstrucția hematopoietică la pacienții canceroși, după transplantul autolog și poate fi generalizată în prezența CSF. Celulele prezentatoare de antigen funcționale sunt generate și extinse în culturi cu CD34 în care se observă și apariția antigenelor unor tumori ale sistemului imunitar (16).

Teste cu G-CSF și GM-CSF în tratarea supresiei după chimioterapie au demonstrat reducerea duratei neutropeniei, mai ales dacă sunt asociate cu antibiotice. Uzul CSF în LAM rămâne controversat; include scurtarea neutropeniei, inducerea intrării celulelor leucemice în faza S a ciclului celular, protecția celulelor stem, inducerea diferențierii celulelor tumorale, întreruperea buclelor para- și autocrine, inhibarea directă a leucemogenezei și creșterea activității antimicrobiene (10).

În acest scop, s-a investigat răspunsul celulelor leucemice la CSF prin teste de încorporare a ³HT și s-a observat că subtipurile LAM 1 și 3 răspund la tratarea cu G-CSF, IL-3 și GM-CSF, în timp ce alte linii nu răspund, dar au creștere autonomă. Celulele tumorale din leucemia acută limfoblastică (LAL) nu răspund, evidențiindu-se astfel efectul țintit al acestor citokine pe linia mieloidă (7).

De asemenea, un experiment pe 12 pacienți tratați cu diferite citokine a relevat faptul că administrarea rh-GM-CSF induce expresia CMH I și II de pe monocite, în timp ce tratarea cu G-CSF este urmată de creșterea expresiei doar a CMH I. Prin aceasta este demonstrată capacitatea CSF-urilor de a crește citotoxicitatea monocitelor (27).

Efectele CSF asupra celulelor leucemice este divers: 20% dintre celule nu răspund, 25% proliferază doar în prezența GM-CSF, 15% proliferază doar în prezența G-CSF iar 40% proliferază în prezența complexului G-CSF+GM-CSF (8).

GM-CSF, spre deosebire de G-CSF, are efecte diferite asupra apoptozei neutrofilelor mature: GM-CSF poate inhiba apoptoza, astfel că neutrofilele își exercită eficient funcțiile, în timp ce G-CSF acționează în scopul creșterii numărului de polimorfonucleare (12). S-au efectuat studii pe loturi de pacienți cu cancer mamar la care s-a administrat G-CSF subcutan timp de 5 zile (10 μg/kg); ciclofosfamidă și GM-CSF (5 μg/kg) cu G-CSF (10 μg/kg). Chimioterapia combinată este mai eficientă în mobilizarea celulelor CD34+ (66%) comparativ cu lotul de pacienți care au primit numai G-CSF (14%) (15).

Filgrastim nu numai că ridică numărul neutrofilelor, dar are efect și asupra funcțiilor lor. Nu are efect surprinzător pe monocite sau macrofage dar poate acționa ca stimulator

asupra celulelor dendritice care induc formarea limfocitelor Th2 . Aceste celule dendritice facilitează răspunsul imun umoral dar produc și citokine inhibitoare care diminuează imunitatea mediată celular. Sargramostim este un CSF multilinear, afectând neutrofilele, monocitele, macrofagele și celulele dendritice. Are un impact mai mare asupra celulelor dendritice care induc limfocitele Th1 ce facilitează răspunsul imun mediat celular, inclusiv activitatea antitumorală. Acțiunea sargramostimului asupra celor două tipuri de celule prezentatoare de antigen (macrofage și celule dendritice) crește recuperarea neutrofilelor la pacienții cu leucemie și după transplantul de celule stem (24).

Splenocitele și macrofagele cultivate cu doze scăzute de aspirină (10 μg/ml) sunt capabile să producă IL-3 în cantitate mai mare decât dacă în cultură nu se găsesc decât splenocite. Aspirina este stimulator indirect al producției IL-3, deoarece induce eliberarea leucotrienelor și implicit activarea macrofagelor.

Și la pacienții infectați cu virusul HIV citokinele sunt eficiente: pentru tratarea anemiei care survine frecvent în această maladie se administrează eritropoietină atunci când nivelul acesteia scade sub 500 IU/L; de asemenea GM-CSF este util în prevenirea neutropeniei la bolnavii tratați cu zidovudină și IFN γ pentru sarcomul Kaposi (9, 20).

Există și contraindicații în tratamentul cu CSF; de exemplu, în limfoame citokinele pot grăbi neuropatia severă atipică în combinație cu vincristina.

S-au raportat efecte secundare cutanate după administrarea subcutanată a GM-CSF la pacientele cu cancer de sân iar analiza histologică a relevat infiltrații cu limfocite, monocite, macrofage, neutrofile și ocazional eozinofile (14).

SCF administrat subcutan în carcinomul pulmonar duce la apariția reacțiilor alergice locale, rar la reacții anafilactice sistemice, însă trebuie asociat cu alte citokine întrucât singur nu induce modificări relevante.

1. **Aronica S. M., Broxmeyer H. E.** (1996) – *Advances in understanding the postreceptor mechanisms of action of GM-CSF, G-CSF and Steel factor* – Current Opinion în Hematology, 3(3):185-90.
2. **Bearman S. I.** (1997) – *Use of stem cell factor to mobilize hematopoietic progenitors* – Current Opinion în Hematology, 4(3):157-62.
3. **Buchsel P. C, Forgey A., Grape F. B., Hamann S. S.** (2002) – *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: current practice and novel approaches* – Clin. J. Oncol. Nurs. 6(4):198-205.
4. **Cavaillon J. M.** (1996) – *Les cytokines* – Ed.Masson, Paris, 119-137.
5. **Cross M., Dexter T.** (1999) – *Growth factors in development, transformation and tumorigenesis* - Cell, 64:271-280.
6. **Danova M., Aglietta M.** (1997) – *Cytokine receptors, growth factors and cell cycle in human bone marrow and peripheral blood hematopoietic progenitors* - Haematologica, 82:622-629.
7. **Dombret H.** (1996) – *Granulocytic colony-stimulating factors in the management of patients with acute myeloid leukemia* – Hematology and Cell Therapy, 38(3):231-40.
8. **Estey E.** (1998) – *Hematopoietic growth factors in the treatment of acute leukemia* – Current Opinion în Oncology, 10(1):23-30.
9. **Frumkin L. R.** (1997) – *Role of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the treatment of patients with HIV infection* – Current Opinion în Hematology, 4(3):200-6.
10. **Furukawa Y.** (1997) – *Cell cycle control during hematopoietic cell differentiation* – Human Cell, 10(3):159-64.
11. **Habenicht A.** (1990) – *Growth Factors, Differentiation Factors and Cytokines* - Edit. Springer, Berlin.

12. **Hu B., Yasui K.** (1997) – *Effects of colony-stimulating factors (CSFs) on neutrophil apoptosis: possible roles in inflammation site* – International Journal of Hematology, 66(2):179-88.
13. **Johnson D. E.** (1998) – *Regulation of survival pathways by IL-3 and induction of apoptosis following IL-3 withdrawal* - Frontiers in Bioscience 3:313-324.
14. **Locker G. J., Simonitsch I., Mader R. M.** (1995) – *Cutaneous side effects in breast cancer patients treated with cytostatic polychemotherapy and rhGM-CSF: immune phenomena or drug toxicity?* – Breast Cancer Research and Treatment, 34(3):213-9.
15. **Meisenberg B., Brehm T., Schmeckel A., Miller W., McMillan R.** (1998) – *A combination of low-dose cyclophosphamide and colony-stimulating factors is more cost effective than granulocyte stimulating factors alone in mobilizing peripheral blood stem and progenitor cells* – Transfusion, 38(2):209-15.
16. **Muench M. O., Roncarolo M. G., Rosnet O., Birnbaum D., Namikawa R.** (1997) – *Colony-forming cells expressing high levels of CD34 are the main targets for granulocyte colony-stimulating factor and macrophage colony-stimulating factor in the human fetal liver* - Experimental Hematology, 25(4):277-87.
17. **Palumbo G., Cacciola E., Guglielmo P., Guistolisi R.** (1994) – *Relationship between growth factors, oncogenes and cytokines in the mechanism of aberrant hematopoiesis* – in Hemopoietic Growth Factors, Oncogenes and Cytokines in Clinical Hematology, Ed. Karger, 4-17.
18. **Păunescu V., Tatu C., Stănescu D., Medrea D.** (1996) – *Imunologie-concepte fundamentale și aplicative*, Ed. Helicon, Timișoara, 182-189.
19. **Pedrazzoli P., Gibelli N., Pavesi L.** (1996) – *Effects of glycosylated and non-glycosylated G-CSFs, alone and in combination with other cytokines, on the growth of the human progenitor cells*, Anticancer Research, 16(4A):1781-5.
20. **Perella O., Finelli E., Perella A., Tartaglia G., Scognamiglio P., Scalera G.** (1996) – *Combined therapy with zidovudine, recombinant granulocyte colony-stimulating factors and erythropoietin in asymptomatic HIV patients*, Journal of Chemotherapy, 8(1):63-6.
21. **Peretz A.** (1995) – *Bone following the menopause* – Revue Medicale de Bruxelles, 16(4):280-4.
22. **Savarese D. M., Valinski H., Quesenberry P., Savarese T.** (1998) – *Expression and function of colony-stimulating factors and their receptors in human prostate carcinoma cell lines*, Prostate, 34(2):80-91.
23. **Sylvester R. K.** (2002) – *Clinical applications of colony-stimulating factors: a historical perspective*, Am JHealth Syst Pharm 1:59(7 Suppl 2):S6-12.
24. **Stull D. M.** (2002) – *Colony-stimulating factors: beyond the effects on hematopoiesis* - Am .J. Health Syst. Pharm., 1;59 (7Suppl 12):S12-20.
25. **Walton S. M.** (1998) – *Therapeutic use of colony stimulating factors for established neutropenic fever*, West Virginia Journal, 94(1):26-8.
26. **Wendling F., Vainchenker W., Debili N., Methia N.** (1995) – *Mpl ligand (thrombopoietin) and regulation of Ratelet production*, Hematologie, Vol. 1, Issue 2, pp. 89-105.
27. **Wiltschke C., Krainer M., Wagner A.** (1995) – *Influence of in vivo administration of GM-CSF and G-CSF on monocyte cytotoxicity*, Experimental Hematology, 23(5):402-6.

FIBRONECTINA (FN) – GLICOPROTEINĂ DE MATRICE EXTRACELULARĂ

Matricea extracelulară conține numeroase **glicoproteine de adeziune** care leagă atât celulele, cât și alte macromolecule matriceale și astfel ajută celulele să se atașeze la matricea extracelulară. Cel mai bine caracterizată dintre aceste glicoproteine adezive este **fibronectina**, o glicoproteină mare, organizată în fibrile, descoperită peste tot în lumea animală. Fibronectina este un dimer compus din două subunități similare (fiecare având aproximativ 2500 resturi de aminoacizi). Aceste subunități sunt menținute împreună de către o pereche de punți bisulfurice aflate în vecinătatea capătului carboxi-terminal și sunt organizate într-o serie de domenii globulare, separate prin regiuni polipeptidice flexibile. Studiile de secvențiere arată că o moleculă de fibronectină este compusă, în principal, din trei tipuri de secvențe scurte de aminoacizi repetate de mai multe ori, sugerând că gena pentru fibronectină implică multiple replicări a trei gene mai mici. (1)

Fibronectina este o glicoproteină multifuncțională ($M = 530 \text{ kg/mol}$) a matricei extracelulare (ECM), având un rol major în adeziunea celulară. În condiții fiziologice, conformația acestei proteine rămâne în continuare dezbătută și controversată. (2)

Fibronectina există sub trei forme: (1) o formă dimerică solubilă, numită *fibronectină plasmatică*, care circulă în sânge și în alte fluide ale organismului, unde se crede că e implicată în coagularea sângelui, vindecarea leziunilor și fagocitoză; (2) oligomeri de fibronectină pot fi găsiți tranzitiv atașați la suprafața celulelor (*fibronectina de suprafață celulară*); și (3) forme fibrilare de fibronectină înalt insolubilă în matricea extracelulară (*fibronectina matriceală*). Pe suprafața celulelor și în agregatele matriceale, dimerii de fibronectină sunt legați unul la celălalt prin legături bisulfurice adiționale.

Fibronectina este o moleculă multifuncțională în care variatele domenii globulare joacă roluri diferite. De exemplu, un domeniu se leagă la collagen, altul la heparină, altul la receptori specifici de pe suprafața variatelor tipuri de celule, și așa mai departe. În acest fel fibronectina contribuie la organizarea matricei și ajută celulele să se atașeze la aceasta.

Rolurile jucate de către diferitele domenii, și în particular de către domeniile de legare la celule, au fost analizate prin clivarea proteolitică a moleculei sau prin sinteza chimică a fragmentelor proteice specifice sau prin tehnici de splicing alternativ al ADN. Astfel, un domeniu responsabil de activitatea de legare celulară a fost izolat din fragmentele proteolitice și i-a fost determinată secvența de aminoacizi. Peptidele sintetice corespunzătoare diferitelor segmente ale acestui domeniu au fost preparate și folosite pentru a localiza activitatea de legare a celulelor la o secvență specifică tripeptidică (Arg-Gly-Asp sau R-G-D). Peptidele ce conțin această **secvență RGD** competiționează pentru situsul de legare de pe celule și astfel inhibă atașarea celulelor la fibronectină; și când aceste peptide sunt cuplate la o suprafață solidă, determină celulele să adere la această suprafață. Secvența RGD nu este limitată la fibronectină. Este un motiv comun într-o mare varietate de proteine adezive extracelulare, și este recunoscut de către o familie de receptori de suprafață omologi care leagă aceste proteine. În ciuda acestei secvențe tripeptidice comune descoperite la situsurile recunoscute de către

acești receptori, fiecare receptor recunoaște specific micul său set de molecule de adeziune. Astfel, legarea receptorului trebuie să fie dependentă de alte părți ale secvenței de proteine de adeziune. (1)

A fost făcută o analiză a îndoirii a celui de-al zecelea reziduu al domeniului fibronectină tip III (fnIII) din fibronectina umană (FNfn10), ceea ce corespunde reziduiului 94. Experimentele au arătat că FNfn10 este semnificativ mai stabilă decât s-a raportat până acum. Compararea parametrilor cinetici și de echilibru au arătat prezența unui intermediar acumulat în concentrații denaturante mici. S-a demonstrat că domeniul omolog al tenascinului uman (TNfn3) se îndoiaie printr-un mecanism de stare dublă, dar aceasta nu indică neapărat că cele două proteine se pliază pe căi diferite. (3)

Reglarea expresiei fibronectinei

Multiple forme de fibronectină sunt produse prin splicing alternativ ARN.

Fiind un membru al mării familii a moleculelor de adeziune ce conțin secvența RGD, însăși fibronectina poate avea forme variate; chiar lanțurile polipeptidice ale aceluiași dimer pot avea diferențe minore. Totuși, toate lanțurile polipeptidice diferite ale fibronectinei sunt codificate de către o singură genă mare care, la șobolan este mai mare de 70 kb și conține 50 exoni, făcând-o una dintre cele mai mari gene caracterizate până acum. Transcrierea sa produce o singură moleculă mare de ARN, care produce una sau mai mult de 20 de tipuri de ARN mesager diferite, în funcție de tipul celular. Nu este clar cum aceste patternuri de ARN splicing alternativ sunt determinate sau cum lanțurile polipeptidice variate rezultate diferă funcțional. Există o oarecare dovadă că o funcție a transcriptului ARN splicing alternativ uman pentru fibronectină este aceea de adiție la moleculele de fibronectină selectate a unui domeniu de legare celulară adițional, care este distinct de situsul de legare a celulelor ce conține RGD. (1)

Deși 60% până la 80% din placa hiperplazică a intimei mature este compusă din proteine ale matricei extracelulare (ECM), se cunosc puține date despre factorii care stimulează celulele musculare netede (SMCs) să producă aceste proteine.

O componentă majoră a proteinelor ECM este fibronectina. Astfel, a fost studiată producerea de fibronectină și răspunsul său la variații factori de creștere, citokine și alte proteine ECM care sunt eliberate în timpul leziunilor vasculare. Culturile de celule musculare netede umane au fost stimulate la intervale diferite cu concentrații crescute de agonist. Fibronectina din celulele din mediu a fost testată prin imunoadsorbtie cu un anticorp specific fibronectinei. După 72 de ore de stimulare, factorul transformant de creștere beta (TGF-beta) – 10ng/mL – a avut cel mai profund efect asupra producției de fibronectină, urmat de factorul de creștere epidermală (EGF) – 100ng/mL. Surprinzător, factorii de creștere plachetară (PDGF AA, AB și BB) și factorul de creștere a fibroblaștilor (FGF) nu au stimulat producția de fibronectină. Dintre proteinele de matrice studiate, doar colagenul de tip I (20microg/mL) a stimulat producția de fibronectină, în timp ce colagenul de tip IV și laminina nu au avut nici un efect. Proteina contractilă angiotensina II (100 ng/mL) a fost un stimulator slab al fibronectinei. Studiile de producere a fibronectinei, până la 72 de ore au fost relevate dezvoltări care variază cu fiecare agonist. TGF-beta stimulează semnificativ producția precoce de fibronectină, în timp ce producția de fibronectină ca răspuns la EGF și collagen de tip I a fost la început modestă, dar a crescut cu timpul. Efectul angiotensinei II nu a devenit evident mai devreme de 72 de ore. În concluzie, citokinele, factorii de creștere și proteinele matriceale au variate efecte cantitative asupra producerii proteinelor ECM de către celulele

musculare netede umane din pereții vaselor (SMCs). Cunoașterea factorilor care influențează producerea proteinelor ECM permite proiectarea inhibitorilor specifici care previn hiperplazia intimei. (4)

Asamblarea fibronectinei matriceale este un proces cu numeroase etape dependent de integrine. Pentru a investiga rolul dinamicii integrinelor în fibrilogeneza fibronectinei a fost dezvoltată o tehnică de observare cu anticorpi pentru urmărirea simultană a două populații de integrine de către anticorpi diferiți. S-a stabilit că în timp ce receptorul $\alpha(v)\beta(1)$ al vitronectinei rămâne în interiorul contactelor focale, receptorul $\alpha(5)\beta(1)$ al fibronectinei se translocă din contactele focale în matricea extracelulară (ECM). Această translocare, asemenea unei scări rulante, are loc relativ la contactele focale la $6,5 \pm 0,7$ microm/h și este dependentă de migrarea celulară. Este indusă de ligaturarea integrinelor $\alpha(5)\beta(1)$ și depinde de interacțiunile cu citoscheletul funcțional de actină și receptorul vitronectinei. În timpul întinderii celulare, translocarea integrinelor $\alpha(5)\beta(1)$ ocupate de liganzi departe de contactele focale și de-a lungul mănunchiurilor de filamente de actină generează contacte ECM. Tensina este un component citoscheletal primar al acestor contacte ECM, și un nou inhibitor al tensinei s-a descoperit că blochează formarea contactului ECM, translocarea integrinei și fibrilogeneza fibronectinei fără a afecta contactele focale. S-a propus că integrinele $\alpha(5)\beta(1)$ translocate induc inițial fibrilogeneza fibronectinei prin transmiterea tensiunii generate de citoschelet către moleculele de fibronectină extracelulară. Blocarea acestei translocări a integrinelor de către o varietate de tratamente previne formarea contactelor ECM și fibrilogeneza fibronectinei. Aceste studii au identificat un mecanism localizat, direcțional de translocare a integrinelor pentru asamblarea matricei. (5)

Au fost studiate efectele citokinelor IL-1 α , IL-6, TNF- α , IL-4, IL-10, IL-13 și TGF- β asupra producerii de FN de către monocitele umane cultivate. IL-1 α , IL-6 și TNF- α cresc producția de FN, un indicator al activării monocitelor. Aceste citokine cresc producția de FN într-un mod dependent de doză, cu un tratament de 4 ore fiind suficient să se măsoare producția de FN prin teste radioimunologice (RIA). În compensație, IL-4, IL-10 și IL-13 inhibă puternic producția de FN indusă de citokine, în timp ce TGF- β inhibă doar parțial producerea de FN. Combinarea dozelor suboptimale de citokine (IL-1 α + IL-6, IL-1 α + TNF- α , IL-6 + TNF- α), care nu pot singure să inducă producerea unor cantități substanțiale de FN, a fost suficientă să inducă producerea de FN de către monocitele cultivate. Aceste date demonstrează că monocitele nu au nevoie întotdeauna de concentrații înalte de citokine pentru activarea in vitro, și această activare poate fi suficientă să promoveze reacțiile imune sau inflamatorii. Aceste date sugerează, de asemenea, că sigur citokinele celulelor T pot regla activarea monocitelor. (6)

Reglarea expresiei și funcției fibronectinei CS1 este realizată și de către IL-1 în celulele endoteliale. Astfel, VLA-4 este o moleculă critică de adeziune care reglează traficul celulelor mononucleare la locul inflamației. VCAM-1 este un ligand primar al VLA-4, deși fibronectina îmbinată alternativ, care conține regiunea CS1 (CS1 FN), leagă și ea la VLA-4. CS1 FN este exprimată de celulele endoteliale sinoviale din artrita reumatoidă (RA), dar factorii care reglează expresia CS1 FN nu sunt cunoscuți. Au fost incubate celule endoteliale venoase ombilicale umane (HUVEC) cu IL-1 (0,1-10 ng/ml) pentru 8-48 ore și s-a determinat FN totală și CS1 FN mRNA. Ambele erau exprimate constitutiv de către HUVEC, iar IL-1 a crescut mRNA FN totală și izoforma ce conține CS1. IL-1 a crescut, de asemenea, expresia proteinei CS1 FN pe HUVEC. IL-1 crește expresia CS1 FN de către HUVEC și crește adeziunea celulară mediată de CS1. Efectele CS1 ar putea avea eficacitate terapeutică prin blocarea recrutării celulelor producătoare de VLA-4. (7)

Stimularea celulelor cu PDGF a crescut acumulara de fibronectină. Pretratamentul cu cefarantină (0,1-2 μM) a supresat creșterea stimulată de PDGF a fibronectinei într-o manieră dependentă de doză. La o concentrație de 2 μM , alcaloidul (cefarantina) supresează aproape complet producția. În funcție de condiții, alcaloidul a inhibat tirozin fosforilarea anumitor proteine, inclusiv receptorul PDGF beta în celulele stimulate de PDGF, și, de asemenea, activitatea tirozin kinazică a receptorului prestimulat cu PDGF într-un sistem liber de celule. Mai mult decât atât, cefarantina a supresat producția de fibronectină TGF-beta stimulată la aceleași nivele ale concentrației.

Rezultatele au sugerat că cefarantina inhibă producția de fibronectină indusă de factorii de creștere, probabil prin supresia autofosforilării receptorului. (8)

Eliberarea fibronectinei adsorbite de pe suprafața culturilor sensibile la temperatură necesită activitate celulară. Astfel, au fost dezvoltate culturi celulare sensibile la temperatură prin grefarea poli-N-izopropilacrilamidei care modifică hidrofobicitatea suprafeței culturii ca răspuns la temperatură. Deși această suprafață arată hidrofobicitate similară suprafețelor culturilor celulare pe polistiren comercial și facilitează adeziunea celulară și proliferarea la 37°C, polimerii grefați devin hidrofilii sub 32°C și eliberează culturi celulare întinse fără tripsină. Detașarea celulelor reglată de temperatură necesită activitate metabolică, cu consum de ATP, transducere de semnale și reorganizarea citoscheletului. Preînvelirea acestor suprafețe cu fibronectină (FN) îmbunătățește întinderea culturilor de hepatocite mai puțin adezive, iar reducerea temperaturii culturii eliberează celulele cultivate de pe suprafața grefată cu FN adsorbită. Imunofluorescența cu anticorpi anti-FN a arătat că numai FN aplicată pe culturile celulare îngrijite este mutată de la suprafața culturilor după reducerea temperaturii. FN adsorbită la suprafața culturilor, care blochează direct atașarea celulelor, a rămas legată de suprafață după reducerea temperaturii. Un nou concept de detașare activă a celulelor este, de asemenea, pus în discuție. (9)

Integrinele – receptori pentru fibronectină

Integrinele ajută legarea celulelor la matricea extracelulară.

Pentru a înțelege cum interacționează matricea extracelulară cu celulele, trebuie să definim moleculele de suprafață celulară care leagă componentele matricei la fel ca și componentele matricei extracelulare între ele. Unii proteoglicani sunt componente integrale ale membranei plasmactice; miezul lor proteic poate fi sau inserat perpendicular pe bistratul lipidic sau legat covalent la el. Prin legarea la mai multe tipuri de componente ale matricei extracelulare, acești proteoglicani ajută la legarea celulelor la matrice. Oricum, componentele matricei extracelulare se leagă, de asemenea, la suprafața celulelor pe calea glicoproteinelor receptoare specifice. Datorită multiplelor interacțiuni dintre macromoleculele matricei în spațiul extracelular, există un tablou larg de semnificații acolo unde componentele membranei plasmactice se termină și începe matricea extracelulară. Glicocalixul celulei, de exemplu, include adesea componente din ambele compartimente.

Receptorii pentru matrice diferă de receptorii de suprafață celulară pentru hormoni și pentru alte molecule semnalizatoare solubile prin faptul că ei leagă ligandul lor cu o afinitate relativ scăzută ($K_a = 10^6$ - 10^8 litri/mol) și sunt de obicei prezenți într-o concentrație de 10-100 ori mai mare pe suprafața celulei. Acest lucru sugerează că receptorii ar putea coopera funcțional și celulele ar putea răspunde mai bine la un grup organizat de liganzi din matrice decât la molecule individuale. În sprijinul acestei idei, fragmentele solubile de legare a

celulelor aparținând componentelor matriceale de obicei nu reușesc să solicite răspunsul celular indus de aceleași componente imobilizate în matrice.

Un **receptor de fibronectină** pe fibroblastele mamaliene este unul dintre cei mai bine caracterizați receptori de matrice. A fost inițial identificat ca o glicoproteină de membrană care leagă la coloana de afinitate a fibronectinei și a putut fi izolat cu o peptidă mică ce conținea secvența RGD de legare a celulelor. Receptorul este un complex de două lanțuri polipeptidice distincte, cu greutate moleculară mare, numite α și β , asociate necovalent. Funcționează ca o legătură transmembranară care mediază interacțiunile dintre actina ce alcătuiește citoscheletul din interiorul celulei și fibronectina din matricea extracelulară. Aceste interacțiuni ce traversează membrana plasmatică pot orienta atât celulele, cât și matricea. Mulți alți receptori de matrice, inclusiv unii care leagă colagenul și laminina, au fost caracterizați și s-a demonstrat că sunt înrudiți cu receptorul de fibronectină al fibroblastului. Colectiv denumiți **integrine**, toți sunt heterodimeri cu lanțuri α și β omoloage celor ale receptorului de fibronectină. Majoritatea par să recunoască secvențele RGD ale componentelor matricei de care se leagă.

Există cel puțin trei familii în cadrul mării superfamilii de integrine; membrii unei familii au în comun lanțul β , dar diferă prin lanțul lor α . O familie include un receptor de fibronectină și cel puțin cinci alți membri. Altă familie include un receptor descoperit pe plachetele sanguine care leagă o serie de componente matriceale, inclusiv fibronectina și *fibrinogenul*, care este o proteină care interacționează cu plachetele în timpul coagulării sângelui; subiecții umani cu *boala Glanzmann* sunt deficienți genetic în acești receptori și sângerează excesiv. A treia familie de integrine constă în receptori descoperiți mai ales pe suprafața leucocitelor: una este numită *LFA-1* (lymphocyte function associated); alta este numită *Mac-1* deoarece s-a găsit mai ales pe macrofage. Acești receptori sunt implicați atât în interacțiunile celulă-celulă, cât și în cele celulă-matrice, și au o importanță critică în posibilitatea acestor celule să lupte împotriva infecțiilor. Subiecții umani cu boala numită *deficiența de adeziune a leucocitelor* sunt genetic incapabili să sintetizeze subunitatea β . Ca o consecință, leucocitele lor blochează întreaga familie de receptori, și ei suferă infecții bacteriene repetate. O parte din glicoproteinele de suprafață celulară implicate în adeziunea celulară poziționată specific în larvele de *Drosophila* aparțin, de asemenea, superfamiliei integrinelor, dar relațiile lor de înrudire cu cele trei familii găsite la mamifere nu sunt certe.

Totuși, nu toți receptorii de matrice aparțin acestei superfamilii. Unele celule, de exemplu, utilizează pentru legare o glicoproteină transmembranară aparent neînrudită cu colagenul; multe celule au proteoglicani integrați în membrană care leagă celulele la matricea extracelulară. (1)

Lanțurile de heparan sulfat din glicoproteine și sindecani leagă domeniul Hep II similar al fibronectinei, în ciuda diferențelor structurale minore.

Astfel, numeroase funcții ale proteoglicanilor heparan sulfat sunt mediate prin intermediul interacțiunilor dintre lanțurile glicozaminoglican ale heparansulfatului și ligandii extracelulari. Specificitatea de legare a ligandului pentru unele molecule, inclusiv mulți factori de creștere, este determinată de structura fină a complexului heparan-sulfat în locurile înalte sulfatate, domenii bogate-iduronate alternând cu domenii N-acetilate. Sindecan-4, un proteoglican heparan sulfat al suprafeței celulare, are un rol distinct în adeziunea celulară, sugerând că lanțurile sale pot să difere de la un proteoglican de suprafață celulară la altul. Pentru a determina rolul specific al sindecan-4 corelat cu structura distinctă a heparan sulfatului, au fost analizate lanțurile de heparan sulfat de la diferiți proteoglicani de suprafață pe întinderea unui singur fibroblast și a fost comparată abilitatea sa de legare a domeniului Hep II a fibronectinei, un ligand cunoscut că susține formarea adeziunii focale prin sindecan-

4. În ciuda maselor moleculare distincte ale glipicanului și sindecan glicozaminoglicanilor precum și a diferențelor minore în compoziția dizaharidelor și a modelului sulfatat, toate proporțiile și distribuția regiunilor sulfatate și afinitatea pentru domeniul Hep II au fost similare. De aceea, regula adeziunii cere miezul determinantilor proteici ai sindecan-4. (10)

Heparina interacționează cu o pentadecapeptidă sintetică din capătul C-terminal al domeniului de legare pentru heparină al fibronectinei.

Pentadecapeptida sintetică FN-C/H II (KNNQKSEPLIGRKKKT-NH₂) are secvența carboxi-terminală a domeniului ce leagă heparina în modulul III (14) al fibronectinei. Interacțiunea FN-C/H II cu heparina pulmonară bovină a fost studiată prin spectroscopie NMR cu ¹H și ²³Na și prin afinitatea cromatografică a heparinei. FN-C/H II leagă heparina de la pD < 2 până la pD de aproximativ 10; la pD mai mari, legarea descrește astfel că grupările amino ale lanțului din fața lizinei sunt titrate. Ioni de Na⁺ sunt deplasați din volumul condensat de ioni care înconjoară sodiul heparinat de către FN-C/H II, ceea ce dovedește că este implicat în interacțiunile electrostatice. Valorile pentru fiecare din cele cinci grupări amino- ale FN-C/H II cresc atunci când leagă heparina, unde împreună cu schimbul de date chimice, arată că legarea implică atât delocalizarea, cât și interacțiunile electrostatice directe dintre grupările amino ale FN-C/H II și grupările carboxil sau sulfat ale heparinei.

Datele NMR evidențiază, de asemenea, interacțiunea directă dintre gruparea guanidin a argininei cu locurile anionice ale heparinei. Afinitatea heparinei pentru FN-C/H II și pentru 13 peptide analoge, în care resturile de arginină și lizină au fost sistematic substituite cu alanină, sporește ca număr de resturi primare. Contribuția relativă a fiecărui rest de lizină și arginină la afinitatea heparinei pentru FN-C/H II este K(12)>K(13)>K(14)>K(1)>K(5). Rezultatele cromatografice de identitate NMR a afinității heparinei au fost obținute pentru interacțiunea dintre FN-C/H II și peptida sa analogă D-aminoacid cu heparina, care prezintă interes pentru utilizarea peptidelor ca agenți terapeutici în bolile în care adeziunea celulară joacă un rol critic. (11)

A fost imaginată și realizată harta locusului de legare a heparinei pe o singură moleculă de fibronectină cu microscopia atomică.

Fibronectina este compusă din multiple regiuni repetate omoloage și conține multe domenii funcționale. Două domenii majore de legare a heparinei au fost identificate cu precădere: locusul Hep I din apropierea capătului amino-terminal și locusul Hep II de lângă capătul carboxi-terminal. Locusul Hep II a fost considerat locusul de legare a heparinei cu înaltă afinitate în urma studiilor efectuate pe fragmente de fibronectină. Oricum, câteva studii au realizat legarea heparinei pe fibronectina intactă. Au fost imaginate molecule separate de fibronectină, asemenea heparinei învelite de particule de aur legate la toate moleculele dimerice ale fibronectinei plasmatică prin bombardarea la microscopul atomic. S-a observat că particulele de heparină-aur s-au legat cu preferință la două locații care corespund locusurilor Hep I și Hep II. Analizele cantitative ale imaginilor complexelor fibronectină-heparină-aur au arătat că particulele de heparină-aur au legat de aproape două ori mai mult la locusul Hep I N-terminal decât la locusul Hep II. Aceste rezultate sugerează că locusul Hep I are o afinitate de legare mai mare sau comparabilă cu locusul Hep II în moleculele intacte de fibronectină. (12)

Rănille îndelungate sunt însoțite de creșterea depunerii fibronectinei (FN) matriceale. Celulele monocitare activate, recrutate la locul rănilor îndelungate, exprimă integrine pentru FN, care mediază interacțiunea lor cu această matrice. O asemenea integrină, alpha(5)beta(1), mediază multe dintre efctele biologice ale FN și expresia sa poate fi importantă pentru funcționarea celulelor imunitare la locul leziunii. A fost examinată expresia integrinei alpha(5)beta(1) în răspunsul la promotorul tumoral phorbol 12-miristat acetat (PMA) în celulele

promonocitice ale liniei U-937. S-a demonstrat că PMA crește aderența celulelor U-937 la FN prin creșterea expresiei atât a subunităților mRNA alpha(5) și beta(1), cât și expresia proteinei de suprafață. În celulele U-937 transfectate cu o genă alpha(5) promotor-prezentator, PMA induce transcrierea genei alpha(5) prin acțiunea foarte specifică a șvențelor promotor, altele decât cea a activatorului proteinei-1 într-o protein kinază C-dependență. Lipopolizaharidele au un efect similar. Modularea expresiei alpha(5)beta(1) poate fi importantă pentru reglarea funcției monocitelor în inflamațiile de lungă durată după rănire. (13)

Activarea căii AMP ciclic în celulele aderente la biomateriale este reglată prin legarea integrinelor la vitronectină și fibronectină.

Studiile în acest sens au arătat că celulele aderente la biomateriale libere în ser cresc conținutul lor în AMP ciclic (cAMP) și devin agregate. În celulele de pe o membrană acrilonitrilică (AN69) aceste schimbări biochimice și morfologice sunt prevenite prin adăugarea de 10% ser fetal bovin (FCS = foetal calf serum) la mediu; celulele de pe membrana celulozică Cuprofan (CU) rămân neafectate. Studiul a examinat rolul vitronectinei (VN) și fibronectinei (FN), care leagă integrinele, în această inhibiție. Blocarea competitivă a VN și FN cu echistatin a crescut semnificativ cAMP intracelular și a determinat agregarea celulelor pe AN69, dar nu a modificat agregarea celulelor cAMP dependente pe CU. VN sau FN adsorbite pe CU au inhibat producția de cAMP de către celulele atașate și au prevenit agregarea lor, în timp ce adsorbția BSA nu a avut nici un efect.

Deci, legarea VN sau FN la integrinele de suprafață celulară se pare că limitează activarea căii cAMP inițiată de către substratul însuși. (14)

Citoscheletul și matricea extracelulară comunică prin membrana plasmatică

Moleculele matricei extracelulare au efecte izbitoare asupra comportamentului celulelor în cultură, influențând nu doar mișcările lor, ci și forma, polaritatea, metabolismul și diferențierea lor. Celulele epiteliale corneene, de exemplu, produc foarte puțin colagen când sunt cultivate pe o suprafață sintetică; dar dacă sunt cultivate pe laminină, colagen sau fibronectină, ele acumulează și secretă cantități crescute de colagen.

Matricea poate, de asemenea, influența organizarea citoscheletului. În general, suprafața bazală a celulelor epiteliale cultivate pe plastic sau sticlă este neregulată, iar citoscheletele din interiorul celulelor sunt dezorganizate. Când aceleași celule sunt cultivate pe macromolecule corespunzătoare ale matricei extracelulare, suprafața bazală este netedă și citoscheletele sunt înalt organizate, ca și cum s-ar afla în țesutul intact. Rezultate similare au fost obținute cu fibroblaste neoplazice transformate, în cultură. Celulele transformate produc frecvent mai puțină fibronectină decât celulele normale cultivate și se comportă diferit: de exemplu, ele aderă mai slab la substrat și nu reușesc să se aplatizeze sau să dezvolte organizarea intracelulară în mănunchiuri a filamentelor de actină, fenomen cunoscut sub numele de *stressul fibrelor*. În unele din aceste celule, deficiența în fibronectină pare să fie cel puțin parțial responsabilă de acest comportament anormal: dacă celulele sunt crescute pe o matrice de fibre organizate de fibronectină, acestea se vor aplatiza și vor asambla fibre de stress intracelulare, care sunt aliniate cu fibrele de fibronectină extracelulare.

Această interacțiune dintre matricea extracelulară și citoschelet este reciprocă: filamentele intracelulare de actină pot influența aranjarea sau secreția moleculelor de fibronectină. În vecinătatea culturilor de fibroblaste, de exemplu, fibrele de fibronectină extracelulară se asamblează în aliniament cu fibrele de stress intracelulare adiacente. Dacă aceste celule sunt tratate cu medicamentul citochalasin, care întrerupe filamentele de actină, fibrele de fibronectină disociază de la suprafața celulei (exact ca în timpul mitozei, când

celula se rotunjește). Este clar că trebuie să existe o conexiune între fibronectina extracelulară și filamentele intracelulare de actină prin membrana plasmatică a fibroblastului. Conexiunea este mediată de către receptorii pentru fibronectină, care servesc ca liganzi transmembranari între fibronectină și filamentele intracelulare de actină, pe calea unui set de proteine de atașare intracelulare, inclusiv talin. Partea receptorului care leagă talinul conține reziduuri de tirozină care, atunci când sunt fosforilate de către protein kinaze specifice tirozinei, se pare că inactivează locusul care leagă talinul, astfel rupând legătura dintre fibronectină și filamentele corticale de actină. Se crede că atașarea celulelor la matrice poate fi reglată astfel de către factori de creștere specifici care activează kinaze specifice tirozinei.

Din moment ce citoscheletele pot ordona macromoleculele matriceale pe care celulele le secretă, iar macromoleculele matriceale pot în schimb organiza citoscheletele celulelor cu care vin în contact, matricea extracelulară poate, în principiu, propaga ordinea de la o celulă la alta. Astfel se crede că matricea joacă un rol central în generarea și menținerea orientării celulelor în țesuturi și organe în timpul dezvoltării: aliniamentele paralele de fibroblaste și fibre de collagen în tendoane, de exemplu, pot în parte reflecta acest tip de interacțiune dintre celule și matrice. Receptorii transmembranari de matrice servesc drept „adaptori” în acest proces de ordonare, mediind interacțiunile dintre celule și matricea extracelulară.

Funcțiile fibronectinei (FN)

Celulele în țesuturi conective sunt implicate într-o complicată matrice extracelulară care nu doar leagă celulele și țesuturile împreună, ci și influențează dezvoltarea, polaritatea și comportamentul celulelor în contact. Matricea conține variate proteine formatoare de fibre întrepesute într-un gel hidratat compus dintr-o rețea de lanțuri de glicozaminoglicani. Glicozaminoglicanii sunt grupuri heterogene de lanțuri polizaharidice lungi, cu sarcină negativă, care (cu excepția acidului hialuronic) sunt legate covalent la proteine pentru a forma molecule de proteoglican.

Fibronectina – moleculă de adeziune

Proteinele formatoare de fibre sunt, din punct de vedere funcțional, de două tipuri: a) în principal structurale (colagenul și elastina) și b) în principal adezive (cum sunt fibronectina sau laminina). Fibrele de collagen (tipurile I, II și III) sunt asemeni frânghiilor, molecule helicale triplu-răsucite care agregă în fibre lungi asemănătoare unui cablu în spațiul extracelular; acestea, prin răsucire, se pot asambla într-o varietate înaltă de aranjări ordonate. Tipul IV de collagen se assemblează într-o împletitură densă asemănătoare unei țesături, care formează miezul tuturor laminelor bazale. Moleculele de elastină formează o rețea extinsă de legături întrepătrunse de fibre și țesături care se pot întinde și reveni la forma inițială, conferind elasticitate matricei. Fibronectina și laminina sunt exemple de glicoproteine adezive mari din matrice; fibronectina este distribuită peste tot în țesuturile conective, în timp ce laminina se găsește mai ales în lamina bazală. Prin intermediul multiplilor lor domenii de legare, astfel de proteine ajută aderența celulelor și organizarea acestora prin intermediul matricei extracelulare. Multe dintre aceste glicoproteine de adeziune conțin o secvență comună tripeptidică (RGD), care constituie partea structurală recunoscută de către superfamilia receptorilor transmembranari de matrice omologi, numiți integrine.

Toate proteinele matriceale și polizaharidele sunt secretate local de către celule în contact cu matricea, și ele pot fi ordonate printr-o asociere strânsă cu suprafața externă a

membranei plasmatică. Din moment ce structura și orientarea matricei influențează pe rând orientarea celulelor pe care le conține, ordonarea este posibil să fie propagată de la o celulă la alta prin intermediul matricei. (1)

Schimbarea în masa trombusului în timpul terapiei trombolitice se crede a fi diferența dintre creșterea și degradarea sa indusă de către agenții trombolitici. Plachetele joacă un rol de pivot în trombozele arteriale, legându-se una de alta, precum și de matricea subendotelială pe calea proteinelor de adeziune ca Factorul von Willebrand, fibrinogen și fibronectină. Au fost administrați anticorpi anti-proteine de adeziune conjugați cu activatorul plasminogenului pentru a vedea dacă aceștia pot crește degradarea trombusului plachetar. Trombușii plachetari murali au fost formați în venulele mezenterice de șobolan folosind iradierea laser cu He-Ne. Stafilokinaza recombinată a fost infuzată continuu și anticorpii policlonali împotriva proteinelor de adeziune au fost introduși prin injectare. Administrarea fiecărei doze de anticorpi a crescut tromboliza indusă de stafilokinază. (15)

Fibronectina – rol în migrare

Fibronectina este importantă nu doar pentru adeziunea celulară, ci și pentru migrarea celulelor. Atât în embrionii de nevertebrate, cât și în cei de vertebrate, se pare că ghidează migrarea celulelor în multe cazuri. De exemplu, mari cantități de fibronectină s-au găsit de-a lungul căii urmate de migrarea celulelor mezodermale prospective în timpul gastrulării amfibiene. Migrarea acestor celule poate fi inhibată fie prin injectarea de anticorpi anti-fibronectină în cavitatea blastocelului, fie prin injectarea peptidelor ce conțin tripeptide de legare a celulelor, dar care închid domeniile de legare a matricei ce aparțin fibronectinei. Fibronectina probabil promovează migrarea celulară prin faptul că ajută la atașarea celulelor la matrice. Efectul trebuie echilibrat delicat, astfel că celulele migratoare se prind strâns de matrice fără a deveni imobilizate pe aceasta. Acest echilibru poate fi realizat de către multe molecule de adeziune considerate a lua parte la ghidarea evenimentelor morfogenetice. (1)

Pentru a explica funcțiile specifice ale FN din structura matricei în timpul dezvoltării precoce a vertebratelor, a fost introdusă FN normală și mutantă recombinantă (recFN) în cavitatea blastocelică a embrionilor de amfibian *Pleurodeles waltl*. S-a demonstrat astfel că o recFN nativă FN (A-B-), ca și recFNs cu mutații specifice în domeniul de legare a celulelor, FN (RGD-) și FN (syn-), sau într-o regiune de legare a FN, FNDeltaIII (1) sunt asamblate într-o matrice fibrilară. O recFN (FNDeltaIII (1-7)) care formează o matrice distinctă structural în culturi celulare a fost asamblată în agregate la periferia celulei și a putut inhiba asamblarea FN matriceale endogene amfibiene într-o manieră dependentă de doză. Adeziunea celulelor, răspândirea și migrarea lor a fost perturbată *in vitro* și *in vivo* pe matricele chimerice care conțin FN (RGD-), FN (syn-) sau FNDeltaIII (1-7) co-asamblate cu FN amfibiană. Dezvoltând, această perturbare a dus la defecte structurale mezodermale și la inhibarea gastrulării. Aceste rezultate arată că structura și compoziția FN fibrilare matriceale reprezintă importanți determinanți ai adeziunii celulare și ai migrării în timpul dezvoltării. (16)

Invazia intercelulară și stabilitatea organizațională a țesuturilor este, de asemenea, un rol al fibronectinei.

Invazia intercelulară reprezintă deplasarea celulelor unui anumit tip structural într-un alt tip structural de țesut, prin contiguitate. Invazia este o semnătură comportamentală a tumorilor maligne și, de asemenea, mai reprezintă o parte a comportamentului normal a celulelor inflamatorii ale sângelui, precum și a țesuturilor angajate în evenimente morfogenetice ale embriogenezei normale și în anumite procese de remodelare ale țesuturilor normale și patologice la adult. Invazia rezultă în dezvoltarea unei interfațe difuze între

țesuturile aflate în contiguitate. Alternativa sa este reprezentată de menținerea stabilității, a suprafeței plane a limitelor dintre țesuturi. Aceasta este cea mai comună condiție pentru țesuturile animale aflate în contiguitate. Procesele care au loc, pe de o parte, stabilizează interfețele plane dintre țesuturi care vin în contact, și, pe de altă parte, promovează destabilizarea integrității tisulare prin adoptarea invaziei celulare. O atenție specială a fost acordată rolului interacțiunilor de adeziune mediate de molecula de matrice extracelulară, fibronectina. În exemple concrete, fibronectina în matrice promovează invazia, în vreme ce în alte locuri, prezența fibronectinei previne invazia. Distincția apare atunci când țesutul invaziv migrează într-o matrice extracelulară sau dacă invazia implică țesuturi cu celule foarte dense. În primul caz fibronectina promovează invazia, în timp ce în al doilea caz fibronectina stabilizează interfața de la contactul țesuturilor și previne invazia. (17)

Migrarea transcelulară a celulelor ascitice hepatice (AH130-MM1) prin monostratul culturii de celule mezoteliale (MCL) este susținută cu acid lizofosfatidic (LPA) care stimulează polimerizarea actinei și fosforilarea lanțului ușor de miozină prin activarea cascadei Rho-ROCK (Rho-kinază). Atunci când motilitatea celulelor MM1 pe o suprafață de sticlă a fost testată pe calea motilității fagokinetice, LPA nu a putut induce motilitatea. Cu toate acestea, când sticla a fost îmbrăcată cu fibronectină (FN), LPA a putut induce motilitatea fagokinetică, care a fost acompaniată de transformarea celulelor MM1 la forma fusiformă și asamblarea în focare de adeziune. Pe celulele MM1 se exprimă beta(1) integrina, receptorul suport al FN. Anticorpul anti-FN, anticorpul anti-integrină beta(1) și ciclo-GRGDSPA au supresat puternic motilitatea fagokinetică și migrarea transcelulară prin MCL indusă de LPA. Rezultatele arată că polimerizarea actinei și fosforilarea lanțului ușor al miozinei prin activarea Rho este insuficientă pentru inducerea motilității, dar adeziunea mediată de cooperarea FN/integrină beta(1) este necesară atât pentru motilitatea fagokinetică, cât și pentru migrarea transcelulară a celulelor MM1. (18)

Decorina este un membru al familiei peste tot exprimată a proteoglicanilor mici bogăți în leucină. În plus față de rolul său primar de modulator al fibrilogenezei proteinelor matricei extracelulare, decorina poate inhiba răspunsul celular la acțiunea factorilor de creștere. Expresia decorinei este indusă în celulele endoteliale în timpul angiogenezei, dar nu în timpul migrării sau când este stimulată proliferarea. Astfel, decorina poate susține formarea matricei fibrilare pericelulare care stabilizează fenotipul endotelial diferențiat în timpul stadiilor finale ale angiogenezei. De aceea, a fost testat dacă expresia decorinei constitutive poate modifica singură migrarea și proliferarea celulelor endoteliale sau poate afecta formarea matricei pericelulare. Vectori retrovirali defectivi ai replicării au fost utilizați pentru a stabili expresia decorinei bovine. Migrarea celulelor endoteliale care exprimă decorină este inhibată semnificativ atât în monostratul de creștere cât și în camerele microchemotactice. Inhibiția migrării celulelor de către decorină nu a fost însoțită de scăderea proliferării. În plus, celulele endoteliale care exprimă decorină assemblează o fibronectină extensivă fibrilară matriceală mai rapid decât celulele de control așa cum s-a observat prin determinări imunocitochimice și de fibrilogeneză a fibronectinei.

Aceste observații sugerează că migarea celulelor poate fi modulată de influența decorinei asupra ansamblului celulă-matrice extracelulară asociată. (19)

Fibronectina – rol în semnalizare

Semnalizarea supraviețuirii matricei se face de la fibronectină pe calea kinazei focale de adeziune la capătul NH₂-terminal al kinazei c-Jun.

Majoritatea celulelor transformate au pierdut ancorarea și dependența serică pentru creștere și supraviețuire. S-a stabilit anterior că atunci când serul este absent, semnalele de

supraviețuire a fibronectinei transduse de către kinaza de adeziune focală (FAK) supresează apoptoza reglată de p53 în fibroblastele primare și celulele endoteliale. S-a urmărit identificarea secvențelor supraviețuitoare în FAK și a moleculelor de semnalizare în aval ale FAK necesare pentru supraviețuirea dependentă de ancorare a fibroblastelor primare. Legarea domeniului SH3 al p130Cas la regiunea 1 a FAK bogată în prolină este necesară pentru susținerea supraviețuirii fibroblastelor pe fibronectină când serul este retras. Complexul FAK-p130Cas activează capătul NH₂-terminal al kinazei c-Jun (JNK) pe calea Ras/Rac1/Pak1/MAPK kinaza 4 (MKK4). JNK activat (fosfo-JNK) colocalizează cu FAK în adeziunile focale ale fibroblastelor cultivate pe fibronectină, care susține supraviețuirea lor, dar nu și a fibroblastelor cultivate pe colagen, care nu susține supraviețuirea lor. Celulele adesea supraviețuiesc în absența matricei extracelulare dacă factorii serici sunt furnizați. Semnalele supraviețuirii sunt transduse de către FAK, fosfatidilinozitol 3-kinaza (PI 3-kinaza) și Akt/PKB (protein kinaza B). Oricum, când serul este absent, fosfatidilinozitol 3-kinaza (PI 3-kinaza) și Akt/PKB nu sunt implicate în calea de supraviețuire fibronectină-FAK-JNK. Astfel, semnalele supraviețuirii de la matricea extracelulară și ser sunt transduse de către FAK pe două căi distincte. (20)

S-a evidențiat faptul că izoforma de FN asociată suprafeței este sintetizată de către celule T activate. FN derivată din celule T are un model îmbinat neobișnuit: un domeniu adițional, EDB, este produs în timp ce secvențe ce aparțin altui domeniu, IIICS, sunt desprinse. CS1, domeniul de legare pentru antigenul-4 al activării foarte târzii (VLA-4), este totuși în continuare generat. Pentru a studia funcția potențială a FN asociată suprafeței, sinteza sa a fost supresată de către oligonucleotide antisens, apoi proliferarea celulelor T a fost indusă de anti-CD3 cross-linkate. Proliferarea a fost redusă așa cum a fost și expresia CD25. Mai mult decât atât, când celulele T au fost cultivate cu densitate înaltă, peptida sintetică QILDVPST, corespunzătoare CS1, a inhibat proliferarea, așa cum făcuseră anticorpii pentru VLA-4. S-a propus că FN asociat suprafeței este un ligand pentru VLA-4, și prin legarea la VLA-4 pe o celulă adiacentă, furnizează un semnal costimulator, astfel susținând proliferarea celulelor T. (21)

Rolul fibronectinei în vindecarea grefelor

Vindecarea crescută a grefelor extinse de politetrafluoroetilenă de înaltă porozitate are loc prin legarea covalentă a fibronectinei.

A fost evaluat efectul legării covalente a fibronectinei pe vindecarea grefei extinse de politetrafluoroetilenă de înaltă porozitate (ePTFE). Grefarea bilaterală a carotidelor a fost realizată la zece câini corciți folosind grefe de ePTFE de înaltă porozitate (60 μm), cu lungimea de 4 cm și diametrul intern de 4 mm, fiecare fiind pretratată cu legături covalente de fibronectină (grefe de fibronectină) sau netratate (grefe de control). Grefele au fost recoltate la 4 – 6 săptămâni după intervenția chirurgicală și au fost supuse observațiilor macroscopice și microscopice. Zona crestată trombus-liberă a fost semnificativ mai mare în grefele de fibronectină decât în cele de control, de 86,9% față de 34,0%. Mai mult, pseudointima a fost mai bine înlocuită de țesutul fibros în grefele de fibronectină decât în cele de control, fiind aliniate cu un strat de celule endotelial-like. În grefele de fibronectină a fost evidențiată o cantitate mai mare de țesut transmural crescut decât în grefele de control.

În concluzie, legarea covalentă a fibronectinei îmbunătățește vindecarea grefei prin stimularea creșterii țesutului transmural în grefele ePTFE de înaltă porozitate. (22)

Relația fibronectinei cu țesutul nervos

Tenascin-R (TN-R), o glicoproteină matriceală a sistemului nervos central (SNC), a fost implicată într-o varietate de interacțiuni celulă-matrice responsabile de controlul creșterii axonului, mielinizării și adeziunii celulare la fibronectină în timpul dezvoltării și regenerării. Deși majoritatea analizelor funcționale au fost concentrate exclusiv pe rolul miezului proteic, contribuția glicoconjugatelor TN-R prezente pe multe situsuri potențiale pentru N- sau O-glicozilare este în prezent necunoscută. TN-R derivat din creier de șoarece adult exprimă condroitin sulfat (CS), glicozaminoglicani (GAGs), etc., care sunt recunoscuți de către anticorpi monoclonali specifici anti-CS/dermatan sulfat, 473 HD și CS-56. CS GAGs legat de TN-R: (1) este implicat în interacțiunile cu locusurile de legare a heparinei ce aparțin fibronectinei și este responsabil de inhibarea mediată de TN-R a adeziunii celulare la un fragment de fibronectină de 33/66 kD care leagă heparina sau la peptidele FN-C/H I și FN-C/H II, cunoscute că participă la legarea fibronectinei la proteoglicanii de suprafață celulară; și (2) contribuie parțial la interacțiunea dintre TN-R și TN-C care, oricum, nu conduce la o interferență cu inhibiția mediată de TN-R și TN-C a creșterii neuronale când cele două molecule sunt oferite ca substrat mixt de cultură.

Aceste descoperiri sugerează implicarea funcțională a CS GAGs legat de TN-R în interacțiunile matricei cu fibronectina și TN-C care contribuie în același fel la modularea comportamentului celular și la organizarea componentelor matricei în dezvoltarea sau lezarea SNC adult. (23)

Relația fibronectinei cu țesutul cardiac

Fibroblastul cardiac este cel mai abundent tip celular prezent în miocard și este în principal responsabil pentru depunerea matricei extracelulare (ECM). Componentele importante ale ECM cardiace includ proteine structurale și de adeziune, cum sunt colagenul și respectiv, fibronectina. Depunerea în exces a ECM cardiace (fibroza) a fost asociată cu supraîncărcarea mecanică patofiziologică a inimii. De aceea, rolul fibroblastelor cardiace în recepționarea, integrarea și răspunsul la stimulii mecanici este de un mare interes. Dezvoltarea in vitro a aparatelor a permis oamenilor de știință să investigheze efectele stimulilor mecanici asupra funcției fibroblastelor cardiace. Fibroblastele cardiace exprimă receptori de ECM (integrine) care leagă stimulii mecanici de răspunsurile funcționale. Stimularea mecanică a fibroblastelor cardiace s-a demonstrat că rezultă în activarea variatelor căi de transducere a semnalelor. Nevoia definirii stimulilor mecanici pentru a cultiva fibroblaste cardiace a fost asociată cu expresia genelor ECM, cu producția, eliberarea și/sau bioactivitatea factorilor de creștere, precum și cu activitatea colagenazică. În cele din urmă, pentru ca fibroza să dezvolte supraproducția de ECM, trebuie inhibate orice creșteri asociate în activitatea colagenazei. Suprareglarea indusă mecanic a producției de ECM poate urma căi directe sau indirecte prin acțiunea autocrină sau paracrină a factorilor de creștere.

Cunoscând natura complexă a spațiului interstițial din inima în funcțiune, cercetările adiționale trebuie să suplimenteze înțelegerea rolurilor jucate de stimulii mecanici în depunerea în exces a ECM miocardiace. (24)

Fibronectina și celulele musculare netede din peretele vascular

Modularea fenotipică de către fibronectină sporește sistemul de generare a angiotensinei II în culturile de celule musculare netede vasculare.

S-a demonstrat că aceste culturi omogene de celule musculare netede vasculare (VSMCs) de la șobolanii cu hipertensiune spontană produc angiotensină II (Ang II) ca răspuns la creșterea nivelelor de angiotensinogen, catepsină D și enzimă convertoare de angiotensină (ACE). Modificarea VSMCs din fenotipul contractil în cel de sinteză a crescut cantitatea organelor sintetizatoare, rezultate în producția de proteaze și factori de creștere. Pentru a evalua contribuția fenotipului sintetic la generarea Ang II, s-a examinat efectul fibronectinei (FN), care induce fenotipul sintetic, pe sistemul generator de Ang II în VSMCs. Culturile VSMCs de șobolani Wistar-Kyoto au fost incubate cu un fragment activ de FN, Arg-Gly-Asp-Ser, pentru 24, 48, sau 72 de ore după sincronizarea ciclului celular, cu 0,2% ser de vițel pentru 48 de ore. Nivelele de proteină actină alpha din musculatura netedă (SM = smooth muscle) și expresia mRNA SM22alpha, evidențiate în fenotipul contractil, au fost supresate de către FN, în timp ce expresia Gla mRNA matriceală și osteopontin (mRNA și proteină), evidențiate în fenotipul sintetic, au fost crescute. Dependent de doză (1-1000 microg/mL), FN a crescut sinteza ADN în VSMCs, care a fost inhibată de către receptorul Ang II tip 1 antagonist CV-11974. Imunoreactivitatea Ang II-like determinată prin RIA a fost semnificativ crescută în mediul VSMCs. În plus, mRNA pentru proteazele catepsină D generatoare de Ang II și ACE a fost crescut de către FN. Expresia mRNAs a TGF-beta1, a lanțului A. al PDGF și a FGF primar a fost, de asemenea, crescută de către FN. Aceste rezultate arată că modificările care însoțesc alterarea fenotipului sintetic în culturile omogene de VSMCs cresc expresia proteazelor, cum ar fi catepsina D și ACE, care în acest caz produc Ang II, iar aceasta modifică creșterea expresiei factorilor de creștere care, la rândul lor, induc creșterea VSMCs. (25)

Fibronectina și celulele intestinale

Remodelarea extensivă a matricei extracelulare (ECM) are loc în țesuturile inflamatorii. Leziunile celiace în intestinul subțire sunt caracterizate prin însoțirea inflamației de către alterări morfologice profunde. Prin metode imunohistochimice s-a determinat distribuția izoformelor de laminină, fibronectină și tenascin în biopsiile intestinului subțire ale pacienților cu boli celiace netratate. În mucoasa normală distribuția izoformelor de laminină definește trei zone ale membranei bazale (BM). Organizarea acestor zone a fost menținută în mucoasa celiacă. Astfel, componentele lamininei-5 (alpha(3) și beta(3)) au fost găsite pe suprafața membranei bazale epiteliale, lanțul alpha(2) al lamininei a fost găsit selectiv în fundurile criptice, iar lanțul alpha(5) al lamininei a fost unicul lanț de tip alpha în mijlocul criptelor membranei bazale (BMs). De asemenea, distribuția fibronectinei și tenascinului s-a asemănat cu cea de la intestinul normal. Organizarea fibroblastelor pericriptale și a straturilor de lamina propria din musculatura netedă, așa cum a fost detectată prin imunofluorescență pentru componenta alpha a actinei din musculatura netedă, a rămas neschimbată în mucoasa celiacă. În mod neașteptat, nu au fost detectate schimbări majore ale ECM în leziunile celiace. (26)

Fibronectina și țesutul osos

Forța de adeziune a osteoblastelor la sticla îmbrăcată în fibronectină (1,0 μg/ml) a fost semnificativ afectată de prezența particulelor de titanium. Forța de adeziune a celulelor incubate cu particule de titanium mai puțin de 4 ore nu a fost afectată semnificativ prin expunerea la particule; după 4 ore, totuși, a fost redusă relativ semnificativ față de control. Aspirarea osteoblastelor provocate de particule într-o micropipetă a demonstrat că particulele nu au fost desprinse de pe suprafața celulelor și deci s-a confirmat că osteoblastele le-au ingerat. În timpul aspirării, particulele au trecut în citoplasmă mai degrabă decât au stat pe suprafața celulară. Când osteoblastele au fost expuse particulelor și citochalasinei D, acestea au expus forțe de adeziune mult mai mici decât atunci când au fost expuse controlului sau doar particulelor de titanium; aceasta indică un rol important al filamentelor de actină în răspunsul osteoblastelor la particule. Mai mult, nivelele de mRNA pentru colagen tip I și fibronectină au fost semnificativ reduse mai devreme de 4 ore după expunerea la particule comparativ cu nivelele de control, și acest efect a continuat până la 72 de ore. Aceste date arată că expunerea directă a osteoblastelor la particulele de titanium, care s-a presupus a fi ingerate de către osteoblaste, poate descrește semnificativ forța de adeziune a osteoblastelor; aceasta poate conduce la o descreștere a activității celulare și a expresiei genelor pentru fibronectină și colagen tip I în prezența particulelor de titanium. (27)

Fibronectina și țesutul mamar

Fragmentele de fibronectină induc activitatea metaloproteinazelor matriceale (MMP) în celulele epiteliale mamare de șoarece, ceea ce evidențiază rolul său în remodelarea țesutului mamar.

Forma și funcțiile glandei mamare sunt reglate prin interacțiunile dintre epiteliu și matricea extracelulară. Majoritatea componentelor glicoproteice ale matricei extracelulare au fost identificate ca susținând supraviețuirea, proliferarea și diferențierea semnalelor la celulele epiteliale mamare. Fragmentele proteolitice ale glicoproteinei matricei extracelulare, fibronectina, supresează creșterea și poate promova apoptoza celulelor epiteliale mamare de șoarece. În timpul involuției glandei mamare, nivelele de fibronectină totală și de fragmente de fibronectină sunt scăzute. Vârful nivelelor proteinei fibronectină și a fragmentelor se observă la 4-6 zile de la înțărare, coincizând cu vârful atins de moartea celulelor epiteliale. Folosind un model pentru hormonul ce induce retragerea morții epiteliului mamar, nivelele ridicate de fragmente proteolitice de fibronectină au fost asociate cu apoptoza în celulele TM-6, o linie celulară epitelială tumorigenică mamară la șoarece. Tratamentul celulelor TM-6 cu fragmente exogene de fibronectină (FN120) a redus numărul celulelor și a indus apoptoza și activitatea de degradare a proteazelor matriceale. Inhibiția activității proteazelor matriceale a salvat viabilitatea celulelor TM-6, indicând că pierderea celulară indusă de FN120 este mediată de activitatea proteazelor matriceale. Într-un model tridimensional pentru dezvoltarea glandei mamare, FN120 a redus dezvoltarea alveolelor-like și a promovat dezvoltarea ductelor-like printr-un mecanism dependent de proteazele matriceale.

Aceste date sugerează că în timpul involuției post-lactaționale fragmentele de fibronectină pot contribui la pierderea celulelor epiteliale și la disoluția alveolelor mamare prin inducerea proteinazelor degradatoare matriceale. (28)

Fibronectina în diverse patii

Au fost întreprinse cercetări pentru a determina dacă determinarea fibronectinei fetale este mai utilă pentru prezicerea nașterii înainte de termen în practica clinică decât se părea a fi în studiile prospective oarbe. Au fost urmărite graficele a 151 de paciente cu teste pentru fibronectină fetală realizate pe parcursul a doi ani. Pacientele erau incluse dacă aveau simptome de travaliu prematur, o singură sarcină la 24-35 săptămâni de gestație, membrane intacte și dilatarea cervixului mai mică sau egală cu 3 cm. Datele complete au fost disponibile pentru 85 de teste. Pentru nașterea în mai puțin de 7 zile după colecționarea specimenului, sensibilitatea, specificitatea, valoarea predictivă pozitivă și valoarea predictivă negativă au fost 89%, 84%, 40% și respectiv 98%. Valoarea predictivă pozitivă a fost mai mare ($P < 0,002$) decât cea raportată în trei studii prospective care evaluau nașterea în mai puțin de 7 zile la pacientele cu simptome. Vârsta fătului la naștere și greutatea sa erau mai mici la pacientele cu rezultate pozitive ($P < 0,0001$ și respectiv $P < 0,006$). Pacientele cu rezultate pozitive au fost, de asemenea, tratate cu mai multă tocoliză, corticosteroizi și spitalizare decât pacientele cu rezultate negative. Pentru o comparație directă cu studiile asupra pacientelor cu o dilatație a cervixului mai mică de 3 cm, numai 4 paciente cu dilatația cervixului de 3 centimetri au fost înrolate. Toate cele 4 au avut rezultate negative la testul fibronectinei fetale, și deci rezultatele lor nu au avut nici un efect asupra valorii predictive pozitive. Ca o concluzie, valoarea predictivă pozitivă a fibronectinei fetale măsurată în practica clinică actuală a fost semnificativ mai mare pentru nașterea în mai puțin de 7 zile decât s-a raportat în studiile prospective oarbe. (29)

Terapia cu oligodeoxinucleotide antisens TGF- β reduce greutatea rinichiului și mRNA din matrice în diabetul de șoarece.

Inhibiția expresiei genei cu oligodeoxinucleotide (ODNs) antisens relevă abilitatea lor de a lega secvențele mRNA complementare și de a preveni translația. Tubul proximal este o țintă potrivită pentru terapia ODN in vivo deoarece se acumulează ODNs circulante în tubul proximal în concentrații mari. Deoarece creșterea tubulară proximală a expresiei TGF-beta(1) poate media hipertrofia diabetului renal, au fost investigate efectele lui ODN TGF beta(1) antisens pe glucoza înalt indusă în celulele hipertrofiate ale epiteliului tubului proximal în cultură și pe diabet renal hipertrofiat in vivo. Celulele tubului proximal de șoarece crescute în 25mM de D-glucoză și expuse ODN-sens ca un control (1 μ M) expus, măresc încorporarea de 3H leucină cu 120% și proteina totală TGF-beta(1) cu 50% față de cultura în 5,5 mM de D-glucoză. ODN antisens scade semnificativ secreția de glucoză înalt stimulată de TGF-beta(1) și încorporarea leucinei. Infuzia continuă timp de 10 zile a ODN (100 μ g/zi) a fost obținută pe calea minipompelor osmotice în diabetul și nondiabetul de șoarece. Tratarea ODN-sens cu streptozocin diabetic de șoarece a crescut greutatea rinichiului cu 15,3%, α 1 (IV) colagenul cu 70% și cu 46% nivelele de mRNA fibronectină față de celulele de șoarece nondiabetice. Tratarea diabetului de șoarece cu ODN antisens a scăzut parțial, dar semnificativ nivelele de TGF-beta(1) din rinichi și a atenuat creșterea în greutate a rinichiului, a α 1 (IV) colagenului și a mRNA fibronectinei. În concluzie, terapia cu ODN TGF-beta(1) antisens scade producția de TGF-beta(1) și atenuază hipertrofia celulelor tubului proximal inductoare de glucoză in vitro și previne parțial creșterea greutății rinichiului și a expresiei matricei extracelulare în diabetul de șoarece. (30)

Ultrafiltrarea factorilor de creștere în nefropatia diabetică experimentală contribuie la fibroza interstițială.

Proteinuria glomerulară este un factor de risc pentru progresia insuficienței renale cronice și contribuie la fibroza renală interstițială. În scleroza diabetică glomerulară

experimentală este o translocăție a factorilor de creștere cu greutate moleculară mare, numiți factori de creștere hepatocitară (HGF) și a factorilor de creștere a transformării (TGF)-beta din plasmă în lichidul tubular, ambele pe celulele tubulare prin membrana apicală a receptorilor. În prezent se studiază ipoteza că HGF și TGF-beta ultrafiltrate induc creșterea expresiei proteinelor matricei extracelulare (ECM) direct în celulele tubulare sau induc creșterea expresiei citokinelor care pot acționa pe miofibroblastele interstițiale. Incubarea culturilor de celule tubulare cu TGF- beta uman recombinant (rh) dezvoltă modest expresia colagenului tip III, dar doza dependentă de rh HGF blochează expresia acestor proteine ECM. Ambii factori de creștere stimulează expresia fibronectinei până la de 4 ori și cresc expresia PDGF (Platelet Derivated Growth Factor)-BB până la de 6 ori, dar nu și a GF-2 fibroblast. În suspensie ultrafiltratul glomerular diluat care a fost colectat prin micropunctura nefronului de la șobolan cu nefropatie diabetică (24-30 săptămâni) crește, de asemenea, expresia fibronectinei la fel ca PDGF-BB în celulele tubulare proximale. În prezența anticorpilor neutralizanți care blochează acțiunile HGF și TGF-beta, ultrafiltratul glomerular din diabetul de șobolan nu mai crește expresia în celulele tubulare a PDGF-BB. În miofibroblastele renale interstițiale NRK-49F, rh PDGF-BB crește pe rând expresia colagenului tip III, dar nu și tip I sau fibronectină. Evidența dată de descoperiri arată că ultrafiltratul HGF și TGF-beta contribuie la acumularea interstițială a proteinelor ECM prin efecte directe pe celulele tubulare, precum și prin mecanisme indirecte, pe calea PDGF-BB și acțiunea sa pe miofibroblaste. Aceste evenimente pot reprezenta importante mecanisme ale fibrozei renale interstițiale cu inducerea proteinuriei și progresia accelerată a insuficienței renale cronice în nefropatia diabetică și probabil în alte boli glomerulare proteinurice. (31)

Studiile au investigat efectul curcuminei pe nefropatia determinată de adriamicină (ADR) la șobolani. Rezultatele arată că lezarea rinichiului indusă de ADR a fost prevenită într-un mod remarcabil de tratamentul cu curcumină. Tratamentul cu curcumină a realizat protecția marcată împotriva proteinuriei, albuminuriei, hipoalbuminemiei și hiperlipidemiei induse de ADR. De asemenea, curcumina a inhibat creșterea indusă de ADR a excreției urinare de N-acetil-beta-D-glucozaminidaze (un marker al lezării tubilor renali), fibronectină și glicozaminoglican, precum și colesterol plasmatic. Curcumina a restaurat funcția renală în șoarecii ADR, judecând după creșterea în GFR. Datele au demonstrat, de asemenea, că aceasta (curcumina) a realizat protecția împotriva leziunilor renale induse de ADR prin supresia oxidativă și creșterea conținutului de glutatation renal, precum și a activității glutatation peroxidazei. Într-o manieră asemănătoare, curcumina a abolit peroxidarea lipidelor microsomale și mitocondriale din rinichi stimulată de ADR. Aceste date sugerează că administrarea de curcumină reprezintă o cale promițătoare în tratamentul nefrozei cauzată de ADR. (32)

Urechea internă de mamifere conține organe pentru detectarea sunetului și accelerației, respectiv cohleea și vestibulul. Celulele perilor mecanosenzoriali din neuroepiteliul acestor organe transduc forța mecanică generată de undele sonore sau mișcările capului în semnale neuronale. Defectele în celulele perilor conduc la surditate și defecte de echilibru. Celulele perilor au stereocili care sunt indispensabili pentru mecanosenzație, dar mecanismele moleculare care reglează formarea stereociliilor sunt puțin cunoscute. Integrina alpha(8)beta(1), un ligand al fibronectinei și reglatorul integrinei – kinaza de adeziune focală (FAK) sunt colocalizate la suprafața apicală a celulelor perilor senzoriali, unde se formează stereociliile. În șoarecii homozigoți, printr-o mutație țintită la Itga8 (care codifică subunitatea alpha(8)beta(1)), această colocalizare este perturbată, iar celulelor perilor din utriculă, un subcompartiment vestibular, le lipsesc stereociliile sau conțin stereocili malformați. Majoritatea șoarecilor deficienți în integrină alpha(8)beta(1) mor imediat după naștere din cauza

defectelor la rinichi. Mulți dintre supraviețuitori au dificultăți în menținerea echilibrului în concordanță cu defectele structurale ale urechii interne. Integrina alpha(8)beta(1), posibil și alte integrine, reglează diferențierea celulelor perilor și maturarea stereocililor. Mutațiile care afectează moleculele matriceale cauzează forme moștenitoare ale disfuncțiilor urechii interne, iar integrinele pot media unele efecte asupra moleculelor matricei din ureche; astfel, mutațiile în genele integrinelor pot conduce, de asemenea, la boli ale urechii interne. (33)

Au fost făcute studii pentru identificarea potențialelor legături imunopatogenice dintre fragmentarea fibronectinei (FN) și răspunsul inflamator în bolile articulare cronice. O serie de fragmente de FN au fost identificate în lichidul sinovial (SF = synovial fluid) artritic. FN și fragmente situate între 30 și 200 kD sunt prezente în concentrații mari în SF inflamator. Expunerea fragmentelor FN în SF a redus afinitatea pentru fibrină și collagen. Fragmentele amino-terminale de 29 și 50 kD mediază eliberarea proteoglicanilor din cartilajele articulare prin mecanisme independente de RGD. Fragmentele de FN pot induce expresia în fibroblaste a genelor metaloproteinazelor sau pot acționa ele însele ca proteinaze. Fragmentele mediază chemotaxia PMN și cresc proliferarea limfocitelor CD4+, ca și legarea la componenta C1q a complementului, influențând astfel comportamentul complexelor imune.

În concluzie, fragmentele de FN pot fi caracterizate din punct de vedere funcțional și biochimic în boli ale SF. Modificarea formei fragmentului și inhibiția funcției sale poate avea valoare potențial terapeutică în întreruperea inflamației sinoviale cronice. (34)

Fibronectina și cancerele

Fibronectinele, glicoproteine de adeziune exprimate mai ales în matricea extracelulară, sunt molecule polimorfe ale căror izoforme variate sunt dependente de combinarea alternativă a patternurilor. Izoformele care conțin secvența ED-B și care se găsesc în țesuturile fetale și neoplazice (oncofetale sau B+FN) au fost recunoscute ca markeri de angieneză. Distribuția acestor izoforme a fost analizată într-o serie consecutivă de 134 de meningioame intracraniene obținute chirurgical, folosind anticorpi monoclonali specifici. FN oncofetală s-a descoperit a fi distribuită peste tot în vasele meningiomei anaplastice, expresia sa fiind restricționată în vasele subtipurilor tipice și absent în vecinătatea țesuturilor cerebrale. Expresia vasculară ubiquitară a B+FN în malignitățile meningiomatoase ar putea furniza o potențială țintă pentru distribuția in vivo a agenților angiosupresori. (35)

Invazia celulelor tumorale în matricea extracelulară reprezintă un pas esențial în formarea și metastazarea cancerului renal. Moleculele de adeziune celulară, precum integrinele beta(1), care se leagă la secvența RGD (arginină-glicină-asparagină) și CD44, sunt implicate în acest proces. A fost examinată invazia celulelor liniei renale carcinoame (CCF-RC1) în compușii matricei extracelulare, fibronectina, collagen IV și laminina, precum și efectul TGF beta și IFN gamma în acest proces. Efectul inhibitor al anticorpilor anti-subunitatea beta(1) a integrinelor (CD29), ca și al unei pentapeptide ce conține secvența RGD, a fost, de asemenea, evaluat. Adăția compușilor matricei extracelulare, fibronectină, laminină și collagen IV crește în invazie. Această invazie crescută depinde strâns de prezența integrinelor beta(1), fapt demonstrat prin utilizarea anticorpilor anti CD29 sau a unei peptide cu secvența RGD care inhibă migrarea celulară cu aproximativ 88%. CD44 este mai puțin implicată în migrarea dependentă de collagen și aproape nici o influență a CD44 nu a fost observată în migrarea dependentă de fibronectină și laminină. TNF alpha și IFN gamma nu au influențat semnificativ expresia CD29 sau CD44 și nu s-a observat nici o alterare în migrarea celulelor tumorale. Aceste rezultate arată că invazia celulelor canceroase renale este reglată

diferențiat de către compuşii matricei extracelulare și că fibronectina pare să fie factorul cel mai critic. Interacțiunile moleculare în acest proces sunt strâns dependente de integritatea beta(1) și de secvența de aminoacizi corespunzătoare RGD. (36)

A fost investigată facilitarea invaziei de către factorii de creștere și factorii chemotactici în liniile celulare tumorale, și în special în carcinomul hepatocelular. Celulele hepatomului (PLC/PRF/5 și Hep G2) au arătat chemotaxie crescută în legătură cu condițiile mediilor lor respective, în timp ce celulele metastatice ale cancerului pancreatic (SU.86.86) și celulele cancerului de colon (LS 174T) nu au migrat legat de condițiile mediilor lor respective. Pe baza tehnicilor de imunoblotting s-a observat că celulele PLC/PRF/5 secretă fibronectină, factor de creștere beta al transformării (TGF beta) și catepsină D (o protează). Fibronectina a indus un răspuns migrator în celulele PLC/PRF/5, iar anticorpii anti-fibronectină au anulat răspunsul acestor celule la condițiile lor de mediu. Anticorpii anti-integrină beta(1) au împiedicat, de asemenea, migrarea acestor celule legat de condițiile de mediu. Anticorpii policlonali anti-TGF beta și inhibitorii proteazici (alpha(2) – macroglobulina și leupeptina) adăugați în mediile de cultură au modulată secreția de fibronectină a celulelor PLC/PRF/5. Cu toate că TGF beta exogen a suprasat celulele SU.86.86, acesta a crescut aderarea celulelor PLC/PRF/5 la substrat, crescând astfel numărul celulelor viabile.

Aceste acțiuni arată că acest carcinom hepatocelular poate poseda un mecanism autocrin puternic care permite celulelor să supraviețuiască și să prolifereze în condiții cirotice. (37)

Pierderea contactului celulă-celulă este indusă de aderarea celulelor la substrat mediată de integritate în celulele carcinomului hepatocelular cu înaltă motilitate și metastazare.

Sistemul de adeziune celulă-celulă mediat de cadherine joacă un rol critic în dezvoltarea și morfogeneza normală. Inactivarea acestui sistem se crede că ar fi responsabilă de invazia cancerului și metastazare. O linie celulară de carcinom hepatocelular uman (HCC), KYN-2, s-a observat a avea un potențial mare de metastazare intrahepatică atunci când a fost implantată ortotopical în ficat de șoareci SCID. Culturile in vitro de celule KYN-2 au format structuri trabeculare în suspensie, dar au pierdut adeziunea strânsă celulă-celulă și s-au împrăștiat când au fost atașate la un substrat, cum ar fi colagenul sau fibronectina. Ca răspuns la aderarea la substrat, colocalizarea subcelulară a filamentelor de cadherină E și actină s-a redus, și o cantitate însemnată de alpha-catenină a fost disociată din complexul cadherină-E-catenină în celulele KYN-2. Aceste modificări ale adeziunii celulă-celulă au fost blocate de către anticorpi monoclonali inhibitorii anti-integrine beta(1) și beta(5). S-a aflat că c-Src a fost coimunoprecipitată cu complexul cadherină-E-catenină și a fost tirozin-defosforilată și activată în celulele aderente. Tirozin-defosforilarea c-Src este indusă de adeziunea celulelor la substrat și inhibată de adiția anticorpilor monoclonali inhibitori anti-integrine beta(1) și beta(5).

Aceste descoperiri arată că adeziunea celule-substrat mediată de integritate inhibă adeziunea celulă-celulă mediată de cadherine, posibil pe calea activării c-Src, și sugerează că aceasta mediază inactivarea tranzitorie a sistemului cadherinelor și joacă un rol important în metastazarea intrahepatică a HCC uman. Modularea acestei interacțiuni ar putea oferi o nouă cale de prevenire a metastazării și recurenței HCC. (38)

Producerea autocrină de IL-6 de către celulele carcinomatoase tranziționale umane suprareglează expresia receptorului alpha(5)beta(1) al fibronectinei.

Studiile au demonstrat creșterea expresiei și secreției de IL-6 de către celulele carcinomatoase tranziționale (TCC), care urmează terapiei împotriva bacilului Calmette-Guerin (BCG). În prezent, rolul IL-6 asupra biologiei TCC este puțin cunoscut. Studiile au

evaluat influența expresiei IL-6 asupra interacțiunii critice variabile dintre tumoră și BCG regulator, precum și expresia tumorală a integrinei alpha(5)beta(1). O linie celulară umană TCC (235J) a fost transfectată cu un vector ce conține secvența cDNA de lungimea IL-6. mRNA atât pentru subunitatea alpha(5), cât și pentru subunitatea beta(1) ale receptorului FN au fost crescute în medie de 9,4, respectiv 125,7 ori în supraexpresia IL-6 a celulelor transfectate comparativ cu celulele 253J parentale. Creșterea mRNA a alpha(5) și beta(1) a fost asociată cu creșterea expresiei pe suprafața celulară a ambelor proteine. Expresia crescută a proteinelor a rezultat într-o mai mare afinitate de legare a fibronectinei substratului și a crescut aderența BCG la celulele tumorale. În concluzie, expresia autocrină a IL-6 suprareglează expresia subunităților receptorului FN în TCC. Expresia crescută a alpha(5)beta(1) crește aderența celulară la FN și aderența BCG la celulele tumorale. Aceste rezultate sugerează un rol pentru IL-6 în medierea activității antitumorale a BCG prin influențarea aderenței BCG la TCC. (39)

Studiile recente au arătat că atașarea bacilului Calmette-Guerin (BCG) la fibronectină a fost necesară pentru medierea răspunsului antitumoral. Studii suplimentare au identificat receptorul bacterian, proteina de atașare la fibronectină (FAP), ca un important mediator al atașării BCG la fibronectină. Studiile in vitro au arătat că o interacțiune stabilă BCG/fibronectină a fost dependentă de legarea FAP la fibronectină; totuși, nu a fost caracterizat nici un rol al FAP în atașarea BCG in vivo. Legarea stabilă a BCG pe calea FAP s-a demonstrat a fi necesară pentru expresia activității antitumorale indusă de BCG. Rezultatele demonstrează un rol biologic pentru FAP în medierea activității antitumorale indusă de BCG. (40)

Fibronectina și microorganismele

Proteinele care leagă fibronectina la *Staphylococcus aureus* sunt implicate în aderența la epiteliul respirator uman.

A fost investigat mecanismul molecular al aderenței *S. aureus* la epiteliul respirator uman, folosindu-se un model xenograf bronșic umanizat la șoarecii nuzi și culturi primare de celule epiteliale respiratorii umane (HAEC) și s-a arătat că *S. aureus* aderă în principal la celulele HAEC nediferențiate, în timp ce aderența la celulele HAEC diferențiate este slabă ($P < 0,01$). O tulpină deficientă în FNBP (fibronectin binding protein) a prezentat un nivel de aderență de cinci ori mai scăzut în cazul celulelor HAEC nediferențiate decât tipul parental ($P < 0,005$). Acest lucru sugerează că aderența FN la *S. aureus* (tulpini clinice) este implicată în aderența bacteriei la HAEC. S-a demonstrat, de asemenea, că 97% din cele 32 de tulpini de *S. aureus* (tulpini clinice) izolate din secrețiile tractului respirator de la pacienții cu fibroză chistică ($n = 18$) și pacienții cu pneumonie nosocomială ($n = 14$) prezentau cele două gene fnb. Tulpinile de la pacienții cu pneumonie aveau o capacitate de legare a FN semnificativ crescută ($P < 0,05$) față de tulpinile de la pacienții cu fibroză chistică. Aceste rezultate au fost confirmate de expresia FNBP în investigațiile de Western blotting cu afinitate la ligand. Rezultatele au sugerat un rol major al FNBP în colonizarea tractului respirator de către *S. aureus*, ceea ce corelează importanța căilor de reglare a adeziunii în procesul infecțios stafilococic. (41)

Multe bacterii patogene Gram-pozitive exprimă proteine de suprafață celulară care se leagă la componentele matricei extracelulare. S-a studiat interacțiunea dintre repeaturile de legare (D3 și D1-D4) ale proteinei de legare la fibronectină din *S. aureus* cu o pereche de module ((4)F1(5)F1) din regiunea N-terminală a fibronectinei. Când D3 a fost adăugat la

(4)F1(5)F1 marcat cu izotopi (1)H, (15)N și (13)C, modificările chimice au arătat că legarea are loc în primul rând pe calea reziduurilor în (4)F1, deși câteva reziduuri din (5)F1 au fost, de asemenea, afectate. Se pare că sunt implicate atât interacțiunile hidrofobe, cât și cele electrostatice. (42)

Proteinele care leagă fibronectina (FNBP) se crede că sunt importante pentru atașarea *Staphylococcus aureus* în timpul infecției. Reglarea genelor *fnbA* și *fnbB* de către locii reglatori globali *sar* și *agr* a fost examinată folosind mutante reglatorii specifice de situs de *S. aureus*. Introducerea *sar* pe un plasmid multicopiat a crescut transcrierea *fnbA* a mutantei *agr* deja crescută. FNBP nu a fost detectabilă și astfel activitatea promotorului *fnbB* în încercările de fuziune a promotorilor nu a fost afectată nici de *sar*, nici de *agr*. Secvența ORF3 localizată în amonte de *sarA* s-a considerat a fi esențială pentru activarea transcrierii *fnbA*. S-a emis ipoteza că această secvență poate modula expresia *SarA* și/sau activitatea nivelului post-transcripțional. *SarA* leagă fragmentele promotorului *fnbA*, probabil sub formă de dimer. A fost, de asemenea, detectată o arie protejată de 102 bp în amonte de *fnbA*. (43)

Inducerea proteinelor de legare a fibronectinei și creșterea adeziunii *Staphylococcus aureus* rezistent la quinolon poate fi realizată cu nivele subinhibitorii de ciprofloxacina. (44)

Toxina B eritrogenică streptococică anulează internalizarea fibronectin-dependență a *Streptococcus pyogenes* de către celulele mamaliene cultivate.

Streptococcus pyogenes secretă o serie de proteine care influențează interacțiunile gazdă-agent patogen. Un model de cultură tisulară a fost utilizat pentru a studia influența toxinei B eritrogenică streptococică cistein proteazică secretată (SPE B) asupra interacțiunii dintre subtipul NZ131 de *S. Pyogenes* (serotipul M49) și celulele mamaliene. Inactivarea genei *speB* a mărit dependența de fibronectină a internalizării patogenului de către celulele ovariene de hamster chinezesc (CHO-K1) comparativ cu cele ale tipului izogenic sălbatic. Preincubarea genei mutante *speB* NZ131 cu protează SPE B purificată a inhibat semnificativ internalizarea fibronectin-dependență atât de către celulele CHO-K1, cât și de celulele CHO-pgs745. Efectul a fost atribuit anulării legării fibronectinei la suprafața bacteriei, care nu a implicat nici proteina M49, nici proteina streptococică *Sfbl* de legare a fibronectinei. În contrast, pretratarea mutantei NZ131 *speB* cu SPE nu a influențat internalizarea mediată de polizaharide sulfatate de către celulele CHO-pgs745. Rezultatele arată că proteaza SPE B alterează specific proteinele suprafeței celulare bacteriene și astfel influențează internalizarea patogenului. (45)

Interacțiunea streptococilor viridans cu componente ale matricei extracelulare (ECM) joacă un rol important în patogeneza endocarditelor infecțioase. A fost identificată o proteină de suprafață la *Streptococcus mutans* care leagă constituentul ECM, fibronectina (FN). Inițial s-a aflat că *S. mutans* poate adsorbi FN solubilă în plasmă, dar cu o eficiență mai mică decât *S. pyogenes*. În plus, *S. mutans* ar putea lega FN imobilizată într-o manieră dependență de doză folosind un imunosorbent legat de enzimă. Extracte crude de proteine asociate la peretele celular sau de proteine extracelulare din *S. mutans* MT8148 au legat specific FN prin intermediul unei proteine cu masa moleculară de cca. 130 kD. Această proteină de legare a FN (FBP-130) a fost purificată folosind FN cuplată la Sefaroză 4B în coloane cromatografice. Un anticorp policlonal de iepure anti-FBP-130 a reacționat specific cu o proteină de masă moleculară de cca. 130 kD atât în fracțiunea peretelui celular, cât și în cea extracelulară, iar abundența FBP a fost mai mare în prima decât în a doua fracțiune. FBP purificată a legat specific la FN imobilizată, în timp ce legarea FN solubile la îmbrăcămintea FBP a putut fi detectată doar în prezența unor concentrații mari de FN. FBP purificată, ca și imunoglobulina G anti-FBP, a inhibat aderența *S. mutans* la FN imobilizată și la celulele endoteliale (ECV304) într-o manieră dependență de doză. Aceste rezultate au demonstrat că FBP-130

mediază aderarea specifică a *S. mutans* la FN și celulele endoteliale in vitro. Caracteristicile *S. mutans* și FBP-130 în legarea FN au confirmat că streptococii viridans adoptă strategii diferite în interacțiunea lor cu ECM. (46)

Domeniile fibronectinei umane mediază legarea antigenului alpha, cel mai imunopotent antigen al mycobacteriilor care induce imunitate protectivă împotriva infecției mycobacteriene.

S-a demonstrat că antigenul alpha (alpha-Ag), antigenul imunodominant al mycobacteriilor, are un nou motiv de legare a fibronectinei care este unic la mycobacterii. S-au studiat domeniile fibronectinei umane care interacționează cu alpha-Ag. Fragmentele de FN generate fie prin proteoliză, fie prin tehnici de splicing alternativ ADN au fost comparate pentru abilitatea lor de a lega la alpha-Ag. Fragmentele care conțin atât domeniul C-terminal de legare a heparinei, cât și domeniul central de legare la celule au legat puternic la alpha-Ag. Fragmentul cu domeniul C-terminal de legare a heparinei, în mutația care a rezultat în pierderea activității sale de legare a heparinei, nu poate lega la alpha-Ag. Aceste descoperiri au sugerat că locusul mutant al FN de legare a heparinei este în același timp și principalul locus de legare al alpha-Ag. Domeniile FN de legare a alpha-Ag ar putea lega toți bacilii mycobacterieni, sugerând că aceste două domenii reprezintă importanți contribuabili la infecția mycobacteriană. (47)

Fibronectina și virusurile

Oncoproteina E7 codificată de papilomavirusul uman (HPV) tipul 16 a reprodus transcrierea fibronectinei, un component cheie al matricei extracelulare. Această reproducere, detectată într-o serie de linii celulare HPV-pozitive nontumorigene și tumorigene, a fost eliminată când repeaturile Cys-X-X-Cys din E7 au fost întrerupte. (48)

Interacțiunile celule-matrice extracelulară, reglate în parte de către integrinele beta(1), joacă un rol cheie în recircularea limfocitelor T și infiltrarea țesutului în răspunsurile inflamatorii și imune. Infecția cu HIV poate afecta aderarea celulelor TCD4+, precum și traficul și migrarea acestor celule, care sunt cruciale pentru recunoașterea antigenelor străine.

A fost studiată expresia lanțurilor CD29 și CD49c, -d, -e și -f ale integrinelor beta(1) in vitro pe celulele T primare infectate cu HIV. S-a urmărit și legarea fibronectinei și producția de limfocite CD4+. Expresia integrinei beta(1) pe subpopulațiile T CD4+ și CD4- a fost reglată prin activarea celulară cu fitohemaglutinină-P și interleukină-2, dar a fost neafectată de infecția HIV, chiar la vârful replicării virale și depleția celulelor CD4+. Similar, legarea fibronectinei la limfocitele CD4+ nu a fost afectată de infecția HIV. Aceasta sugerează că limfocitele infectate pot fi în măsură să extravazeze, să migreze și să recircule prin organism până la moartea lor. (49)

Superfibronectina, o formă multimerică de fibronectină, crește infecția cu HIV a limfocitelor primare T CD4+.

Abilitatea virusurilor și a bacteriilor de a interacționa cu matricea extracelulară joacă un rol important în infecțiozitatea și patogenitatea lor. Fibronectina este un component major al matricei extracelulare în țesutul limfatic nodal, principalul loc al depozitării și replicării HIV în timpul fazei cronice a infecției. De aceea, s-a pus întrebarea dacă FN matriceală poate afecta abilitatea HIV de a infecta limfocitele. Pentru a studia rolul FN matriceale în infecția HIV, s-a folosit superfibronectină (sFN), o formă multimerică de FN care se aseamănă mult in vivo cu FN matriceală. HIV-1IIIIB leagă eficient la sFN și astfel infecția cu HIV a limfocitelor primare CD4+ este crescută în prezența sFN. Această creștere pare să fie rezultatul creșterii

adeziunii particulelor virale la suprafața celulară în prezența sFN, urmată de internalizarea virusului. Modificarea enzimatică a proteoglicanilor de suprafață celulară a inhibat aderarea complexelor HIV-1IIIB/sFN la limfocite. Aceeași acțiune pe integrine nu a avut nici un efect asupra aderării complexelor HIV-1IIIB/sFN la limfocite. Peptida III1-C a legat singură HIV-1IIIB eficient și a crescut infecția HIV, dar nu așa de eficace ca sFN. Proteina de înveliș gp120 HIV-1IIIB se leagă la regiunea III1-C a sFN și poate fi importantă în interacțiunea virusului cu FN matriceală.

S-a concluzionat că HIV-1IIIB interacționează specific cu regiunea III1-C din FN matriceală, și această interacțiune poate juca un rol în facilitarea infecției cu HIV in vivo, și mai ales în țesutul limfatic nodal. (50)

1. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson D. J., *Molecular Biology of cell*, Second Edition, 1994, 186-192.
2. Pelta J., Berry H., Fadda G. C., Pauthe E., Lairez D., *Statistical conformation of human plasma fibronectin*, *Biochemistry*, 2000, 39 (17): 5146-54.
3. Cota E., Clarke J., *Folding of beta-sandwich proteins: three-state transition of a fibronectin type III module*, *Protein Science*, 2000, 9 (1): 112-20.
4. Kaiura T. L., Itoh H., Kubaska S. M. 3rd, McCaffrey T. A., Liu B., Kent K. C., *The effect of growth, cytokines, and extracellular matrix proteins on fibronectin production in human vascular smooth muscle cells*, *Journal of Vascular Surgery*, 2000, 31 (3): 577-84.
5. Pancov 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) integrins promotes early fibronectin fibrillogenesis*, *Journal of Cell Biology*, 2000, 148 (5): 1075-90.
6. Kitamura N., Nishinarita S., Takizawa T., Tomita Y., Horie T., *Cultured human monocytes secrete fibronectin in response to activation by proinflammatory cytokines*, *Clinical & Experimental Immunology*, 2000, 120 (1): 66-70.
7. 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*, 2000, 200 (1): 1-7.
8. Hayama M., Inoue R., Akiba S., Sato T., *Inhibitory effect of cepharanthine on fibronectin production in growth factor-stimulated rat mesangial cells*, *European Journal of Pharmacology*, 2000, 390 (1-2): 37-42.
9. Yamato M., Konno C., Kushida A., Hirose M., Utsumi M., Kikuchi A., Okano T., *Release of adsorbed fibronectin from temperature-responsive culture surfaces requires cellular activity*, *Biomaterials*, 2000, 21 (10): 981-6.
10. Tumova S., Woods A., Couchman J. R., *Heparan sulfate chains from glypican and syndecans bind the Hep II domain of fibronectin similarly despite minor structural differences*, *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275 (13): 9410-7.
11. Hari S. P., McAllister H., Chuang W. L., Christ M. D., Rabenstein D. L., *Interaction of heparin with a synthetic pentadecapeptide from the C-terminal heparin-binding domain of fibronectin*, *Biochemistry*, 2000, 39 (13): 3763-73.
12. Lin H., Lal R., *Imaging and mapping heparin-binding sites on single fibronectin molecules with atomic force microscopy*, *Biochemistry*, 2000, 39 (12): 3192-6.
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 – Lung Cellular & Molecular Physiology*, 2000, 278 (4): L703-12.
14. Faucheux N., Hays B., Nagel M. D., *Activation of the cyclic AMP pathway in cells adhering to biomaterials: regulation by vitronectin- and fibronectin-integrin binding*, *Biomaterials*, 2000, 21 (10): 1031-8.

15. Yamamoto J., Kawano M., Hashimoto M., Sasaki Y., Yamashita T., Taka T., Watanabe S., Giddings J. C., *Adjuvant effect of antibodies against von Willebrand Factor, fibrinogen, and fibronectin on staphylokinase-induced thrombolysis as measured using mural thrombi formed in rat mesenteric venules*, *Thrombosis Research*, 2000, 97 (5): 327-33.
16. Darribere T., Schwarzbauer J. E., *Fibronectin matrix composition and organization can regulate cell migration during amphibian development*, *Mechanisms of Development*, 2000, 92 (2): 239-50.
17. Armstrong P. B., Armstrong M. T., *Intercellular invasion and the organizational stability of tissues: a role for fibronectin*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1470 (2): 09-20.
18. Ayaki M., Mukai M., Imamura F., Iwasaki T., Mammoto T., Shinkai K., Nakamura H., Akedo H., *Cooperation of fibronectin with lysophosphatidic acid induces motility and transcellular migration of rat ascites hepatoma cells*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1495 (1): 40-50.
19. Kinsella M. G., Fischer J. W., Mason D. P., Wight T. N., *Retrovirally mediated expression of decorin by macrovascular endothelial cells. Effects on cellular migration and fibronectin fibrillogenesis in vitro*, *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275 (18): 13924-32.
20. Almeida E. A., Ilic D., Han Q., Hauck C. R., Jin F., Kawakatsu H., Schlaepfer D. D., Damsky C. H., *Matrix survival signaling: from fibronectin via focal adhesion kinase to c-Jun NH(2)-terminal kinase*, *Journal of Cell Biology*, 2000, 149 (3): 741-54.
21. Wagner C., Burger A., Radsak M., Blum S., Hug F., Hansch G. M., *Fibronectin synthesis by activated T lymphocytes: up-regulation of a surface-associated isoform with signaling function*, *Immunology*, 2000, 99 (4): 532-9.
22. Nishibe T., Okuda Y., Kumada T., Tanabe T., Yasuda K., *Enhanced graft healing of high-porosity expanded polytetrafluoroethylene grafts by covalent bonding of fibronectin*, *Surgery Today*, 2000, 30 (5): 426-31.
23. 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.
24. MacKenna D., Summerour S. R., Villarreal F. J., *Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis*, *Cardiovascular Research*, 2000, 46 (2): 257-63.
25. Hu W. Y., Fukuda N., Satoh C., Jian T., Kubo 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 & Vascular Biology*, 2000, 20 (6): 1500-5.
26. 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 & Cytochemistry*, 2000, 48 (7): 1011-20.
27. Kwon S. Y., Takei H., Pioletti 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*, 2000, 18 (2): 203-11.
28. 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*, 2000, 113 (Pt 5): 795-806.
29. Lopez R. L., Francis J. A., Garite T. J., Dubyak J. M., *Fetal fibronectin detection as a predictor of preterm birth in actual clinical practice*, *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 2000, 182 (5): 1103-6.
30. Han D. C., Hoffman B. B., Hong S. W., Guo J., Ziyadeh F. N., *Therapy with antisense TGF-beta1 oligodeoxynucleotides reduces kidney weight and matrix mRNAs in diabetic mice*, *American Journal of Physiology*, 2000, 278 (4): F628-34.
31. Wang S. N., Hirschberg R., *Growth factor ultrafiltration in experimental diabetic nephropathy contributes to interstitial fibrosis*, *American Journal of Physiology*, 2000, 278 (4): F554-60.

32. Venkatesan N., Punithavathi D., Arumugam V., *Curcumin prevents adriamycin nephrotoxicity in rats*, British Journal of Pharmacology, 2000, 129 (2): 231-4.
33. Littlewood Evans A., Muller U., *Stereocilia defects in the sensory hair cells of the inner ear in mice deficient in integrin alpha8beta1*, Nature Genetics, 2000, 24 (4): 424-8.
34. Barilla M. L., Carsons S. E., *Fibronectin fragments and their role in inflammatory arthritis*, Seminars in Arthritis & Rheumatism, 2000, 29 (4): 252-65.
35. Castellani P., Docaratto A., Pau A., Nicola M., Siri A., Gasparetto B., Zardi L., Viale G., *The angionesis marker ED-B+ fibronectin isoform in intracranial meningiomas*, Acta Neurochirurgica, 2000, 142 (3): 277-82.
36. Brenner W., Gross S., Steinbach F., Horn S., Hohenfellner R., Thoroff J. W., *Differential inhibition of renal cancer cell invasion mediated by fibronectin, collagen IV and laminin*, Cancer Letters, 2000, 155 (2): 199-205.
37. Ito H., Miyazaki M., Nishimura F., Nakajima N., *Secretion of extracellular matrix (fibronectin), growth factor (transforming growth factor beta) and protease (cathepsin D) by hepatoma cells*, Oncology, 2000, 58 (3): 261-70.
38. Genda T., Sakamoto M., Ichida T., Asakura H., Hirohashi S., *Loss of cell-cell contact is induced by integrin-mediated cell-substratum adhesion in highly-motile and highly-metastatic hepatocellular carcinoma cells*, Laboratory Investigation, 2000, 80 (3): 387-94.
39. 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, 2000, 163 (5): 1553-9.
40. 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, 2000, 86 (1): 83-8.
41. Mongodin E., Bajolet O., Cutrona J., Bonnet N., Dupuit F., Puchelle E., de Bentzmann S., *Fibronectin-binding proteins of Staphylococcus aureus are involved in adherence to human airway epithelium*, Infection & Immunity, 2002, 70 (2): 620-30.
42. Penkett C. J., Dobson C. M., Smith L. J., Bright J. R., Pickford A. R., Campbell I. D., Potts J. R., *Identification of residues involved in the interaction of Staphylococcus aureus fibronectin-binding protein with the (4)F1(5)F1 module pair of human fibronectin using heteronuclear NMR spectroscopy*, Biochemistry, 2000, 39 (11): 2887-93.
43. Woltz C., Pohlmann-Dietze P., Steinhuber A., Chien Y. T., Manna A., van Wamel W., Cheung A., *Agr-independent regulation of fibronectin-binding protein (s) by the regulatory locus sar in Staphylococcus aureus*, Molecular Microbiology, 2000, 36 (10): 230-43.
44. Bisognano C., Vaudaux P., Rohner P., Lew D. P., Hooper D. C., *Induction of fibronectin-binding proteins and increased adhesion of quinolone-resistant Staphylococcus aureus by subinhibitory levels of ciprofloxacin*, Antimicrobial Agents & Chemotherapy, 2000, 44 (6): 1428-37.
45. 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 & Immunity, 2000, 68 (60): 3226-32.
46. Chia J. S., Yeh C. Y., Chen J. Y., *Identification of a fibronectin binding protein from Streptococcus mutans*, Infection & Immunity, 2000, 68 (4): 1864-70.
47. 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 mycobacterial infection*, Biochemical Journal, 2000, 347 Pt 3: 725-31.
48. Rey O., Lee S., Park N. H., *Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein represses transcription of human fibronectin*, Journal of Virology, 2000, 74 (10): 4912-8.
49. Leblond V., Legendre C., Gras G., Dereuddre-Bosquet N., Lafuma C., Dormont D., *Quantitative study of beta1-integrin expression and fibronectin interaction profile of T lymphocytes in vitro infected with HIV*, AIDS Research & Human Retroviruses, 2000, 16 (5): 423-33.
50. Tellier M. C., Greco G., Klotman M., Mosoian A., Cara A., Arap W., Ruoslahti E., Pasqualini R., Schnapp L. M., *Superfibronectin, a multimeric form of fibronectin, increase HIV infection of primary CD4+ T lymphocytes*, Journal of Immunology, 2000, 164 (6): 3236-45.

ICAM (MOLECULE DE ADEZIUNE INTERCELULARA)

Moleculele de adeziune pot fi definite drept complexe moleculare, exprimate pe unele structuri biologice, cu densitate și intensitate variabile, care prezintă afinitate particulară față de alte molecule, liganzi. La rândul lor, liganzii pot fi constituiți tot din molecule de adeziune sau din alți receptori celulari de suprafață sau aflați pe proteine circulante.

Superfamilia imunoglobulinică – cu numeroși reprezentanți: LFA-2 (Lymphocyte Function Associated 2-molecule) sau CD 2+; LFA-3 (Lymphocyte Function Associated 3-molecule) sau CD 58+; subgrupul ICAM (Intercellular Cell Adhesion Molecule); VCAM (Vascular Cell Adhesion Molecule); PECAM-1 sau CD 23+.

Acest subgrup de molecule de adeziune cuprinde, după cercetările ultimilor ani, 5 membrii: ICAM-1, ICAM- 2, ICAM-3, ICAM-4, ICAM-5.

ICAM-1(CD 54)

ICAM-1 este o glicoproteină de suprafață de 90 kDa, care funcționează ca moleculă de adeziune în diferite reacții imunologice inflamatorii. ICAM-1 este codificat de un ARNm de 3,3 kb, având 7 exoni și 6 introni. Prezintă un domeniu extracelular cu 453 reziduuri de aminoacizi, conținând 5 domenii *Ig-like*, fiecare domeniu fiind codificat de câte un exon. (1)

ICAM-1 are omologii de secvență cu moleculele de adeziune neurale (NCAM) și cu glicoproteinele asociate mielinei (MAG), structuri care conțin tot 5 domenii *Ig-like*. NCAM și MAG sunt molecule de adeziune ale sistemului nervos. (2)

Secvența upstream a ARNm a ICAM-1 prezintă situsuri de legare pentru factorii de transcriere SP-1, AP-1 și NF-kB. Un scurt fragment conținând un situs de legare pentru NF-kB s-a dovedit că funcționează ca un activator. În secvența ARNm a moleculei ICAM există și un element „silencer”. Expresia genică a ICAM-1 pare a fi modulată de multiple elemente cis-acting. (3)

ICAM-1 este un ligand pentru LFA-1 (Lymphocyte Function Associated antigen-1, $\alpha\text{L}\beta_2$). Legarea ICAM-1 la LFA – 1 este indusă de citokine proinflamatorii precum IL-1, TNF- α sau IFN- γ . LFA-1 este o integrină foarte importantă în răspunsul specific antigenic al limfocitelor și, împreună cu alte integrine β_2 , în diapedeza monocitelor și neutrofilelor către situsurile inflamatorii.

LFA-1 recunoaște molecule de adeziune intercelulare (ICAM), membre ale superfamiliei de molecule imunoglobulinice, dintre care, cea mai importantă, din punct de vedere biologic, este molecula ICAM-1. Experimental, a fost introdusă o punte bisulfurică în domeniul αL I pentru a stabiliza o conformație extinsă. Astfel s-a descoperit că acest lucru crește afinitatea pentru ICAM-1 și s-a adus o nouă argumentație în sprijinul ideii că afinitatea este reglată de conformație.

Prin studii cristalografice s-a demonstrat existența interacțiunii dimerice dintre o integrină și un ligand (respectiv dintre domeniul $\alpha\text{L}\beta_2$ și ICAM). (4).

Molecula ICAM-1 sau CD 54 este exprimată pe o serie de celule precum: celule endoteliale activate (nivel crescut de ICAM-1), limfocite T activate (nivel moderat), limfocite B activate (nivel moderat), monocite (nivel moderat), celule prezentatoare de antigen (APC), unele celule ale tumorilor solide.

Citokinele inflamatorii precum TNF, IL-1, IFN- γ cresc expresia CD 54.

Expresia CD 54 poate fi indusă pe celulele epiteliale, fibroblastice, endoteliale.

CD 54 este exprimată constitutiv in vivo pe anumite celule epiteliale și endoteliale. Forma solubilă a CD 54 poate acționa ca un inhibitor al reacțiilor imune dintre celulele maligne și celulele T citotoxice sau NK, motiv pentru care poate fi utilizată ca agent terapeutic în bolile autoimune. (5).

Funcția moleculei ICAM-1 este de a realiza adeziunea între celulele endoteliale și cele leucocitare. ICAM-1 se leagă la LFA-1 sau la Mac-1 (Macrophage Antigen-1). ICAM este receptor pentru rinovirusuri dar și pentru parazitul *Plasmodium falciparum*, agentul etiologic al malariei, agent care parazitează celulele sangvine. CD 54 reacționează cu CD 11a/CD 18 sau cu CD 11b/CD 18 în reacțiile imune și/sau inflamații. Neutrofilele care prezintă CD 11a/CD 18 se leagă la celulele endoteliale ale vaselor de sânge prin ICAM-1. (6).

Mai multe studii au arătat că, în ateroscleroză, celulele musculaturii netede ale vaselor de sânge exprimă ICAM-1 și VCAM. Studii in vitro au arătat că există factori stimulatori și inhibitori care reglează expresia ICAM-1 și VCAM în culturile de celule musculare netede. Se cunoaște rolul moleculelor de adeziune de pe celulele musculare netede ale vaselor de sânge în acumularea leucocitelor și activarea celulelor mononucleare. Expresia moleculelor de adeziune pe celulele musculare netede este dependentă de fazele ciclului celular și influențează proliferarea și diferențierea celulelor musculare netede. Moleculele ICAM-1 și VCAM din celulele musculare netede, pot contribui la reacția inflamatorie din peretele vascular și pot fi implicate activ în progresia și stabilitatea plăcilor aterosclerotice. (7)

ICAM-2 (CD 102)

ICAM-2 este un membru al superfamiliei imunoglobulinice, al proteinelor de adeziune la suprafața celulară și care mediază legarea leucocitelor la LFA-1 (CD 11a/CD 18) și MAC-1 (CD 11b/CD 18). Fiind o proteină de adeziune la suprafața celulară implicată în migrarea tisulară a leucocitelor, ICAM-2 este exprimată pe următoarele celule: majoritatea leucocitelor, limfocitele T, limfocitele B, monocite, plachete sangvine, progenitorii hematopoietici CD 34+.

Molecula ICAM-2 a fost identificată, prin screen-ing genetic, ca un activator al căii PI 3K /AKT care conduce la inhibarea apoptozei. ICAM-2 induce fosforilarea tirozinei din ezrin și translocația membranelor a kinazei PI 3K, rezultând producerea de PI 3, PI 4, PI 5, activarea PDK-1 și AKT, și fosforilarea subsegmentelor, respectiv BAD, GSK 3 și FKHR. ICAM-2 protejează celulele primare umane CD 19+ de TNF- α și de apoptoza mediată prin Fas.

ICAM-2 are o funcție de semnal prin care participă la comunicarea intracelulară și în diferite cai imunologice.

S-a postulat ideea că ICAM-2 ar fi implicată în recirculația limfocitelor, traficul limfocitar, extravazare. Studii efectuate pe șoareci deficienți în ICAM-2 au demonstrat că traficul de eosinofile crește în răspunsul inflamator. S-a descoperit că ICAM-2 este exprimată în cantitate mare în limfoame și pe celulele B CD 5+ de la pacienții cu leucemie cronică limfocitară B (B-CLL). (8).

ICAM-2 este singura dintre cele 5 molecule ICAM care prezintă pe cromozomul 17q 23–25 un segment asociat cu instabilitate genomică și care a fost recent identificat ca prezentând forme aberante în diferite cancere. (9)

Studiile genetice au demonstrat că ICAM-2 este un mediator al semnalelor de supraviețuire celulară inițiate prin interacțiunea cu LFA-1. ICAM-2 mediază transmiterea semnalelor de supraviețuire care blochează apoptoza celulară, prin activarea căii PI 3K/AKT, prin activarea ezrin după fosforilarea tirozinei src și fosforilarea kinazei Rho, dependentă de treonină. Activarea ezrin presupune prezența, pe suprafața membranelor a celulelor limfoide, a PI 3K, lucru care conduce la activarea căii PI 3K/AKT. Semnalul de supraviețuire poate fi inițiat când celula B primară întâlnește o celulă T primară, în absența unei recunoașteri a TCR celular. (10)

ICAM-2 induce activarea ezrin. Domeniul ICAM-2 citoplasmatic interacționează cu ezrin, membru al familiei ERM (Ezrin – Radixin – Moesin), familie de proteine ce aparține citoscheletului membranelor. Proteina ERM influențează morfologia celulară, adeziunea, creșterea celulară prin interacțiuni membrană – citoplasmă. Supraexprimarea ezrin induce creșterea exprimării ICAM-2, ceea ce duce la fosforilarea ezrin – tirozinei și a treoninei, concomitent cu creșterea cantității de p 85 și asocierea PI 3K în celulele T Jurkat. Acest lucru este suficient pentru a transloca PI 3K pe membrana plasmatică și pentru a iniția producerea de PIP 3. Acumularea de PIP 3 conduce la localizarea AKT pe membrană și la activarea acestuia. (11)

A fost propus și un model de activare în două etape pentru ezrin. Proteinele ERM se pare că prezintă o conformație dormantă, închisă, datorită interacțiunii capătului – COOH terminal cu porțiunea – NH₂ terminală. (12)

Rho GDI (Rho – GDP – Dissociation Inhibitor) leagă numai proteine ERM activate, ceea ce demonstrează că disocierea Rho/Rho GDI este o precerință pentru activarea Rho kinazei (ROCK). Se sugerează că ROCK este implicată în activarea ezrin, care conduce la fosforilarea lui prin src/p 62^{yes}. (13).

Activarea ICAM-2 poate conduce la un semnal antiapoptotic într-o varietate de celule. Deși ICAM-3, CD 43 și CD 44 induc activarea AKT în celulele primare, numai ICAM-2 și ICAM-3 sunt capabile să blocheze apoptoza prin Fas și TNF – α .

ICAM-2 și ICAM-3 posedă roluri funcționale specifice pentru fiziologia celulelor, roluri distincte de ale moleculelor CD 43 și CD 44. Totuși, studii recente au demonstrat că CD 44, în celulele sinoviale ale pacienților cu artrită reumatoidă, pot conduce la apoptoză. Funcțiile specifice ale moleculelor CD 43 și CD 44 de pe limfocite, nu sunt încă bine studiate. Rolurile antiapoptotice ale ICAM-3 sunt similare cu cele ale ICAM-2, ambele molecule cresc nivelul PIP 3. Prezența pe suprafața membranelor a ICAM-3 determină creșterea producției PIP 2, deși întârzie activarea AKT, lucru care deosebește molecula ICAM-3 de ICAM-2. Studiile prezentate demonstrează că, în ciuda similarității structurale dintre unele molecule ICAM, există diferențe semnificative între căile de semnalizare ale moleculelor ICAM capabile să lege aceleași proteine ERM. Căile implicate în reglarea ICAM-2 sau în expresia altor molecule de adeziune pot constitui ținte alternative în dezvoltarea terapiei antitumorale și pot oferi noi ținte imunomodulatoare. (14).

ICAM-3 (CD 50)

ICAM-3 umană, cunoscută ca CD 50, este o glicoproteină transmembranară de 120kDa. Ca și ceilalți membri ai familiei ICAM, ICAM-3 conține în segmentul extracelular domeniul C-2 *Ig-like*, aparținând superfamiliei de molecule imunoglobulinice.

Celulele care exprimă ICAM-3 sunt: neutrofilele, monocitele, bazofilele, macrofagele, celulele epidermale Langerhans, celulele dendritice, limfocitele T CD 4+, celulele endoteliale din angiogeneză.

ICAM-3, în celulele normale, are valori detectabile prin ELISA cuprinse în intervalul 40–360 ng/ml.

Molecula matură ICAM-3 posedă 518 aminoacizi, 450 aminoacizi în segmentul extracelular (organizat în 5 domenii C-2 *Ig-like*), 25 aminoacizi în porțiunea transmembranară și 37 aminoacizi la nivelul cozii citoplasmatică care aparent nu are activitate kinazică dar se poate asocia cu tirozin – kinazele citoplasmatică. h ICAM nu prezintă omologie de secvență în porțiunea transmembranară cu h ICAM-1 și h ICAM23. (15).

În ceea ce privește identitatea structurală între domeniile C-2 *Ig-like* din porțiunea extracelulară a ICAM-3 și ICAM-2, se pare că există o omologie de 31% a domeniului 5 între ICAM-3 și ICAM-1, iar între domeniul 2 al ICAM-3 și domeniul 2 al ICAM-1, omologia este de 77%. ICAM-2 și ICAM-3 prezintă o omologie de secvență de 37% între domeniile C-2 *Ig-like*.

ICAM-3 este cunoscută ca ligand pentru LFA-1 și $\alpha\text{D}\beta_2$. Atât LFA-1 cât și $\alpha\text{D}\beta_2$ aparțin familiei de β_2 -integrine, subfamilie asociată cu leucocitele. Dacă LFA-1 se află pe limfocitele T, B, monocite, molecula $\alpha\text{D}\beta_2$ este exprimată de monocitele și macrofagele activate. Legarea LFA-1, prin intermediul moleculei CD 50, se realizează prin domeniul C-2 *Ig like*, mai precis prin 4 aminoacizi din domeniul 1. LFA-1 se leagă la ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, deși identitatea aminoacizilor din domeniul 1 a celor trei molecule de adeziune nu depășește 45%.

Studii experimentale au arătat că integrina leucocitară $\alpha\text{D}\beta_2$, care mediază adeziunea celulară într-o varietate de evenimente esențiale pentru o funcție imunitară normală, se leagă preferențial la ICAM-3. (16).

ICAM-3 este un receptor specific pentru leucocite, implicat în răspunsul imun primar. A fost investigată interacțiunea dintre ICAM-3 și proteinele ERM (Ezrin – Radixin – Moesin), rolul acestei molecule de adeziune în interacția celulară prin intermediul LFA-1, dar și poziția membranară a ICAM-3 în limfocitele polarizate care migrează. S-a demonstrat că asocierea dintre ICAM-3 și capătul – NH₂ terminal al proteinelor ERM este indusă de fosfatidil inositol 4,5 bifosfat (PIP 4,5). Studiile de fluorescență celulară au arătat că moesin și ICAM-3 se redistribuie pe membrana plasmatică în timpul migrării limfocitelor. Un rol foarte important în poziționarea moleculelor ERM dar și în stabilirea polarizării ICAM-3, îl au reziduurile serinice Ser 487, Ser 489, Ser 496 din regiunea citoplasmatică a ICAM-3. (17)

Din punct de vedere al activității biologice, ICAM-3 este un receptor specific leucocitar implicat în răspunsul imun primar. Funcțional, ICAM-3 pare a juca un rol important în interacțiunile dintre limfocitele T și celulele prezentatoare de antigen. Prin prezența ICAM-3 pe suprafața limfocitelor T, este facilitată interacțiunea celulelor T cu antigenele prezentate de celulele prezentatoare de antigen.

ICAM-3 leagă molecula DC-SIGN, o lectină de tip C prezentă pe suprafața celulelor dendritice. DC-SIGN și DC-SIGNR (un receptor descoperit pe endoteliul capilarelor sinusoide, al capilarelor placentare, al vaselor limfatice), se leagă la oligozaharidele prezente la nivelul anvelopei virusului imunodeficienței umane (HIV). Prin această interacțiune, infecția virală este promovată către celulele T. DC-SIGN și DC-SIGNR recunosc oligozaharidele endogene, manoză, lucru care ar putea reprezenta un viitor în profilaxia HIV. (18).

ICAM-3 are un rol important în proliferarea subseturilor de celule T. Și forma serică a ICAM-3 este asociată celulelor T.

ICAM-4

ICAM-4 este un membru al familiei ICAM exprimată de celulele eritroide. Au fost identificați liganzi pentru ICAM-4, în urma studiilor efectuate pe linii de celule hematopoietice și nonhematopoietice. Adeziunea liniilor celulare la fragmentul ICAM-4 Fc este mediată de integrina LDV, pe celulele hematopoietice, și de integrina RGD, pe celulele nonhematopoietice. Integrina de pe celulele hematopoietice a fost identificată, prin studii cu anticorpi monoclonali, ca fiind 41, iar integrina de pe celulele nonhematopoietice, V-integrina (V_1 și V_5). (19).

ICAM-4 funcționează ca ligand pentru integrine și prezintă și situs de legare a integrinelor.

ICAM-4 prezintă numeroase similitudini cu ICAM-2. Din punct de vedere structural, ICAM-4 este o glicoproteină de membrană eritocitară de 42 kDa. Capătul - NH_2 terminal al ICAM-4 este orientat extracelular. Domeniul extracelular al ICAM-4 constă, ca și cel al ICAM-2, din două domenii *Ig like* și din reziduurile de aminoacizi care leagă LFA-1. Între structurile ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 și ICAM-4 există omologie de secvență de 30%. S-a reconstituit structura ICAM-4 pe baza structurii ICAM-2. Modelul ICAM-4, construit experimental pe baza structurii ICAM-2, prezintă omologie în secvența aminoacizilor de 29%. Regiunea- NH_2 terminală a ICAM-4 prezintă 15 reziduuri de aminoacizi neincluse în structura ICAM-2. (20)

ICAM-4 este o moleculă de adeziune intercelulară care aparține grupului de celule roșii Landsteiner-Wiener, care se leagă la integrinele specifice leucocitelor. ICAM-4 este exprimată de celulele eritroide și placentă.

Principala funcție a ICAM-4 este legată de fiziologia hematiei. ICAM-4 este prima moleculă exprimată în eritropoieză. În măduva osoasă mamaliană, eritropoieza are loc în unități anatomice cunoscute sub numele de insule eritroblastice. Integritatea acestor structuri este menținută în parte de interacția dintre integrina 41, exprimată de eritroblaste, și VCAM-1, exprimată de macrofagele centrale. Toate liniile de celule hematopoietice care se leagă la ICAM-4 Fc exprimă integrine din familia 1. (21).

ICAM-5 (Telencephalin-TLN)

Telencephalin este o glicoproteină de 130 kDa exprimată de neuronii din telencephalon, cel mai rostral segment al creierului. În neuroni, TLN este localizată la nivelul membranei dendritice dar nu și la nivelul membranei axonale. Telencephalin este o proteină integrală de membrană, cu 9 domenii *Ig like* în tandem în regiunea extracelulară, un domeniu transmembranar și o scurtă coadă citoplasmatică. Cele 8 domenii distale *Ig like*, ale TLN prezintă înaltă omologie cu domeniile *Ig like* ale moleculelor de adeziune intercelulare ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 și ICAM-R. Similaritățile funcționale între TLN și ICAM arată o legătură nouă și puternică între moleculele superfamiliei de imunoglobuline din sistemul nervos și sistemul imunitar. TLN este un exemplu de moleculă de adeziune asociate dendritelor, implicată în organizarea segmentală a creierului, responsabilă de interacțiunea celulă-celulă din timpul dezvoltării dendritice dar și în menținerea rețelei neuronale. (22)

Telencephalin este o glicoproteină de tip 1 care a fost localizată și în materia cenușie telencefalică, respectiv în cortexul cerebral și în ganglionii bazali. S-a studiat din punct de vedere imunohistochimic rolul TLN în dezvoltarea creierului uman. În hipocamp, imunoactivitatea TLN apare la 29 de săptămâni, în perioada de gestație, se intensifică apoi

în perioada de gestație și persistă până la adult. În cortexul temporal, imunoreactivitatea TLN a fost slabă, restrânsă la citoplasma neuronilor piramidali din a 35-a și a 39-a săptămână de gestație, devenind apoi difuză și intensă în straturile corticale, mai ales în stratul molecular, în luna a 5-a postnatal. TLN a fost comparată ulterior cu synaptophysin și cu proteina 2 asociată microtubulilor, sugerându-se implicarea ei în maturarea funcțională a dendritelor neuronale și în sinapse. (23)

Experimentele pe șoareci au arătat că gena murină a TLN are 6,3 kb și 11 exoni. Siturile de inițiere a transcrierii sunt localizate upstream de codonul start ATG, la 92–95 bp. Secvențierea ADN la nivelul regiunii 5' a relevat prezența unui element inițiator puternic pentru regiunea TATA, două cutii CAAT și patru secvențe E-box, 2 secvențe N-box. Gena murină a TLN se găsește în regiunea proximală a cromozomului 9, în vecinătatea genei ICAM-1, ceea ce arată că genele pentru TLN și pentru ICAM derivă dintr-o genă ancestrală comună, fiind rezultatul unui proces de duplicație genică. (24)

TLN servește ca ligand pentru integrina leucocitară CD 11a/CD 18. A fost studiat situsul de legare al ICAM-5 de pe CD 11a/CD 18. S-a construit o proteină care conținea primul domeniu imunoglobulinic al ICAM-5 și care s-a dovedit capabilă să suporte interacția CD 11a/CD 18. Experimental s-a dovedit că deleția domeniului sus-menționat conduce la dispariția interacției. Anticorpul monoclonal care reacționează cu primul domeniu al ICAM-5, blochează interacția. Primul domeniu solubil al ICAM-5 inhibă legarea limfocitelor, immobilizând ICAM-5 la concentrații de 50nM sau mai mari. Al șaselea domeniu al ICAM-5 a fost capabil să suporte legarea leucocitelor dar această activitate nu implică integritatea leucocitare. Pentru a testa implicarea ICAM-5 în interacțiile leucocite–neuroni, s-a efectuat un test utilizând celule T umane legate la neuronii hipocampici de șobolan. S-a constatat că ICAM-5 acționează ca o moleculă de adeziune majoră pentru leucocitele legate la neuronii din sistemul nervos central.

S-a demonstrat că proteina ICAM-5 umană interacționează homofilic la legarea domeniului 1 imunoglobulinic la domeniul 4–5. În timpul dendritogenezei, în dezvoltarea creierului de șobolan, ICAM-5 este exprimat sub formă monomerică, în timp ce în neuronii maturi, se regăsește sub forma unui complex cu masă moleculară mare. Descoperirile indică că activitatea de legare homofilică este reglată de tranziția nonmonomer/monomer. ICAM-5 mediază două tipuri de activitate de legare: legare homofilică, între neuroni și legare heterofilică, între neuroni și celulele leucocitare. (25)

De TLN din creier se leagă și capetele – COOH terminale ale presenilin 1 și presenilin 2 (PS 1 și PS 2). Deficiența cu PS 1 conduce la acumularea de TLN într-un compartiment celular care nu a fost încă identificat. Primul domeniu transmembranar și domeniul – COOH terminal al PS 1 formează un „buzunar” de legare cu domeniul transmembranar al TLN. Proteina precursoră mieloidă (APP) se leagă de această regiune și îi conferă un model structural de inel. (26).

Rolul biologic al moleculelor de adeziune

Moleculele de adeziune au un rol foarte important în imunomodularea adaptativă.

a) moleculele de adeziune și receptorul TCR (T Cell Receptor)

Receptorul pentru antigen din membrana limfocitelor T (TCR) este modulată funcțional de unele molecule de adeziune prin următoarele metode:

- interacțiunea, prin complementaritate, între moleculele de adeziune, unele exprimate pe celula limfoidă T purtătoare de receptor TCR, altele pe celulele prezentatoare de antigen (APC), de tipul LFA-2 (CD2+)/LFA-3 sau ICAM/LFA-1 (CD 11a+ CD18+);
- potențarea sensibilității receptorului TCR de către unele molecule de adeziune, precum LFA-1 (CD 11a+ CD18+), LFA-3 și ICAM-1, prin consolidarea legăturii limfocit–celulă prezentatoare de antigen;
- integrinele exprimate pe limfocitele T (LFA-1, VLA) sunt recunoscute de către receptorii specifici de pe celula prezentatoare de antigen, ulterior decelării semnalului antigenic de către TCR, lucru care influențează pozitiv activarea intracelulară prin protein–tirozin–kinaze. (24)

b) moleculele de adeziune și receptorul BCR (B Cell Receptor)

Receptorul imunoglobulinic de la suprafața limfocitelor B este și el modulată de unele molecule de adeziune pe mai multe căi:

- exprimarea concomitentă pe același limfocit B atât a receptorului BCR, cât și a unor molecule de adeziune (LFA-1, ICAM-1) mărește sensibilitatea BCR față de semnalul antigenic (rol catalitic al moleculelor de adeziune);
- L-selectinele, prezente pe limfocitele B, ca receptori distincți, cooperează activ cu receptorul BCR în recunoașterea antigenului, în sensul asigurării unei mai fine discriminări între semnalele antigenice cu intensități diferite. (41)

c) moleculele de adeziune și celulele prezentatoare de antigen:

Celulele prezentatoare de antigene (APC) pot fi modulate de către moleculele de adeziune prin:

- exprimarea diferită a ICAM-1, VCAM, VLA-3 pe celulele dendritice foliculare „controlează” rata de prezentare a epitopilor antigenici de către receptorii TCR sau BCR;
- exprimarea ICAM-1 pe keratinocitele tegumentare induce modularea funcției de prezentare a antigenelor, în cazul antigenelor pătrunse pe cale cutanată. (21)

d) moleculele de adeziune și acțiunea citokinelor

Unele molecule de adeziune reprezintă ele însele receptori pentru acțiunea unor citokine (de exemplu: receptorul moleculelor de adeziune este reprezentat de superfamilia imunoglobulinică iar citokina-ligand este IL-1, IL-6, M-CSF, G-CSF). (35)

e) moleculele de adeziune și procesul inflamator

Moleculele de adeziune modulează unele procese inflamatorii precum:

- activarea aderării leucocitelor la peretele endotelial;
- accelerarea diapedezei (transmigrării) leucocitare;
- stimularea proceselor tisulare reparatorii

Moleculele de adeziune modulează următoarele mecanisme ale inflamației:

- accelerarea migrării intravasculare a leucocitelor (în precapilare) prin potențarea dependenței de moleculele de adeziune, în sensul exprimării selectinelor pe diferite structuri (L-selectine pe leucocit, E-selectine pe endotelium, P-selectine pe vasele placentare);
- aderarea fermă a leucocitelor la peretele endotelial, realizată tot prin relația de tip ligand – receptor, între leucocit și celula endotelială (integrine $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1; integrine $\alpha_4\beta_7$ /VCAM-1);
- diapedeza (transmigrarea leucocitară) este potențată, pe de o parte, prin relația ligand – receptor dintre leucocit și celula endoteliului (LFA-1/ICAM-1), iar pe de

altă parte prin efectul stimulator al PECAM-1 (CD 31+), moleculă de adeziune exprimată la nivelul joncțiunilor intercelulare din structura endoteliului capilar.

Între moleculele de adeziune și inflamație se pot stabili și alte relații precum cele dintre:

- integrine $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1;
- integrine $\alpha_4\beta_1$ /fibronectină;
- integrine $\alpha_4\beta_7$ /E-cadherine;
- p 150,95 (CD 11c+CD18+)/fibrinogen. (27, 28)

Expresia ICAM în patologice

Este bine stabilit că interacțiunile celulelor endoteliale și ale leucocitelor, prin intermediul moleculelor de adeziune, joacă un rol important în aterogeneză. Pe lângă selectine, moleculele de adeziune din superfamilia imunoglobulinică (ICAM-1), ca și VCAM-1 contribuie la adeziunea leucocitelor la endoteliu. ICAM-1 se leagă la LFA-1 (CD 18/CD 11a) sau la Mac-1 (CD 18/CD 11 b) și mediază adeziunea monocitelor, limfocitelor și a neutrofilelor la celulele endoteliale. (27).

Pe lângă rolul său în adeziunea celulă-celulă, ICAM-1 servește ca receptor pentru fibrinogenul solubil și pentru acidul hialuronic.

VCAM-1 se leagă la VLA-4. La pacienții cu ateroscleroză s-au măsurat nivelele moleculelor de adeziune solubile. Nivele ridicate de ICAM-1 solubil s-au observat în variatele forme de angină și au fost corelate cu riscul de infarct de miocard. În urmă cu câțiva ani, expresia ICAM-1 și VCAM-1 a fost detectată și pe celulele intimei din peretele vascular aterosclerotic. (28).

Ateroscleroza

Expresia moleculelor de adeziune de pe celulele musculare netede din artera aortă și arterele coronare umane a fost evidențiată prin studii imunohistochimice, utilizând anticorpi împotriva ICAM-1 sau VCAM-1, dar și antigene celulare specifice. În timp ce expresia ICAM-1 nu a fost detectată pe celulele musculare netede din aorta adulților, expresia acestei molecule de adeziune a fost observată pe celulele musculare netede ale intimei din leziunile aterosclerotice. ICAM-1 s-a regăsit și pe unele celule ale mediei, adiacente placilor aterosclerotice.

Expresia VCAM-1 a fost detectată pe celulele musculare netede ale intimei din arterele coronariene aterosclerotice, ca și din arterele aortice și carotide. Studiile experimentale au demonstrat o corelație între expresia ICAM-1 și VCAM-1 de pe celulele musculare netede sangvine și infiltratul celular mononuclear, sugerându-se că mediatorii derivați din celulele mononucleare pot să contribuie la inducerea in vivo a moleculelor de adeziune „vasculare”. Pe de altă parte, expresia moleculelor de adeziune de pe pereții vaselor poate facilita acumularea leucocitelor. (29)

Expresia ICAM-1 și VCAM-1 de pe celulele musculare netede ale intimei și mediei a fost proeminentă în plăcile fibroase și în leziunile aterosclerotice avansate.

Expresia moleculelor de adeziune de pe celulele musculare netede din pereții vasculari este controlată de citokine, factori de creștere, LDL (Low Density Lipoproteins), NO, prostaciline, metaloproteinaze de matrice.

Corelația dintre expresia moleculelor de adeziune de pe pereții vaselor aterosclerotice și infiltratul celular mononuclear sugerează un potențial rol al mediatorilor derivați din celulele

mononucleare în inducerea moleculelor de adeziune. Infiltratul de celule mononucleare din pereții vaselor aterosclerotice este alcătuit din limfocite T și macrofage. În plăcile aterosclerotice, limfocitele T sunt frecvent localizate la nivelul capului fibros, împreună cu celule musculare netede. Activarea limfocitelor T și a macrofagelor generează și eliberarea unor citokine ce exercită diferite efecte biologice asupra celulelor învecinate. Nivelele crescute de TNF- α și IL-1 β , substanțe secretate de macrofage, precum și IFN- γ , o importantă citokină derivată din celulele T, au fost detectate în pereții vaselor aterosclerotice. (30)

Unele studii *in vitro* au urmărit efectele citokinelor asupra expresiei ICAM-1 și VCAM-1, în culturi de celule musculare netede umane. IL-6, IL-8, TNF- β , IL-1 α nu exercită nici un efect asupra exprimării moleculelor de adeziune. IL-4 nu exercită nici un efect asupra expresiei ICAM-1 pe celulele musculare netede din arterele coronariene umane sau din vena safenă. În opoziție, IL-4 induce expresia VCAM-1 de pe celulele din vena safenă, dar nu are nici un efect pe celulele musculare netede coronariene. (31).

Anumite studii au urmărit efectele factorilor de creștere asupra expresiei moleculelor de adeziune de pe celulele musculare netede ale vaselor de sânge. În celulele izolate din șunturile arteriale, PDGF – BB și – AB, dar nu și –AA, induc expresia ICAM-1.

LDL (Low Density Lipoproteins) modificate cresc adeziunea monocitelor la celulele musculare netede ale coronarelor umane, în timp ce LDL native nu au nici un efect asupra acestor vase. Totuși, reglarea expresiei moleculelor de adeziune nu a fost indusă, pe celule musculare netede, de LDL modificate. (32)

Inhibitorii expresiei moleculelor de adeziune de pe celulele musculare netede ale vaselor de sânge ar putea oferi noi tinte terapeutice.

S-a demonstrat recent, prin experimente de co-cultivare a celulelor musculare netede și a celulelor endoteliale, ca aceste tipuri celulare inhibă expresia TNF- α . Un efect asemănător a fost obținut prin adăugarea exogenă de TGF- β . Totuși, TGF- β , derivat din endoteliu, pare a fi un mediator endotelial.

Donorii NO, SIN-1 și nitroprusiat de sodiu s-a demonstrat că inhibă expresia IL-1, indusă de ICAM-1, și expresia IFN- γ , indusă de VCAM-1 de pe celulele musculare netede din aorta umană și din vena safenă. Efectul NO se manifestă independent de stimularea guanilat ciclazei solubile. Efectul donozilor NO se manifestă la nivelul transcripțional și implică inhibarea activității IL-1 stimulate de NF-kB.

S-a demonstrat că prostaciclina sau cicloprost inhibă expresia TNF- α și IL-1 β indusă de VCAM-1, restrânge exprimarea ICAM-1 de pe celulele musculare netede din arterele coronariene umane și venele safene. Această inhibiție are loc la nivelul transcripțional și a fost mediată de creșterea nivelului de cAMP. În opoziție, nu s-au demonstrat efectele cicloprost, sau ale altor substanțe, asupra expresiei IFN- γ . Efectele cAMP-ului implică inhibarea unor căi de semnalizare comune TNF- α și IL-1 β , dar nu și IFN- γ .

Aceste experimente sugerează că celulele endoteliale pot controla expresia moleculelor de adeziune de pe celulele musculare netede, prin trei mediatori diferiți: TGF- β , prostaciclina, NO.

Acțiunea modulatorie a mediatorilor endoteliali este importantă din punct de vedere fiziologic. În condiții patofiziologice, precum în ateroscleroză, celulele endoteliale își schimbă repertoriul activităților funcționale, putând să contribuie la expresia moleculelor de adeziune de pe celulele musculare netede. (33)

Consecințele biologice ale adeziunii leucocitelor la celulele musculare netede nu sunt bine definite. În *in vitro*, producerea proteinei MIP-1 a fost activată în culturile monocitare, sub acțiunea ICAM-1. Recent a fost descrisă o creștere a activității procoagulante a monocitelor,

prin adeziune la celulele musculare netede. Acest efect a fost asociat cu o creștere a ARNm tisular și o creștere a sintezei proteice a monocitelor, putând fi blocat specific cu anticorpi anti-ICAM-1.

Moleculele ICAM-1 și VCAM-1 pot acționa, ca semnale costimulatorii asupra limfocitelor T, în timpul prezentării antigenului. Studiile au demonstrat că celulele musculare netede ale pereților vaselor aterosclerotice pot exprima proteine CMH II și, de aceea, a fost postulat rolul acestor celule în prezentarea antigenului de către celulele T.

S-a demonstrat că expresia ICAM-1 și a VCAM-1 de pe celulele musculare netede, poate fi indusă prin interacții CD 40/CD 40 ligand. (34).

ICAM-1 și VCAM-1 sunt exprimate de celulele musculare netede fetale imature, în timpul embriogenezei. În embrionul de șoarece, o expresie puternică a VCAM-1 a fost observată mai ales în mezenchim, care reprezintă sursa dezvoltării celulelor musculare netede. Șoarecii „deficienți” VCAM sau de ligandul său, VLA-4, prezentau alterări ale dezvoltării miocardului, ale vaselor, o dezvoltare insuficientă a epicardului și a vaselor coronare. Expresia moleculelor ICAM-1 și VCAM-1 scade în timpul ontogeniei, ambele molecule de adeziune sunt absente de pe celulele diferențiate ale muscularei netede contractile din media arterelor adulților. (35).

ICAM și stările de hipersensibilitate

Moleculele de adeziune pot avea un rol esențial în inițierea și autoîntreținerea imunofuncțiilor, mai ales în stările de hipersensibilitate.

Atât eosinofilele, cât și neutrofilele, poartă pe suprafață moleculele de adeziune din familia integrinelor LFA-1, CR 3 și p 150, 95, care interacționează cu structuri celulare complementare (de tipul ICAM-1 pentru LFA-1), ceea ce duce la aderarea leucocitelor la endoteliul vascular și la activarea diapedezei leucocitare.

Moleculele de adeziune se exprimă mai puternic la nivelul ariilor tisulare implicate în faza tardivă a reacției atopice. Acest lucru determină accentuarea influxului celular în infiltratul inflamator (prin cuplarea complementară a integrinelor de pe leucocite cu moleculele de adeziune de pe alte celule, inclusiv de pe celulele endoteliale; spre exemplu cu ELAM-1).

În unele boli atopice, moleculele de adeziune se exprimă mai puternic, sub acțiunea unor citokine eliberate în focarul inflamator local, ceea ce duce la agravarea fenomenelor alergice.

În conjunctivita atopică, în dermatita atopică sau în astmul alergic, inflamația locală are drept urmare secreția în exces a unor citokine (IL-5, IL-1, TNF- α , TNF- β , IFN- γ), care, la rândul lor, induc hiperexprimarea de ICAM-1 (CD 54) pe celulele epiteliale. Consecința, în cazul conjunctivitei sau dermatitei este acutizarea fenomenelor locale. Consecința, în cazul astmului bronșic constă în hiperreactivitatea bronșică, factor esențial în declanșarea crizelor astmatiforme. (38).

ICAM și afecțiunile neurologice

În cazul unor afecțiuni neurologice, precum encefalita, nivelul anumitor molecule de adeziune se modifică. Astfel, în encefalita virală crește nivelul ICAM-1 și ICAM-5 seric. Encefalita este o afecțiune acută a parenchimului cerebral, caracterizată clinic prin febră,

cefalee, scăderea statusului cognitiv. Boala are drept agenți etiologici virusuri precum: HIV, HSV (Herpes Simplex Virus), poliomielitice, rabic. Aceste tipuri virale afectează anumite arii anatomice sau subpopulații celulare determinând fenomenul de „tropism”. În timpul infecției virale, atât ICAM-1 cât și VCAM-1 sunt puternic exprimate în sistemul cerebrovascular. (39)

ICAM-proliferarea și migrarea celulară

Expresia VCAM-1 indusă de TNF- α este dependentă de ciclul celular. Ciclul celular rămâne în faza S, ceea ce duce la o scădere semnificativă a expresiei VCAM-1.

Pentru ICAM-1 sunt diferiți liganzi, spre exemplu fibrinogenul care pare a media proliferarea celulelor prin intermediul acestei molecule de adeziune. ICAM-1 are cel puțin două domenii de legare pentru acidul hialuronic, acid care, alături de proteina lui de legare, a fost implicat în creșterea celulară, migrarea și diferențierea celulară. Rolul specific al interacțiunii ICAM-1-acid hialuronic nu a fost încă clarificat. Totuși, asocierea ICAM-1 cu citoscheletul sugerează că această moleculă de adeziune poate media efectele acidului hialuronic asupra adeziunii și migrării celulare. (36).

Studiile privind importanța ICAM-1, și nu numai în patofiziologie, cu precădere în bolile vasculare, sunt în plină desfășurare. Studii cu anticorpi monoclonali au arătat că în serul pacienților cu metastaze hepatice se regăsesc nivele crescute de antigen ICAM-1. S-a sugerat că antigenul ICAM-1 ar putea fi un marker în monitorizarea tumorilor. Pornind de la observațiile experimentale asupra moleculelor de adeziune, cea mai cunoscută biologic fiind ICAM-1, se încearcă găsirea unor noi strategii terapeutice. (37)

Expresia ICAM în cancer

A fost studiat efectul moleculei ICAM-1 pe diferite linii de celule. Astfel, pe linia de celule MCF-7, linie celulară implicată în cancerul mamar, s-a constatat, prin citometrie de flux, o interacție între IL-6 și TNF- α soldată cu o inhibare a creșterii tumorale, concomitent cu o creștere a expresiei moleculei ICAM-1. IL-6 și TNF- α , analizate separat, au efecte neglijabile asupra ciclului celular. Efectul individual al IL-6 se concretizează în scăderea expresiei moleculei ICAM-1, în timp ce TNF- α crește expresia moleculei ICAM-1. Efectul combinat al IL-6 și TNF- α conduce la creșterea expresiei ICAM-1.

Au fost studiate pe liniile celulare umane BCC (Basal Cell Carcinoma) (T47-D, ZR-75-1, MCF-7, HS 578-T) efectele diferitelor citokine asupra expresiei ICAM-1. IFN- γ , TNF- α , IL-1 și IL-6 amplifică expresia ICAM-1 în toate liniile celulare menționate. (40)

Un ligand pentru ICAM-1 este MUC-1. O linie celulară de adenocarcinom mamar murin, transfectată cu MUC-1 de la om, a indicat că, pentru recunoașterea ICAM-1 sunt necesare secvențe de MUC-1 repetate în tandem.

Caracterele fenotipice exprimate de liniile de celule tumorale BC-H 1 și BC-K 1, obținute din măduva osoasă a pacienților cu cancer mamar, au arătat prezența moleculelor de E-cadherină, vimentină, ICAM-1, M/CAM, LFA-3, CD-44s. Linia celulară BC-H 1 exprimă și Erb B 2, moleculă care nu se regăsește în linia celulară BC-K 1.

ICAM-1 prezintă o distribuție alterată și în cancerul mamar. Un studiu efectuat pe un număr de 274 de femei care prezentau cancer mamar, pe o perioadă de 98 de luni, a arătat că 50.3% dintre paciente prezentau molecula ICAM-1. La aceste paciente, s-a dovedit o corelație negativă între ICAM-1 și dimensiunile tumorii, metastazarea ganglionară, invazia tumorală,

polimorfismul nuclear. Pacienții la care corelația a fost pozitivă au prezentat șanse mai mari de supraviețuire.

Expresia ICAM-1 a fost urmărită și în cancerul gastric, constatându-se că o scădere a nivelului ICAM-1 în celulele canceroase gastrice este corelată cu apariția metastazelor apărute la nivelul nodulilor limfatici. În cancerul gastric, molecula ICAM-1 are un rol de mediator al sistemului de supraveghere imunologică între celulele tumorale și limfocitele citotoxice.

Nivele ridicate ale expresiei ICAM-1 au fost detectate și în cancerul colorectal. Un studiu care a durat 5 ani, efectuat pe un număr de 126 de pacienți aflați în diferite stadii ale bolii (de la I la IV) a arătat că nivele crescute de ICAM-1 sunt detectate în stadiul IV, nivele de ICAM-1 care scad după chemoterapie. S-a concluzionat că nivelul seric al ICAM-1 poate servi ca marker pentru cancerul colorectal dar și pentru monitorizarea stadiilor evolutive ale bolii.

S-a demonstrat că celulele NK recunosc o moleculă de adeziune celulară normală, denumită ICAM-2, la nivelul membranei celulare. Diferența critică între celulele rezistente NK și cele sensibile NK este aceea că, în celulele patologice, ICAM-2 este distribuită în *hot-spots*, mod de distribuție controlat de o proteină a citoscheletului membranar, ezrin. În celulele normale, ICAM-2 este distribuită în mod aleatoriu. Un studiu a urmărit modul prin care ezrin, activată de celulele maligne și de unele virusuri, acționează asupra moleculei ICAM-2. A fost analizat și rolul membrilor familiei ERM (Ezrin-Radixin-Moesin) în sensibilizarea celulelor NK. S-a constatat că anumite toxine din mâncare pot conduce la distrugerea celulelor T de către celulele NK. Concluzia acestui studiu a fost că celulele NK pot afecta statusul imunologic iar celulele endoteliale pot induce apoptoza în anumite celule hematopoietice.

În încercarea de a găsi noi strategii pentru combaterea cancerului, s-a descoperit Phytomix-40 (PhM-40) care pare a fi un agent pentru prevenirea apariției cancerului. Au fost studiate mecanismele imunitare în cazul pacienților cu malignități orale (precancer oral leukoplakia-OL), dar și efectul exercitat de PhM-40 asupra statusului imun. S-a constatat că tratamentul cu PhM-40 crește procentul de celule limfoide care exprimă markeri ai celulelor T (CD 3), celulelor Th (CD 4), receptorilor IL-2 (CD 25), ICAM-1 (CD 54), dar scade nivelul celulelor T supresor (CD 8). După tratamentul cu PhM-40 au mai fost observate nivele crescute ale celulelor B (CD 20), ale macrofagelor și ale celulelor NK. S-a constatat un nivel ridicat al ICAM-3 exprimat de limfocitele mature, corelat cu exprimarea markerului apoptotic Fas/APO-1. (41)

1. **Jun C. D., Carman C. V., Redick S. D., Shimaoka M., Erickson H. P., Springer T. A., (2001),** *Ultrastructure and function of dimeric, soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)*, J. Biol Chem 3;276(31):29019-27.
2. **Simmons D., Makgoba M. W., Seed B., (1988),** *ICAM, an adhesion ligand of LFA-1, is homologous to the neural cell adhesion molecule NCAM*, Nature, 18;331(6157):624-7.
3. **Stade B. G., Messer G., Riethmuller G., Johnson J. P., (1990),** *Structural characteristics of the 5' region of the human ICAM-1 gene*, Immunobiology, 182(1):79-87.
4. **Xu C. R., Yusuf-Makagiansar H., Hu Y., Jois S. D., Siahaan T. J., (2002),** *Structural and ICAM-1-docking properties of a cyclic peptide from the I-domain of LFA-1: an inhibitor of ICAM-1/LFA-1-mediated T-cell adhesion*, J. Biomol. Struct. Dyn. 19(5):789-99.
5. **Bechard D., Scherpereel A., Hammad H., et al., (2001),** *Human endothelial-cell specific molecule-1 binds directly to the integrin CD11a/CD18 (LFA-1) and blocks binding to intercellular adhesion molecule-1*, J. Immunol 15;167(6):3099-106.
6. **Fernandez-Reyes D., Craig A. G., Kyes S. A., et al., (1997),** *A high frequency African coding polymorphism in the N-terminal domain of ICAM-1 predisposing to cerebral malaria in Kenya*, Hum. Mol. Genet., 6(8):1357-60.

7. **Couffinhal T., Duplaa C., et al.,** (1994), *Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 in human vascular smooth muscle cells*, *Circ. Res.*, 74:225-234.
8. **Molica S., Datillo A., Mannella A.,** (1996), *Intercellular adhesion molecules (ICAMs) 2 and 3 are frequently expressed in B cell chronic leukemia*, *Leukemia*, 10, 907-908.
9. **Sansom D., Borrow J., et al.,** (1991), *The human ICAM 2 gene maps to 17q23-25*, *Genomics*, 11, 462-464.
10. **Hamada K., Shimizu T., Yonemura S., Tsukita S., Tsukita S., Hakoshima T.,** (2003), *Structural basis of adhesion-molecule recognition by ERM proteins revealed by the crystal structure of the radixin-ICAM-2 complex*, *EMBO J.*, 3;22(3):502-514.
11. **Gautreau A., Poulet P., Louvard D., Arpin M., Ezrin, a plasma membrane-microfilament linker, signals cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 7300-7305.
12. **Ng T., Parsons M., et al.,** (2001), *Ezrin is a downstream effector of trafficking PKC-integrin complexes involved in the control of cell motility*, *EMBO J.*, 20, 2723-2741.
13. **Takahashi K., Sasaki T., et al.,** (1998), *Interaction of radixin with Rho small G protein GDP/GTP exchange protein Dbl*, *Oncogene*, 16, 3279-3284.
14. **Tsukita S.,** (1998), *Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2*, *J. Cell. Biol.*, 140, 885-895.
15. **Dustin M. L., Springer T. A.,** (1999), *Intercellular adhesion molecules (ICAMs)*. In *Guidebook to the Extracellular Matrix and Adhesion Proteins*, Sambrook and Tooze, New York.
16. **Van der Vieren M., Le Trong H., Wood C. L., et al.,** (1995), *A novel leukointegrin, alpha d beta 2, binds preferentially to ICAM-3*, *Immunity*, 3(6):683-90.
17. **Serrador J. M., Vicente-Manzanares M., Calvo J., et al.,** (2002), *A novel serine-rich motif in the intercellular adhesion molecule 3 is critical for its ezrin/radixin/moesin-directed subcellular targeting*, *J. Biol. Chem.*, 22, 277(12):10400-9.
18. **Feinberg H., Mitchell D. A., Drickamer K., Weis W. I.,** (2001), *Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR.*, *Science* 7, 294 (5549):2163-2166.
19. **Frances A. Spring, Stephen F. Parsons, Susan Ortlepp, et al.,** (2002), *Intercellular adhesion molecule-4 binds 41 and V-family integrins through novel integrin-binding mechanisms*, *Science* 8; 295(5557):1086-9;
20. **Diacovo T. G., deFougerolles A. R., Bainton D. F., Springer T. A.,** (1994), *A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2*, *J. Clin. Invest.*, 94, 1243-1251;
21. **Bailly P., Tontti E., Hermand P., Cartron J. P., Gahmberg C. G.,** (1995), *The red cell LW blood group protein is an intercellular adhesion molecule which binds to CD11/CD18 leukocyte integrins*, *Eur. J. Immunol.*, 25(12):3316-20;
22. **Arii N., Mizuguchi M., Mori K., Takashima S.,** (1999), *Development of telencephalin in the human cerebrum.*, *Microsc. Res. Tech. J.*, 46(1):18-23;
23. **Nakamura K., Manabe T., Watanabe M., Mamiya T., et al.,** (2001), *Enhancement of hippocampal LTP, reference memory and sensorimotor gating in mutant mice lacking a telencephalon-specific cell adhesion molecule*, *Eur. J. Neurosci.*, 13(1):179-89;
24. **Tian L., Kilgannon P., Yoshihara Y., et al.,** (2000), *Binding of T lymphocytes to hippocampal neurons through ICAM-5 (telencephalin) and characterization of its interaction with the leukocyte integrin CD11a/CD18*, *Eur. J. Immunol.*, 30(3):810-8.
25. **Annaert W. G., Esselens C., Baert V., et al.,** (2001), *Interaction with telencephalin and the amyloid precursor protein predicts a ring structure for presenilin*, *Neuron*, 20; 32(4):579-89.
26. **van de Stolpe A., van der Saag P. T.,** (1996), *Intercellular adhesion molecule-1*, *J. Mol. Med.*, 74:13-33;

27. **Miwa K., Igawa A., et al.,** (1997), *Soluble E-selectin, ICAM-1 and Vcam-1 levels in systemic and coronary circulation in patients with variant angina*, Cardiovasc. Res., 36:37-44;
28. **Ross R.,** (1993), *Cellular mechanisms of atherosclerosis*, Atheroscler. Rev., 25:195-200;
29. **Couffinhal T., Duplaa C., et al.,** (1993), *Tumor necrosis factor- α stimulates ICAM-1 expression in human vascular smooth muscle cells*, Arterioscl. Thromb, 13:407-414;
30. **Braun M., Pietsch P., et al.,** (1995), *Modulation of intercellular adhesion molecule-1 and vascular adhesion molecule-1 on human coronary smooth muscle cells by cytokines*, J. Mol. Cell. Cardiol., 27:2571-2579;
31. **Smalley D. M., Lin J. H., et al.,** (1996), *Native LDL increases endothelial cell adhesiveness by inducing intercellular adhesion molecule-1*, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 16:585-590;
32. **Braun M., Hohlfeld T., et al.,** (1993), *Antiatherosclerotic effects of oral cicaprost in experimental hypercholesterolemia in rabbits*, Atherosclerosis, 103:93-105;
33. **Lukacs N. W., Strieter R. M., et al.,** (1994), *Intercellular adhesion molecule-1 mediated the expression of monocyte-derived MIP-1 alpha during monocyte-endothelial cell interactions*, Blood, 83:1174-1178;
34. **Kwee L., Baldwin H. S., et al.,** (1995), *Defective development of the embryonic and extraembryonic circulatory systems in vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) deficient mice*, Development, 121:489-503;
35. **Entwistle J., Hall C. L., Turley E. A.,** (1996), *HA receptors:Regulators of signaling to the cytoskeleton*, J. Cell Biochem., 61:569-577;
36. **Savani R. C., Turley E. A.,** (1995), *The role of hyaluronan and its receptors in restenosis after balloon angioplasty:Development of a potential therapy*, Int. J. Tiss. Res., 17:141-151;
37. **Faruqi R. M., DiCorleto P. E.,** (1993), *Mechanisms of monocyte recruitment and accumulation*, Br. Heart J., 69:S19-29;
38. **Lindsberg P. J., Launes J., Tian L., Valimaa H., Subramanian V., et. al.,** (2002), *Release of soluble ICAM-5, a neuronal adhesion molecule, in acute encephalitis*, Neurology, 12; 58(3):446-51.
39. **Hutchins D., Steel C. M.,** (1994), *Regulation of ICAM-1 (CD 54) expression in human breast cancer cell lines by interleukin 6 and fibroblast-derived factors*, Int. J. Cancer, 58, 80-84.
40. **Regimbald L. H., et al.,** (1996), *The breast mucin MUC I as a novel adhesion ligand for endothelial intercellular adhesion molecule 1 in breast cancer*, Cancer Res., 56, 925-933.
41. **Simmons D. L.,** (1995), *The role of ICAM expression in immunity and disease*, Cancer Surv., 24, 141-155.

FAMILIA DE GTP-azele Rho (Rho, Rac și Cdc42)

Familia de GTP-aze Rho (ras homologous) cuprinde peste 20 de membri, cei mai importanți fiind **Rho (A, B și C)**, **Rac (1, 2 și 3)** și **Cdc42**. Aceste proteine joacă un rol central în asamblarea citoscheletului, controlând astfel numeroase procese celulare: migrarea, adeziunea și transformarea celulară, contracția și citokineza.

Inițial, rolul GTP-azelor Rho în remodelarea actinei a fost elucidat studiindu-se răspunsul fibroblastelor la stimularea cu factori de creștere. Modificările apărute în urma stimulării cu factori de creștere, includ producerea de protruziuni ale suprafeței celulare (filopodii, lamelipodii, vâluri membranare), formarea adeziunilor focale și a fibrelor de stres (1). Microinjectarea celulelor cu mutații ai diferiților membri ai familiei Rho a arătat că Cdc42 induce formarea filopodiilor, Rac mediază formarea lamelipodiilor și a vâurilor membranare, iar Rho este responsabilă de formarea adeziunilor focale și fibrelor de stres (2, 3).

Studii ulterioare au demonstrat că activitatea membrilor familiei Rho nu se rezumă la fibroblaste, ci au roluri similare în toate tipurile de celule eucariote, în ceea ce privește remodelarea actinei.

În neuroni, Rac, Cdc 42 și Rho reglează extensia și retracția axonilor în timpul dezvoltării sistemului nervos (8). În celulele musculare netede, Rho contribuie la reglarea contracției. În celulele epiteliale, membrii familiei Rho reglează formarea joncțiunilor de aderență, care implică legarea caderinelor la actina citoscheletală.

În concluzie, GTP-azele Rho servesc ca reglatori universali ai asamblării actinei citoscheletale și ai expresiei genice, exercitându-și funcția ca răspuns la semnalele extracelulare (4, 5, 6, 7).

Rho, Rac și Cdc-42 interacționează cu un număr mare de proteine, multe din rolurile acestora rămânând a fi elucidate. Experimentele au clarificat unele din căile prin care membrii familiei Rho reglează asamblarea citoscheletului.

Modul de acțiune al proteinelor Rho în reorganizarea citoscheletului

Proteinele Rho mamaliene sunt implicate în multe procese celulare dependente de actina citoscheletală, precum: agregarea plachetară, adeziunea limfocitelor și fibroblastelor, migrarea celulară, contracție și citokineză.

La *Saccharomyces cerevisiae*, proteinele Rho (Rho1, Rho2, Rho3 și Rho4) reglează procesul de înmugurire și citochineza, prin reorganizarea actinei citoscheletale (18, 19, 20). Modul de acțiune al proteinelor Rho a fost inițial clarificat pentru Rho1, în procesul de înmugurire la drojdii. PKC 1 de la drojdii, un omolog al protein kinazei C de la mamifere, s-a dovedit a fi un efector al Rho1 (20, 21).

PCK 1 reglează expresia genelor prin intermediul cascadei MAP-kinazei, care constă din: BCK1 (MAP kinase kinase kinase), MKK 1/MKK 2 (MAP kinase kinase) și Mpk1 (MAP kinase). Această cascadă reglează expresia genelor necesare pentru integritatea peretelui celular (22).

Bni 1, un alt efector al Rho1, interacționează și cu GTP-Rho3, GTP-Rho4 și GTP-Cdc42 (23). Bni are două domenii numite domenii *formin homology* (FH) 1 și 2, întâlnite într-o varietate de proteine implicate în reorganizarea citoscheletului (24).

1,3-β-Glucan sintaza este al 3-lea efector al Rho1. Această enzimă sintetizează 1,3-β-glucan, un component major al peretelui celular. Experimentele au stabilit că proteinele Rho reglează funcțiile celulare prin efectori multipli, într-o manieră cooperantă (25, 26).

O altă proteină cu domenii FH a fost descoperită tot la drozdii și numită Bnr 1. Această proteină este un efector al lui Rho4 și leagă atât profilina cât și Aip3 (27).

Rho2 are 53% omologie cu Rho1, având funcții redundante cu Rho1 dar și funcții specifice (28).

Rho3 și Rho4 sunt implicate în creșterea polarizată, probabil, prin reglarea citoscheletului via Bni1 și Bnr1. Rho 3 interacționează cu Myo2 (tipul V de miozină) și cu Exo70 (un complex multiproteic implicat în exocitoză), sugerând astfel implicarea Rho3 în secreția polarizată.

Au fost identificați numeroși efectori ai proteinelor Rho mamaliene. Un efector al GTP-azei Rho este protein-serin/treonin kinaza, numită Rho kinaza sau ROCK. ROCK activat determină fosforilarea lanțului ușor al miozinei, după ce în prealabil fosforilează și inhibă fosfataza miozinei (9,17).

Fosforilarea lanțului ușor al miozinei determină activarea miozinei, ceea ce conduce la asamblarea filamentelor de actină și miozină. Se produc modificări ale citoscheletului, precum formarea fibrelor de stres, adeziunilor focale și joncțiunilor de aderență.

Rho-kinaza mai activează și o altă protein-kinază, LIM-kinaza, care fosforilează proteina de legare a actinei, cofilina. Cofilina are activitate de depolimerizare a actinei, capacitate inhibată în urma fosforilării de către LIM-kinaza. Astfel, fosforilarea LIM-kinazei de către ROCK și ulterior fosforilarea cofilinei de LIM-kinaza contribuie la asamblarea actinei citoscheletale (10, 11).

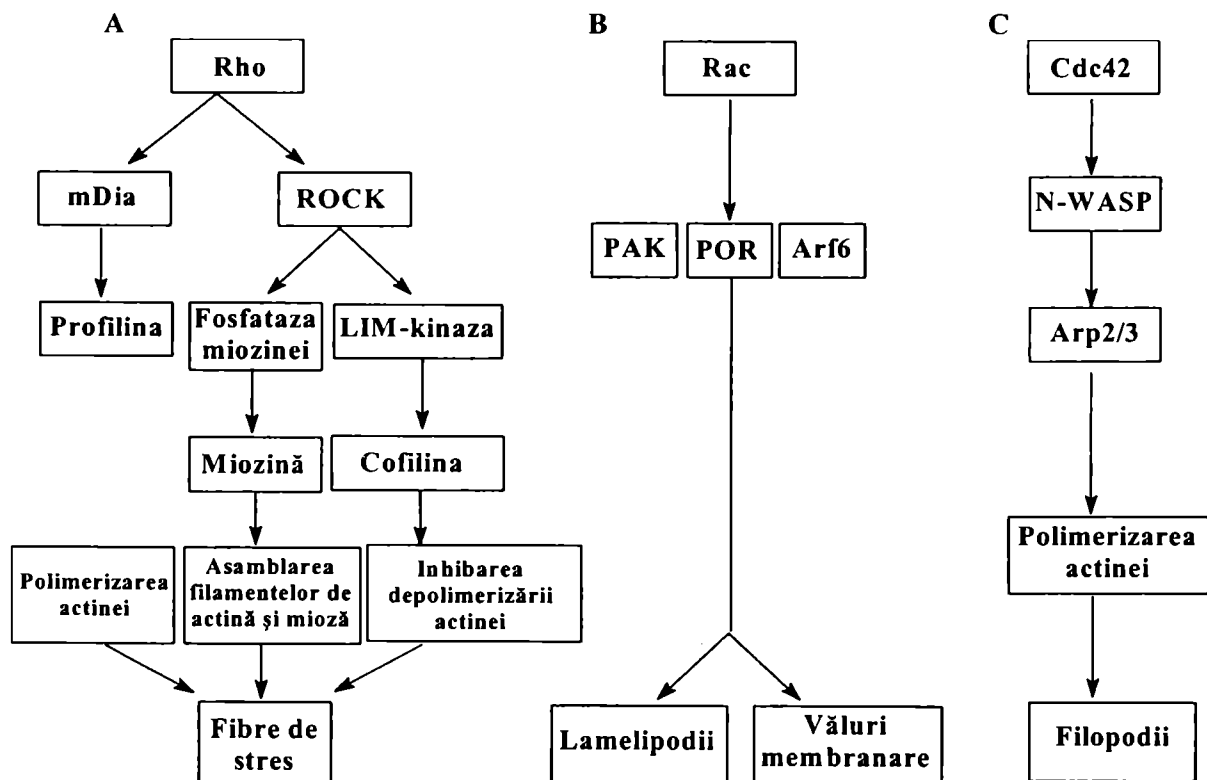


Fig. 1: Modul de acțiune al proteinelor Rho, Rac și Cdc42 în reorganizarea citoscheletului. A: modul de acțiune al proteinelor Rho. B: modul de acțiune al proteinelor Rac. C: modul de acțiune al Cdc42 (47).

P140 mDia, un omolog mamalian al Bni1 și Bnr1 de la drojdii (12, 13) este, de asemenea, un efector al proteinelor Rho (14).

mDia are domenii FH1 și FH2 și, asemenea lui Bni1 și Bnr1 leagă profilina prin intermediul domeniului FH1, reglând reorganizarea actinei. Supraexpresia mDia afectează formarea fibrelor de stres, însă nu și a adeziunilor focale (15, 16).

Un efector al Rac și Cdc42 este protein-serin/treonin kinaza numită PAK. Ca și Rho-kinaza, PAK afectează fosforilarea lanțului ușor al miozinei dar în direcție opusă, fosforilând și inhibând kinaza lanțului ușor al miozinei, ceea ce conduce la scăderea fosforilării.

Acest lucru are ca rezultat inactivarea miozinei II, scăderea interacției actină-miozină, ceea ce influențează abilitatea Rac și Cdc42 de a stimula formarea de protruțiuni ale suprafeței celulare (filopodii și lamelipodii) mai mult decât a fibrelor de stres și a adeziunilor focale. De asemenea, activarea Rac conduce la stimularea LIM-kinazei și fosforilarea cofilinei.

A fost descoperită și o altă categorie de efectori ai proteinelor Rho, careia aparțin: serin/treonin protein kinaza, citronul, rhotekina, rhotefilina (43,44).

GTP-aza Rac

Rac este unul din membrii familiei de GTP-aze Rho și al superfamiliei Ras. Este implicat în reglarea multor procese biologice: remodelarea actinei, transformarea celulară, progresia în faza G1 a ciclului celular și în expresia genică.

GTP-azele Rho au numeroase efecte asupra actinei din citoschelet. Rho, Rac și Cdc-24 acționează diferit determinând heterogenitatea actinei (29).

Reglarea de către Rac a transformării, expresiei genice și organizării actinei se face pe căi multiple, independente de PAK.

Analiza genetică pentru investigarea rolului Rac1 în dezvoltarea embrionară la șoareci, a demonstrat că, în embrionii deficienți în această proteină, în stadiul primitiv, celulele dintre ectoderm și endoderm sunt moarte.

Investigarea culturilor de celule izolate din epiblastul embrionilor deficienți în Rac-1 arată că, in vivo, proteina este implicată în formarea de lamelipodii ca și în adeziunea și migrarea celulelor. Aceasta sugerează că adeziunea celulară mediată de Rac1 este esențială pentru formarea celor 3 straturi germinale în timpul gastrulației (32).

Prin transferul mediat adenoviral, a două izoforme ale Rac1 dintre care una constitutiv activă (V12 Rac1) și cealaltă dominant negativă (N17 Rac1), s-a urmărit valoarea GTP-azei Rac în ciclul celular.

Expresia V12 Rac-1 în miocitele neonatale conduce la creșterea dimensiunii celulelor, aspecte care nu se deosebesc de hipertrofia stimulată prin ligand. Expresia acestei izoforme conduce la creșterea secreției peptidului ANP (Atrial Natriuretic Peptide).

Dimpotrivă, expresia N17 Rac 1, dar nu și a formei trunchiate a Raf-1, atenuază hipertrofia morfologică asociată cu stimularea cu fenilefrină. Deci, Rac1 este esențială pentru calea de semnalizare ce conduce la hipertrofia miocitelor cardiace (57).

În celulele mamaliene, Rac induce activarea NADPH oxidazei, conducând la producția de superoxid. La plante, rezistența la agenții patogeni depinde de superoxidul generat via enzimelor NADPH oxidaze-like. La *Zea mays* s-au identificat 4 gene ce prezintă omologie cu gena Rac umană.

S-a emis ipoteza că, proteina Rac de la plante ar putea funcționa precum omologii mamalieni, activând un complex enzimatic care conduce la producția de superoxid. În urma studiilor s-a dovedit că proteinele Rac de la *Zea mays* pot induce producția de superoxid în celulele mamaliene (48).

Rac și semnalizarea celulară

Interferând pe diverse căi de semnalizare, proteina Rac poate modifica activitatea diferiților factori.

Rac este o componentă esențială a căilor de transducție a semnalelor care controlează proliferarea, diferențierea și supraviețuirea celulelor. S-au urmărit răspunsurile celulare la semnalizarea de înaltă intensitate prin Ras.

Expresia unei cantități ridicate a formelor oncogenice ale Ras – HaRasV12 rezultă în apoptoza (dependentă de doză) celulelor primare imortalizate.

Inducerea apoptozei de către HaRasV12 este blocată de proteina Rac activată. Abilitatea acesteia de a supresa apoptoza indusă de Ras, este dependentă de căile efectoare controlate de regiunile de inserție și este legată de activarea NF-kB. Efectul apoptotic al HaRasV12 necesită activarea kinazelor, la rândul lor activate de mitogenii ERK și JNK și este independent de p53. Aceasta demonstrează un rol al lui Rac în controlul semnalelor necesare supraviețuirii celulare și sugerează un mecanism prin care activitatea Rac poate conferi un avantaj de creștere a celulelor transformate de către oncogenul Ras (41).

Ciclina D1 este un factor limitant în progresia normală a ciclului celular (faza G1), iar abundența ei este indusă prin activare mutațională atât de Ras, cât și de Rac 1.

Proteinele NF-kB sunt proteine citoplasmice hetero- sau homodimerice înrudite cu Rel, complexate cu un membru al familiei de proteine inhibitoare Ikappa B.

Activarea mutantelor Rac1, Rac1(Leu-61) și Rac1(Val-12) induce în celulele NIH3T3 expresia ciclului D1 via promotorul acesteia, inducție care necesită prezența situsurilor de legare pentru NF-kB sau ATF-2.

Inhibarea NF-kB prin supraexpresia unui inhibitor NF-kB trans-dominant (o formă nefosforilată a Ikappa alfa) reduce activarea promotorului ciclului D1 de către mutantele Rac1, plasând astfel NF-kB în calea de activare a ciclului D1 de către Rac1.

O mutație specifică în aminoacizii din capătul aminoterminal al Rac (Leu-61), care este domeniul efector al proteinei, are efecte comparabile cu activitatea transcripțională și activarea promotorului ciclului D1 de către NF-kB.

Factorii Rel A (p65) și NF-kB(1) (p50) induc promotorul ciclului D1 necesitând domeniile de legare atât pentru NF-kB cât și pentru ATF-2.

Supraexpresia stabilă a Rac (Leu-61) crește legarea Rel A și NF-kB(1) la situsul NF-kB din promotorul ciclului D1.

Activarea Rac1 în celulele NIH 3T3 induce atât legarea NF-kB cât și activarea sa și crește expresia ciclului D1 via situsurilor NF-kB și ATF în promotorul proximal, sugerând un rol critic pentru NF-kB în reglarea ciclului celular via ciclului D1 și Rac1(42).

Expresia tranzitorie a dominantei negative a genei Rac1 (N17 rac1) folosind un vector adenoviral, arată că nivelul de expresie a acesteia este proporțional cu multiplicitatea infecției. Expresia N17 rac1 în fibroblastele Rat-2 rezultă în arestul citostatic al creșterii.

Analizele ciclului celular demonstrează că celulele care exprimă N17 Rac1 s-au acumulat în fazele G2/M de unde concluzia că, pe de o parte, Rac1 este necesar pentru proliferare și pe de altă parte, dovedește pentru prima dată rolul GTP-azelor Rac în tranziția G2/M în celulele mamaliene (50).

Rac și sistemul nervos

Studii recente sugerează că Rac1 și alți membri ai familiei de GTP-aze Rho joacă un rol important în formarea prelungirilor neuronale.

S-a comparat creșterea spontană a conului de creștere al axonilor cu evoluția indusă de tensiunea asupra axonilor celulelor PC12 cu mutante care exprimă o formă dominant negativă a proteinei Rac.

Celulele PC 12 expuse la NGF, spre deosebire de cele de control, au inițiat un proces *de novo* (bogat în microtubuli) ca răspuns la tensiunea aplicată celulelor.

Alungirea proceselor este proporțională cu tensiunea aplicată pe acestea. Adăugarea c-AMP amplifică creșterea neuritelor indusă de NGF în celulele PC12. Expresia unei dominante negative a lui Rac inhibă elongarea spontană a neuritelor, dar nu afectează substanțial pe cea indusă de tensiune. Astfel, celulele deficiente în Rac arată o relativă elongare atât în condiții normale cât și sub tensiunea creată de NGF, prelungirile conținând o densitate normală de microtubuli axiali. Se conclude că, Rac1 este mai necesară pentru funcția de adeziune și motilitate a conurilor de creștere, mai curând decât pentru asamblarea neuritelor (31).

La șobolani, în neuronii piramidali din hipocamp, expresia formei dominant negativă a Rac1 are ca rezultat eliminarea progresivă a prelungirilor dendritice, în timp ce hiperactivarea RhoA determină simplificarea drastică a ramificațiilor neuronale, activitate dependentă de Rho-kinaza. Rezultatele experimentelor sugerează că Rac și Rho au roluri distincte în formarea prelungirilor neuronale și sunt vitale pentru menținerea și reorganizarea structurilor dendritice în neuronii maturi (38, 39).

Rac și transformarea tumorală

Activarea constitutivă a genei Rac1 și RhoA cauzează transformarea tumorigenică a celulelor NIH3T3 și funcționarea lor apare necesară pentru transformarea acestor celule via Ras.

Rac1 se distinge de Rho A prin abilitatea de a lega și activa serin/treonin kinaza, p65 PAK, de a induce formarea de lamelipodii și „falduri” membranare și de a activa kinaza JNK (c-Jun NH-2 terminal kinază).

Pentru a investiga rolul lui PAK în funcționarea lui Rac1, s-a experimentat un domeniu efector mutant a lui Rac1 și o himeră Rac1-Rho A care nu pot lega PAK.

Legarea PAK s-a dovedit a fi dispensabilă pentru transformarea și formarea lamelipodiilor induse de Rac1, precum și pentru activarea JNK p38 și a factorului de răspuns la ser (SRF). Totuși, abilitatea Rac1 de a se lega și de a activa PAK se corelează cu abilitatea sa de a stimula transcrierea la promotorul ciclului D1. Mai mult chiar, activarea JNK și SRF sau inducerea formării lamelipodiilor nu sunt nici necesare, nici suficiente pentru activitatea transformantă a Rac1.

Căile de semnalizare care mediază activarea SRF și JNK de către proteina Rac1 sunt distincte de cele care mediază formarea lamelipodiilor de către această proteină.

Luată împreună, aceste observații sugerează că Rac1 reglează cel puțin 4 funcții mediate de efectori și că sunt multiple căi prin care ea contribuie la transformarea celulară în care intervine și citoscheletul (30).

Hipertransformarea celulelor tumorale epiteliale poate fi dobândită prin adăugarea în celulele care exprimă tipul sălbatec de E1A și Ras, a unei forme de Rac, sugerându-se astfel că reorganizarea actinei poate fi importantă pentru apariția fenotipului hipertransformant. Celulele epiteliale primare care exprimă mutantele hipertransformante E1A sau V12 Rac1 arată o pierdere a filamentelor de actină corticale. În aceste celule joncțiunile de aderare nu încorporează catenina-alfa, neexistând astfel o asociere a citoscheletului cu membrana plasmatică, ceea ce conduce la destabilizarea componentelor joncțiunilor de aderare și pierderea funcției acestora.

Pierderea caracteristicilor de epitelium, predispoze aceste celule la creșterea malignității prin pierderea adezivității celulă-celulă.

Se sugerează astfel, un nou mecanism de reglare a funcției joncțiunilor de aderare în progresia tumorilor, mecanism ce implică o țintire a componentelor joncționale care sunt afectate de statutul actinei corticale și care poate fi diferențiat afectat de E1A și Rac (33).

S-a stabilit că RhoB este suficient pentru a media efectele antitransformante ale inhibitorilor farnesil-transferazei (FTIs) în fibroblastele transformate. Celulele epiteliale intestinale transformate, în urma activării de către K-ras sau Rac1, sunt sensibile la FTI, fiind indusă remodelarea actinei și inhibarea creșterii, în ciuda incapacității FTI de a bloca prenilarea K-Ras sau Rac (55).

Autotaxin (ATX) este un puternic mitogen, având capacitatea de a spori invazivitatea și angiogeneza tumorilor. Studii făcute pe celule de melanom, linia A2058, au arătat că ATX activează Cdc42 și Rac1 și amplifică formarea complexelor între proteinele G mici și PAK (p21-activated kinase). Mai mult, autotaxin fosforilează FAK (focal adhesion kinase), lucru care nu se întâmplă în celulele care exprimă mutantele dominant negative ale Cdc42 sau Rac1. În concluzie se poate spune că Cdc42 și Rac1 sunt esențiale pentru motilitatea celulelor tumorale, indusă de ATX (52).

Factorul tisular (FIII), unul din factorii plasmatici ai coagulării, este principalul reglator al angiogenezei embrionare și neoangiogenezei tumorale. De asemenea, influențează procesul inflamator, diapedeza leucocitelor și progresia tumorală.

Domeniul intracelular al factorului tisular nu are omologie cu alte clase de receptori, iar mecanismul de semnalizare este puțin înțeles. S-a demonstrat că factorul VIIa, ligandul natural pentru FIII, induce activarea membrilor familiei Src: c-Src, Lyn, Zes și a fosfatidil inozitol 3-kinazei (PI3K), urmată de stimularea c-Act/proteinkinazei B și GTP-azelor Rac și Cdc42. S-a sugerat astfel că, Rac are rol important în patofiziologie, mediind efectele factorului VIIa și a factorului tisular (49).

Rolul Rac este multiplu intervenind în căile de semnalizare a diferiților factori. Activitatea GTP-azei Rac este esențială pentru mitogeneza indusă de EGF.

Pentru a verifica dacă activitatea Rac GTP-aza este necesară pentru mitogeneza indusă de EGF, s-au transplatat celule Rat-2 care exprimau o mutantă dominant negativă a Rac1 și anume Rac N17.

Expunerea la EGF a acestor celule (Rat-2 – Rac N17) a condus la o semnificativă restricție a creșterii, comparativ cu Rat-2 parentale, sugerându-se astfel rolul esențial al proteinei Rac în mitogeneza indusă de EGF.

EGF induce sinteza de DNA și aceasta este semnificativ blocată prin microinjectarea proteinei Rac N17 recombinată.

Studii ulterioare au demonstrat că mediatorul lui Rac în aval de această cale de semnalizare mitogenică indusă de EGF, este PLA 2 (fosfolipaza A2 activată de Rac) care are un rol critic în dezvoltarea acestui proces.

Luată împreună, aceste rezultate sugerează că Rac și PLA 2 formează o cascadă majoră în calea mitogenică indusă de EGF (34).

În calea de semnalizare Rac, EGF induce promotorul c-jun. Protooncogenul c-jun care codifică un factor de transcriere, este activată de mitogeni atât la nivel transcripțional, cât și prin fosforilarea de către JNK (Jun N-terminal kinase).

Formele Ras, Rac1, Cdc 42 Hs și MEKK activate cresc expresia promotorului c-jun, în timp ce formele lor dominant negative inhibă inducția acestuia în condițiile inducției de către EGF. Aceste date sugerează că EGF activează promotorul c-jun via Ras→Rac→MEKK (35).

Celulele MM1, provenite de la șobolan, din lichid ascitic, necesită atât prezența acidului lisofosfatidic (LPA) cât și a fibronectinei (FN) pentru migrarea celulară și pentru a-și desfășura activitatea fagocitară, procese reglate prin calea de semnalizare RhoA-ROCK și prin fosforilarea FAK (focal adhesion kinase) la nivelul tirozinei.

Pal-cPA (palmitoyl-cyclic phosphatidic acid), un analog structural al LPA, inhibă migrarea celulelor MM1 indusă de LPA și metastazarea celulelor B16 de melanom murin. În celulele MM1, activarea RhoA prin intermediul LPA a fost complet stopată de Pal-cPA. Mai mult, s-a demonstrat că autofosforilarea FAK la nivelul Tyr-397, contribuie la formarea adeziunilor focale și e un factor decisiv în migrarea celulelor MM1. De asemenea, Pal-cPA inhibă (independent de LPA) activarea RhoA în celulele HT-1080 provenite din fibrosarcom uman. Aceste observații conduc la ideea că Pal-cPA poate constitui o nouă terapie în tratamentul metastazelor (53, 54).

Rac și fosfatidil inozitol 3-kinaza (PI-3 kinaza) intervin în semnalizarea nucleară via TNF-alfa. PI-3 kinaza și Rac sunt implicate în cascada de semnalizare declanșată de TNF-alfa, care induce în fibroblastele Rat-2, activarea c-fos și c-jun.

Inhibarea PI-3 kinazei blochează, în funcție de doză, stimularea c-fos de către TNF-alfa. Semnalizarea nucleară prin TNF-alfa este dependentă și de Rac, așa cum o demonstrează cotransfecția tranzitorie a unei mutante Rac dominant negativă (Rac N17), care are un efect inhibitor. Se apreciază că PI-3 kinaza și Rac joacă fiecare un rol de pivot în cascada de semnalizare nucleară declanșată de TNF-alfa (36).

Tratarea cu HGF (Hepatocyte Growth Factor) a celulelor HepG2 provenite din carcinom hepatocelular uman, induce migrarea acestora, concomitent cu creșterea nivelului p27. GTP-aza Rac este necesară pentru migrarea dependentă de p27, dar singură este insuficientă pentru migrarea celulelor HepG2, fibroblastele deficiente în p27 neavând această capacitate (56).

Mutante constitutive active Rac și Cdc 42 dar nu și Rho, sunt inductori ai E2F în fibroblastele NIH3T3.

Rac și Cdc 42 activate pot induce acumularea ciclului D1 și hiperfosforilarea Rb, subliniind astfel o cale ce conduce la transcrierea E2F.

În celulele Rat-1 R12 creșterea activității transcripționale a lui E2F via Rac și cdc 42 este suficientă pentru intrarea în faza S și pentru sinteza ADN. Pe lângă acestea însă, pentru celulele NIH3T3 sunt necesari și factori adiționali (37).

În fibroblastele Rat-2 H₂O₂ activează elementul c-fos ca răspuns la ser (SRE). Examinându-se rolul GTP-azei Rac indusă de H₂O₂ s-a constatat că transfecția unei plasmide mutantă a Rac (Rac N17) cât și pretratamentul cu mepacrină (un inhibitor al PLA 2) blochează dramatic activarea de către H₂O₂ a SRE. Aceasta sugerează un rol critic al lui Rac și al activării ulterioare a fosfolipazei A2 (PLA 2) în activarea SRE de către H₂O₂ (40).

Fenotipul celulelor hematopoietice transformate de oncoproteina bcr/abl de pe cromosomul Philadelphia este caracterizat prin proliferare independentă de factorii de creștere, susceptibilitate redusă la apoptoză, motilitate și adeziune alterate.

Unele din proprietățile celulelor care exprimă bcr/abl sunt dependente de activarea unor molecule efector din aval, precum Ras, PI-3K și bcl-2.

Se susține că proteina Rac (care leagă GTP-ul) este activată de bcr/abl într-o manieră tirozin-kinazică.

În urma transfecției cu un vector ce conține dominantă negativă, N17 Rac, celulele precursorare mieloidă 32Dc13 care exprimă bcr/abl capătă rezistență la apoptoză indusă de deprivarea de factori de creștere, și relevă un potențial proliferativ redus în absența interleukinei-3 (IL-3), ca și o reducere marcată a proprietăților invazive.

În acord cu aceste aspecte, supraviețuirea șoarecilor SCID infectați cu bcr/abl și dublu transfecțați N17 rac, apare prelungită comparativ cu cei la care s-au injectat numai celule ce exprimă bcr/abl.

Aceste date susțin rolul important al căilor dependente de Rac în controlul motilității în leucemogeneza mediată de bcr/abl (45).

Rac1 activată, reglează pozitiv și selectiv expresia integrinei alfa6beta4 și induce adeziune celulară și falduri membranare în celulele neaderente de carcinom de colon – COLO 201.

S-a investigat astfel, funcția unei GTP-aze mici în expresia unor integrine, când celulele COLO 201 interacționează cu matricea extracelulară.

Transfectarea unor forme constitutiv active ale Rac1 și Rac V12 în celule, a condus la adeziunea acestora la matrixul extracelular concomitent cu formarea de prelungiri (falduri membranare). Aceleași reacții au fost induse și de formele activate de Cdc42 și CdcV12, dar nu de RhoA tip-sălbatec.

Adeziunea este dependentă de integrina beta4, deoarece anticorpii direcționați împotriva acestei integrine inhibă Rac V12 de care depinde adeziunea și induce un număr crescut de celule care au aderat pe plăci cu laminină, comparativ cu cele care au aderat pe plăci cu collagen sau fibronectină.

Prin imunofluorescență s-a demonstrat că, pe lângă o grupare a moleculelor de integrină, celulele în care s-au exprimat Rac V12 și Cdc V12 arată că expresia integrinei alfa6beta4 a fost reglată în sens pozitiv, fără a se observa o creștere în biosinteza sa.

Se concludă astfel că, reglarea expresiei acestei integrine indusă de către Rac1 și Cdc42 poate juca un rol important în adeziunea celulară și tumorigeneza celulelor de carcinom de colon (46).

Rac3 diferă de Rac1 și Rac2 la capătul COOH- terminal printr-un domeniu asociat cu localizarea subcelulară și legarea la reglatori celulari specifici.

Rac3 mRNA diferă de mRNA Rac-2 prin modul de expresie, care este specific hematopoietic dar diferă, de asemenea, și de Rac1.

Gena Rac3 a fost cartată în cromosomul 17q23-25, o regiune frecvent deletată în cancerul mamar.

Nivelele Rac3 nu sunt afectate de către organizarea actinei din citoschelet, dar sunt inductibile de către ser.

Când gena Rac3 este activată constitutiv, ea poate stimula eficient calea de semnalizare a c-jun aminoterminal-kinazei (51).

1. Kozma R., Ahmed S., Best A., Lim L., *The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts*, Mol. Cell Biol., 15:1942-1952, 1995.
2. Nobes C. D, Hall A., *Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia*, Cell 8:53-62, 1995.
3. Ridley A. J., Paterson H. F., Johnston C. L., Diekmann D., and Hall A., *The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling*, Cell 70: 401-410, 1992.
4. Hill C. S., Wynne J., Treisman R., *The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF*, Cell 81: 1159-1170, 1995.
5. Minden A., Lin A., Claret F. X., Abo A., Karin M., *Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs*, Cell 81: 1147-1157, 1995.
6. Perona R., Montaner S., Saniger L., Sanchez-Perez I., Bravo R., Lacal J. C., *Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins*, Genes Dev., 11: 463-475, 1997.

7. Westwick J. K., Lambert Q. T., Clark G. J., Symons M., Van Aelst L., Pestell R. G., Der C. J., *Rac regulation of transformation, gene expression, and actin organization by multiple PAK-independent pathways*, Mol. Cell Biol., 17: 1324-1335, 1997.
8. Kozma R., Sarner S., Ahmed S., Lim L., *Rho family GTPases and neuronal growth cone remodelling: relationship between increased complexity induced by Cdc42Hs, Rac1, and acetylcholine and collapse induced by RhoA and lysophosphatidic acid*, Mol. Cell Biol., 17: 1201-1211, 1997.
9. Noda M., Yasuda-Fukazawa C., Moriishi K., Kato T., Okuda T., Kurokawa K., Takuwa Y., *Involvement of rho in GTP S-induced enhancement of phosphorylation of 20 kDa myosin light chain in vascular smooth muscle cells: inhibition of phosphatase activity*, FEBS Lett 367: 246-250, 1995.
10. Maekawa M., Ishizaki T., Boku S., Watanabe N., Fujita A., Iwamatsu A., Obinata T., Ohashi K., Mizuno K., Narumiya S., *Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase*, Science 285: 895-898, 1999.
11. Sumi T., Matsumoto K., Takai Y., Nakamura T., *Cofilin phosphorylation and actin cytoskeletal dynamics regulated by rho- and Cdc42-activated LIM-kinase 2*, J. Cell Biol., 147: 1519-1532, 1999.
12. Imamura H., Tanaka K., Hihara T., Umikawa M., Kamei T., Takahashi K., Sasaki T., Takai Y., *Bni1p and Bnr1p: downstream targets of the Rho family small G-proteins which interact with profilin and regulate the actin cytoskeleton in Saccharomyces cerevisiae*, EMBO J., 16: 2745-2755, 1997.
13. Kohno H., Tanaka K., Mino A., Umikawa M., Imamura H., Fujiwara T., Fujita Y., Hotta K., Qadota H., Watanabe T., Ohya Y., Takai Y., *Bni1p implicated in cytoskeletal control is a putative target of Rho1p small GTP-binding protein in Saccharomyces cerevisiae*, EMBO J., 15: 6060-6068, 1996.
14. Watanabe N., Madaule P., Reid T., Ishizaki T., Watanabe G., Kakizuka A., Saito Y., Nakao K., Jockusch B. M., Narumiya S., *p140mDia, a mammalian homolog of Drosophila diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin*, EMBO J., 16: 3044-3056, 1997.
15. Watanabe N., Kato T., Fujita A., Ishizaki T., Narumiya S., *Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization*, Nat. Cell Biol., 1: 136-143, 1999.
16. Nakano K., Takaishi K., Kodama A., Mammoto A., Shiozaki H., Monden M., Takai Y., *Distinct actions and cooperative roles of ROCK and mDia in Rho small G protein-induced reorganization of the actin cytoskeleton in Madin-Darby canine kidney cells*, Mol. Biol. Cell., 10: 2481-2491, 1999.
17. Matsui T., Amano M., Yamamoto T., Chihara K., Nakafuku M., Ito M., Nakano T., Okawa K., Iwamatsu A., Kaibuchi K., *Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho*, EMBO J., 15: 2208-2216, 1996.
18. Cabib E., Drgonova J., Drgon T., *Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis*, Annu. Rev. Biochem., 67: 307-333, 1998.
19. Fujiwara T., Tanaka K., Mino A., Kikyo M., Takahashi K., Shimizu K., Takai Y., *Rho1p-Bni1p-Spa2p interactions: implication in localization of Bni1p at the bud site and regulation of the actin cytoskeleton in Saccharomyces cerevisiae*, Mol. Biol. Cell., 9: 1221-1233, 1998.
20. Tanaka K., Takai Y., *Control of reorganization of the actin cytoskeleton by Rho family small GTP-binding proteins in yeast*, Curr. Opin. Cell Biol., 10: 112-116, 1998.
21. Nonaka H., Tanaka K., Hirano H., Fujiwara T., Kohno H., Umikawa M., Mino A., Takai Y., *A downstream target of RHO1 small GTP-binding protein is PKC1, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in Saccharomyces cerevisiae*, EMBO J., 14: 5931-5938, 1995.
22. Levin D. E., Errede B., *The proliferation of MAP kinase signaling pathways in yeast*, Curr. Opin. Cell Biol., 7: 197-202, 1995.

23. **Evangelista M., Blundell K., Longtine M. S., Chow C. J., Adames N., Pringle J. R., Peter M., Boone C.,** *Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis*, Science 276: 118-122, 1997.
24. **Frazier J. A., Field C. M.,** *Actin cytoskeleton: are FH proteins local organizers?*, Curr. Biol., 7: R414-R417, 1997.
25. **Mazur P., Baginsky W.,** *In vitro activity of 1,3- β -D-glucan synthase requires the GTP-binding protein Rho1*, J. Biol. Chem., 271: 14604-14609, 1996.
26. **Qadota H., Python C. P., Inoue S. B., Arisawa M., Anraku Y., Zheng Y., Watanabe T., Levin D. E., Ohya Y.,** *Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3- β -glucan synthase*, Science 272: 279-281, 1996.
27. **Imamura H., Tanaka K., Hihara T., Umikawa M., Kamei T., Takahashi K., Sasaki T., Takai Y.,** *Bni1p and Bnr1p: downstream targets of the Rho family small G-proteins which interact with profilin and regulate actin cytoskeleton in Saccharomyces cerevisiae*, EMBO J., 16: 2745-2755, 1997.
28. **Desrivieres S., Cooke F. T., Parker P. J., Hall M. N.,** *MSS4, a phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase required for organization of the actin cytoskeleton in Saccharomyces cerevisiae*, J. Biol. Chem., 273: 15787-15793, 1998.
29. **Aspenstrom P.,** *The Rho GTPases have multiple effects on the actin cytoskeleton*, Exp. Cell Res., 246(1):20-5, 1999.
30. **Westwick J. K., Lambert Q. T., Clark G. J., Szmions M., Van Aelst L., Pestell R. G., Der C.J.,** *Rac regulation of transformation, gene expression, and actin organization by multiple, PAK-independent pathways*, Mol. Cell Biol., 17(3):1324-35, 1997.
31. **Lamoureux P., Altun-Gultekin Z. F., Lin C., Wagner J. A., Heidemann S. R.,** *Rac is required for growth cone function but not neurite assembly*, J. Cell Sci., 110(Pt 5):635-41, 1997.
32. **Sugihara K., Nakatsuji N., Nakamura K., Hashimoto R., Otani H., Sakagami H., Kondo H., Nozawa S., Aiba A., Katsuki M.,** *Rac-1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation*, Oncogene 17(26):3427-33, 1998.
33. **Fisher R. S., Quinlan M. P.,** *Identification of a novel mechanism of regulation of the adherens junction by E1A, Rac1, and cortical actin filaments that contributes to tumor progression*, Cell Growth Differ., 9(11):905-18, 1998.
34. **Kim B. C., Yi J. K., Yi S. J., Shin I. C., Ha K. S., Jhun B. H., Hwang S. B., Kim J. H.,** *Rac GTPase activity is essential for EGF-induced mitogenesis*, Mol. Cells, 8 (1):90-5, 1998.
35. **Clarke N., Arenzana N., Hai T., Minden A., Prywes R.,** *Epidermal growth factor induction of the c-jun promoter by a Rac pathway*, Mol. Cell Biol., 18(2):1065-73, 1998.
36. **Kim B. C., Lee M. N., Kim J. Y., Lee S. S., Chang J. D., Kim S. S., Lee S. Y., Kim J. H.,** *Roles of phosphatidylinositol 3-kinase and Rac in the nuclear signaling by tumor necrosis factor- α in rat-2 fibroblasts*, J. Biol. Chem., 274(34):24372-2, 1999.
37. **Gjoerup O., Lukas J., Bartek J., Willumsen B. M.,** *Rac and Cdc42 are potent stimulators of E2F-dependent transcription capable of promoting retinoblastoma susceptibility gene product hyperphosphorylation*, J. Biol. Chem., 273(30):18812-8, 1998.
38. **Nakayama A. Y., Harms M. B., Luo L.,** *Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons*, J. Neurosci., 20(14):5329-38, 2000.
39. **Tashiro A., Minden A., Yuste R.,** *Regulation of Dendritic Spine Morphology by the Rho Family of Small GTPases: Antagonistic Roles of Rac and Rho*, Cereb. Cortex, 10(10): 927-938, 2000.
40. **Kim J. H., Kwack H. J., Choi S. E., Kim B. C., Kim Y. S., Kang I. J., Kumar C. C.,** *Essential role of Rac GTP-ase in hydrogen peroxide-induced activation of c-fos serum response element*, FEBS Lett., 406(1-2):93-6, 1997.
41. **Joneson T., Bar-Sagi D.,** *Suppression of Ras-induced apoptosis by the Rac GTPase*, Mol. Cell Biol., 19(9):5892-901, 1999.
42. **Joice D., Bouzahzah B., Albanese C., Steer J., Klein J. U., Lee R. J., Segall J. E., Westwick J. K., Der C. J., Pestell R. G.,** *Integration of Rac-dependent regulation of cyclin D1 transcription through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway*, J. Biol. Chem., 274(36):25245-9, 1999.

43. Watanabe G., Saito Y., Madaule P., Ishizaki T., Fujisawa K., Morii N., Mukai H., Ono Y., Kakizuka A., Narumiya S., *Protein kinase N (PKN) and PKN-related protein rhotekin as targets of small GTPase Rho*, Science, 271: 645-648, 1996.
44. Reid T., Furuyashiki T., Ishizaki T., Watanabe G., Watanabe N., Fujisawa K., Morii N., Madaule P., Narumiya S., *Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and rhotekin in the rho-binding domain*, J. Biol. Chem., 271: 13556-13560, 1996.
45. Skorski T., Wlodarski P., Daheron L., Salomoni P., Majewski M., *BCR/ABL-mediated leukemogenesis requires the activity of the small GTP-binding protein Rac*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 95(20):11858-62, 1998.
46. Mohri T., Adachi Y., Ikehara S., Hioki K., Tokunaga R., Taketani S., *Activated Rac1 selectively up-regulates the expression of integrin alpha6beta4 and induces cell adhesion and membrane ruffles of nonadherent colon cancer Colo201 cells*, Exp. Cell Res., 252(2):533-40, 1999.
47. Yoshimi Takai, Takuya Sasaki, Takashi Matozaki, *Small GTP-Binding Proteins*, Physiol. Rev., 81:153-208, 2001.
48. Hassanain H. H., Sharma Z. K., Moldovan L., Khramtsov V., Berliner L. J., Duvick J. P., *Plant rac proteins induce superoxide productions in mammalian cells*, Biochem. Biophys., 272(3):783-8, 2000.
49. Versteeg H. H., Hoedemaeker I., Diks S. H., Stam J. K., Spaargaren M., van Bergen En Henegouwen P. M., *Factor VIIa/Tissue factor-induced signaling via activation of src-like kinases, phosphatidylinositol 3-kinase and Rac*, J. Biol. Chem., 275(37):28750-6.
50. Moore K. A., Sethi R., Doanes A. M., Jonson T. M., Pracyk J. B., Kirby M., Irani K., *Rac is required for cell proliferation and G2/M progression*, Biochem. J., 326:17-20, 1997.
51. Haataja L., Groffen J., Heisterkamp N., *Characterization of RAC3, a novel member of the Rho family*, J. Biol. Chem., 272(33):20384-8, 1997.
52. Jung I. D., Lee J., Zun S. Y., Park C. G., Choi W. S., Lee H. W., Choi O. H., Han J. W., Lee H. Y., *Cdc42 and Rac1 are necessary for autotaxin-induced tumor cell motility in A2058 melanoma cells*, FEBS Lett., 532(3):351-6, 2002.
53. Mukai M., Iwasaki T., Tatsuta M., Togawa A., Nakamura H., Murakami-Murofushi K., Kobayashi S., Imamura F., Inoue M., *Cyclic phosphatidic acid inhibits RhoA-mediated autophosphorylation of FAK at Tyr-397 and subsequent tumor-cell invasion*, Int. J. Oncol., 22(6):1247-1256, 2003.
54. Mareel M., Leroy A., *Clinical, cellular and molecular aspects of cancer invasion*, Physiol. Rev., 83(2):337-76, 2003.
55. Zeng P. Y., Rane N., Du W., Chintapalli J., Prendergast G. C., *Role for Rho B and PRK in the suppression of epithelial cell transformation by farnesyltransferase inhibitors*, Oncogene, 22(8):1124-34, 2003.
56. McAllister S. S., Becker-Hapak M., Pintucci G., Pagano M., Dowdy S. F., *Novel p27(kip1) C-terminal scatter domain mediates Rac-dependent cell migrations independent of cell cycle arrest functions*, Mol. Cell Biol., 23(1):216-28, 2003.
57. Pracyk J. B., Tanaka K., Hegland D. D., Kim K. S., Sethi R., Rovira I. I., Blazina D. R., Lee L., Bruder J. T., Kovessi I., Goldshmidt-Clermont P. J., *A requirement for the Rac1 GTPase in the signal transduction pathway leading to cardiac myocyte hypertrophy*, J. Clin. Invest., 102(5):929-37, 1998.

INTERLEUKINA-10, CITOKINĂ ANTIINFLAMATOARE

Interleukina-10 (IL-10) a fost citată pentru prima dată în 1989 de către Mossman ca un factor produs de către limfocitele Th₂, la șoareci, un factor capabil să inhibe citokinele produse de limfocitele Th₁. Inițial ea a fost denumită „factor inhibitor al citokinelor“. Ulterior s-a semnalat faptul că IL-10 este produsă și de alte tipuri celulare, cum ar fi: celulele B, monocitele și keratinocitele și că are numeroase acțiuni biologice în afară de inhibiția citokinelor eliberate de limfocitele Th₁. IL-10 este cunoscută drept o citokină imunomodulatoare.

hIL-10 diferă de omologul său viral detectat la virusul Epstein Barr (vIL-10) prin numai 16% la nivelul secvenței de aminoacizi. cIL-10 – IL-10 celulară – termen colectiv pentru IL-10 umană și murină, are atât efecte pro-stimulatorii cât și inhibitorii pe diverse tipuri celulare, inclusiv co-stimularea proliferării limfocitele T, chemoatracție pentru celulele T_{CD8+} și stimularea proliferării celulelor NK. Se pare că vIL-10 împarte, în principal, cu cIL-10 efectele inhibitorii.(1)

Prin hibridizare s-a izolat din celulele T transformate cu Herpesvirus saimiri, o nouă genă, Ak 155, care este omoloagă cu gena IL-10. Aceste celule T supraexprimă Ak 155 și secretă în supernatant IL-10. În alte linii celulare T, Ak 155 este transcrisă în cantitate redusă. Ak 155, formează homodimeri, similar cu IL-10. Ca limfokină, ar putea contribui la transformarea celulelor T umane după infecția cu Herpesvirus saimiri. (2)

S-a observat că receptorul orfan CRF_{2,4}, membru al familiei receptorilor citokinici clasa II (clasă alcătuită din receptorul pentru interferon, receptorul lui IL-10 și al factorului tisular CRFB₄) este esențial în medierea efectelor lui IL-10 și este, de fapt, o subunitate a receptorului lui IL-10. Gena care codifică CRF_{2,4} este localizată pe o genă „cluster“, pe cromosomul 21 care cuprinde 3 subunități ale receptorului interferonic. Pentru a se elucidă rolul lui CRF_{2,4} s-a fragmentat CRFB₄ la șoareci. Șoarecii deficienți în CRF_{2,4} nu au arătat malformații evidente, au crescut normal și au fost fertili. Celulele deficiente în CRF_{2,4} au responsivitate normală la interferoni de tip I și II, dar nu au responsivitate la IL-10. La vârsta de aproximativ 12 săptămâni, majoritatea șoarecilor mutați au dezvoltat colită cronică sau splenomegalie, concluzionându-se astfel că, CRF_{2,4} este o subunitate a receptorului lui IL-10.

Celulele implicate în producerea interleukinei-10. Factori care influențează producerea citokinei

Citokina IL-10 aparține tipului 2 de citokine (antiinflamatoare) împreună cu IL-4, IL-13. IL-10 este o proteină de 33kD și de 157 aminoacizi și cu două punți disulfurice intramoleculare, cu rol de pivot în reglarea răspunsului imun mediat celular. Sursele majore de IL-10 sunt: fagocitele mononucleare, limfocitele CD4+, celulele B, keratinocitele, mastocitele. (3)

IL-10 s-a izolat din frunzele de tabac de Rima menassa.

S-a raportat existența, in vitro, a unei noi populații de celule T generată ca răspuns la infecția cronică cu *Borrelia burgdorferi*, populație celulară capabilă să producă atât IL-10, cât și IFN γ . Nu se cunoaște existența in vivo a unei astfel de linii celulare.

În 1998 s-a observat că celulele NK proaspete (celule care stimulate cu IL-12 sau IL-2 sunt capabile să producă IFN- γ , TNF- α , GM-CSF) stimulate cu IL-2 proliferază și produc IL-10 în funcție de doză. ARNm IL-10 se exprimă la concentrație maximă la 24 de ore. S-au decelat concentrații detectabile ale proteinei IL-10 în ziua a 2-a de cultură, care continuă să crească între zilele 3 și 6. Stimularea celulelor NK numai cu IL-12 nu determină proliferare substanțială și nici concentrații detectabile de IL-10, dar IL-12 sinergizează cu IL-2 în inducerea ARNm IL-10 și sintezei proteice.

Unele celule tumorale au, de asemenea, capacitatea de a produce IL-10. Producerea acestei citokine este indusă de unele microorganisme, câteva citokine (TNF- α , IL-6, IL-12), și hormoni (glucocorticoizi, epinefrina).

Mecanismele de reglare a producerii IL-10 în monocite sunt puțin cunoscute la nivel celular și biochimic. Se știe că expresia IL-10, IL-15, GM-CSF și IFN γ de către limfocitele T este dependentă de activarea căii MAP-kinazelor.(4)

Sinteza IL-10 de către monocitele umane este inegal dependentă de citokinele proinflamatorii endogene IL-1 și/sau TNF- α . Transducția semnalului lipopolizaharidelor implică activarea p38 și p42 MAP-kinazelor. Inhibarea lui p38 MAP-kinazei ar inhiba producția de IL-10, IL-1 β și TNF- α , în schimb, blocarea p42/p44 MAP-kinazei inhibă parțial producerea de TNF- α și IL-1 β , dar nu are efect asupra secreției monocitare de IL-10. Eliberarea de IL-10 împreună cu alte citokine (IL-6, PG E2, IL-12, IL-1R și stromalizina) este stimulată și de IL-17.

Stimulate cu endotoxină, celulele Kupffer primare secretă IL-10. S-a arătat că ARNm IL-10 crește de 450 de ori în celulele Kupffer după stimulare cu endotoxină. Celulele Kupffer sintetizează de novo proteina IL-10. Expresia genei IL-10 de către endotoxină a fost inhibată de proteina IL-10 endo- sau exogenă (scade ARNm IL-10 > sau = 350 de ori), apărând astfel un feed-back negativ autoreglator.

IL-10R se exprimă constituțional și funcțional în celulele Kupffer. Exprimarea precoce a lui IL-10 în aceste celule ar putea avea relevanță funcțională în stoparea răspunsului imun și reacției inflamatorii în sinusoidale hepatice. Autoreglarea negativă a expresiei IL-10 ar putea reprezenta un mecanism de răspuns funcțional al micromediului împotriva unor noi stimuli proinflamatori.

De asemenea, în reglarea secreției de IL-10 în celulele B intervine și TIMP-1 care mediază diferențierea specifică și inhibă apoptoza celulelor B. În schimb, IL-10 stimulează expresia TIMP-1 în macrofagele tisulare, monocite și în unele linii celulare ale carcinomului de prostată (5). Există studii care arată că TIMP-1 se corelează strâns cu IL-10 în limfocitele B din limfomul non-Hodgkin de grad histologic avansat. Se pare că prognosticul negativ al acestei boli pentru care a fost incriminată IL-10 ar fi dat, de fapt, de expresia crescută a lui TIMP-1. (6)

Toate regimurile alimentare bogate în grăsimi cresc semnificativ concentrația de ARNm IL-10. Rolipramul și cicaprostul (agenți ce determină creșterea AMPc) exercită o funcție reglatorie duală prin stimularea formării lui IL-10 și inhibarea sintezei de TNF, funcții reglatorii mediate de activarea protein-kinazei A. Dexametazona nu influențează producerea de IL-10. Corticosteroidii au capacitatea de a inhiba citokinele proinflamatorii și de a stimula citokinele antiinflamatorii precum IL-10. Acest efect sugerează că IL-10 ar juca un rol în acțiunea terapeutică a corticosteroidilor în astm.

La șoarecii endotoxemici, isoproterenolul, agonist neselectiv al receptorilor β adrenergici, scade producerea de mediatori proinflamatori: TNF- α și oxid nitric (NO) și stimulează formarea de citokine anti-inflamatoare ca IL-10.

Efectele biologice ale interleukinei 10

IL-10 este cunoscută drept o citokină imunosupresivă pentru că dezactivează macrofagele și inhibă inducția și fazele efectoare ale răspunsului T celular. Inhibă funcția de APC (celulă prezentatoare de antigen) a monocitelor/macrofagelor prin scăderea expresiei CMH clasa II și a moleculelor co-stimulatoare, inclusiv co-factorul B₇ în molecula 1 de adeziune intercelulară. Mai mult, IL-10 inhibă sinteza de IL-12 de către APC. (3) Funcția anti-inflamatoare a IL-10 este mediată prin inhibarea citokinelor pro-inflamatoare cum ar fi IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , GM-CSF și a chemokinelor, inclusiv MIP-1a, și prin inducerea eliberării antagonistului receptorului IL-1 (IL-1Ra). IL-10 previne, de asemenea, eliberarea de radicali liberi de oxigen și activitatea bactericidă a macrofagelor și neutrofilelor dependente de NO și scade capacitatea macrofagelor de a genera prostaglandine. (3)

În același context, IL-10 modulează funcția de prezentare antigenică a celulelor Langerhans umane de la nivelul epidermului.

După cum s-a afirmat anterior, IL-10 limitează răspunsul inflamator prin inhibarea activării macrofagelor. În macrofage activează STAT-1 și STAT-3. Efectele anti-proliferative și anti-activatoare ale citokinei asupra macrofagelor necesită prezența celor două reziduuri de Tyr membranare ale IL-10R. STAT-3 pare a fi implicat numai în transmiterea semnalului anti-proliferativ.

Monocitele umane în prezența lui IL-10 nu dezvoltă morfologie de celule dendritice, nu exprimă CD1a și se caracterizează prin nivele scăzute de CMH clasa II. Se pare totuși că IL-10 promovează diferențierea unui număr mare de celule din punct de vedere morfologic, citokinic și al fenotipului membranal spre macrofage, inclusiv colorație pozitivă pentru esteraza nespecifică și nivele crescute de CD14, CD16 și CD18, numai dacă citokina acționează în stadiile timpurii ale dezvoltării, la nivel de precursori. Efectul lui IL-10 în cultura de monocite a fost doză – dependent și a fost apreciabil când citokina s-a adăugat de la început în cultură, în comparație cu adăugarea ei după primele 3 zile de cultură, când efectul ei inhibitor este mai redus. Când IL-10 acționează în a 6-a zi de diferențiere spre celulele dendritice, determină numai o expresie scăzută de CMH clasa II și CD1a și neachiziționarea markerilor macrofagici: CD14, CD16 și CD18. O incubare prelungită, mai mult de 5 zile, cu IL-10 nu induce diferențierea celulelor dendritice în macrofage. Pe de altă parte, macrofagele obținute în cultură după incubarea monocitelor cu GM-CSF + IL-13 + IL-10 timp de 7 zile nu se transformă în celule dendritice după suplimentarea cu IL-10 timp de încă 3 zile. Deci, IL-10 inhibă diferențierea monocitelor în celule dendritice și promovează evoluția lor, în proporție mare, în macrofage mature. IL-10 inhibă capacitatea de prezentare antigenică a macrofagelor, dar stimulează activitatea de endocitoză.

De asemenea, IL-10 are efect reglator asupra secreției de CSF de către monocite. La fel ca și IL-4 și IL-13, are efect inhibitor asupra secreției de GM-CSF și G-CSF. IL-10 și IL-4 au efect inhibitor mai puternic decât IL-13. IL-10 exogenă are efect inhibitor mai puternic asupra producerii de GM-CSF, decât G-CSF. Monocitele produc IL-10 cu efect autocrin inhibitor în concentrație care afectează semnificativ numai producerea de GM-CSF (nu și de G-CSF). Se postulează astfel că, efectele inhibitorii ale citokinei IL-10 secretată de monocite asupra celor 2 factori, reflectă funcțiile lor fiziologice (GM-CSF este în principal o citokină pro-inflamatoare și G-CSF este mai mult un factor de recrutare celulară).

Într-un studiu al efectului lipopolizaharidelor asupra monocitelor s-a observat că acestea induc stimularea celulelor prin activarea indirectă a STAT-5, pe calea GM-CSF. Activarea lui STAT-5 a fost inhibată de IL-10 și dexametazonă, IL-10 blocând activitatea factorului transcripțional prin supresia lui GM-CSF, după cum s-a arătat anterior. Se dovedește astfel că, STAT-5 ar putea fi o țintă pentru IL-10 și dexametazonă pentru inhibarea lui Cox-2.

S-a observat că IL-10 stimulează și expresia receptorilor de înaltă afinitate pentru Ig G (FcγRI / CD64) în monocitele umane.

S-a determinat că IL-10 și IFN γ inhibă independent expresia proteinei inhibitoare macrofagică (MIP-1 α , MIP-1 β) indusă de hialuronat, la nivel de ARNm și de proteină. Acest efect nu necesită prestimulare și apare chiar dacă citokina s-a adăugat în cultură după 3 ore de la stimularea cu hialuronat. IL-10 scade pregnant stabilitatea ARNm MIP-1 α și inhibă expresia macrofagică a ARNm MIP-1 β la nivel transcripțional. Se sugerează astfel, un potențial rol al IL-10 și IFN γ ca reglatori ai expresiei citokinelor pro-inflamatoare induse de matricea extracelulară.

Stimularea limfocitelor B pe calea CD27 prin ligandul CD27 (CD70) a arătat o creștere a plasmocitelor în prezența IL-10. Diferențierea celulelor B în plasmocite prin asocierea cu IL-10 și CD70 apare numai la limfocitelor CD27+, nu și la limfocitelor CD27-. Adăugarea de IL-2 la IL-10 și CD70 induce o diferențiere mai accentuată în plasmocite, dar acest efect nu apare numai în prezența de IL-2, IL-4, IL-6 și CD70. Se pare că CD70 este o moleculă cheie în prevenția inițierii procesului de apoptoză indus de IL-10 și în direcționarea celulelor BCD27+ spre diferențierea în plasmocite, în cooperare cu IL-10.

IL-10 intervine în procesul de diferențiere a limfocitelor B în limfocite B cu memorie sau plasmocite împreună cu CD40-ligand, IL-4 și IL-6. IL-10 la nivelul limfocitelor B are rol în „switching“-ul de clasă (modificarea clasei de Ig secretată de limfocitele B: E \rightarrow G, M, A). Are efect diferit în acest proces în funcție de factorii adiționali ce acționează asupra limfocitelor B. Sub acțiunea lui IL-4, IL-10 scade expresia transcriptului epsilon și producerea de Ig E, atunci când este adăugată în cultură în primele 3 zile și crește producerea de Ig G $_4$. În schimb, dacă IL-10 se adaugă în cultură după 3 zile, când celulele B sunt deja programate pe „switching“-ul Ig E, citokina potențează producerea de Ig E.

IL-10 inhibă răspunsul inflamator într-o manieră independentă T $_{H1}$ / T $_{H2}$. Ea inițiază dezvoltarea limfocitelor T $_{CD8+}$ (limfocitelor T $_{H1}$). Are efecte diferite asupra celulelor T $_{CD8+}$, în funcție de starea lor de activare, observându-se atât efecte stimulatorii cât și inhibitorii asupra limfocitelor T $_{CD8+}$, pe modele experimentale in vivo. IL-10 este un binecunoscut imunosupresor care inhibă macrofagele și limfocitelor T $_{CD4+}$, in vitro. De asemenea, inhibă răspunsul proliferativ specific alloantigenic și induce un status anergic pe celulele T $_{CD8+}$ purificate, când se adaugă concomitent cu antigenul în prezența APC.(7)

IL-10 inhibă generarea citotoxică allospecifică. Aceste efecte sunt indirecte fiind mediate prin intermediul inhibării funcțiilor co-stimulatorii ale APC. În schimb, nu are efecte directe inhibitorii asupra proliferării celulelor T $_{CD8+}$ purificate activate de anticorpi monoclonali anti-CD3. Determină și creșterea limfocitelor T $_{CD8+}$ activate, în combinație cu doze mici de IL-2.

S-a analizat efectul lui IL-10 asupra funcțiilor celulelor Langerhans purificate umane, de la nivelul epidermului normal. Adăugarea de IL-10 la începutul unei culturi mixte limfo-

epidermică determină inhibarea proliferării limfocitelor. Acest efect este dependent de doză și s-a observat o scădere a răspunsului allogenic de circa 50% la doze de 1 ng/ml. O inhibiție totală a răspunsului s-a obținut la doze de 5 – 10 ng / ml. Inhibarea în acest mod a limfocitelor T este legată de o activitate specifică a IL-10, pentru că acest efect a putut fi inhibat cu anticorpi monoclonali anti-IL-10. IL-10 acționează într-un stadiu precoce de activare limfocitară; nu s-a obținut nici o modificare dacă citokina s-a adăugat în ziua a 2-a / a 3-a de cultură.

S-a observat că IL-10 este produsă la nivelul epidermului sub acțiunea radiațiilor ultraviolete B astfel că, ar putea avea rol în imunosupresia indusă de radiații.

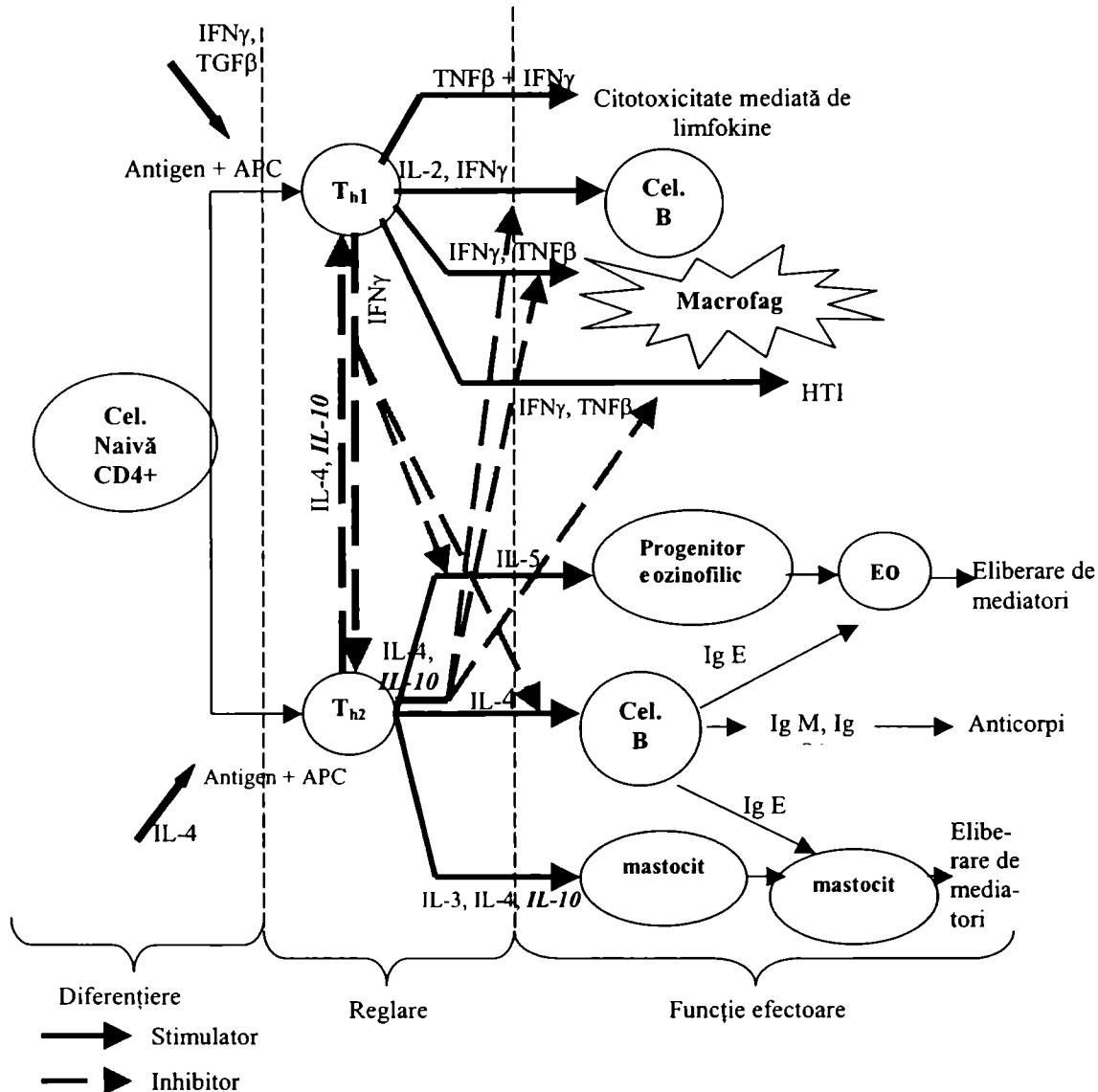
TGFβ1 și IL-10 împreună cu PGE₂ are abilitatea de a dezactiva puternic macrofagele periferice și microgliile. Ambele citokine inhibă secreția de NO indusă de LPS, iar IL-10 are efect inhibitor asupra secreției de PGE₂ indusă de LPS.

S-a arătat că celulele hepatice stelate (HSC), cu rol în remodelarea hepatică și în fibroza hepatică, exprimă IL-10 după activare in vivo și in vitro și se pare că această citokină are efecte autocrine, cum ar fi inhibarea producerii de colagen. Tratarea culturilor de HSC cu TNF-α, TGF-β sau LPS determină o creștere a IL-10 de două ori și eliberarea de proteină IL-10 în mediu. HSG izolate de la șobolani cu ligatura ductelor biliare au arătat o creștere marcată a ARNm IL-10 (×100) și a proteinei (×30) după 7 zile de la ligatură, dar această inducție dispare în fibroza hepatică avansată. Expresia IL-10 se corelează pozitiv cu expresia ARNm al colagenazei interstițiale și invers proporțional cu cea a colagenului-α. Deci, IL-10 are un efect autoreglator negativ asupra producerii de colagen, efect mediat, în parte, de inhibarea transcripțională a colagenului-α și stimulează exprimarea colagenazelor. Aceste date sugerează un posibil rol al IL-10 în remodelarea matricei și un posibil eșec al HSC în susținerea secreției de IL-10 în apariția cirozei hepatice.(8)

IL-10, la fel ca alte citokine anti-inflamatoare, IL-4 sau TGF-β1, inhibă producerea de IL-8 de către celulele microgliale umane ca răspuns la citokinele inflamatoare (IL-1β, TNF-α) în meningite, encefalite, leziuni traumatice ale SNC și alte injurii care determină inflamație. Aceste rezultate sugerează o posibilă implicare terapeutică a IL-10 într-o astfel de patologie. La fel ca IL-4, IL-13 și dexametazona, IL-10 inhibă parțial eliberarea de IL-8 indusă de TNFα și IFNγ în culturi de celule musculare din tractul respirator uman.

IL-10 induce o scădere a urokinazei (PA) și CD11b după 18 ore de incubație în culturi de monocite și o scădere întârziată a receptorului urokinazei (uPAR), semnificativă, doar după 48 de ore. uPA și uPAR sunt implicați în migrarea monocitelor și inducerea degradării proteinelor matriciale. uPAR este implicat în adeziunea celulelor la peretele vascular. Funcția de adeziune a uPAR este dependentă de interacțiunea directă cu fibronectina (care e crescută de uPA) și de modificarea integrinelor celulare de suprafață (CD11b, CD18). Aceste rezultate explică scăderea adeziunii monocitelor după 18 ore de incubație cu IL-10 și imobilizarea fibronectinei și fibrinogenului. IL-10 ar putea avea efect protectiv asupra degradării matricei proteice, prin scăderea uPA.

Citokina anti-inflamatoare și imunosupresivă IL-10 stimulează expresia receptorilor chemochimici CC, CCR5, CCR2 și CCR1, în monocitele umane prin prelungirea t_{1/2} al ARNm acestor receptori. Stimulează monocitele prin creșterea numărului de receptori de suprafață pentru agoniștii care controlează aceste celule și prin creșterea responsivității la acțiunea chemotactică a acestora.



Implicarea interleukinei-10, împreună cu alte citokine, în răspunsul imun

În concluzie:

Deși este cunoscută ca o citokină antiinflamatoare, IL-10 exercită efecte biologice multiple și variate asupra sistemului imun ce pot fi grupate astfel:

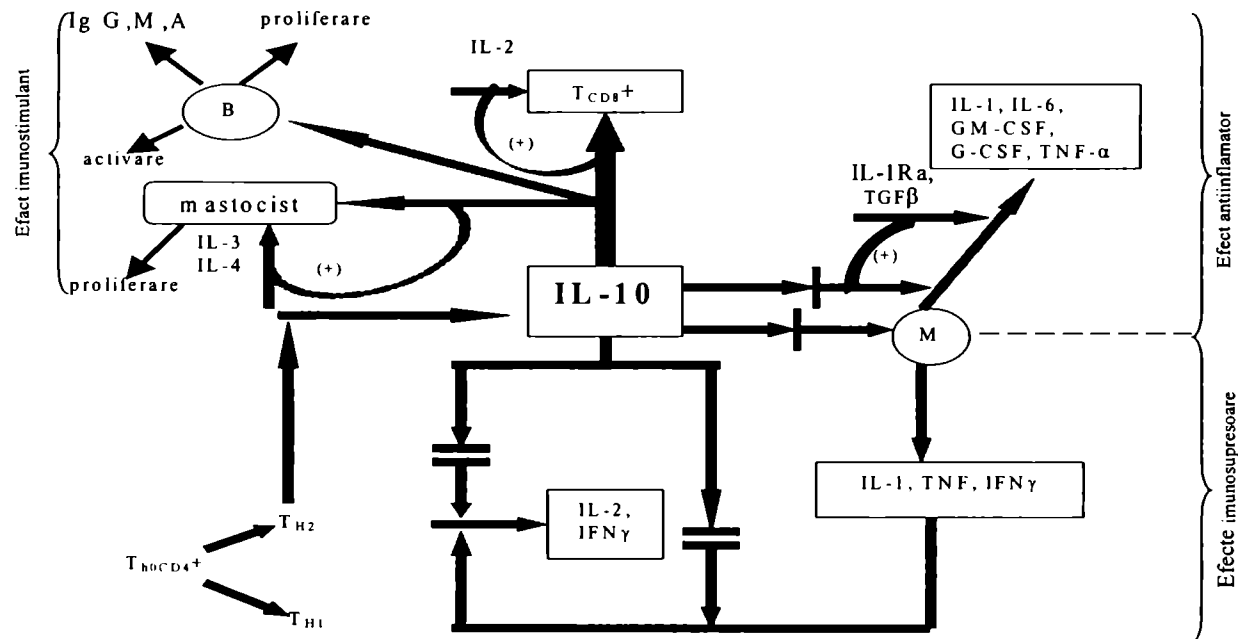
> Efecte imunosupresoare: – acționează asupra limfocitelor Th₀ stimulând diferențierea acestora spre limfocite Th₂;

– inhibă subpopulațiile Th₁ prin mecanism indirect, mediat pe două căi: inhibă sinteza de citokine accesorii pentru acest proces (IL-1, IL-12, TNF- α , IFN- γ) și inhibă funcția de celule prezentatoare de antigen (APC) a macrofagelor, proces obligatoriu pentru inițierea diferențierii. Se pare că activarea și diferențierea limfocitelor Th₁ induse de „antigenul prezentat“ de limfocitele B nu sunt afectate.

IL-10 scade producerea de citokine de către subpopulațiilor Th₁, mai ales prin IFN- γ , printr-un mecanism direct de inhibiție a transcripției genelor care codifică aceste citokine și inhibă capacitatea macrofagelor de a prezenta antigenul limfocitelor T prin scăderea expresiei moleculelor CMH clasa II.

➤ Efecte antiinflamatoare: se datorează inhibării altor funcții ale macrofagelor, cum ar fi sinteza citokinelor IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF, TNF- α - citokine proinflamatoare, precum și sinteza de radicali liberi de oxigen și derivați nitrici. Efectul antiinflamator este sinergic cu al altor „mediatori supresivi“: TGF- β , IL-1R și PGE₂. Efectul inhibitor al IL-10 asupra citokinelor pro-inflamatoare are loc la nivel posttranscripțional și necesită, probabil, stimularea unei ribonucleaze.

➤ Efecte imunomodulatoare: pe limfocitele T citotoxice și limfocitele B; crește viabilitatea limfocitelor B mature, stimulează expresia moleculelor MHC clasa II, proliferarea, diferențierea și producția de Ig M, G și A; stimulează răspunsul proliferativ și funcția citotoxică a limfocitelor T citotoxice; stimulează proliferarea mastocitelor printr-un efect sinergic cu IL-3 și IL-4.(9)



Efecte biologice ale interleukinei 10

Interleukina-10 în patologii

IL-10 în infecții: Concentrații crescute de IL-10 se asociază cu diferite tipuri de infecții cum ar fi șocul meningococic, bacteriemii cu germeni Gram + și Gram -, malarie, etc., hepatita virală cu virus C și infecții fungice. Concentrațiile crescute de citokină se leagă, în principal, de severitatea complicațiilor ulterioare și chiar de mortalitatea pacienților febrili și cu sepsis sever. (3)

Pentru diagnosticul diferențial între febra neoplazică și infecții sau bacteriemii, IL-10, singură, nu are valoare de marker mai bună ca neopterin sau VSH (viteza de sedimentare a hematiilor).

Datorită efectelor antagoniste ale IL-10 și IL-12 în reglarea rețelei de citokine, balanța exprimării acestora a atras interesul în diverse afecțiuni patologice cum ar fi bolile autoimune, reacția allogrefei, artrite, ateroscleroză, afecțiuni ginecologice și oftalmologice. (3) Într-un model experimental, cantitățile crescute de ARNm IL-10 și scăzute de ARNm IL-12 au expus șoarecii la un risc mai mare de pneumonie cu Klebsiella. S-a utilizat acest antagonism la om,

în strategiile terapeutice, cum ar fi, spre exemplu, administrarea de IL-10 în diferite boli infecțioase și inflamatorii. Ar putea fi utilizată în tratamentul șocului septic determinat de germeni Gram + și/sau Gram -. Studii recente au arătat că administrarea de anticorpi anti-IL-10 ar putea fi utilă în prevenirea unor dezechilibre imune determinate de injurii diverse și pare a îmbunătăți supraviețuirea în șocul polimicrobian experimental.

Cum nici una dintre aceste citokine nu are valoare în diagnosticul infecțiilor la pacienții neoplazici, s-a luat în calcul valoarea simultană a IL-10 și IL-12 observându-se că raportul IL-10/IL-12 are o valoare mai bună de diagnostic. Acest raport s-a dovedit net superior altor markeri deja consacrați cum ar fi neopterinul și VSH și se utilizează împreună cu raportul dintre neopterin și IL-12 (sensibilitatea: neopterin/IL-12 = 82%, specificitatea: IL-10/IL-12 = 90%).

IL-10 crește în timpul răspunsului septic în șocul septic acționând, probabil, împreună cu TGF- β , cortizolul, IL-1Ra, TNFRs, pentru scăderea reacției imune.

În meningită, concentrația de IL-10 în lichidul cerebrospinal depășește de 100 → 1000 de ori pe cea din plasmă. Pacienții cu meningococemii fulminante au, de obicei, concentrații crescute atât de citokine pro-inflamatoare cât și de cele anti-inflamatoare (IL-10, TNFRs, IL-1Ra).

Parazitismul splenic cu *Leishmania donovani* se asociază cu un răspuns precoce a IL-4, o creștere marcată a IL-10, o expresie minimă a IL-12 și o expresie întârziată a iNOS. De asemenea, IL-10 ar putea avea rol în diagnosticul precoce al leishmaniozei cutanată care se manifestă după leishmanioza sistemică (viscerală), corect tratată. Unii pacienți după tratamentul infecției sistemice Kala-Azar (leishmanioza viscerală) dezvoltă leishmanioză cutanată post-Kala-Azar (PKDL). S-a raportat că dezvoltarea PKDL ar putea fi prevăzută înaintea începerii tratamentului leishmaniozei viscerale și că IL-10 are implicații în patogeneză. Înaintea începerii tratamentului leishmaniozei viscerale, parazitul este prezent în tegument care aparent pare normal la toți pacienții. La pacienții care au dezvoltat mai târziu PKDL, și nu în celelalte cazuri, s-au decelat concentrații crescute de IL-10 la nivelul keratinocitelor și/sau glandelor sudoripare, ca și în plasmă. Mai mult, la aceștia, concentrațiile de IL-10 din plasmă, ca și cele din supernatantul culturilor de mononucleare sangvine, au fost mai mari decât la grupul de control.

S-au măsurat concentrațiile de ARNm al citokinelor în aspirate splenice seriate de la pacienți cu leishmanioză viscerală în timpul monoterapiei cu IFN- γ , gluconat de sodiu antimonice (SAG) sau amfotericină B (ABLC). ARNm pentru IL-10 s-a detectat la 100% din pacienți la nivel bazal. După tratament cu IFN- γ s-au menținut nivele înalte de ARNm IL-10 pe toată perioada tratamentului. În grupurile tratate cu SAG și ABLC, nivelele de ARNm IL-10 au scăzut semnificativ. După un tratament corect și vindecarea infecției, ambele componente ale răspunsului imun (IL-10 și IFN- γ) par a involua.

În malarie, la gravide, scade concentrația de IL-10 și crește concentrația de IFN- γ , IL-2 și TNF- α la nivelul placentei, schimbând balanța citokinelor de tip I. Aceste schimbări ale citokinelor placentare se pare că se asociază cu o rată mică de supraviețuire a fătului la naștere.

S-a demonstrat că în peritonitele fecaloide, pe model murin, efectul benefic al terapiei cu inhibitor de oxid nitric este mediat, în parte, de creșterea concentrației de IL-10 și MCP-1 (proteină chemoattractantă pentru monocite). Imunoneutralizarea lui IL-10 sau IL-10 + MCP, cu anticorpi monoclonali înainte de operație, la șoareci, a redus semnificativ rata de supraviețuire.

Studii pe candidoze murine sugerează că rezistența la infecție este legată de răspunsul T_{H1} și producerea de IFN γ , în timp ce eșecul în protecția față de *Candida albicans* se asociază cu răspunsul T_{H2} și producerea de IL-4 și IL-10. (10)

La șoarecii cu toxoplasmoză cronică, la exacerbarea hipofagiei și statusului hipermetabolic participă și hiperreactivitatea la secreția de TNF- α și IL-10.

Infecția keratinocitelor in vivo cu herpes simplex stimulează producția de chemokine, urmată de IL-12, apoi IL-10, indicând un potențial rol al acestor evenimente în recrutarea precoce, activarea și producerea de IFN γ în leziunile herpetice.

Celulele mononucleare din sângele periferic al pacienților cu hepatită cronică cu HVB proliferază și produc IFN γ și IL-10 după stimularea cu Ag Hbe, dar nu și după stimularea cu Ag HBs.

S-a observat că polimorfismul promotorului genei IL-10 se asociază cu susceptibilitatea de infecție primară cu EBV (Epstein Barr virus). Promotorul genei IL-10 are 3 subunități de bază cunoscute (G/A la -1082, C/T la -819, C/A la -592), care formează 3 haplotipuri GCC, ACC și ATA. Prezența haplotipului ATA, în studiul de față, protejează față de infecția precoce cu EBV. Concentrațiile de IL-10 sunt semnificativ mai mari la purtătorii haplotipului ATA, astfel, se pare că protecția față de infecția primară cu EBV este mediată de IL-10. (11)

IL-10 în bolile cardio-pulmonare: By-pass-ul cardio-pulmonar (CPB) este caracterizat prin eliberarea sistemică de citokine atât pro-inflamatoare, cum ar fi TNF α , IL-1, IL-6, cât și anti-inflamatoare endogene, inclusiv IL-10. După CPB, glucocorticoizii scad concentrațiile plasmatiche de TNF α , în timp ce cresc concentrațiile de IL-10. Aprotinin – o serin-protează inhibitoră – scade eliberarea de citokine pro-inflamatoare, TNF, induse de CPB, similar cu glucocorticoizii și determină creșterea răspunsului anti-inflamator prin eliberarea de IL-10, cu posibil răsunset terapeutic.

La pacienții cu by-pass aorto-coronarian (CABG) s-au găsit valori crescute ale concentrațiilor IL-10 și IL-6 după operația intervențională, dar nu și de TNF α sau de IL-1 β .

S-a demonstrat pe șoareci că factorii patogeni induc ateroscleroză (ATS) dacă IL-10 este absentă. Sinteza de IL-10 este sub control genetic. La om, 50-60% din populație este capabilă să producă cantități crescute de IL-10, 40-50% produc concentrații intermediare, iar 5-10% nu pot sintetiza decât cantități mici. Experimente efectuate pe șoareci deficienți în IL-10 și crescuți în atmosferă cu aer filtrat și cu regim alimentar ce determină apariția plăcilor de aterom au demonstrat formarea unor plăci de aterom de 3 ori mai extinse decât la cei cu concentrații normale de IL-10. Expunerea acestora și la agenții patogeni din atmosferă a determinat formarea de plăci de aterom de 30 ori mai extinse față de șoarecii care exprimă normal IL-10. Plăcile de aterom în astfel de cazuri conțin de 4 ori mai puține fibre de colagen decât la șoarecii IL-10 pozitivi, ceea ce favorizează ruperea plăcii de aterom. Administrarea de IL-10 a redus semnificativ placa, deschizând astfel perspectiva unui tratament cu rIL-10 în ateroscleroză. (12)

Celulele T reglatoare cu implicații în protecția față de dezvoltarea astmului bronșic, par a avea rol în secreția de IL-10. S-a observat că dacă este blocată calea de semnalizare pentru IL-10 sau ICOS (moleculă celulară de suprafață cu rol protectiv), celula T nu mai poate proteja șoarecii cu susceptibilitate de a dezvolta astm bronșic.

La șoarecii cu reacție inflamatorie pulmonară indusă de instilații intratraheale cu siliciu, concentrația de IL-10 a celulelor din lavajul bronho-alveolar și din omogenatele de țesut pulmonar au fost semnificativ crescute în comparație cu controlul. Sinteza crescută de IL-10 în silicoză ar putea limita reacția inflamatorie, dar contribuie la amplificarea răspunsului fibrotic pulmonar. S-a determinat amplitudinea răspunsului inflamator la șoarecii deficienți în IL-10 care a fost semnificativ mai mare decât la cei cu IL-10 normal, deci răspunsul fibrotic a fost semnificativ mai puțin important la cei cu deficit de IL-10. (13)

De asemenea, IL-10 are importanță în instalarea toleranței imune la antigene respiratorii. Expunerea la antigene, pe cale respiratorie, induce toleranța celulelor T și

protejează împotriva dezvoltării hiperreactivității bronșice și astmului bronșic. S-a observat că celulele dendritice la șoarecii cu o astfel de expunere au produs tranzitoriul IL-10. Aceste celule, pe lângă secreția de IL-10, stimulează și dezvoltarea limfocitelor T_{CD4+} , care produc, de asemenea, concentrații crescute de IL-10.

Expresia IL-10 în alte afecțiuni: Se pare că IL-10 este o citokină cheie în psoriazis. Este o citokină de tip 2 cu impact major asupra imunoreglării, întrucât inhibă formarea citokinelor de tip 1/pro-inflamatoare. În psoriazis a fost demonstrată supraexpresia citokinelor de tip 1 și se crede că acestea au importanță în fiziopatologia bolii. În psoriazis s-a decelat o deficiență relativă în ARNm IL10 la nivelul epidermului față de alte dermatoze inflamatorii. Interesant este faptul că pacienții, în timpul tratamentului antipsoriazic, au arătat o expresie mai crescută a ARNm IL-10 la nivelul celulelor mononucleare din sângele periferic, față de pacienții fără tratament, ceea ce demonstrează că IL-10 poate avea rol protectiv față de psoriazis. S-au administrat subcutan 8 $\mu\text{g/kg/zi}$ IL-10, 24 de ore, la 3 pacienți. S-a observat eficiența administrării prin parametrii clinici obiectivi și subiectivi. S-au găsit astfel efecte imunosupresive ale tratamentului (scăderea expresiei monocitare de HLA-DR, scăderea capacității de secreție a $\text{TNF}\alpha$ și IL-12, scăderea concentrației de IL-12 și scăderea responsivității la restimulare antigenică), precum și o schimbare a modelului citokinelor de tip 2 (crește proporția de IL-4, IL-5 și IL-10 produse de celulele T, creșterea selectivă a concentrației serice de Ig E). De asemenea, administrarea de IL-10 a intensificat expresia cutanată de ARNm IL-10. Astfel, administrarea de IL-10 ar putea constitui o nouă linie de tratament în psoriazis.

S-a observat că IL-10 se asociază cu galectin-3 în protecția celulelor hepatice de efectul de „ischemie-reperfuție” (14)

Prezența unei alele A în poziția -627 a promotorului genei IL-10 se pare că se asociază cu hepatopatia alcoolică avansată, ipoteză susținută și de observația că purtătorii de alela -627A asociază concentrații reduse de IL-10, ceea ce favorizează apariția inflamației la nivel hepatic și a mecanismelor implicate în fibroza hepatică.

Indivizii purtători de genotipuri specifice ale bcl-2 și IL-10 au risc mare de a dezvolta lupus eritematos sistemic (SLE). Analizele finale arată un efect sinergic al alelelor susceptibile ale lui bcl-2 și IL-10 în determinarea bolii. Prezența individuală a uneia dintre aceste alele s-a asociat cu o creștere moderată a riscului de SLE, în timp ce exprimarea lor împreună crește riscul dezvoltării SLE cu mai mult de 40%. (15)

În artrita reumatoidă există o balanță dezechilibrată a citokinelor pro- sau anti-inflamatoare în cartilajele articulare. Gena IL-10 se exprimă crescut în țesutul sinovial la pacienții cu artrită reumatoidă, ceea ce ar putea avea rol în scăderea invaziei cartilajului și expresiei metaloproteinazelor. La pacienții cu artrită reumatoidă, la nivelul cartilajelor, s-a decelat exclusiv ARNm pentru IL-6, IL-6R IL-7, IL-8, IL-10 și IL-12, iar la cei cu osteoartrită s-a exprimat doar ARNm pentru IL-10 și IL-8. Datorită faptului că IL-10 și IL-4 supresează $\text{Lf } T_{H1}$ și IL-10 poate, de asemenea, stimula IL-1Ra, s-a ridicat problema utilizării acestei citokine în tratamentul artritei reumatoide.

La copiii cu artrită reumatoidă juvenilă sistemică, monocitele din sângele periferic au o secreție crescută de IL-10 și IL-4, in vitro, constitutiv sau după stimulare cu diferite antigene, și deficiență de IL-2 și $\text{IFN-}\gamma$. Acest model al citokinelor este reprezentativ pentru un răspuns celular mixt T_{H1}/T_{H2} în această afecțiune. Moleculele co-stimulatoare au fost identificate ca un indicator potent al secreției de IL-10 și IL-4.

S-a evidențiat că și în scleroza multiplă apare o creștere a citokinelor pro-inflamatoare și a celor inhibitoare ale răspunsului imun (IL-10, $\text{TGF-}\beta$).

IL-10 ar putea avea implicații terapeutice în granulomatoza Wegener, citokina exogenă inhibând în funcție de doză secreția de IFN- γ a monocitelor din sângele periferic, in vitro.

La pacientele cu tiroidită autoimună și sterilitate s-a decelat o creștere a numărului de celule T la nivel endometrial, cu scăderea secreției de IL-4 și IL-10 în comparație cu pacienții normali. Sursele de IL-4, IL-10 și IFN- γ sunt leucocitele endometriale.

Encefalomielite autoimună indusă experimental la șobolanii Lewis este o boală autoimună mediată de celulele T din SNC. S-a detectat un vârf al expresiei ARNm IL-10 între zilele 11 – 13 ale fazei acute a bolii, vârf însoțit de o creștere a proteinei IL-10. Au fost identificate drept surse majore de IL-10, in vivo, limfocitelor T, macrofagele/microglia și osteocitele. Nu se știe dacă IL-10 endogenă contribuie la remisia clinică rapidă caracteristică pentru encefalomielitele autoimune induse experimental la șobolanii Lewis, sau joacă alte roluri încă neelucidate în autoimunitatea SNC.

IL-10 sinergizează cu IL-4 și IL-13 în inhibarea secreției lizosomale a monocitelor și mononuclearelor din lamina propria umană, la pacienții cu boală inflamatorie de colon. Injuria tisulară și inflamația în această afecțiune se asociază cu creșterea enzimelor lizosomale monocitare, IL-10 și IL-4 scăzând puternic această secreție. S-a observat că tratamentul combinat cu IL-10 și IL-13 sau IL-10 și IL-4 inhibă puternic eliberarea de enzime a mononuclearelor din lamina propria. În același timp, IL-13 scade forma precursoră a catepsinei D, iar IL-4 și IL-10 afectează ambele forme ale acestei enzime (matură și precursoră). Catepsina D, sub ambele forme, este crescută în colita inflamatorie. Se evidențiază astfel un nou posibil tratament efektiv pentru această boală și utilitatea unui tratament citokinic combinat. (16)

La pacienții cu nefropatie Ig A s-a observat o creștere a IL-10 în culturile de celule sangvine stimulate cu lipopolizaharide și fitohemaglutinină. Creșterea secreției de IL-10 poate apare datorită unui număr crescut de limfocite B producătoare de Ig A la nivel medular. În plus, concentrațiile crescute ar putea determina, în general, funcțiile efectoare ale monocitelor și, posibil, APC-urilor și răspunsul Ig A la nivelul mucoaselor.

S-a studiat posibilitatea utilizării IL-10 ca potențial antiinflamator în caz de naștere prematură, deces fetal perinatal, deficiență de dezvoltare fetală, afecțiuni ce se asociază cu indicii inflamatori sau cu infecție uteroplacentară. S-au administrat doze mici de endotoxină (LPS, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.p.) în trimestrul III de sarcină, la șobolani (zilele 14-20 de gestație); lotul de control a primit soluții saline, iar al 3-lea lot a primit IL-10 (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.c.) concomitent cu LPS, 7 zile prenatal. Expunerea la LPS a determinat o rată a decesului fetal de 43% și nu a modificat greutatea placentei; IL-10 a atenuat rata de deces fetal (la 22%). La șobolanii cu gestație normală, IL-10 nu a afectat dimensiunile fătului, chiar dacă dimensiunile placentei au fost mai mici. IL-10 a determinat și normalizarea concentrației uterine a TNF- α , NO și a apoptozei epitelului uterin induse de LPS. Deci, IL-10 ar putea reprezenta o nouă opțiune terapeutică a diferitelor complicații perinatale; beneficiul ar putea rezulta datorită supresiei TNF- α sau apoptozei celulare determinată de NO.

Interleukina 10 în infecția HIV. S-a observat că IL-10 inhibă replicarea HIV în macrofagele și monocitele infectate acut, prin blocarea rețelei de citokine inductoare ale replicării virale (TNF- α , IL-6). De asemenea, stimulează expresia CXCR₄ și inhibă expresia CCR₅.

Indivizii purtători ai alelei IL-10-5' 529A a promotorului genei IL-10 au risc crescut de infecție HIV, iar o dată contactată boala, aceasta are o evoluție mult mai rapidă decât în celelalte cazuri.

Monocitele stimulate cu IL-10 sunt infectate cu HIV mult mai eficient, efect ce s-ar putea datora creșterii pătrunderii virusului la nivelul lui CCR₅.

HIV determină dereglarea modelului citokinic al limfocitelor T_{CD4+} , prin creșterea secreției de IL-6 și inhibarea secreției IL-10, fapt ce pare a fi implicat în inducerea defectelor limfocitelor T_{CD4+} și ar putea induce formarea de autoanticorpi anti-celulă T_{CD4+} . (17)

Pacienții cu infecții HIV avansate, au susceptibilitate crescută la infecții cu *Mycobacterium avium complex* (MAC). Cele mai mari concentrații de IL-10 s-au detectat în culturile celulare de la pacienții cu boală foarte avansată SIDA. Monocitele sunt sursa principală de IL-10, în timp ce o cantitate mică este secretată de limfocitele T_{H2} . Secreția crescută de IL-10 derivat din monocite/macrofage ar putea contribui la susceptibilitatea înaltă la infecții MAC observată la pacienții cu boală avansată SIDA.

Interleukina 10 în transplantul de organe. S-a demonstrat că disfuncția intragrefă a ARNm ce codifică molecula de atac citotoxic – granzyma B – și citokinele imunoreglatoare IL-10 sau IL-2 se corelează cu reiectul acut de grefă, iar expresia ARNm TGF-1 cu cel cronic. (18)

S-au detectat cantități crescute de ARNm IL-10, la nivelul monocitelor periferice, la pacienții cu reiect grefă-contra gazdă (GVHD), chiar până la 29 de ori mai mari, față de indivizii sănătoși. Purtătorii de alele G/G (-1082) au risc crescut de a dezvolta boala post-transplant. Recipienții purtători ai alelelor satelite mai lungi (-1064) dezvoltă o reacție GVHD mai severă, cu mortalitate precoce (19). Polimorfismul regiunii promotoare IL-10 ar putea explica diferențele de susceptibilitate a pacienților cu GVHD autolog. De asemenea, IL-10 ar putea fi utilizată în creșterea efectului grefă-contra tumoră după transplant.

Tratamentul cu IL-10 s-a dovedit benefic în transplantul hepatic ortotopic, scăzând producerea de citokine chemoattractante pentru neutrofile, riscul de apariție a leziunilor hepatice și frecvența reiectului acut și crescând supraviețuirea allogrefelor. (20)

IL-10 pare a avea o importanță foarte mare în controlul dezvoltării bronșiolitei obstructivă post-transplant (considerată o formă de reiect cronic al grefei).

IL-10 în neoplazii. IL-10 este o citokină importantă în tumorigeneză. Polimorfismul genic se corelează cu un efect diferit în dezvoltarea neoplaziilor. (21)

Exprimarea anumitor alele ale promotorului genei IL-10 determină o creștere a susceptibilității apariției anumitor tipuri tumorale:

➤ Frecvența crescută semnificativ a genotipurilor IL-10G (136/136) și IL-10R (112/114) împreună cu scăderea genotipului IL-10R (114/116) s-au constatat la pacienții cu mielom multiplu. (22)

➤ Exprimarea genotipului IL-10-1082 AA crește incidența melanomului malign cutanat. (23)

➤ Genotipul IL-10 G/G arată un efect protectiv față de răspunsul slab la tratamentul cu prednison la copiii cu leucemie acută limfoblastică. (24)

Numeroase studii au evidențiat secreția crescută de IL-10, atât la nivel local, cât și în serul pacienților neoplazici.

S-a evidențiat că macrofagele tumorale produc o cantitate crescută de IL-10 și arată o secreție defectuoasă de IL-12 ce se asociază cu lipsa activării NF- κ B p50/p65. Anticorpii anti-IL-10 au restabilit capacitatea macrofagelor tumorale de a produce IL-12. S-a sugerat că în timpul creșterii tumorale ar putea fi activate diverse funcții ale macrofagelor pe o cale dependentă de IL-10 în micromediul tumoral determinând apariția macrofagelor cu fenotip IL-10+/IL12-. Blocarea IL-10 sau a altor citokine imunosupresive, cum ar fi TGF- β , ar putea completa strategia terapeutică antitumorală. (25)

Recent s-a semnalat faptul că IL-10 are semnificație prognostică independentă pentru evoluția tumorilor solide avansate și ar putea fi utilă pentru monitorizarea progresiei bolii. O

scădere semnificativă a concentrației serice a IL-10 a fost observată în grupul de pacienți „responder“-i, în timp ce la „non-responder“-i s-a semnalat o creștere semnificativă a concentrației (26).

O valoare prognostică a concentrației IL-10 s-a evidențiat în cancerul gastric și pulmonar cu celule mari (28), în leucemia limfatică cronică (29), în limfomul Hodgkin (30).

Deși IL-10 este cunoscută ca o citokină imunosupresivă, s-au găsit evidențe că IL-10 exercită acțiuni antitumorale și antimetastazice, acțiuni determinate de inhibarea angiogenezei. Efectul antiangiogenic se datorează capacității ei de a inhiba sinteza VEGF, IL-1 β , TNF α , IL-6 și MMP-9 în macrofagele tumorale. (5) Alte studii au evidențiat că IL-10 inhibă metastazarea tumorală printr-un mecanism dependent de celulele NK. (31). Se pare că, citokina se corelează cu expresia genei trombospondin 1 și 2 la pacienții cu cancer de colon, exercitând astfel efect antiangiogenic. (32)

În unele tumori, IL-10 se corelează cu expresia angiopoietinei/TIE2 având rol în angiogeneza tumorală, ca spre exemplu în cancerul pulmonar cu celule mari (33).

De asemenea, s-a observat că șoarecii deficienți în IL-10 au risc crescut pentru dezvoltarea anumitor tumori, cum este cancerul de colon (34).

S-a sugerat un posibil rol funcțional în progresia unor tumori, ca de exemplu, glioblastomul (35) și mielomul multiplu (22).

IL-10 în cancerul cutanat. Concentrații crescute de IL-10 s-au decelat în supernatantul de celule bazale ale carcinomului cutanat. Este foarte posibil ca prezența acestei citokine în celulele neoplazice să fie responsabilă direct/indirect de absența completă a HLA-DR, ICAM 1, CD40 și CD80 în aceste celule dar și de eludarea sistemului imunitar (36).

Genotipurile și haplotipurile IL-10 sunt diferit distribuite la recipienții de transplant renal care dezvoltă carcinom cutanat, în special carcinomul scuamo-celular (SCSC), cu o creștere a exprimării haplotipului GCC și o scădere a celui ATA. Secreția IL-10 se corelează stâns cu producerea fenotipului prezis și tinde să fie mai mare la pacienții care dezvoltă SCSC decât la ceilalți. Polimorfismul genei IL-10 și capacitatea de secreție a citokinei ar putea contribui la dezvoltarea SCSC după transplant renal. (21)

În schimb, keratoacantomul a arătat o creștere semnificativă a ARNm IL-10 și GM-CSF în comparație cu SCSC, explicându-se astfel că, prin supresia răspunsului imun determinată de această citokină și prin imposibilitatea opririi creșterii celulare, celulele keratoacantomului ating limita de diviziune celulară și apoi mor. (37)

În micosys fungoides s-a constatat expresia imunohistochimică a IL-10 în infiltratul tegumentar și în liniile celulare T. Reacția pozitivă pentru IL-10 într-o biopsie dintr-o leziune cutanată activă de micosis fungoides indică posibilitatea progresiei bolii.

IL-10 în carcinomul naso- și orofaringian. Numărul celulelor IL-10+ și concentrația de IL-10 în ser au fost crescute semnificativ la pacienții cu carcinom nasofaringian tip III și cu stadii clinice tardive ($p < 0,05$), sugerând faptul că citokina ar putea avea rol crucial în progresia acestei tumori. (38) De asemenea, IL-8 și IL-10 sunt citokine ce se asociază cu virusul Epstein Barr care este implicat în dezvoltarea carcinomului nasofaringian.

Potențialul oncogenic al lui IL-10 a fost investigat în carcinomul bronhogenic, nasofaringian, de inel Waldeyer și în supernatantul seric al pacienților cu carcinom cu celule scuamoase al capului și gâtului. Folosindu-se tehnici specifice imunohistochimice (țesuturile au fost puse împreună cu anticorpi policlonali anti-IL-10) s-a găsit localizarea specifică a antigenului IL-10 în celulele tumorale la 65% din tumorile studiate. Intensitatea reacției a fost semnificativă, dar invers proporțională cu gradul tumorii și stadiul N; de asemenea, a existat o

predispoziție pentru o reacție semnificativă pentru leziunile orale, când probele de la acest nivel s-au comparat cu țesuturi derivate din alte regiuni ale faringelui. Mai mult, IL-10 nu s-a localizat la nivelul keratinocitelor epiteliale normale sau celulelor inflamatorii normale, concluzionându-se că ea ar putea fi localizată specific la nivelul celulelor carcinomului orofaringian uman. (39)

S-a observat că expresia lui CD95 – fas-ligand – se corelează cu expresia lui IL-10 și G-CSF în celulele carcinomului cu celule scuamoase oral sau orofaringian (calea fas/fas-ligand este importantă în apoptoză). (40)

IL-10 în melanomul malign. S-au comparat concentrațiile citokinei IL-10 între subiecții sănătoși și pacienții cu melanom malign avansat, constatându-se la normali concentrații sub 3,0 pg/ml, iar la cei neoplazici concentrații mai mari. Mai mult, supraviețuirea la pacienții cu concentrații ale IL-10 > 10,0 pg/ml a fost de 365 de zile în comparație cu cei cu concentrații sub 10,0 pg/ml. Creșterea concentrației de IL-10 s-a corelat cu o rată scăzută de supraviețuire. (41) Concentrații crescute s-au detectat mai frecvent la pacienții ce au dezvoltat în evoluția bolii metastaze și prognosticul celor cu concentrații detectabile a fost semnificativ mai sumbru decât la cei cu nivele de IL-10 nedetectabile. (42)

S-au transfectat celulele melanomului uman A 375P care exprimă IL-10, cu gena murină IL-10 și s-au analizat ulterior modificările apărute în creșterea tumorală și metastazare. Surprinzător, transfecția genei IL-10 a determinat o pierdere a metastazării și inhibarea semnificativă a creșterii tumorale. S-au găsit evidențe că IL-10 exercită acțiuni antitumorale și antimetastazice, acțiuni determinate de inhibarea angiogenezei. Efectul antiangiogenic se datorează capacității citokinei de a inhiba sinteza VEGF, IL-1 β , TNF α , IL-6 și MMP-9 în macrofagele tumorale. Alte studii au evidențiat că IL-10 inhibă metastazarea tumorală printr-un mecanism dependent de celulele NK. Capacitatea de inhibare a creșterii tumorale și metastazării s-a observat și în alte tipuri de tumori, cum ar fi neoplasmul mamar. Administrarea de rIL-10 la șoareci a determinat inhibarea metastazării tumorale. Deoarece această citokină are toxicitate redusă la administrarea sistemică pe subiecți umani, ar trebui explorată eficacitatea sa ca agent antimetastatic. (31)

Exprimarea genotipului IL-10 - -1082 AA a crescut în timpul evoluției melanomului malign. De asemenea, genotipul IL-10 a arătat asocieri semnificative cu 3/4 indicatori prognostici cunoscuți ai acestei tumori. Genotipurile IL-10 - -1082 GG și -1082, -819 și -592 cu expresie înaltă s-au asociat cu dezvoltarea orizontală a tumorii (neinvazivă), iar expresia joasă a IL-10 - -1082 AA s-a asociat cu neoplazie avansată (stadiile II – III). Genotipurile asociate cu concentrații crescute de IL-10, in vitro, sunt protectoare în melanomul malign, în timp ce expresia joasă este un factor de risc pentru prognosticul sumbru al bolii și ar putea conferi susceptibilitate la dezvoltarea tumorii. Recente studii arată că IL-10 are efect antitumoral în melanom, posibil pe calea inhibării angiogenezei. (23)

IL-10 în cancerul pulmonar. Stimularea cu IL-12 și IL-2 a mononuclearelor pleurale de la pacienții cu cancer pulmonar determină creșterea secreției de IL-10 în comparație cu mononuclearele din sângele periferic. Mononuclearele din pleurezia malignă pot produce ambele tipuri de citokine după expunerea la IL-12 și IL-2: tipul 1 (IFN- γ) și tipul 2 (IL-10). Este posibil ca secreția de IL-10 de la nivelul micromediului să fie importantă pentru eficacitatea imunoterapiei cu IL-12 în cancerul pulmonar. (43) IL-10 ar putea avea rol în lipsa de răspuns la doze mari de IL-12, prin determinarea rezistenței celulelor tumorale la acțiunea limfocitelor T citotoxice. (44)

Expresia IL-10 se corelează cu prognosticul clinic al cancerului pulmonar cu celule mari (NSCLC). Dintre tumorile examinate, 82,1% și 97,9% au fost pozitive pentru IL-10, respectiv, IL-10R. (28) Recent s-a corelat creșterea secreției de IL-10 imunosupresivă din

celulele NSCLC și concentrația plasmatică de IL-10, cu scăderea ratei de supraviețuire. În culturile celulare sangvine de la indivizii sănătoși, secreția de IL-2 a fost inhibată în funcție doză, de adăusul de IL-10. Astfel secreția de IL-2 este predictivă pentru supraviețuirea pacienților cu NSCLC și ar putea fi mediată de IL-10 derivată din tumoră. (45)

Administrarea de IL-10 murină la 12 ore după virusul vaccinia recombinat (rVV) conținând gena Lac 2 la șoarecii cu metastaze pulmonare exprimând β -galactozidaza, crește semnificativ eficiența tratamentului. IL-10 ar putea acționa prin scăderea eliminării rVV, ceea ce prelungeste expunerea la antigenul experimental. IL-10 nu alterează concentrația de anticorpi anti-vaccinia sau activarea celulelor NK iar titrurile de rVV la șoarecii imunizați au fost mai scăzute. Astfel, IL-10 crește funcția antitumorală a vaccinului poxvirus recombinat și ar putea fi un potențial adjuvant în vaccinarea antitumorală umană cu acest vaccin (46).

IL-10 în leucemii și limfoame. Concentrația de IL-10 a fost mai mare la pacienții cu LLC decât la voluntarii normali. Pacienții cu concentrații serice crescute de IL-10 sau IL-6 sau ambele au avut cea mai slabă supraviețuire medie la 3 ani ($P < 0,001$) și caracteristici nefavorabile (β -2-microglobulina și lactat dehidrogenaza crescute, sau stadiul Rai sau IV). Concentrațiile de IL-10 sau IL-6 sunt factori de prognostic independenți de supraviețuire la pacienții cu LLC. De asemenea, IL-10, IL-4 și TNF- α sunt importante pentru creșterea și supraviețuirea celulelor leucemice în B-LLC. Deficiențele observate în unele cazuri de B-LLC ale celulelor T din sângele periferic în secreția acestor citokine, sugerează un mecanism de supraviețuire pentru celulele leucemice la acești pacienți. (47)

Recent s-a descris faptul că IL-10 inhibă funcțiile celulelor B-LLC, in vitro, prin inducerea apoptozei și inhibarea expresiei bcl-2. Scade proliferarea și sinteza ARN indusă de PMA și PMA/anti-Ig în 50–80% și, respectiv, 15–40%. Citokina nu inhibă secreția de IgM și are doar efecte minime pe viabilitatea celulelor activate. Inhibă însă, celulele leucemice CD5+ printr-un mecanism diferit de inducere a apoptozei ridicând problema utilizării IL-10 în tratamentul B-LLC. (48)

În LAM, IL-10 împreună cu IL-4 și IL-13 modulează proliferarea blastilor, dar efectele finale depind de diferențele dintre pacienți ca și de prezența altor citokine exogene. Toate aceste citokine inhibă constitutiv secreția de alte citokine de către blastii leucemici, in vitro.

Reglarea efectelor acestor citokine, acționând direct (tratament cu IL-4, IL-10 sau IL-13 exogene) sau indirect (creșterea eliberării lor endogene) asupra celulelor imunocompetente, ar putea deveni o abordare clinică în creșterea eficienței imune antileucemice. O astfel de modulare a răspunsului imun ar putea fi folosită in vivo, în tratamentul grefei înainte de transplant, sau ca manipulare a celulelor stem (49).

Serurile pacienților adulți cu leucemie cu celule T (ATL) au prezentat concentrații crescute de IL-10 în comparație cu controlul. IL-10 este produsă constitutiv de celulele ATL și de liniile celulare infectate cu HTLV-1. Se crede că infecția cu HTLV induce expresia genei sale (50).

IL-10 a avut efect inhibitor puternic, dependent de doză, asupra creșterii celulelor din LMC, in vitro. IL-10 inhibă semnificativ creșterea spontană a coloniilor mieoide în metilceluloză la 10 din 11 pacienți și inhibă creșterea autonomă a celulelor din LMC în suspensie la 5 din 5 pacienți. Efectul inhibitor al acesteia se produce, în mare parte, prin inhibarea eliberării endogene de GM-CSF de unde ar putea avea o posibilă eficiență în tratamentul LMC.

IL-10 este o citokină pleiotropă care crește concentrația de bcl-2 și protejează celulele de apoptoza indusă de steroizi și doxorubicină în limfomul Hodgkin. (51) Celulele Hodgkin și Reed-Sternberg prezintă IL-10R funcționali. Astfel IL-10 seric ar putea inhiba apoptoza acestor celule indusă de chemoterapie sau prin mutilarea genelor imunoglobulinelor. Concentrații mari de IL-10 (≥ 10 pg / ml) s-au detectat la 45% din pacienți, ceea ce se

corelează cu stadiile avansate de boală și cu concentrații crescute de β -2-microglobulină. Analize variate au arătat că IL-10 este un predictor puternic, independent, al supraviețuirii pacienților cu limfom Hodgkin. (30)

Într-o analiză univariabilă în boala Hodgkin cei mai puternici indici predictivi pentru rată mică de supraviețuire au fost: concentrația mare de IL-10, creșterea sCD30 și CRP, anemia, concentrația scăzută de albumină, stadiul IV de boală, vârsta peste 45 de ani, creșterea concentrației serice a sCD25 și număr mic de limfocite (52).

Clonele celulare EBV pozitive AKATA și MUTU exprimă la nivel transcripțional, nivele mai mari de IL-10 decât cele EBV negative. Transfecția unei gene latente EBV în celulele EBV negative demonstrează că EBERs (RNAs ce codifică EBV) au fost responsabile de inducția de IL-10. Pe de altă parte, dezvoltarea celulelor AKATA EBV+ a fost blocată prin tratament cu anticorpi anti-IL-10 sau oligonucleotide antisens împotriva IL-10. Deci, IL-10 indusă de EBERs acționează ca un factor de creștere autocrin pentru celulele din limfomul Burkitt. (53) De asemenea, s-a observat că pentru inițierea activității lui IL-10 în celulele limfomului Burkitt este importantă regiunea -54-66 bogată în AT. (54)

La pacienții care au dezvoltat limfom în primele luni posttransplant și prezintă o formă agresivă de boală, s-a detectat IL-10 la 14 din 19 cazuri luate în studiu, dintre care 11 au avut tumori EBV +. Deci, IL-10 joacă un rol în dezvoltarea unor forme severe de limfoame posttransplant și ar putea fi secretat de celulele tumorale. (55)

73% din limfoamele cu celule anaplastice (ALCLs), 18% din limfoamele cu celule T pleiomorfe și 43% din limfoamele cu celule NK arată un număr mare de celule ce exprimă IL-10. (56)

În ALCLs modelul celulelor ce exprimă ARNm IL-10 arată supraexpresia CD30 și localizare preferențială în ariile sinusale și perifoliculare, sugerându-se că celulele care exprimă IL-10 sunt celule tumorale. Mai mult, transcripte de IL-10 s-au determinat în linia celulară a limfomului anaplastic SU-DHL-1. IL-10 ar putea avea un rol în patogeniza acestor limfoame prin progresia proprietăților imunosupresive și stimularea proliferării și diferențierii celulelor T citotoxice și NK. (56)

Linia celulară HUT78 provenind din limfomul Sezary produce cantități semnificative de IL-10 în comparație cu linia celulară JURKAT. S-a observat că membrii familiei de factori transcripționali nucleari NF-kB/Rel pot recunoaște specific 3 secvențe identice localizate în regiunea reglatoare 5' a genei IL-10 în celulele HUT78, în timp ce celulele JURKAT exprimă concentrații mari de NF-kB (p65 și p50) numai după activarea TNF α , NF-kB având rol în expresia genei IL-10 în celulele HUT78 și nu necesită TNF- α . (50)

IL-10 în mielomul multiplu. Împreună cu IL-6, IL-10 este considerată una dintre cele mai importante citokine reglatoare ale proliferării și caracteristicilor ale celulelor mielomatoase. Mai mult, studiile au raportat că IL-10 afectează celulele mielomatoase prin stimularea secundară a semnalului pentru proliferare celulară prin OSM (oncostatin) și IL-11. IL-10 pare a fi exprimată în jumătate din mioame simultan cu OSM și pare a se corela cu c-maf (cunoscut ca fiind supraexprimat în mioamele cu t (14; 16) (q32; q23)). Mai mult, IL-10 inactivează acidul all-transretinoic care inhibă creșterea celulelor mielomatoase. Expresia și producerea IL-10 la pacienții cu mioame ar putea fi importantă pentru subclasificarea și stabilirea tratamentului, în funcție de caz. (57)

S-a identificat IL-10 ca un factor de creștere a celulelor din mielom și s-a observat o relație strânsă între IL-10 și gp 130 (58). IL-10 S-a identificat în 3 din 7 linii celulare de mielom și 5 dintre ele prezintau expresie exacerbată a ARNm IL-10, expresie crescută, de asemenea, în 1/3 din mostrele de țesuturi analizate, în condiții în care expresia IL-10R nu a fost modificată față de control (59). Adușul de anticorpi monoclonali anti-IL-10 determină

stimularea expresiei unor gene, cum ar fi IL-11, LIFR și syndecan – 1, în liniile celulare care exprimă IL-10R. IL-10 ar putea modifica rețeaua de citokine din mielom și proprietățile biologice celulare, cum ar fi proliferarea celulară.

Concentrații crescute de IL-10 s-au detectat la pacienții cu boala lanțurilor ușoare și hipercalemie și s-au corelat cu creșterea CRP (proteina C reactivă). S-a găsit o corelație pozitivă între concentrația de IL-10 serică și IL-6 serică la pacienții cu mielom multiplu. Legătura dintre IL-10 și IL-11 la acești pacienți nu a fost semnificativă, dar a fost semnificativă între IL-10 și OSM. IL-10 împreună cu IL-6, OSM și IL-6Rs, ar putea fi un marker util pentru aprecierea bolii. (29)

La pacienții cu mielom multiplu s-a observat o frecvență crescută a genotipurilor IL-10 G 136/136 și IL-10R 112/114, împreună cu scăderea frecvenței genotipului IL-10R 114/116. Secreția crescută de IL-10 s-a detectat în supernatantul PBMC din mielom multiplu stimulate cu LPS care prezintă homozigotism (136/136) și heterozigotism (136/non-136), pentru alela G IL-10 136, în comparație cu alte genotipuri IL-10 G (non-136/non-136). Variația genică a regiunii promotore poate avea rol în dezvoltarea mielomului. (22)

IL-10 în cancerul gastric și colorectal. Concentrații serice mari de IL-10 și IL-6 s-au raportat la pacienții cu cancer gastric avansat. (7, 60) IL-10 și IL-18 cresc cu progresia tumorii, iar abilitatea celulelor din exsudatul peritoneal de a secreta IFN ca răspuns la IL-18 (care crește cu progresia tumorii) ar putea fi influențată de concentrațiile locale de IL-10. De asemenea, IL-10 crește într-o manieră dependentă de stadiu. Concentrațiile crescute ale citokinei se corelează cu răspunsul nefavorabil la tratament. (61)

IL-10 și IL-6 sunt capabile să prevadă posibilitatea unei intervenții chirurgicale radicală performante în cancerul gastric. IL-10 revine la concentrații normale după operație, iar la pacienții la care se menține în concentrații mari s-a diagnosticat recurența tumorii. S-a observat că nivelul bazal al IL-10 face parte din variabilele semnificative ce afectează rata de supraviețuire. Nivelele preoperatorii anormal de mari ale citokinei, afectează negativ rata de supraviețuire și recurența tumorii (60).

Șoarecii deficienți în IL-10 dezvoltă colită sau cancer colorectal, similar cu colita inflamatorie (34). Toate celulele carcinomului de colon stimulează monocitele periferice să producă concentrații crescute de IL-10. Celulele tumorale secretă cantități neglijabile de citokină, dar secretă cantități crescute de TGF- β_1 și PGE $_2$ cu rol în stimularea secreției de IL-10 de către monocite in vitro, iar stimularea monocitelor cu cantități, în picograme, de TGF- β_1 și PGE $_2$ determină secreția crescută de IL-10 (62).

În anumite celule tumorale, secreția de IL-10 produsă de carcinomul de colon este reglată, în mod direct, de citokine pro-inflamatoare sistemice/locale, cum ar fi IL-6 sau IFN- γ (63).

S-a demonstrat că numărul de vase sangvine în cancerule de colon care exprimă gena IL-10 este semnificativ mai mic decât în cele fără gena IL-10 ($p < 0,001$), știindu-se că citokina este un stimulator al expresiei genei factorului angiostatic și are rol în supresia implicării venoase (32).

În ciuda evidențelor că IL-10 are efect antiinflamator și imunosupresiv, s-a observat că, în cancerul colorectal ea poate reduce capacitatea tumorigenică.

Transferul genei IL-10 în celulele CT 26 nu a avut efect pe creșterea celulelor tumorale pe suprafețe de plastic, dar a inhibat capacitatea de ancorare a celulelor tumorale și potențialul lor metastazic, afectându-le capacitatea invazivă și de migrare. Expresia IL-10 crește, de asemenea, răspunsul imun antitumoral care implică atât celule T $_{CD4}^+$ cât și celule T $_{CD8}^+$. Astfel, IL-10 afectează creșterea celulelor tumorale CT 26 prin inhibarea fenotipului lor malign și prin activarea unui răspuns antitumoral mediat de celulele T (64).

IL-10 în cancerul uterin și ovarian. Cancerul de col uterin ar putea fi semnificativ asociat cu polimorfismul genei codificantă pentru creșterea secreției de IL-10.

Concentrația ARNm IL-10 în leziuni precanceroase ale cervixului uterin (CIN) este semnificativ mai mare ($p = 0,005$) decât în cervixul normal (înainte de microdisecție). S-a identificat că IL-10 crește semnificativ la nivel subepitelial în CIN 2 (0,08) și CIN 3 (0,26) decât normalul și nu au fost diferențe semnificative între concentrațiile subepiteliale de IL-10 la normali și CIN 1 ($p = 0,96$). Creșterea sintezei subepiteliale a IL-10, ca și scăderea epitelială și subepitelială a IFN- γ , ar putea juca un rol în dezvoltarea și progresia leziunilor precanceroase asociate cu HPV-16.

S-a pus problema că un răspuns imun inadecvat ar putea contribui la progresia leziunilor preneoplazice asociate cu HPV. S-a determinat o perturbare a secreției citokinelor IL-10 și IL-12 la pacienții cu CIN, la care raportul dintre IL-12/IL-10 a fost semnificativ mai mic față de control (65).

IL-10, una dintre cele mai potente citokine anti-inflamatoare, se exprimă, in vivo, în cancerul ovarian. În contrast cu concentrațiile crescute de IL-10 în ascita și țesutul tumoral, expresia acesteia pare a fi un eveniment rar în liniile celulare ale cancerului ovarian, in vitro.

S-a studiat expresia IL-10 în liniile carcinomului ovarian OVCAR-3, SKOV-3, CAOV-3 și OAW-42. S-a detectat ARNm IL-10 în OVCAR-3 și numai această linie celulară produce IL-10 constitutiv în condiții lipsite de ser, la fel ca și în serul care conține mediul de creștere. Studiile asupra reglării secreției IL-10 în OVCAR-3 au arătat că:

- secreția de IL-10 este crescută de citokine pro-inflamatoare IL-1 β și TNF α , dar nu și de LPS,
- IL-6 nu are influență asupra eliberării de IL-10,
- PGE2 nu influențează secreția de IL-10, nici spontană, nici stimulată de TNF α și IL-1 β ,
- IFN γ inhibă secreția de IL-10.

Numai o mică parte din celulele cancerului ovarian își mențin abilitatea de a produce IL-10, in vitro. Datele privind reglarea producerii de IL-10 în OVCAR-3 indică faptul că celulele carcinomului ovarian împart câteva, dar nu toate, dintre caracteristicile reglătorii tipice ale secreției IL-10 de către monocite (66).

1. **Berman R. M., Suzuki T., Tahara H.,** *Systemic administration of cellular IL-10 induces an effective, specific, and long-lived immune response against established tumors in mice,* Journal of Immunology, 157(1):231-8, 1996 Jul 1.
2. **Knappe A., Hor S., Wittmann S., Fickenscher H.,** *Induction of a novel cellular homolog of interleukin-10, AK155, by transformation of T lymphocytes with herpesvirus saimiri,* Journal of Virology, 74(8):3881-7, 2000 Apr.
3. **Kallio Raija,** *Raditional and new markers of infection in adult cancer patients and the possible interfering effect of underlying malignancy on these markers,* International Journal of Oncology, 18(3):581-6, 2001 Mar.
4. **Egerton M., Fitzpatrick D. R.,** *Activation of extracellular – regulated kinase pathway is differential required for TCR – stimulated production of six cytokines in primary T lymphocytes,* International Immunology, 1998 Feb.
5. **Stearns M. E., Fudge K., Garcia F., Wang M.,** *IL-10 inhibition of human prostate PC-3 ML cell metastases in SCID mice: IL-10 stimulation of TIMP-1 and inhibition of MMP-2/MMP-9 expression,* Invasion & Metastasis, 17(2):62-74, 1997.

6. **Guedez L., Mansoor A., Birkedal-Hansen B., Lim MS.,** *Tissue inhibitor of metalloproteinases 1 regulation of interleukin-10 in B-cell differentiation and lymphomagenesis*, *Blood*, 97(6):1796-802, 2001 Mar 15.
7. **Galizia G., Lieto E., De Vita F., Romano C., Orbitura M., Castellano P., Imperatore V., Infusino S.,** *Circulating levels of interleukin-10 and interleukin-6 in gastric and colon cancer patients before and after surgery: relationship with radicality and outcome*, *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 22(4):473-82, 2002 Apr.
8. **Steinbrink K., Jonuleit H., Muller G.,** *Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells*, *Blood*, 93(5):1634-42, 1999 Mar 1.
9. **Gluhovschi G. H.,** *Actualități în imunologia clasică*, Ed. Helicon Timișoara, 1994, 48-51.
10. **Lavine L. M., Schopf L. R.,** *The role of recombinant murin IL-12 and IFN- γ in the pathogenesis of a murine systemic *Candida albicans* infection*, *Journal of Immunology*, 160:284-92, 1998 Jan 1.
11. **Helminen M. E., Kilpinen S., Virta M.,** *Susceptibility to primary Epstein-Barr virus infection is associated with interleukin-10 gene promoter polymorphism*, *Journal of Infectious Diseases*, 184(6):777-80, 2001 Sep 15
12. **Kaufman H. L., Rao J. B.,** *Interleukin-10 enhances the therapeutic effectiveness of a recombinant poxvirus-based vaccine in an experimental murine tumor model*, *Journal of Immunotherapy*, 22(6):489-96, 1999 Nov.
13. **Wittke F., Hoffmann R., Buer J.,** *Interleukin 10 (IL-10): an immunosuppressive factor and independent predictor in patients with metastatic renal cell carcinoma*, *British Journal of Cancer*, 79(7-8):1182-4, 1999 Mar.
14. **Lee Y. J., Song Y. K.,** *Cooperative interaction between interleukin 10 and galectin-3 against liver ischemia-reperfusion injury*, *Clinical Cancer Research*, 8(1):217-20, 2002 Jan.
15. **Mehrian R., Quismorio F.P. Jr.,** *Synergistic effect between IL-10 and bcl-2 genotypes in determining susceptibility of systemic lupus erythematosus*, *Arthritis & Rheumatism*, 1998 Apr.
16. **Lugering N., Kucharzik T.,** *IL-10 synergizes with IL-4 and IL-13 in inhibiting lysosomal enzyme secretion by human monocytes and lamina propria mononuclear cells from patients with inflammatory bowel disease*, *Journal of Immunology*, 162:184-2, 1998 Jan 8.
17. **Barcova M.,** *Gp 41 envelope protein of human immunodeficiency virus induces interleukin-10 in monocytes, but not in B, T, or NK cells, leading to reduced IL-2 and interferon gamma production*, *International Immunology*, 1998 Feb.
18. **Miura Y., Thoburn C.J., Bright E.C., Chen W., Nakao S., Hess A.D.,** *Cytokine and chemokine profiles in autologous graft-versus-host disease GVHD: interleukin 10 and interferon gamma may be critical mediators for the development of autologous GVHD*, *Blood*, 100(7):2650-8, 2002 Oct 1.
19. **Cavet J., Middleton P.G., Segall M., Noreen H., Davies S.M., Dickinson A.M.,** *Recipient tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms associate with early mortality and acute graft-versus-host disease severity in HLA-matched sibling bone marrow transplants*, *Blood*, 94(11):3941-6, 1999 Dec 1.
20. **Zou X.M., Yagihashi A.,** *Down regulation of cytokine - induced neutrophil chemoattractant and prolongation of rat liver allograft survival by IL-10*, *Surgery Today*, 184-91, 1998 Feb
21. **Alamartine E., Berthoux P.,** *Interleukin-10 promoter polymorphisms and susceptibility to skin squamous cell carcinoma after renal transplantation*, *Journal of Investigative Dermatology*, 120(1):99-103, 2003 Jan.
22. **Zheng C., Huang D., Liu L., Wu R., Bergenbrant G. L. S., Osterborg A., Björkholm M.,** *Interleukin-10 gene promoter polymorphisms in multiple myeloma*, *International Journal of Cancer*, 95(3):184-8, 2001 May 20.
23. **Howell W. M., Turner S. J., Bateman A. C., Theaker J. M.,** *IL-10 promoter polymorphisms influence tumour development in cutaneous malignant melanoma*, *Genes & Immunity*, 2(1):25-31, 2001 Feb.

24. Lauten M., Matthias T., Stanulla M., Beger C., Welte K., *Association of initial response to prednisone treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia and polymorphisms within the tumour necrosis factor and the interleukin-10 genes*, *Leukemia*, 16(8):1437-42, 2002 Aug.
25. Kallio R., Surcel H. M., Bloigu A., Syrjala H., *Balance between interleukin-10 and interleukin-12 in adult cancer patients with or without infections*, *European Journal of Cancer*, 37(7):857-61, 2001 May.
26. De Vita F., Orditura M., Galizia G., Romano C., Lieto E., Iodice P., Tuccillo C., *Serum interleukin-10 is an independent prognostic factor in advanced solid tumors*, *Oncology Reports*. 7(2):357-61, 2000 Mar-Apr.
27. Majima T., Ichikura T., Seki S., Takayama E., *Interleukin-10 and interferon-gamma levels within the peritoneal cavity of patients with gastric cancer*, *Journal of Surgical Oncology*, 78(2):124-30; discussion 131, 2001 Oct.
28. Hatanaka H., Abe Y., Kamiya T., Morino F., Nagata J., Tokunaga T., Oshika Y., *Clinical implications of interleukin (IL)-10 induced by non-small-cell lung Cancer*, *Annals of Oncology*, 11(7):815-9, 2000 Jul.
29. Otsuki T., Yata K., Sakaguchi H., Uno M., Fujii T., Wada H., Sugihara T., Ueki A., *IL-10 in myeloma cells*, *Leukemia & Lymphoma*. 43(5):969-74, 2002 May.
30. Vassilakopoulos TP., Nadali G., Angelopoulou MK., Siakantaris MP., *Serum interleukin-10 levels are an independent prognostic factor for patients with Hodgkin's lymphoma*, *Haematologica*. 86(3):274-81, 2001 Mar.
31. Huang S., Ullrich S. E., Bar-Eli M., *Regulation of tumor growth and metastasis by interleukin-10: the melanoma experience*, *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 19(7):697-703, 1999 Jul.
32. Kawakami T., Tokunaga T., *Interleukin 10 expression is correlated with thrombospondin expression and decreased vascular involvement in colon cancer*, *International Journal of Oncology*, 18(3):487-91, 2001 Mar.
33. Hatanaka H., Abe Y., Naruke M., Tokunaga T., Oshika Y., Kawakami T., Osada H., *Significant correlation between interleukin 10 expression and vascularization through angiopoietin/TIE2 networks in non-small cell lung cancer*, *Clinical Cancer Research*, 7(5):1287-92, 2001 May.
34. Sturlan S., Oberhuber G., Beinhauer B. G., Tichy B., Kappel S., Wang J., Rogy M. A., *Interleukin-10-deficient mice and inflammatory bowel disease associated cancer Development*, *Carcinogenesis*, 22(4):665-71, 2001 Apr.
35. Wagner S., Czub S., Greif M., Vince GH., Suss N., Kerkau S., Rieckmann P., *Microglial/macrophage expression of interleukin 10 in human glioblastomas*, *International Journal of Cancer*, 82(1):12-6, 1999 Jul 2.
36. Kooy A. J., Prens E. P., Van Heukelum A., Vuzevski V. D., Van Joost T., Tank B., *Interferon-gamma-induced ICAM-1 and CD40 expression, complete lack of HLA-DR and CD80 (B7.1), and inconsistent HLA-ABC expression in basal cell carcinoma: a possible role for interleukin-10?*, *Journal of Pathology*, 187(3):351-7, 1999 Feb.
37. Lowes M. A., Bishop G. A., Cooke B. E., Barnetson R. S., Halliday G. M., *Keratoacanthomas have an immunosuppressive cytokine environment of increased IL-10 and decreased GM-CSF compared to squamous cell carcinomas*, *British Journal of Cancer*, 80(10):1501-5, 1999 Jul.
38. Budiani D. R., Hutahaean S., Haryana S. M., Soesatyo M. H., *Interleukin-10 levels in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma*, *Journal of Microbiology, Immunology & Infection*, 35(4):265-8, 2002 Dec.
39. Chandler S. W., Rassekh C. H., Rodman S. M., Ducatman B. S., *Immunohistochemical localization of interleukin-10 in human oral and pharyngeal carcinomas*, *Laryngoscope*, 112(5):808-15, 2002 May.
40. Fujieda S., Sunaga H., Tsuzuki H., Fan G. K., Ito T., Sugimoto C., Saito H., *Expression of fas (CD95) ligand is correlated with IL-10 and granulocyte colony-stimulating factor expression in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma*, *Cancer Letters*, 161(1):73-81, 2000 Dec 8.

41. **Nemunaitis J., Fong T., Shabe P., Martineau D., Ando D.**, *Comparison of serum interleukin-10 (IL-10) levels between normal volunteers and patients with advanced melanoma*, *Cancer Investigation*, 19(3):239-47, 2001.
42. **Boyano M. D., Garcia-Vazquez M. D.**, *Soluble interleukin-2 receptor, intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-10 serum levels in patients with melanoma*, *British Journal of Cancer*, 83(7):847-52, 2000 Oct.
43. **Takeuchi E., Yanagawa H., Suzuki Y., Shinkawa K.**, *IL-12-induced production of IL-10 and interferon-gamma by mononuclear cells in lung cancer-associated malignant pleural effusions*, *Lung Cancer*, 35(2):171-7, 2002 Feb.
44. **Asselin-Paturel C., Megherat S., Vergnon I., Echchakir H., Dorothee G., Blesson S.**, *Differential effect of high doses versus low doses of interleukin-12 on the adoptive transfer of human specific cytotoxic T lymphocyte in autologous lung tumors engrafted into severe combined immunodeficiency disease-nonobese diabetic mice: relation with interleukin-10 induction*, *Cancer*, 91(1):113-22, 2001 Jan 1.
45. **Neuner A., Schindel M., Wildenberg U., Muley T., Lahm H., Fischer JR.**, *Cytokine secretion: clinical relevance of immunosuppression in non-small cell lung cancer*, *Lung Cancer*. 34 Suppl 2:S79-82, 2001 Dec.
46. **Kaufman H. L., Rao J. B.**, *Interleukin-10 enhances the therapeutic effectiveness of a recombinant poxvirus-based vaccine in an experimental murine tumor model*, *Journal of Immunotherapy*, 22(6):489-96, 1999 Nov.
47. **Mainou-Fowler T., Miller S., Proctor S. J., Dickinson AM.**, *The levels of TNF alpha, IL4 and IL10 production by T-cells in B-cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL)*, *Leukemia Research*, 25(2):157-63, 2001 Feb.
48. **Tangye S. G., Weston K. M., Raison R. L.**, *Interleukin-10 inhibits the in vitro proliferation of human activated leukemic CD5+ B-cells*, *Leukemia & Lymphoma*, 31(1-2):121-30, 1998 Sep.
49. **Bruserud O.**, *IL-4, IL-10 and IL-13 in acute myelogenous leukemia*, *Cytokines Cellular & Molecular Therapy*, 4(3):187-98, 1998 Sep.
50. **Mori N., Prager D.**, *Interleukin-10 gene expression and adult T-cell leukemia*, *Leukemia & Lymphoma*, 29(3-4):239-48, 1998 Apr.
51. **Morabito F., Filangeri M., Sculli G.**, *In vitro modulation of bcl-2 protein expression, drug-induced apoptosis and cytotoxicity by interleukin-10 in chronic lymphocytic leukemia*, *Haematologica*, 83(11):1046-8, 1998 Nov.
52. **Axdorph U., Sjoberg J.**, *Biological markers may add to prediction of outcome achieved by the International Prognostic Score in Hodgkin's disease*, *Annals of Oncology*, 11(11):1405-11, 2000 Nov.
53. **Kitagawa N., Goto M., Kurozumi K., Maruo S.**, *Epstein-Barr virus-encoded poly(A)(-) RNA supports Burkitt's lymphoma growth through interleukin-10 induction*, *EMBO Journal*, 19(24):6742-50, 2000 Dec 15.
54. **Kube D., Laser H.**, *The AT-rich region between -54 to -66 is important for the promoter activity of interleukin-10 in Epstein-Barr virus positive Burkitt's lymphoma cells*, *Genes & Immunity*. 1(2):105-14, 1999 Nov.
55. **Garnier J. L., Blanc-Brunat N., Vivier G., Rousset F., Touraine J. L.**, *Interleukin-10 in Epstein-Barr virus-associated post-transplant lymphomas*, *Clinical Transplantation*, 13(4):305-12, 1999 Aug.
56. **Boulland M. L., Meignin V., Leroy-Viard K., Copie-Bergman C., Briere J., Touitou R., Kanavaros P.**, *Human interleukin-10 expression in T/natural killer-cell lymphomas: association with anaplastic large cell lymphomas and nasal natural killer-cell lymphomas*, *American Journal of Pathology*, 153(4):1229-37, 1998 Oct.
57. **Otsuki T., Yata K., Sakaguchi H., Kurebayashi J.**, *Interleukin 10 abolishes the growth inhibitory effects of all-trans retinoic acid on human myeloma cells*, *British Journal of Haematology*, 116(4):787-95, 2002 Mar.

58. Klein B., Lu ZY., Gu Z. J., Costes V., Jourdan M., Rossi J. F., *Interleukin-10 and Gp130 cytokines in human multiple myeloma*, *Leukemia & Lymphoma*, 34(1-2):63-70, 1999 Jun.
59. Otsuki T., Yamada O., Yata K., Sakaguchi H., Kurebayashi J., Yawata Y., *Expression and production of interleukin 10 in human myeloma cell lines*, *British Journal of Haematology*, 111(3):835-42, 2000 Dec.
60. Galizia G., Orditura M., Romano C., *Prognostic significance of circulating IL-10 and IL-6 serum levels in colon cancer patients undergoing surgery*, *Clinical Immunology*, 102(2):169-78, 2002 Feb.
61. Majima T., Ichikura T., Seki S., Takayama E., Matsumoto A., Kawabata T., Chochi K., Hiraide H., Mochizuki H., *The influence of interleukin-10 and interleukin-18 on interferon-gamma production by peritoneal exudate cells in patients with gastric carcinoma*, *Anticancer Research*, 22(2B):1193-9, 2002 Mar-Apr.
62. Kucharzik T., Luger N., Winde G., *Colon carcinoma cell lines stimulate monocytes and lamina propria mononuclear cells to produce IL-10*, *Clinical & Experimental Immunology*, 110(2):296-302, 1997 Nov
63. Suzuki S., Mita S., Kamohara H., Sakamoto K., Ishiko T., Ogawa M., *IL-6 and IFN-gamma regulation of IL-10 production by human colon carcinoma cells*, *International Journal of Oncology*, 18(3):581-6, 2001 Mar.
64. Adris S., Klein S., *IL-10 expression by CT26 colon carcinoma cells inhibits their malignant phenotype and induces a T cell-mediated tumor rejection in the context of a systemic Th2 response*, *Gene Therapy*. 6(10):1705-12, 1999 Oct.
65. Jacobs N., Giannini S. L., Doyen J., Baptista A., *Inverse modulation of IL-10 and IL-12 in the blood of women with preneoplastic lesions of the uterine cervix*, *Clinical & Experimental Immunology*, 111(1):219-24, 1998 Jan.
66. Berger S., Siegert A., Denkert C., Kobel M., Hauptmann S., *Interleukin-10 in serous ovarian carcinoma cell lines*, *Cancer Immunology & Immunotherapy*, 50(6):328-33, 2001 Aug.

VCAM1, MOLECULE DE ADEZIUNE A CELULELOR VASCULARE

Comunicarea dintre celulele sistemului imun și dintre acestea și celulele barierei hemato-tisulară sau celulele țintă este o cerință obligatorie pentru un răspuns imun eficient și bine organizat. De asemenea, interacțiunile celulă-celulă sunt esențiale pentru asamblarea corectă a țesuturilor în timpul dezvoltării. Este cunoscut faptul că celulele posedă un sistem de recunoaștere moleculară pe suprafața lor, ceea ce le permite să interacționeze specific cu tipuri celulare similare sau diferite și să transducă semnale specifice transmembranar, spre interiorul celulei. Aceste proteine celulare de suprafață care sunt implicate în recunoaștere și adeziune sunt cunoscute sub denumirea de molecule de adeziune.

Două mecanisme principale sunt implicate în această interacțiune celulă – celulă. Primul sistem eficient este asigurat de factori solubili, spre exemplu, citokinele. Al doilea mecanism este interacțiunea celulară „via“ contactului intim celulă – celulă, care se realizează prin intermediul moleculelor de adeziune. (1)

În funcție de structura lor, moleculele de adeziune se clasifică în diferite familii:

- superfamilia imunoglobulinelor,
- familia caderinelor (N-caderina - se exprimă în creier, mușchi scheletici, mușchi cardiac, E-caderina - în ficat și alte țesuturi epiteliale - și P-caderina - în placentă și mezotelii),
- selectine (trei membri: E selectina - molecule de adeziune a leucocitelor la endoteliu, P selectina CD62, pe plachete și celule endoteliale și L selectina - receptorul leucocitelor homing,
- integrine,
- CD₄₄.

Superfamilia imunoglobulinelor este compusă din mai mult de 70 de membrii, inclusiv, receptorul celulelor T, imunoglobulinele, antigenul MHC, CD₂, CD₃, CD₄, CD₈, NCAM și ICAM₁₃. Criteriul de includere a moleculelor de adeziune în această familie este prezența unuia sau mai multor domenii imunoglobulinice (D), în regiunea extracelulară.(2) Aceste secvențe se crede că iau naștere prin duplicare genică. Se presupune că aceste domenii reprezintă locul realizării legăturilor homofilice și heterofilice. Fiecare domeniu Ig – like are o lungime de 75-100 aminoacizi, structural este format din două lanțuri beta antiparalele stabilizate prin punți disulfurice între reziduurile de cisteină și poate fi împărțit în subgrupurile V, C1 și C2 pe baza secvențelor lor similare cu regiunile variabile sau constante. Toate imunoglobulinele din superfamilia CAMs decelate în creier conțin, de asemenea, domenii cu secvențe similare cu fibronectina. Spre deosebire de cadherine ele funcționează printr-un mecanism calciu-independent. (3)

Membrii familiei imunoglobulinelor au structuri terțiare extrem de consecvente, dar structurile primare prezintă variație foarte mare. Se speculează că aceste structuri primare servesc drept „schelet“, care au rol în recunoașterea ligandului, chiar dacă determinanții unici lipsesc din structura moleculei. O astfel de structură este rezistentă la acțiunea proteazelor determinând supraviețuirea moleculei în mediu ostil, extracelular.

Membrii acestei familii leagă la: alți membrii ai aceleiași familii, integrine, la un număr divers de receptori adiționali.

Adeziunea celulară este importantă pentru numeroase reacții imune, inclusiv atașarea leucocitelor de celulele endoteliale, migrarea leucocitelor la locul inflamației, aderarea leucocitelor la celulele prezentatoare de antigen sau la celulele țintă.

Principalele molecule de adeziune și receptori lor sunt prezentați în tabelul de mai jos (1):

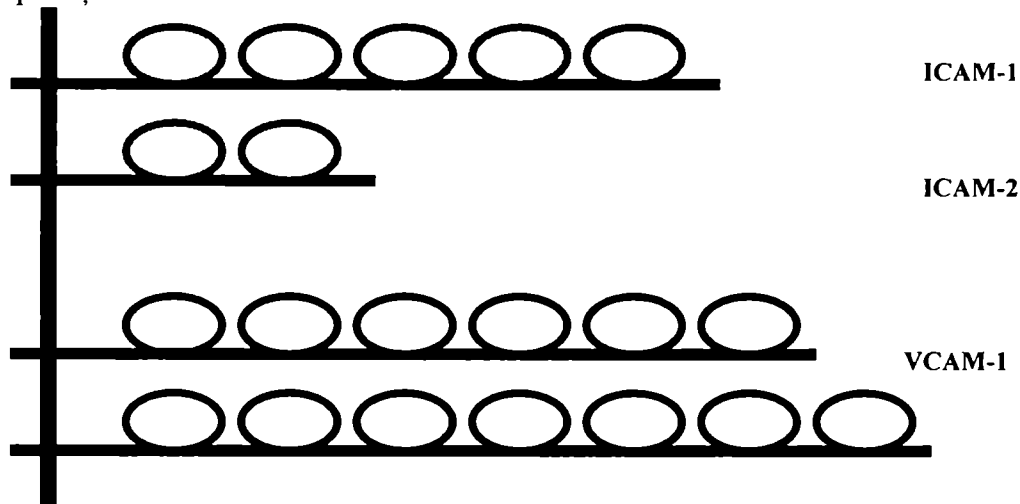
Molecule importante de adeziune

Molecule de adeziune	Exprimare	Receptori
Superfamilia imunoglobulinelor		
ICAM-1	celule endoteliale, monocite; induse pe multe tipuri celulare cum ar fi, limfocitele T și B, fibroblaste, celule dendritice, celule epiteliale	LFA-1; Mac-1
ICAM-2	Celule endoteliale, limfocite, monocite, celule dendritice	LFA-1
ICAM-3	Leucocite, celule dendritice	LFA-1
PECAM-1	Celule vasculare, trombocite, monocite, neutrofile, celule T CD8+, celulele stem din măduva spinării, celulele liniilor mieloide și megacariocite, linii celulare tumorale	Homotipic; heterotipic ligand necunoscut
VCAM-1	Celule endoteliale activate, macrofage, celule dendritice, fibroblastele din măduva osoasă, mioblaste, miotubuli	VLA-4
Familia selectinelor		
E-selectina	Endoteliul activat	Antigen sialil-Lewis
L-selectina	Granulocite, monocite, limfocite	HEV: glicoproteine fucozilate și sialilate
P-selectina	Trombocite, endoteliul activat	antigen sialil-Lewis, lacto-N-fucopentoza III
beta2-Integrine		
LFA-1	Limfocite, neutrofile, monocite, macrofage	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3
Mac-1	Monocite, macrofage, granulocite, celule NK, celulele liniei mieloide induse de PMA	ICAM-1, C3b, factor X, LPS
p150,95	Macrofage, monocite, celule NK, celule dendritice, unele celule tumorale	fibrinogen, iC3b;
Altele		
CD44	Limfocite, monocite, neutrofile, celule epiteliale, celule gliale, fibroblaste, miocite	Acid hialuronic

Caracteristica structurală a moleculelor de adeziune din superfamilia imunoglobulinelor este prezența, în număr variabil, în regiunea extracelulară, a domeniilor imunoglobulin-like (C2) realizate prin punți disulfurice. Structura este schematizată în figura următoare, unde se poate observa că ICAM-1 are 5 astfel de domenii, ICAM-2 are 2, iar VCAM-1 prezintă 6 sau 7 domenii imunoglobulin-like. Această categorie de molecule cuprinde moleculele de adeziune celulară numite CAMs.

Cele 5 molecule CAM funcționale descrise până în prezent, cu implicare importantă în interacțiunea leucocite – țesut conjunctiv / celule endoteliale sunt molecule de adeziune celulară vasculară (VCAM-1, CD-106 sau INCAM-110), molecule de adeziune celulară endotelială – trombocitară (PECAM-1 / CD-31) și moleculele de adeziune intercelulară 1, 2 și 3.

Suprafața celulei



Exprimate în primul rând pe celulele endoteliale, aceste molecule reglează în general, migrarea leucocitelor la nivelul pereților vaselor sangvine și determină punctele de plecare (fixare) pentru dezvoltarea endoteliului în timpul angiogenezei.

Gena moleculei VCAM-1

Clonele genomice care codifică VCAM-1 au fost izolate și s-a stabilit organizarea genei umane și murine.

Gena umană este prezentă într-o singură copie în genomul uman, are 9 exoni separați de fragmente de ADN de aproximativ 25 Kbaze. Exonii 2-8 conțin domeniile imunoglobulinice tip C2/H. Prin „splicing“ alternativ al ARNm, gena umană poate genera cel puțin 2 precursori diferiți VCAM-1, prin includerea sau excluderea exonului 5. Un element TATAA este localizat înaintea locusului transcripțional de start. Promotorul VCAM-1 conține locusul de legare pentru NF-Kappa B, factorilor transcripționali ai familiei GATA, ca și locusul pentru AP-1.

Gena umană VCAM-1 este localizată pe cromozomul 1, în regiunea p31-32. (4)

Gena murină VCAM-1 este formată din 10 exoni separați de aproximativ 20 Kbaze. Exonul 1 codifică regiunea 5', exonii 2-4 și 6-9 codifică domeniile imunoglobulinice tip C2/H și exonul 10 domeniile transmembranar și citoplasmatic. Toate domeniile Ig – like sunt separate de exoni separați. (5) Exonul 5 codifică un domeniu nou, existent doar la VCAM-1 murin. Promotorul VCAM-1 murin are omologie crescută cu cel uman, inclusiv conservarea locusurilor de legare pentru NF-kB, familia Ets și factorii transcripționali din familia GATA, sugerând faptul că genele VCAM-1 murină și umană pot fi sub control similar al transcripției. (6)

Informații structurale

VCAM-1 uman are 100–110 KDa, 715 reziduuri de aminoacizi și este o glicoproteină transmembranară din superfamilia imunoglobulinelor de tip I (N-terminal extracelular) caracterizată de prezența a 7 domenii imunoglobulinice tip C₂. Segmentul extracelular este format din 674 reziduuri de aminoacizi, cel transmembranar – 22 reziduuri de aminoacizi, iar cel citoplasmatic din 19 reziduuri de aminoacizi. (7)

Inițial, s-au raportat numai 6 domenii imunoglobulinice extracelulare (6D VCAM-1). Aceste 6D VCAM-1 dau naștere prin splicing alternativ celui de-al 7-lea domeniu Ig-like (7D VCAM-1). 7D VCAM-1 este forma dominantă, exprimată în culturile celulare endoteliale umane. Domeniile 1–3 au omologie înaltă cu domeniile 4–6, ceea ce sugerează că iau naștere prin duplicare genică. ADNc al 7D VCAM-1 determină o proteină de aproximativ 81 KDa, cu 7 situsuri cu potențial de N-glicozilare. După glicozilare completă, proteina matură are o greutate moleculară de ≈ 102 KDa. Fiecare domeniu C_2 se asociază cu un cuplu de cisteine între care se formează punți disulfurice, stabilizând structura primară.

VCAM-1 murin și de șobolan par a fi înalt conservate în timpul evoluției, având o identitate de 75% cu molecula umană, spre deosebire de ICAM-1 care prezintă o identitate de numai 50%.

VCAM-1 este implicat în adeziunea limfocitelor, monocitelor, celulelor NK, eozinofilelor și bazofilelor, prin interacțiune cu VLA-4 (leukocyte adhesion late antigen). Interacțiunea dintre VCAM-1 și VLA-4 modulează adeziunea fermă a leucocitelor circulante la endoteliu. VCAM-1 participă, de asemenea, la adeziunea leucocitelor în afara vaselor sangvine, mediind adeziunea precursorilor limfocitari la celulele stromale din măduva spinării și a celulelor B la celulele dendritice din foliculii limfatici. VCAM-1 nu este exprimat constitutiv pe endoteliu, dar expresia lui este stimulată, in vitro, sub acțiunea LPS, TNF- α și IL-1, ca și la IFN γ și IL-4. VCAM-1 este prezent și pe macrofagele tisulare, celulele dendritice, fibroblastele din măduva osoasă, mioblaste. (1)

Celulele cunoscute ca exprimând VCAM-1 sunt: neuronii activați, celulele endoteliale, celulele musculare netede, fibroblastele, celulele Kupffer, celulele dendritice, oocitele, celulele Sertoli. (1) Liniile celulare cunoscute ca exprimând VCAM-1 includ linia celulelor stromale din măduva osoasă HS20 și celulele neuroblastomului LAN-1. Forme solubile ale moleculei VCAM-1 s-au decelat în supernatantul de culturi tisulare și în sânge. Concentrații sangvine crescute apar în diverse maladii, cum ar fi leucemia mielomonocitară acută, astmul bronșic, scleroza multiplă în faza acută.

Co - Receptorii lui VCAM-1

Liganzii (co-receptorii) pentru VCAM-1 sunt $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4) și $\alpha_4\beta_7$ integrinele.

Integrinele sunt heterodimeri legați necovalent, formați dintr-o subunitate α mare (120–180 KDa) și o subunitate β mică (90–120 KDa). Există cel puțin 8 subfamilii de integrine cunoscute, fiecare deosebindu-se prin prezența subunităților β_1 -8 diferite. Dintre cele mai bine cunoscute integrine, β_2 integrinele sunt citate pentru legarea lor de ICAM și asocierea lor cu proteinele legate prin intermediul guanozinfosfatidilinozitol, în timp ce, β_1 integrinele (VLA-4) se leagă de matricea extracelulară și VCAM-1.

Principalul ligand pentru VCAM-1 este $\alpha_4\beta_1$ /VLA-4. Subunitatea α_4 umană este o glicoproteină transmembranară tip I, de 150 Kda, 999 reziduuri de aminoacizi. Ea conține 944 reziduuri de aminoacizi în segmentul extracelular, 23 de aminoacizi în domeniul transmembranar și 32 reziduuri de aminoacizi intracitoplasmatic. Segmentul extracelular este caracterizat de 7 domenii repetitive omoloage, fiecare domeniu de aproximativ 30–40 aminoacizi, separate de secvențe peptidice de 30 aminoacizi. (2)

Clasic, complexe VLA-4 posedă lanțuri α care au o secvență de 180 aminoacizi inserată între domeniile 2 și 3 sau un procesor proteolitic în capătul C-terminal al regiunii transmembranare ce determină clivarea în două subunități, de 130 și 30 KDa, ce sunt legate împreună prin punți disulfurice. Lanțul α_4 arată ocazional clivarea regiunii mijlocii cu apariția

a 2 echivalenți (80 și 70 KDa), nelegate covalent între ele. Semnificația acestui lucru nu este încă cunoscută, dar poate fi un mecanism de reglare a VLA-4 funcțional. α_4 murin are o identitate de 84% cu α_4 uman (există diferențe numai la nivelul unei secvențe de 32 reziduuri de aminoacizi, din domeniul citoplasmatic).

Molecula β_1 este, de asemenea, o proteină transmembranară de tip I, de 130–140 KDa și 778 reziduuri de aminoacizi. Are 47 de reziduuri de aminoacizi în domeniul intracitoplasmatic, 23 aminoacizi în segmentul transmembranar și 708 reziduuri de aminoacizi în domeniul extracelular. La nivelul regiunii extracitoplasmatică există 4 secvențe repetitive bogate în reziduuri de cisteină. β_1 murin prezintă o identitate de 92% cu cel uman. Comparându-se cele două molecule, β_1 murin cu cel uman, s-a observat că se păstrează toate situsurile de glicofosforilare de la capătul N-terminal și reziduurile de cisteină.

În afară de VCAM-1 (de care se leagă prin intermediul domeniilor Ig-like 1 și 4), VLA-4 se leagă și la fibronectină și cu el însuși prin legătură homotipică. Celulele cunoscute ca exprimând VLA-4 sunt eozinofilele, bazofilele, celulele NK, monocitele, celulele T, celulele B, timocitele și celulele mielomatoase. Neutrofilele nu par a exprima VLA-4.

De asemenea, s-a decelat că și $\alpha_4\beta_7$ leagă la VCAM-1. Receptorii primari pentru $\alpha_4\beta_7$ sunt MadCAM-1 și fibronectina. (8)

După activarea atât a eozinofilelor, cât și a celulelor NK, legarea de VCAM este augmentată și $\alpha_4\beta_7$ probabil are rol în migrarea acestor celule.

$\alpha_4\beta_1$ și $\alpha_4\beta_7$ joacă un rol cheie în recrutarea leucocitelor la locul inflamației și în recircularea limfocitelor, iar $\alpha_4\beta_1$ este necesar în timpul hematopoezei din măduva osoasă.

O caracteristică a integrinei α_4 este că activitatea ei adezivă poate fi amplificată de stimuli externi, determinând atașarea fermă. Câteva chemokine, prin legarea la receptorii lor cuplați cu proteina G, la fel ca și citokinele ai căror receptori au activitate tirozin-kinazică, determină o creștere rapidă și tranzitorie a adeziunii celulare dependentă de integrina α_4 . Spre exemplu, SDF-1 (factorul-1 chemokinic derivat din celulele stromale) determină stimularea limfocitelor, progenitorilor hematopoetici și adeziunea celulelor mielomatoase mediate de integrina α_4 . S-a arătat că această creștere a adeziunii este independentă de schimbările expresiei de suprafață a α_4 și se pare că se datorează variației avidității și/sau afinității acestor integrine față de ligandul lor.

S-a studiat efectul concentrației cationilor asupra adeziunii celulelor care exprimă $\alpha_4\beta_1$ sau $\alpha_4\beta_7$ integrine la VCAM-1 sau MadCAM-1. S-a observat că Mg^{2+} și Mn^{2+} ajută legarea fiecărei integrine cu oricare dintre cele două molecule de adeziune Ig-like, pe când Ca^{2+} susține numai legarea $\alpha_4\beta_1$ integrinei la VCAM-1. Concentrația de cationi necesară pentru realizarea a 50% din legăturile maxime (EC50) este de 0,8–280 microM pentru Mn^{2+} și de 0,8–30 microM pentru Mg^{2+} , adică de 2–3 ori mai mică decât pentru Mn^{2+} , indiferent de concentrația liganzilor. Valoarea lui EC50 pentru legarea lui $\alpha_4\beta_1$ la VCAM-1 este de 35–40 de ori mai mică comparativ cu MadCAM-1, în timp ce $\alpha_4\beta_7$ arată o selectivitate de 3–15 ori mai mare pentru MadCAM-1 față de VCAM-1. Densitatea ligandului necesară pentru adeziune via $\alpha_4\beta_1$ a fost marcat mai mică cu Mn^{2+} versus Mg^{2+} și cu VCAM-1 versus MadCAM-1. Se pare că prin legarea cationilor se stabilizează integrinele activate. Se crede că Mn^{2+} și Mg^{2+} se leagă la un situs reglator comun, cu afinitate diferită, determinând o stare de activare similară a integrinelor. În urma activării $\alpha_4\beta_1$ se leagă mai puternic ($\times 30$ – 40) la VCAM-1 comparativ cu MadCAM-1, în timp ce $\alpha_4\beta_7$ se leagă de 3–15 ori mai puternic la MadCAM-1, comparativ cu VCAM-1. De asemenea, și Ca^{2+} se leagă la situsul reglator al ambelor integrine, dar statusul de activare a $\alpha_4\beta_1$ determinat de acest cation este diferit de cel determinat de Mn^{2+} și Mg^{2+} , prin creșterea selectivității de legare la VCAM-1, comparativ cu MadCAM-1. (9)

Funcțiile biologice ale VCAM-1

VCAM-1 are un număr modest de acțiuni. Toate acestea par a se relaționa la expresia lui ca moleculă de adeziune membranară. Cele mai multe acțiuni studiate pentru VCAM se raportează la extravazarea leucocitară (1). VCAM-1 nu este exprimat pe celulele endoteliale în repaus, dar după stimulare cu IL-1, TNF- α , endotoxină sau complexul imun C1q, celulele endoteliale sintetizează și exprimă VCAM-1 pe suprafața lor. Expresia maximală a acestei molecule s-a observat la 48 de ore după stimulul inițial (10).

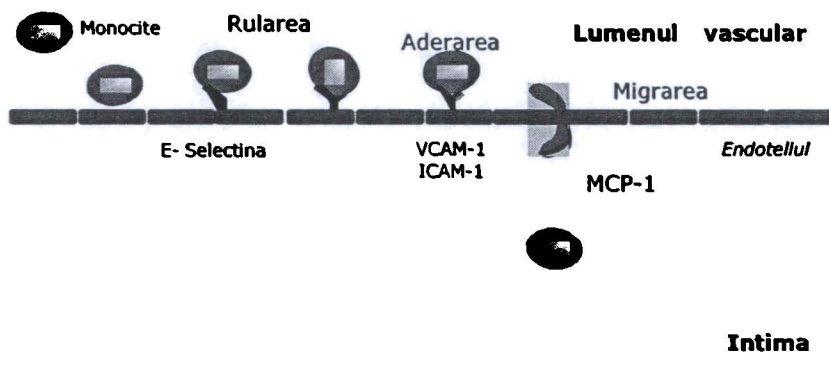
Pentru evidențierea implicării moleculelor de adeziune, în particular VCAM-1 și liganzii săi, vom lua în discuție modelul migrării neutrofilelor în timpul inflamației.

Inflamația este caracterizată din punct de vedere histologic prin acumularea de leucocite la locul inflamației, datorită migrării direcționată a leucocitelor circulante. Migrarea în afara vasului este inițiată prin contactul dintre leucocite și endoteliul vascular inflammat.

Este cunoscut faptul că atât leucocitele, cât și celulele endoteliale, exprimă o varietate de molecule de adeziune de suprafață care ajută la medierea traficului. Toate aceste molecule de adeziune joacă un rol în recrutarea leucocitelor și în forța legăturii de adeziune. Interacțiunea inițială dintre leucocite și celulele endoteliale este mediată de L-selectine. Legarea reversibilă a acestora cu ligandul specific de pe endoteliu mediază rularea leucocitelor în vasele mici. La nivelul ariilor de inflamație, rularea de-a lungul pereților vasculari le permite leucocitelor să se lege mai strâns și să activeze endoteliul prin intermediul interacțiunii cu P-selectina și E-selectina, exprimate pe endoteliul stimulat. În schimb, adeziunea mediată de P- și E-selectine determină foarte rapid (secunde sau minute) activarea leucocitelor și adeziunea mediată de integrină -ICAM-1. Interacțiunea tardivă este chiar puternică. Stimularea legăturii integrină -ICAM-1 este determinată și de factori chemoatracțanți, cum ar fi IL-8 și C5a, complexe imune, factorul activator al trombocitelor (exprimat pe suprafața celulelor endoteliale activate). Toți acești factori activează leucocitele. În final, leucocitele migrează printre celulele endoteliale în spațiul extravascular, cu ajutorul beta 2 integrinelor.

Atât leucocitele, cât și celulele endoteliale, sunt activate de o varietate de factori eliberați de la locul inflamației. Factori chemoatracțanți, liganzii selectinelor, complexe imune, componente ale complementului activat pot activa leucocitele și pot determina beta 2 integrinele să devină adezive pentru ICAM-1 (LFA-1 și Mac-1) și ICAM-2 (LFA-1). În același timp, trombina, histamina, citokinele (IL-1 și TNF α), endotoxina și complexul imun C1q stimulează celulele endoteliale ce exprimă moleculele lor de adeziune (P-, E-selectinele, ICAM-1 și VCAM-1) și care susțin mai departe recrutarea celulară la locul inflamației sau infecției.

Recrutarea monocitelor circulante de către moleculele de adeziune celulare endoteliale este schematizată în figura următoare:



În mod normal, VCAM-1 are exprimare scăzută pe endoteliul nestimulat. Expresia lui este inductibilă de citokine: IL-1, TNF- α , IL-4 și IL-13. Când este indus, VCAM-1 are rol semnificativ în migrarea leucocitelor care exprimă VLA-4 (ex. limfocite, monocite, eozinofile, bazofile). Oricum, contribuția actuală a VCAM-1 ar putea depinde de expresia și activarea altor molecule de adeziune (10). Expuse la TNF- α , celulele endoteliale stimulează expresia ICAM-1, E-selectină și VCAM-1. Aceste molecule sunt utilizate de neutrofile (E-selectine și ICAM-1) și monocite (E-selectine și ICAM-1) în timpul extravazării. În contextul unei infecții în fază precoce, orice infiltrat leucocitar e de așteptat să fie mixt și predominant neutrofilic, iar VCAM-1 joacă un rol minor în migrare. Când o stimulare antigenică este „alergică” și implică anticorpi Ig E, mastocitele pot fi din nou implicate, dar de această dată eliberează IL-4. Astfel, atât TNF- α , cât și IL-4 induc expresia endotelială a lui VCAM-1. IL-4, spre deosebire de TNF- α , nu stimulează E-selectina sau ICAM-1. Acest lucru poate schimba substratul moleculelor de adeziune pentru extravazarea aproape tuturor neutrofilelor și monocitelor și determină apariția unui infiltrat inflamator predominant eozinofilic. VCAM-1 are rol în migrare și în recircularea leucocitelor.

De asemenea, VCAM-1 activează semnalele în celulele endoteliale, determinând deschiderea unei „porți endoteliale” prin care migrează leucocitele. Imediat după migrare contactul celulă endotelială–celulă endotelială este restabilit. Semnalizarea externă a lui VCAM-1 este mediată de NADPH oxidaza și producerea de specii reactive de oxigen și de activarea, în consecință, a metaloproteinazelor matriciale. Aceste semnale sunt necesare pentru schimbarea formei celulelor endoteliale și migrarea leucocitară. Semnalele de activare ale lui VCAM-1 în celula endotelială sunt reglate de citokine.

Adeziunea leucocitelor este mediată în totalitate, iar migrarea transendotelială parțial, de interacțiuni heterotipice între $\beta 1$ și 2 integrine de pe leucocite și liganzii lor, molecule de adeziune Ig-like, VCAM-1 și ICAM-1 de pe endoteliu. Ambele, atât integrinele, cât și moleculele Ig-like, sunt cunoscute că au capacitate de semnalizare. VCAM-1 pe celulele endoteliale din vena ombilicală umană activate de IL-1 β induce contractilitatea celulară, formarea fibrelor de actină și a legăturilor gap intercelulare. Efectele determinate de VCAM-1 sunt inhibitate de toxina C3, ceea ce demonstrează implicarea lui p21Rho, GTP-ază cu moleculă mică. Efectele VCAM-1 se însoțesc de activarea lui Rac1, cunoscut drept un inductor al legăturilor gap – efect dependent de Rho. Pentru adeziunea celulă-celulă indusă de VCAM-1 este necesară semnalizarea prin Rac, ca și producerea unor specii reactive de oxigen și activarea lui p38 MAPK.

Pentru migrarea leucocitelor este importantă activarea protein-tirozin-kinazei. Gismondi A. și colaboratorii au arătat că legarea celulelor NK la endoteliu activează tirozin-kinaza bogată în prolină 2 (Pyk-2) și proteina Rac de legare a GTP-ului care este cuplată cu integrinele și receptorii chemokinici. Ambele, Pyk-2 și Rac, sunt implicate funcțional în migrarea transendotelială a celulelor NK și în expresia proteinelor de adeziune ICAM-1 și VCAM-1 (11).

Se pare că VCAM-1 are rol în dezvoltarea sistemului cardio-vascular. Șoarecii deficienți în VCAM-1 nu dezvoltă pericardul, lucru care se datorează, se pare, lipsei sistemului funcțional VLA-1/VCAM. Se presupune că absența VCAM-1 de pe celulele miocardice determină lipsa exprimării VLA-4 pe celulele mezoteliale și imposibilitatea migrării lor spre locația normală în timpul dezvoltării (12).

De asemenea, interacțiunea dintre VCAM-1 și $\alpha 4$ integrina este importantă pentru inervația simpatică a inimii (13).

Factorii care intervin în reglarea expresiei moleculei VCAM-1

După cum s-a mai arătat IL-1, TNF α , endotoxina și complexul imun C1q sunt principalii factori care stimulează celulele endoteliale să sintetizeze și să exprime VCAM-1. (10) Studii recente au arătat că numeroși alți factori intervin în reglarea expresiei acestei molecule de adeziune. Efectul reglator al acestora se realizează în principal prin intermediul factorului NF-kB și Rac-1. De asemenea, un rol important în modularea expresiei lui VCAM-1 la nivelul celulelor endoteliale îl are TNF- α . S-a observat că tratamentul cu TNF- α conduce la inducerea E-selectinei și determină o creștere importantă a concentrației de VCAM-1 și ICAM-1 în supernatant, comparativ cu celulele nestimulate

Stimularea transcripțională a genei VCAM-1, indusă de citokine cum ar fi IL-1 β și TNF- α , necesită activarea nu numai lui NF-kB, dar și implicarea factorului reglator interferonic (IRF)-1. În timpul unui studiu de inducere a genei VCAM-1 prin stimuli mecanici, în culturi de celule endoteliale umane, s-a observat că o hiperosmolaritate medie pare a influența expresia lui VCAM-1 indusă de citokine. Într-adevăr adăugarea unei soluții hiperosmotice de NaCl, inhibă efectiv inducerea lui VCAM-1 de către IL-1 β și TNF- α , dar nu și a E-selectinei, la nivel de ARNm și de proteină de suprafață. S-a observat că hiperosmolaritatea inhibă selectiv expresia lui VCAM-1 indusă de citokine printr-un mecanism dependent de calea IRF-1.

Recent, s-a demonstrat că trombina induce expresia lui VCAM-1 în celulele endoteliale printr-un mecanism dependent de NF-kB și GATA (14).

Semnalele oxidative joacă un rol important în expresia moleculelor de adeziune celulară endotelială. Rac1, proteină mică care leagă GTP-ul, este activată de diverse substanțe proinflamatoare și reglează generarea de radicali superoxid în celulele endoteliale. Rac1 inhibă expresia lui VCAM-1, ICAM-1 și E-selectina indusă de TNF- α prin supresarea transactivării determinată de NF-kB. Expresia superoxid dismutazei de adenovirus inhibă acumularea de ARNm VCAM-1, ICAM-1 și E-selectinei. Rac1 și superoxidul joacă roluri principale în reglarea expresiei moleculelor de adeziune celulară în celulele endoteliale. De asemenea, NO exogen inhibă expresia lui VCAM-1 prin supresia lui NF-kappaB pe o cale independentă de GMPc.

Activarea leucocitelor în timpul inflamației căilor aeriene implică adeziunea lor la celulele epiteliale bronșice (BEC), un proces ce necesită interacțiuni specifice între glicoproteine și proteine de suprafață de pe celulele epiteliale, în principal, ICAM-1 și VCAM-1. Factorul de creștere al keratinocitelor (KGF), un factor de creștere implicat în repararea epiteliului pulmonar, determină scăderea expresiei moleculelor ICAM-1 și VCAM-1 și aderarea neutrofilelor la celulele epiteliale activate, sau nu, de TNF- α sau IL-4. (15)

Incubarea celulelor endoteliale aortice cu testosteron, a decelat o scădere a expresiei lui VCAM-1 dependentă de doză. Acest efect este complet abolit de un blocant selectiv de receptor androgenic. Efectul inhibitor al testosteronului se datorează inhibării activării lui NF-kB, indusă de TNF- α , factor important în inducerea expresiei lui VCAM-1, probabil prin supresia translocării nucleare.

17-beta-estradiol inhibă expresia lui VCAM-1, in vivo, în concentrații fiziologice (pg/ml), în timp ce in vitro, același efect se obține la concentrații mai mari decât cele fiziologice (ng/ml). 17-epiestriol, un metabolit estrogenic și agonist β selectiv al receptorului estrogenic, este de aproximativ 400 de ori mai activ decât 17- β -estradiol în inhibarea ARNm VCAM-1 indus de TNF- α și în supresarea expresiei proteinei în celulele endoteliale. Genistein, de asemenea un agonist al receptorilor estrogenici, supresează expresia ARNm

VCAM-1 indusă de TNF- α , la concentrații mici (1-10 ng). Acțiunea supresoare a lui 17-epiestriol este mediată, în parte, de NO. 1) 17-epiestriol induce expresia ARNm pentru nitric-oxid sintetazei endoteliale și a acestei proteine, 2) previne pătrunderea NF-kappaB în nucleu determinată de TNF- α , 3) un inhibitor al NO-sintetazei, N-nitro-L-arginin-metil ester, abolește efectul inhibitor al lui 17-epiestriol asupra expresiei ARNm VCAM-1 și asupra migrării lui NF-kB din citoplasmă în nucleu (16).

Pentru maturarea osteoclastică este necesară adeziunea celulară a osteoblastelor și precursorilor osteoclastici cu origine hematopoetică. Celulele osteoblastice umane exprimă la nivel înalt CD₄₄, un receptor major pentru acidul hialuronic prezent în matricea osoasă. Crosslinkarea lui CD₄₄ pe celulele osteoblastice cu anticorpi specifici determină augmentarea expresiei moleculelor ICAM-1 și VCAM-1. Ligandul major al lui CD₄₄, acidul hialuronic, reglează astfel expresia lui ICAM-1. Stimularea lui CD₄₄ de pe celulele osteoblastice amplifică adeziunea lor la monocite prin intermediul lui ICAM-1 și VCAM-1. Deci, moleculele de adeziune au rol în metabolismul osului și osteoclastogeneză (17).

Expunerea osteoblastelor umane la rhIL-13 determină o creștere a ARNm VCAM-1 de 5 ori în decurs de 4 ore cu stimulare maximă la o doză de 1 ng/ml. De asemenea, apare o creștere a expresiei proteinei de suprafață în decurs de 16 ore. Acest lucru demonstrează că în timpul proceselor patologice asociate cu activarea celulelor T, cum ar fi artrita reumatoidă sau osteoporoza post-menopauză, celulele T ar putea juca un rol de pivot în adeziunea precursorilor osteoclastici la osteoblaste, prin eliberarea de IL-13.

VCAM-1 în patologii

S-au decelat creșteri ale concentrației de VCAM-1 solubil în:

- Cancer ovarian, cancer gastro-intestinal, renal, de vezică urinară, limfom non-Hodgkin, cancer mamar;
- Boli autoimune: scleroză multiplă, scleroza sistemică, lupus eritematos sistemic, artrita reumatoidă;
- Infecții: sepsis, meningită, malarie;
- Inflamație: vasculită, ciroza alcoolică, ciroze biliare primare, granulomatoza Wegener;
- Altele: insuficiența renală, hemodializă, hipertiroidism.(1)

VCAM-1 în aterogeneza: Forțele de frecare intravasculare (laminare), ce acționează în cele mai numeroase regiuni arteriale normale, supresează moleculele de adeziune leucocitare – VCAM-1. Locurile cu predilecție de formare a leziunilor aterosclerotice (ex. punctele de ramificare) prezintă frecvent modificarea fluxului sangvin. Forțele de frecare din fluxul sangvin normal determină producerea de oxid nitric de către celulele endoteliale. Aceste molecule acționează ca vasodilatatoare, chiar și la concentrațiile scăzute produse de celulele endoteliale, și determină limitarea expresiei locale de VCAM-1. Astfel, forțele hemodinamice inhibă inițierea leziunilor aterosclerotice și explică distribuția focală a acestor leziuni.

După acumularea lipidelor extracelulare, recrutarea leucocitelor este al doilea pas în dezvoltarea plăcii de aterom. Tipic, în dezvoltarea ateromului, sunt implicate celulele liniei mononucleare, monocitele și limfocitele. Numeroase molecule de adeziune exprimate pe suprafața celulelor endoteliale arteriale participă la recrutarea leucocitelor și la nașterea plăcii de aterom. Un rol important în acest proces îl au VCAM-1, ICAM-1 și P-selectina. Lisofosfatidilcolina, un constituent al LDL modificat oxidativ, poate crește expresia lui VCAM-1, exemplu ce ilustrează legătura dintre acumularea lipoproteinelor în intima arterială

și recrutarea leucocitară cu determinarea evenimentelor subsidiare care duc la apariția leziunii aterosclerotice (18).

După aderarea la suprafața celulelor endoteliale prin interacțiunea cu receptori ca VCAM-1, monocitele și limfocitele străbat stratul endotelial și se localizează la nivelul intimei. Ca urmare a lipoproteinelor modificate, citokinele stimulate pot regla expresia moleculelor de adeziune implicate în recrutarea leucocitelor. Spre exemplu, IL-1 sau TNF- α determină creșterea expresiei lui VCAM-1 și ICAM-1 pe celulele endoteliale. Această cale ar putea avea implicații adiționale în acumularea de lipoproteine și recrutarea leucocitelor în aterogeneză (19).

VCAM-1 în boli cardiovasculare: În patogeneza disfuncției miocardului din sindromul coronarian acut un rol important este atribuit răspunsului inflamator. S-a studiat corelația dintre VCAM-1, ICAM-1 și disfuncția miocardică din angina instabilă și infactul miocardic acut, observându-se o creștere semnificativă a concentrației de VCAM-1 la pacienții cu această patologie și o creștere a concentrației de ICAM-1 la pacienții cu infarct miocardic acut. Concentrația celor două molecule de adeziune nu diferă semnificativ la admisia în studiu și la 10 zile mai târziu. Nu s-a decelat o legătură între concentrațiile de sVCAM-1 și sICAM-1 și severitatea disfuncției miocardice, estimată prin enzimele miocardice și modificările electrocardiografice (20).

Studii cu anticorpi monoclonali umani aduc noi informații privind etapele inflamației din afectarea cardiacă în cardita reumatoidă autoimună poststreptococică. Aceste noi date arată că etapele în patogeneza afectării cardiace, după infecția cu streptococul de grup A, includ: dezvoltarea de anticorpi anti-antigen carbohidrat N-acetil-glucozamină al streptococului tip A; acești anticorpi reacționează cu endoteliul valvular care exprimă VCAM-1; Lf T, CD4+ și CD8+, străbat endoteliul/endocardul și infiltrază valva - structură avasculară; formarea leziunilor granulomatoase sau nodulilor Aschoff din macrofage sau limfocite T. Se pare că expresia moleculei VCAM-1 joacă un rol important în patogeneza acestei afecțiuni (21).

VCAM-1 în rejetul cardiac al allogrefei: Adeziunea leucocitelor la endoteliul vascular este unul din primii pași în rejetul allogrefei de cord datorită migrării limfocitelor în parenchimul allogrefei. Un rezultat al rejetului cardiac este creșterea expresiei moleculelor CAMs. În timpul episodului de rejet, crește expresia ARNmVCAM-1 și ICAM-1, nu și al P-selectinei, la nivelul endocardului și miocardului. Nu se știe încă dacă creșterea expresiei genelor VCAM-1 și ICAM-1 precede dezvoltarea rejetului histologic. S-a determinat prin PCR competitiv ARNmVCAM-1 la 1, 2 și 4 săptămâni anterioare reacției de rejet și s-au observat creșteri semnificative ale acestora în toate cele 3 măsurători, ceea ce înseamnă că expresia genei VCAM-1 este crescută cu 4 săptămâni înainte de apariția rejetului cardiac. Spre deosebire de VCAM-1, ICAM-1 nu a arătat creșteri semnificative în aceeași perioadă. Astfel, VCAM-1 ar putea fi un factor de predicție precoce în apariția episodului de rejet al allogrefei cardiace (22).

VCAM-1 în patologia pulmonară: În timpul sindromului inflamator din ARDS (sindrom de detresă respiratorie acut) datorită sintezei crescute de IL-1 β și TNF- α este activat endoteliul microvascular și exprimă ICAM-1, VCAM-1 și selectine. Este posibil ca distrucția tisulară și insuficiența multiplă de organe să aibe o legătură strânsă cu aceste citokine și expresia moleculelor de adeziune. La pacienții cu ARDS, s-au găsit concentrații serice crescute atât de IL-1 β și TNF- α , cât și de ICAM-1 și VCAM-1, la 2 ore de spitalizare. Activarea endotelială apreciată prin concentrația moleculelor de adeziune nu se corelează cu evoluția ARDS, dar se corelează cu extensia afectării tisulare și, de asemenea cu scorul APACHE II. Pacienții decedați cu ARDS au prezentat concentrații serice crescute de

VCAM-1 și ICAM-1, spre deosebire de cei cu risc de deces și care nu dezvoltă ARDS (au concentrații scăzute de sVCAM-1). Deci, aceste molecule ar putea avea utilitate ca factori predictivi ai supraviețuirii la pacienții cu risc de deces (23).

În astmul bronșic, VCAM-1 și eotaxinul participă activ la procesul inflamator cu eozinofile. NF-kB și AP-1 ar putea regla expresia lui VCAM-1 și eotaxinului. Pe un model de astm la porcușorii de Guineea, s-a observat supraexpresia acestor mediatori inflamatori, atât în căile aeriene centrale, cât și în căile aeriene mici și în țesutul pulmonar. În lotul cu astm, concentrația proteinelor VCAM-1, eotaxin, NF-kB și AP-1 a fost crescută semnificativ, în căile aeriene centrale și periferice, în comparație cu lotul de control. În homogenatele de țesut pulmonar, expresia ARNm VCAM-1 și eotaxin a fost semnificativ mai mare în lotul cu astm față de control. Activitatea de legare a NF-kB și AP-1 a ADN-ului a fost semnificativ mai mare în lotul cu astm, față de control. După tratament cu glucocorticoizi, toți acești parametri scad semnificativ (24).

VCAM-1 în diabetul zaharat: La pacienții cu diabet zaharat, procesul aterogenetic avansat poate fi influențat, în mare măsură, de activarea endoteliului vascular. Expresia moleculelor de adeziune VCAM-1 și E-selectina, este un eveniment major în recrutarea monocitelor, în procesul de formare a plăcilor de aterom. Adăugarea de ser de la pacienți fără diabet la culturile de celule endoteliale umane determină o expresie bazală a moleculelor de adeziune. Serul pacienților diabetici determină o expresie mai mare a VCAM-1 pe celulele endoteliale după 6 ore de incubare, față de serul de la pacienți fără diabet, cu aceeași vârstă și sex. Nu s-a observat nici o diferență a expresiei E-selectinei între aceste 2 loturi de pacienți. Alterarea concentrației de glucoză din mediul de cultură nu determină modificări în expresia celor două tipuri de molecule de adeziune, înainte sau după tratament cu TNF- α . Deci, serul pacienților diabetici are componente capabile să inducă expresia lui VCAM-1 pe celulele endoteliale, independent de hiperglicemie. Creșterea expresiei lui VCAM-1 endotelial de factorii circulanți ar putea avea rol important în dezvoltarea aterosclerozei la diabetici (25).

VCAM-1 la pacienții cu hemodializă cronică: Studii recente au arătat că ateroscleroza carotidiană, la pacienții aflați în program de hemodializă cronică, se asociază cu inflamație și concentrații plasmatiche crescute de sVCAM-1 și sICAM-1. Grosimea plăcii de aterom se corelează cu aceste concentrații. Spre deosebire de VCAM-1, ICAM-1 s-a dovedit un posibil marker al acestui proces, responsabil de mortalitatea mare a pacienților cu hemodializă cronică (26).

Chlamydia pneumoniae (Cp) induce producerea de citokine și molecule de adeziune în celulele eucariote ale gazdei infectată. Cp se pare că are rol în apariția aterosclerozei mediată de infecție. La pacienții cu hemodializă cronică, acest microorganism ar putea fi responsabil de creșterea expresiei moleculelor de adeziune și accelerarea procesului aterogenic. S-a determinat că pacienții cu hemodializă cronică, care au Cp viabilă în mononuclearele din sângele periferic, au concentrații serice crescute de IL-1 și sVCAM-1, față de cei negativi pentru IgGCp, lucru care susține ipoteza implicării acestui microorganism în apariția plăcilor de aterom (27).

VCAM-1 în infecții: În infecția cu *Helicobacter pylori*, afectarea mucoasei gastrice se realizează, în parte, prin intermediul vascularizației gastrice. *Helicobacter pylori* determină stimularea moleculelor de adeziune. Pentru determinarea pattern-ului moleculelor de adeziune influențate de această infecție, s-au expus celule endoteliale din vena ombilicală umană la mediu de control sau la *H. pylori*. După 6 ore de expunere la *H. pylori*, s-a observat o creștere a concentrațiilor de VCAM-1, ICAM-1, P- și E- selectina de 167%, 100%, 30%, respectiv, 124% și o creștere de 400% a adeziunii leucocitelor polimorfonucleate, față de control (28).

În hepatita cronică determinată de virusul hepatic C (HC VHC), VCAM-1 și ICAM-1 se exprimă de novo pe hepatocitele infectate de VHC și pe celulele din vasele sinusoide. S-a observat o creștere semnificativă a concentrațiilor acestor molecule de adeziune la pacienții cu HC VHC, față de pacienții sănătoși. În timpul tratamentului cu interferon și ribavirină, nu s-a observat o modificare semnificativă a expresiei lui VCAM-1, în schimb, normalizarea concentrației serice a lui ICAM-1 la 6 luni de la începerea tratamentului ar putea fi un parametru prognostic util pentru răspunsul bun la terapie (30).

VCAM-1 în afecțiuni reumatologice: S-a studiat corelarea dintre concentrația plasmatică de VCAM-1, împreună cu trombomodulina solubilă (sTM), și afectarea renală la pacienții cu lupus eritematos sistemic (SLE). Concentrația plasmatică de sVCAM-1 și sTM este crescută semnificativ la pacienții cu SLE cu/fără afectare renală, față de pacienții sănătoși. sTM plasmatic s-a corelat semnificativ cu sVCAM-1 plasmatic; ambele s-au corelat cu concentrația serică a creatininei și ureei și cu indexul de activitate al bolii. Concentrațiile plasmatică crescute de sVCAM-1 și sTM au intercorelații semnificative și se asociază cu implicarea renală din SLE (31).

La șoarecii MRL/fas(lpr) care sunt afectați de o boală sistemică ce constă în recrutarea inadecvată a leucocitelor în patul vascular, inclusiv în microvascularizația cerebrală, s-a studiat mecanismul molecular responsabil de această recrutare leucocitară. Adeziunea leucocitară s-a observat rar la șoarecii MRL (+/+), de orice vârstă. Analiza histologică a relevat că celulele interactive sunt exclusiv mononucleare. Rularea leucocitelor a fost redusă, dar nu absentă, la șoarecii P-selectină(-/-)MRL/fas(lpr). La aceștia, adeziunea leucocitelor nu a fost redusă, ceea ce sugerează că rularea leucocitelor dependentă de P-selectină nu este necesară pentru recrutarea leucocitelor în vascularizația cerebrală în acest model de inflamație sistemică. De asemenea, blocarea E-selectinei nu a avut efect pe rularea leucocitară. În schimb, blocarea lui VCAM-1 sau a $\alpha 4\beta 2$ -integrinei a eliminat rularea leucocitelor independentă de P-selectină și a inhibat semnificativ adeziunea leucocitară. Se pare că sistemul $\alpha 4\beta 2$ -integrina/VCAM-1 joacă un rol central în medierea răspunsului inflamator sistemic care afectează șoarecii MRL/fas(lpr) (32).

În sclerodermie, studii recente au arătat că anticorpii anti-celulă endotelială, care ar putea avea un rol important în patogeneza bolii prin inițierea apoptozei celulare, induc expresia lui VCAM-1, ICAM-1, E-selectinei și P-selectinei pe celulele endoteliale. Concentrații crescute ale VCAM-1, ICAM-1 și P-selectinei s-au observat în stadiile precoce ale bolii.

VCAM-1 în sarcină: La pacientele cu hipertensiune indusă de sarcină complicată cu întârziere de creștere fetală (IUGR), s-a observat că expresia lui VCAM-1 pe endoteliul vascular decidual și vasele capilare ale placentei vilozose este semnificativ crescută la pacientele cu modificări patologice, față de cele sănătoase, în opoziție cu expresia lui VCAM-1 din sincițiotrofoblast. La aceste paciente, ar putea fi prezente modificări semnificative patologice la nivelul placentei, intim legate de expresia anormală a moleculei VCAM-1 în placentă (33).

Date recente arată că preeclampsia ar putea fi caracterizată de disfuncția selectivă a lui VCAM-1. Această anomalie nu este prezentă în hipertensiunea gestațională fără proteinurie. Expresia lui VCAM-1 în această afecțiune ar putea contribui la apariția leziunilor tisulare sau reflectă alterarea altor funcții ale acestora, necunoscute încă, în timpul sarcinii.

VCAM-1 în infecția HIV: Localizarea virusului HIV la nivel cerebral, se datorează, în parte, abilității macrofagelor activate imun sau infectate viral de a induce moleculele de adeziune – VCAM-1 și E selectina – pe endoteliul cerebral. Alte studii demonstrează că gp 120 stimulează expresia moleculei ICAM-1 în celulele gliale. Toate acestea facilitează intrarea celulelor infectate viral în lichidul cefalorahidian și promovează formarea de sinciții.

Encefalita din HIV se caracterizează prin prezența în parenchimul cerebral și perivascular a macrofagelor și celulelor gigante multinucleate. La fel ca orice proces inflamator cerebral, celulele inflamatoare, cum ar fi monocitele, traversează peretele vascular în spațiul Virchow-Robin. Pentru acest proces este necesară adeziunea monocitelor circulante la endoteliul vascular. S-a decelat o distribuție difuză a proteinei VCAM-1 pe celulele endoteliale arteriale, venoase și capilare, cerebral, la animalele cu encefalită. La lotul de control, fără infecție HIV, s-au găsit rare/absente molecule VCAM-1 exprimate endotelial. De asemenea, s-au decelat concentrații crescute de sVCAM-1 în lichidul cerebrospinal, la animalele cu encefalită HIV. Celulele U973, asemănătoare cu celulele inflamatoare mononucleare caracteristice encefalitei HIV, exprimă VLA-4. Aderarea leucocitelor la vascularizația cerebrală a fost blocată neuniform de anticorpi monoclonali anti-VCAM-1. VCAM-1 nu s-a decelat la nivel cerebral, la animalele normale și nici la cele infectate HIV, dar fără encefalită. Aceste date subliniază rolul funcțional al moleculei VCAM-1 în recrutarea monocitelor în lichidul cefalorahidian, în encefalitele HIV și ridică problema unei posibile căi terapeutice (34).

VCAM-1 în patologia malignă: Moleculele de adeziune au un rol important în migrarea celulelor tumorale la nivelul endoteliului capilar. În acest efect, sunt implicate în special integrinele, dar studii cu anticorpi anti-LFA-1, VLA-4, L-selectina pe celule tumorale colonice COLO526 au arătat implicarea în acest fenomen a LFA-1/ICAM-1, VLA-4/VCAM-1 și L-selectina/E-selectina.

În melanomul malign, VCAM-1 are un rol important în adeziunea celulelor tumorale la leptomeninge. Metastazele leptomeningiale apar la 8% dintre pacienții cu tumoră sistemică. Se presupune că celulele tumorale trebuie să adere la leptomeninge, care este bine vascularizat, datorită faptului că lichidul cefalorahidian nu are nutrienții și factorii de creștere necesari pentru o proliferare a celulelor tumorale eficientă. Acest proces de adeziune este mediat de interacțiuni specifice ligand-receptor, încă necunoscute. S-au studiat caracteristicile de creștere în LCR ale celulelor tumorale din melanom B16F-10, măsurându-se expresia moleculelor de adeziune specifice de pe celulele leptomeningiale de la șoareci (MLMC) și de pe celulele tumorale B16F-10 murine. S-a observat că MLMC exprimă concentrații scăzute de VCAM-1, ICAM-1, β 1- și β 3-integrine și CD44. Expresia lui VCAM-1 de pe MLMC este stimulată de TNF- α . Blocând VCAM-1 de pe MLMC cu anticorpi specifici, s-a obținut în 60% din cazuri inhibarea adeziunii celulelor tumorale mielomatoase la leptomeninge, în timpul fluxului circulator, dar nu și în condiții statice. Nu s-a decelat un efect inhibitor adițional prin blocarea concomitentă prin anticorpi a β 1- și β 3-integrinelor și CD44. Expresia lui VCAM-1 pe MLMC este o moleculă cheie în adeziunea celulelor mielomatoase, in vitro, în condiții de flux sangvin (34).

Într-un studiu recent, s-au studiat căile de semnalizare prin intermediul cărora TNF- α induce expresia moleculelor de adeziune ICAM-1 și VCAM-1 în celulele condrosarcomatoase și s-a determinat semnificația funcțională a acestora prin examinarea adeziunii celulelor Jurkat T. VCAM-1 mediază adeziunea celulelor Jurkat T indusă de TNF- α . TNF- α determină activarea MAPK, protein-kinazei, p38 kinazei și c-jun N-terminal kinazei (JNK). Expresia lui VCAM-1 și adeziunea celulelor Jurkat T a fost blocată de inhibarea p38 kinazei, în timp ce inhibarea lui JNK stimulează expresia lui VCAM-1 și adeziunea celulară fără modularea activității lui NF- κ B.

De asemenea, concentrațiile serice preoperatorii ale VCAM-1 și ICAM-1 la pacienții cu cancer gastric sunt semnificativ crescute în comparație cu subiecții sănătoși, dar nu există diferențe semnificative în ceea ce privește concentrația serică a E-selectinei. S-a observat o

asociere semnificativă între concentrațiile serice preoperative ale acestor molecule de adeziune și stadiul tumorii, invazia peretelui gastric, implicarea ganglionilor limfatici și prezența metastazelor la distanță. Aceste concentrații scad semnificativ după rezecția radicală a tumorii, în timp ce rămân aproape nemodificate la pacienții cu tumoră depășită chirurgical. Concentrațiile crescute ale acestor molecule de adeziune sunt factori semnificativi de prognostic pentru rata de supaviețuire, dar nu și independenți. Concentrațiile serice ale lui VCAM-1, ICAM-1 ar putea reflecta progresia tumorii și metastazarea și ar putea avea uz clinic (35).

Concentrația serică a ICAM-1, 216ng/ml (112-453ng/ml) și VCAM-1, 1290ng/ml (550-4000ng/ml) a fost semnificativ crescută la pacienții cu NSCLC în comparație cu subiecții sănătoși la care ICAM-1s a fost decelat de aproximativ 180ng/ml (145-262ng/ml) și, respectiv, VCAM-1s de 869ng/ml (515-1272ng/ml). Concentrații anormale de ICAM-1 s-au decelat la 55% din pacienți, iar de VCAM-1 la 60%. Concentrațiile de VCAM-1 anormale s-au observat la 27% din pacienții cu tumori operabile, în comparație cu 71% la pacienții cu tumori inoperabile. După chemoterapie, concentrațiile de ICAM-1s au rămas crescute în 30%, iar VCAM-1 în 20%, din responder-I, în comparație cu non-responder-I, la care s-au observat concentrații anormale de ICAM-1 la 67%, iar de VCAM-1 la 86%. În concluzie:

- Concentrațiile de ICAM-1s și VCAM-1s sunt frecvent anormale la pacienții cu NSCLC;
- Aceste concentrații sunt în relație cu stadiul tumorii;
- Nici concentrațiile de ICAM-1s, nici de VCAM-1s, nu se corelează cu răspunsul la chemoterapie la pacienții cu NSCLC avansat.

Keratoacantomul este o tumoră benignă a țesutului epitelial cu creștere rapidă și care poate evolua spre carcinomul cu celule scuamoase sau reprezintă o variantă de carcinom cu celule scuamoase. VCAM-1, la fel ca și ICAM-1, este exprimat în timpul dezvoltării Keratoacantomului și este absent în timpul evoluției sau rezolvării tumorii, o expresie moderată a VCAM-1 s-a observat în carcinomul cu celule scuamoase bine diferențiat, iar o expresie intensă s-a decelat în keratoacantomul în plină dezvoltare și în carcinomul cu celule scuamoase slab diferențiat. Deci, este o legătură temporală relativă între creșterea expresiei lui VCAM-1 și evoluția keratoacantomului. O creștere a ambilor markeri, VCAM-1 și ICAM-1, s-a observat în carcinomul cu celule scuamoase nediferențiate. Acești markeri ar putea fi importanți în predicția evoluției biologice și patogeneza acestor leziuni. VCAM-1 și ICAM-1 ar putea diferenția keratoacantomul de carcinomul cu celule scuamoase (36).

Moleculele de adeziune sunt intim implicate în reacțiile inflamatorii și în ultimul timp se postulează un rol al lor în progresia tumorii. VCAM-1, împreună cu E-selectina și ICAM-1, ar putea avea rol în diseminarea celulelor tumorale. La pacientele cu carcinom mamar s-au decelat concentrații serice semnificativ crescute de VCAM-1, ICAM-1 și E-selectina, în stadiul patru de boală, în comparație cu controlul. La pacientele cu stadiul 2 de boală, creșterea VCAM-1 este predictivă pentru scăderea ratei de supraviețuire, chiar dacă este corectată cu statusul N sau T. În concluzie, moleculele de adeziune sunt crescute la pacientele cu boală neoplazică avansată, iar creșterea lui VCAM-1 are semnificație prognostică la pacientele cu cancer mamar (37).

Pentru a se decela rolul moleculelor de adeziune în progresia neoplaziilor, s-a studiat expresia acestora în carcinoamele colorectale primare, luându-se drept control țesuturi colonice normale de la aceiași pacienți. Prezența intens pozitivă vasculară a ICAM-1 și VCAM-1 s-a asociat cu prezența limfocitelor T CD3+. ARNm VCAM-1, ICAM-1 și ELAM-1 au fost crescute în 57%, 67% și, respectiv, 63% din carcinoamele luate în studiu, în comparație cu probele de țesut normal. S-a decelat o creștere a VCAM-1 de 3-4 ori, a ICAM-1 de 2,1 ori și ELAM-1 de 2,2 ori, în țesuturile carcinoatoase. Supraexpresia lui

ICAM-1 ar putea preveni desfacerea legăturii celulă-celulă și ar putea preveni astfel diseminarea tumorală. Supraexpresia lui VCAM-1 și ICAM-1, dar nu și ELAM-1, ar putea stimula răspunsul gazdei anti-tumoră prin traficul limfocitelor. (38)

1. **Bender MedSystems Products**, *Adhesion molecules*, PMID: 12431382;
2. **Kendrew J.**, *The Encyclopedia of Molecular Biology*, Ed. Blackwell Science, 1995;
3. **Speinger T. A.**, Adhesion receptors of the immun system, *Nature* 346, 1990, 425-434;
4. **Cybulsky M. I., Fries J. W., Williams A. J., Sultan P.**, *Gene structure, chromosomal location, and basis for alternative mRNA splicing of the human VCAM1 gene*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1991, 88 (17), 7859-7863;
5. **Cybulsky M. I., Allan-Motamed M., Collins T.**, *Structure of the murine VCAM1 gene*, *Genomics*, 1993, Nov;18(2):387-91;
6. **Kumar A. G., Dai X. Y., Kozak C. A., Mims M. P., Gotto A. M., Ballantyne C. M.**, *Murine VCAM-1. Molecular cloning, mapping, and analysis of a truncated form*, *J Immunol*, 1994, Nov 1;153(9):4088-98;
7. **Polte T., Newman W.**, *Structural and functional studies of full-length vascular cell adhesion molecule-1: internal duplication and homology to several adhesion proteins*, *DNA Cell Biol.*, 1991, 10 (5), 349-357;
8. **Watanabe C., Miura S., Hokari R.**, *Spatial heterogeneity of TNF-alpha-induced T cell migration to colonic mucosa is mediated by MAdCAM-1 and VCAM-1*, *Am J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.*, 2002, Dec;283(6):G1379-87;
9. **Day E. S., Osborn L., Whitty A.**, *Effect of divalent cations on the affinity and selectivity of alpha4 integrins towards the integrin ligands vascular cell adhesion molecule-1 and mucosal addressin cell adhesion molecule-1: Ca²⁺ activation of integrin alpha4beta1 confers a distinct ligand specificity*, *Blood*, 100 (13), 2002, 2303-2309;
10. **Lozada C., Levine R. I., Huie M.**, *Adhesion Molecules in Up to Date*, Rose BD (Ed), Up to Date, Wellesley, MA 2001;
11. **Gismondi A., Jacobelli J., Strippoli R.**, *Proline-rich tyrosine kinase 2 and rac activation by chemokine and integrin receptors controls NK cell transendothelial migration*, *J. Immunol.* 2003 Mar 15;170(6):3065-73;
12. **Sengbusch J. K., He W., Pinco K. A., Yang J. T.**, *Dual functions of [alpha]4[beta]1 integrin in epicardial development: initial migration and long-term attachment*, *J. Cell. Biol.*, 2002 May 27;157(5):873-82;
13. **Wingerd K. L., Goodman N. L., Tresser J. W., Smail M. M.**, *Alpha 4 integrins and vascular cell adhesion molecule-1 play a role in sympathetic innervation of the heart*, *J. Neurosci.*, 2002 Dec 15;22(24):10772-80;
14. **Minami T., Abid M. R., Zhang J., King G., Kodama T., Aird W. C.**, *Thrombin stimulation of vascular adhesion molecule-1 in endothelial cells is mediated by protein kinase C (PKC)-delta-NF-kappa B and PKC-zeta-GATA signaling pathways*, *J. Biol. Chem.*, 2003 Feb 28;278(9):6976-84;
15. **Just N., Tillie-Leblond I., Guery B. P., Fourneau C.**, *Keratinocyte growth factor (KGF) decreases ICAM-1 and VCAM-1 cell expression on bronchial epithelial cells*, *Clin. Exp. Immunol.*, 2003 Apr; 132(1):61-9;
16. **Mukherjee T. K., Nathan L.**, *17-epiestriol, an estrogen metabolite, is more potent than estradiol in inhibiting vascular cell adhesion molecule 1 (vcam-1) mRNA expression*, *J. Biol. Chem.*, 2003 Apr 4; 278(14):11746-52;
17. **Fujii Y., Fujii K., Nakano K., Tanaka Y.**, *Crosslinking of CD44 on human osteoblastic cells upregulates ICAM-1 and VCAM-1*, *FEBS Lett.*, 2003 Mar 27; 539(1-3):45-50;
18. **Chen Y., Chen H., Zhang W.**, *[Effects of shear stress and lysophosphatidylcholine on adhesion molecules expression of endothelial cells]*, *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*, 2002 Dec; 19(4):648-51, 672;

19. **Park S. H., Park J. H., Kang J. S., Kang Y. H.,** *Involvement of transcription factors in plasma HDL protection against TNF-alpha-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression*, Int. J. Biochem. Cell. Biol., 2003 Feb; 35(2):168-82;
20. **Macias C., Villaescusa R., Valle Ld L., Boffil V., Cordero G.,** *[Endothelial adhesion molecules icam-1, vcam-1 and e-selectin in patients with acute coronary syndrome.]*, Rev. Esp. Cardiol., 2003 Feb; 56(2):137-44;
21. **Cunningham M. W.,** *Autoimmunity and molecular mimicry in the pathogenesis of post-streptococcal heart disease*, Microcirculation, 2002 Dec; 9(6):463-70;
22. **Xiao-Peng Zhang, Sheri E.,** *The time course of ICAM-1 and VCAM-1 gene expression in endomyocardial biopsy specimens from cardiac transplant recipients: predictive value of enhanced VCAM-1 gene expression for subsequent significant allograft rejection episodes*, Symp Nonhum Primate Models AIDS, 1992 Nov 17-20;
23. **Agouridakis P., Kyriakou D., Alexandrakis M.G.,** *The predictive role of serum and bronchoalveolar lavage cytokines and adhesion molecules for acute respiratory distress syndrome development and outcome*, Acta Neurol Scand, 2003 Feb; 107(2):134-41;
24. **Cui D., Zeng Z.,** *The expression and regulation of vascular cell adhesion molecules and eotaxin in bronchioles and lung tissue from a guinea-pig model of asthma*, Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi, 2002 Nov; 25(11):655-60;
25. **Rasmussen L. M., Schmitz O., Ledet T.,** *Increased expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured endothelial cells exposed to serum from type 1 diabetic patients: no effects of high glucose concentrations*, Scand J Clin Lab Invest, 2002; 62(7):485-93;
26. **Papagianni A., Kalovoulos M.,** *Carotid atherosclerosis is associated with inflammation and endothelial cell adhesion molecules in chronic haemodialysis patients*, Nephrol Dial Transplant, 2003 Jan; 18(1):113-9;
27. **Tsirpanlis G., Chatzipanagiotou S., Ioannidis A., Ifanti K.,** *The effect of viable Chlamydia pneumoniae on serum cytokines and adhesion molecules in hemodialysis patients*, J. Neuroimmunol, 2002 Oct; 131(1-2):147-59;
28. **Byrne M. F., Corcoran P. A., Atherton J. C.,** *Stimulation of adhesion molecule expression by Helicobacter pylori and increased neutrophil adhesion to human umbilical vein endothelial cells*, FEBS Lett 2002, Dec 18; 532(3):411-4;
29. **Dejica D., Grigorescu M., Dejica V., Radu C., Neculoiu D.,** *Serum levels of soluble intercellular-1 and vascular cell-1 adhesion molecules in chronic hepatitis C and the influence of interferon-alpha + ribavirin therapy*, Rom. J. Gastroenterol, 2002 Dec; 11(4):277-83;
30. **Ho CY, Wong CK, Li EK, Tam LS, Lam CW.,** *Elevated plasma concentrations of nitric oxide, soluble thrombomodulin and soluble vascular cell adhesion molecule-1 in patients with systemic lupus erythematosus*, Rheumatology (Oxford) 2003 Jan;42(1):117-2;
31. **James W. G., Bullard D. C., Hickey M. J.,** *Critical role of the alpha 4 integrin/VCAM-1 pathway in cerebral leukocyte trafficking in lupus-prone MRL/fas(lpr) mice*, J. Immunol., 2003 Jan 1; 170(1):520-7;
32. **Wang Z. J., Yu Y. H., Shen L. Y.,** *[Relationship between pathological changes and the expression of vascular cell adhesion molecule-1 in the placenta of patients with pregnancy-induced hypertension complicated by intrauterine growth retardation]*, Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002 Nov; 22(11):1022-4;
33. **Sasseville V., Newman W., Lackner A., Smith M., Lausen N., Hesterberg P.,** *VCAM-1 is induced and mediates monocyte adhesion to endothelium in SIV encephalitis.*, Symp Nonhum Primate Models AIDS, 1992 Nov 17-20;
34. **Brandsma D., Reijneveld J. C., Taphoorn M. J., de Boer H. C., Gebbink M. F., Ulfman L. H., Zwaginga J. J., Voest E. E.,** *Vascular cell adhesion molecule-1 is a key adhesion molecule in melanoma cell adhesion to the leptomeninges*, Lab. Invest., 2002 Nov; 82(11):1493-502;

35. **Alexiou D., Karayiannakis A. J., Syrigos K. N., Zbar A., Sekara E., Michail P., Rosenberg T., Diamantis T.,** *Clinical significance of serum levels of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in gastric cancer patients*, *Am. J. Gastroenterol*, 2003 Feb; 98(2):478-85;
36. **Melendez N. D., Smoller B. R., Morgan M.,** *VCAM (CD-106) and ICAM (CD-54) Adhesion Molecules Distinguish Keratoacanthomas from Cutaneous Squamous Cell Carcinomas*, *Mod. Pathol.*, 2003 Jan; 16(1):8-13;
37. **O'Hanlon D. M., Fitzsimons H., Lynch J., Tormey S., Malone C., Given H. F.,** *Soluble adhesion molecules (E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1) in breast carcinoma*, *Eur. J. Cancer*, 2002 Nov; 38(17):2252-7;
38. **Maurer C. A., Friess H., Kretschmann B., Wildi S., Muller C., Graber H., Schilling M., Buchler M. W.,** *Over-expression of ICAM-1, VCAM-1 and ELAM-1 might influence tumor progression in colorectal cancer*, *Int. J. Cancer*, 1998 Feb 20; 79(1):76-81.

TENASCIN (TN)

Tenascin este o glicoproteină matriceală oligomerică din matrixul extracelular. Cele mai cunoscute izoforme sunt tenascin -C, -X, -R, -Y și -W. Cel mai mult analizat este TN-C.

Tenascinel are o structură moleculară unică, conținând domenii omologe cu EGF (epidermal growth factor), fibronectină și fibrinogen.

TN-R (Tenascin R) este exprimat în SNC de oligodendrocite, în principal și tractusurile albe.

TN-X (Tenascin X) este o proteină a matricei extracelulare abundentă în mușchi și inimă. Se exprimă și în fibroblastele în cultură.

TN-Y (Tenascin Y) este omologul avian al TN-X, este concentrat în porțiunea proximală a nervilor periferici la pui.

Tenascin C este sintetizat în timpul dezvoltării embrionare, este exprimat în diverse tumori, fiind absent sau slab exprimat în majoritatea țesuturilor adulte. Funcția acestei molecule este încă neclară.

Rolul biologic al TN

Tenascin C este o proteină care ar regla organogeneza. A fost analizată expresia lui TN-C m RNA în timpul dezvoltării dinților la șoareci și s-a constatat că se exprimă tranzitoriu în timpul înmuguririi epiteliale, în mezenchimul dentar condensat, și că reappare mai târziu în mezenchimul papilei dentare, unde persistă în pulpa dentară, dar este subreglat în odontoblaste. Epiteliul dentar induce TN-C în mezenchimul timpuriu, iar familiile TGF- β și FGF pot mima acest efect. FGF-4 și TGF β -1 stimulează expresia TN-C în mezenchimul dentar E 12, ambii factori inducând câteva izoforme TN-C. În concluzie, câteva forme îmbinate sunt exprimate în timpul dezvoltării dinților la șoareci, iar TGF- β și familia FGF pot acționa ca semnale ce induc expresia TN-C în mezenchimul dentar. (1)

Alături de TN-C, în pulpa dentară există două molecule matriceale: fibronectină (FN) și collagen tip III. S-a demonstrat că cele trei molecule matriceale sunt prezente în pulpa dentară normală, iar distribuirea lor în procesele inflamatorii și degenerative este diferită de cea din pulpa dentară normală. (2)

Colagenul tip I, fibronectină și TN-C joacă un rol important în reglarea diferențierii osteoblastelor timpurii. În dinți, TN-C este localizat în/și în jurul condensării celulelor mezenchimale, în embrionul de 14 zile intrauterin. În tibii, TN-C este localizat în țesutul mezenchimal pericondral la 17 zile. Deci, colagenul tip I, fibronectina și TN-C au o localizare caracteristică în timpul osteogenezei embrionare, în dinți, mandibulă și tibii. (3)

S-a urmărit posibilă implicare a TN-C în reinervarea mușchilor scheletici la șoarecii deficienți în TN-C. Creșterea axonilor este afectată în mușchii în care TN-C este absent. Unii axoni cresc dincolo de țintele lor originale și reinervează alte locuri sinaptice ce pot deveni

inervate dublu. Deci, TN-C este puternic implicat în formarea, maturarea și stabilizarea joncțiunii neuromusculare. Absența TN-C face ca axonul să crească dincolo de țintele originale. (4)

Expresia TN-C și activarea metaloproteinazei matriceale (MMP) sunt induse în remodelarea arterelor pulmonare unde determină creșterea celulelor. Pentru că bolile vasculare pulmonare la copiii cu defecte congenitale ale inimii sunt asociate frecvent cu schimbări în hemodinamica pulmonară, se presupune că tulburările înregistrate în fluxul sanguin pulmonar reglează TN-C și MMP. Modificarea hemodinamicii pulmonare este expresia mRNA și proteinei TN-C, activității MMP și activității de legare a Egr-1 la DNA, Egr-1 fiind un factor de transcripție ce activează expresia TN-C. (5)

În timpul dezvoltării corneei, derivatele crestei neurale din mezenchimul periocular migrează în cornee și se diferențiază în fibroblastele corneale. În acest timp ele interacționează cu o varietate de proteine ale matricei extracelulare, pentru propria orientare și dezvoltare. S-a urmărit interacțiunea integrinelor $\beta 1$ pe celulele mezenchimale perioculare și fibroblastele corneale, cu fibronectina și TN-C, prin perturbarea funcției acestor integrine. Celulele mezenchimale perioculare și fibroblastele corneale sunt atașate și diseminate mai mult pe fibronectină decât pe TN-C. Deci, in vitro, atât celulele mezenchimale perioculare cât și fibroblastele corneale au $\beta 1$ integrină care interacționează cu fibronectina pentru a le permite să se atașeze și să disemineze, pe când TN-C este antiadeziv. (6)

Se sugerează rolurile specifice ale TN-C în sistemul nervos, în fenomene ca migrarea celulelor precursorare, creșterea axonului și orientare. TN-C apare într-un număr mare de izoforme generate de variația combinațiilor a repeaturilor fibronectinei tip III alternativ spliced. (7)

Expresia TN-C pe oligodendrocite este paralelă cu migrarea celulelor granulare în dezvoltarea cerebelului. TN-C are rol de ghid pentru neuronii granuloși, pentru a-și găsi propria localizare. (8)

TN-C se exprimă masiv în SNC al vertebratelor, în timpul dezvoltării și reparării. S-a demonstrat că TN-C reglează proliferarea și migrarea oligodendrocitelor precursorii, în timpul dezvoltării. (9)

TN-C este o moleculă a matricei derivată din astroglie, expresia ei vizualizându-se în zona germinală a creierului embrionar, așa că poate fi un marker al precursorilor astrogliei, înainte de a se expune proteina acidă fibrillogială – marker al stadiului târziu al diferențierii astrogliale. (10)

S-a studiat influența TN-C și lamininei asupra sinaptogenezei, în culturi primare de neuroni pituitari melanotrofi și hipotalamici. Un nou rol al TN-C este exprimarea lui ca un semnal timpuriu și tranzitoriu al recunoașterii țintei pentru fibrele aferente selective. Expresia TN-C dispare din neuronii melanotrofi curând după stabilirea contactelor neurale. (11)

TN-R (tenascin R) este exprimat în SNC de oligodendrocite în principal și tractusurile albe. S-au incubat membrane mielinice purificate din cromozom adult de șoarece, în diferite condiții ionice. Izoforma de 160 KDa este principalul component. TN-R este un dimer care se disociază în monomeri de 160 KDa și fragmente majore de 125 și 80 KDa în absența inhibitorilor proteazici. În absența agenților „de legare”, TN-R este complet extras din membranele mielinice. Ionii de Ca^{2+} promovează disocierea TN-R, pe când cei de Zn^{2+} o blochează. Elaborarea TN-R din membrane mielinice este sensibilă la căldură sugerând implicarea în acest proces a proteazelor dependente de Ca^{2+} . Concludem că ionii metalici bivalenți, stabilizează asocierea TN-R cu proteazele endogene, demonstrând implicarea TN-R derivat din mielină în schimbarea structurii axonului și în bolile demielinizante. (12)

Glicoproteina matriceală, TN-R, din SNC participă la o varietate de interacțiuni celulă-matrice, în controlul creșterii axonului, în mielinizare și în adeziunea celulelor la fibronectină în timpul dezvoltării și regenerării. (13)

TN-R modulează o varietate de interacțiuni celulă-matrice, contribuind la controlul molecular al ghidării axonului și migrarea neuronilor în timpul dezvoltării și regenerării SNC. În timp ce TN-R se exprimă amplu în SNC postnatal timpuriu și în cel adult mamalian, proteina nu se detectează în diferite compartimente ale SN periferic. TN-R și mai ales izoforma 160, este exprimat tranzitoriu în nervul sciatic al embrionului târziu (E14-18) și la șoarecii nou-născuți, pe când în stadiul mai târziu de dezvoltare mRNA și proteina sunt subreglate. In vitro, TN-R se exprimă în neuronii nediferențiați, în cei diferențiați și în celulele Schwann L¹⁺, dar nu și în alți neuroni sau celule non-neurale derivate din nervul sciatic de la nou-născuți. În dezvoltarea SN periferic, expresia TN-R se corelează cu creșterea axonilor și migrarea celulelor Schwann în timpul înervării musculaturii scheletice. (14)

Matricea este o rețea complexă de macromolecule glicoproteice, polizaharide și proteoglicani. Tenascin-R și condroitin sulfat proteoglican sunt componente esențiale ale matricei extracelulare a hipocampului, colocalizate în cuiburi perineuronale pe interneuroni. TN-R și condroitin sulfat proteoglican modulează diferențierea câtorva forme ale plasticității sinaptice sugerând că sunt implicate diferite mecanisme. (15)

Tenascin X (TN-X) este o proteină a matricei extracelulare abundentă în mușchi și inimă. Se exprimă și în fibroblastele în cultură. (16)

Deficiența în TN-X duce la o creștere a producției de MMP₃ (metaloproteinaze din matrice), iar activitatea crescută a MMP poate duce la degradarea lamininei. Celulele provenite din melanom inoculate la șoareci TN-X ^{-/-}, ar putea facilita invazia și metastazarea, rezultat care implică faptul că TN-X este reclamat pentru împiedicarea invaziei și metastazării celulelor tumorale. (17)

Absența TN-X duce la alterarea proprietăților mecanice ale țesutului conjunctiv. Pentru a înțelege mecanismul integrării lui TN-X în matrice, s-au folosit extracte de piele. Lanțurile dermatan sulfat ale decarinului, se leagă de TN-X în locul ce cuplează heparina, adică în domeniile 10 și 11 ale TN-X, tip fibronectină. Deci, asocierea TN-X cu fibrilele de colagen este mediată de decarin și contribuie la integritatea rețelei extracelulare. (18)

TN-X este o moleculă ce cuplează heparina. Spre deosebire de TN-C, domeniul recombinat fibrinogen – like al TN-X nu este implicat în legarea heparinei. Interacția cu heparina este conformațională și implică ambele domenii 10 și 11 ale moleculei. Receptorii heparan sulfat de la suprafața celulei pot interacționa cu proteinele ce poartă domeniile 10 și 11 arătând că TN-X poate activa diferite semnale pentru a regla comportarea celulei. (19)

TN-X este o glicoproteină mare din matricea extracelulară. Cuplează factorii A și B de creștere a endoteliului vascular (VEGF – A și B). VEGF –B în combinație cu TN-X induce sinteza DNA în celulele endoteliale prin semnalele mediate de VEGF – R1. Adăusul de VEGF – A la explante de la șoareci TN-X ^{-/-} arată că TN-X cu membrii familiei VEGF joacă un rol important în controlul proliferării celulelor endoteliale, in vivo. (20)

TN-C și TN-R, proteoglicanii, condroitin sulfatul și NG2 sunt potențiale surse ale barierei de celule gliale mixtale și pentru regenerarea senzorială care există la granița dintre SNP și SNC. (21)

TN-Y este omologul avian al TN-X; este concentrat în porțiunea proximală a nervilor periferici la pui. În culturi îmbogățite cu celule Schwann, TN-Y recombinat are efecte dependente de doză, în atașarea, diseminarea și migrarea celulelor gliale. Modelul expresiei TN-Y și proprietățile sale in vitro sunt în acord cu efectul de inhibitor al migrării celulelor gliale și regenerării senzoriale în originea nervului. (22)

Deficiența TN-X la om este asociată cu sindromul EHLERS-DANLOS, o boală generalizată a țesutului conjunctiv ce rezultă din metabolismul modificat al fibrilelor de colagen. Deoarece Tnxb este prima genă în sindromul E-D care nu codifică colagenul fibrilar

sau enzima ce modifică colagenul sau depunerea lui. Pielea șoarecilor fără gena *Tnxb* este normală histologic, dar conținutul ei în colagen este redus semnificativ. La microscopul electronic fibrele de colagen arată normal ca formă și dimensiuni, dar densitatea lor este redusă proporțional cu reducerea conținutului în colagen. Deci, *Tnxb* are un rol cauzator în sindromul EHLERS-DANLOS, iar *TN-X* este un reglator esențial al depunerii de colagen de către fibroblastele dermale. (23)

Condiții potologice umane ale SNC asociate cu angiogeneza (neovascularizația) includ procese neoplazice, infecții, ischemie și traume. Suprareglarea VEGF/VPF și a *TN-C* se leagă spațial și temporal cu neovascularizația. Spațial VEGF/VPF-*TN-C* se găsește la locul neovascularizației dar nu sunt detectate în ariile creierului normal sau în arii fără vascularizație. VEGF/VPF-*TN-C* se exprimă în timpul angiogenezei și nu sunt detectate când aceasta se oprește. (24)

În analiza schimbărilor țesutului conjunctiv induse de radiații s-a studiat expresia *TN*, fibrelor elastice, angiogenezei și proprietățile fizico-mecanice la pacienții iradiați. S-au făcut biopsii ale pielii luată de la pacienții radiotratați și netratați. Expresia *TN* este crescută în pielea umană iradiată. Nu au fost diferențe marcate în fibrele elastice în pielea iradiată și neiradiată. Expresia crescută a *TN* s-ar putea datora activării citokinelor ca rezultat al iradierii. Creșterea angiogenezei ar putea fi cauzată de o activare a factorilor angiogenici, prin iradiere sau prin lezarea directă a pereților vaselor. (25)

Izoformele *TN-C* sunt exprimate în manieră reglată în sistemul vascular și au rol în remodelarea peretelui vascular. (26)

Expresia *TN-C* în os și placa aterosclerotică și *MMP₂* din matrice sunt coordonate și interdependente în celulele musculare netede vasculare cultivate. Se presupune că *TN-C* și *MMP₂* sunt implicate mecanic în patobiologia stenozei aortice calcificate umane. Această boală arată depozitarea masivă a *TN-C*, *MMP₂* și activitatea lor, ca și activitatea gelatinolitică a *MMP₂*. Acumularea în primul rând a *TN-C* și apoi a *MMP₂* sunt asociate cu progresia calcifierii. Prezența reziduală a acestor proteine în calcificările severe este indiciul implicării lor în patogeneza. (27)

Depozitarea proteinelor matricei este o cauză majoră a stenozei umane după angioplastia coronară percutanată. Depozitarea *TN-C* crește tranzitoriu într-o lună după angioplastia coronară percutanată, când migrarea și proliferarea celulelor musculare netede era activă. S-a observat că proteinele matricei din leziuni restenotice ale coronarei se schimbă secvențial după angioplastie și că *TN-C* ar putea fi molecula cheie în stadii timpurii. (28)

TN-C joacă roluri importante în remodelarea țesuturilor. Nu se exprimă în mod normal la adulți, dar re apare în condiții patologice. S-a demonstrat contribuția *TN-C* la remodelarea ventriculului după infarctul experimental la șobolan. În 24 ore de ligatură coronară permanentă, fibroblastele interstițiale de la marginea zonei infarctate exprimă mRNA *TN-C*. Expresia *TN-C* este subreglată în ziua a 7-a dar nu mai mult de ziua a 14-a după infarct. În timpul procesului de vindecare, proteina *TN-C* și celulele care o produc se găsesc la marginea miocardului rezidual. Unele din celulele care produc *TN-C* sunt imunoreactive pentru activitatea mușchiului neted. În cultură, *TN-C* crește numărul cardiomiocitelor atașate la laminină. În timpul fazei acute postinfarct, celulele interstițiale de la marginea zonei sintetizează *TN-C* care poate pierde adeziunea puternică a cardiomiocitelor supraviețuitoare, la țesutul conjunctiv și astfel să faciliteze rearanjarea țesutului. (29)

S-a constatat acumularea marcată a *TN* și colagenului tip I și III la grupul de 80-90 ani cu concentrarea fibrelor elastice crescute în același regiuni ca la grupul de 20 ani. Distribuția și conținutul în *TN* și colagen din matrice se leagă de schimbările în performanța mecanică a mușchiului cardiac, vis-a-vis de vârstă. (30)

TN-C în cancer

TN-C este o glicoproteină suprareglată în diferite neoplazii și procese patologice. Toate tumorile maligne exprimă puternic sau moderat TN, pe când majoritatea celor benigne (70%) nu sunt sau sunt foarte puțin imunopozitive.

S-a demonstrat expresia TN în feocromocitoame și în special în celulele maligne. TN poate fi asociat cu transformarea malignă și metastazarea acestor tumori. Este de asemenea un marker mai agresiv în feocromocitoame. (31)

TN-C se exprimă în embriogeneză, vindecarea rănilor și în neoplazie. Au fost analizate 86 glioame de diferite grade, imunohistochimic, pentru exprimarea TN-C. În general, expresia TN-C crește cu malignitatea. În toate glioamele, colorarea perivasculară a TN-C în jurul vaselor ce hrănesc tumora, este evidentă. Izoformele endogene de TN-C din glioame suportă atât proliferarea celulară cât și migrarea celulelor tumorale. TN-C poate fi un potent marker de prognostic pentru recurența mai timpurie a tumorii. (32)

TN-C este o glicoproteină oligomerică a matricei, care se exprimă predominant în tumori maligne. Modelul expresiei TN-C in vitro, în condrocitele articulare umane, se caracterizează prin rata înaltă a variantei mici față de cea mare (TN-C – small și TN-C – large), pe când expresia in vitro pentru celulele condrosarcomului se caracterizează prin rata joasă. Probele clinice de condrosarcom, cu rata TN-C – small, arată tendința scăzută de supraviețuire. Deci modelul „splicing TN-C” specific poate avea semnificație clinică în condrosarcom. Expresia TN-C joacă astfel un rol obiectiv în gradarea tumorii și în noi tentative terapeutice ale acestei malignități. (33)

TN-C are proprietăți atât adezive cât și antiadezive pentru celule. Variante TN-C spliced majore (320 și 220 KDa) arată posibilitatea variatelor funcții ale moleculei, vis-à-vis de modelul de splicing. TN-C se exprimă marcat în embriogeneză, tumorigeneză și vindecarea rănilor.

Fibronectina (FN) este o moleculă adezivă proeminentă a matricei, frecvent colocalizată cu TN-C în aceste procese. Linia JJ012 de condrosarcom arată o mică variantă TN-C spliced (220 KDa) ce cuplează la fibronectina, pe când varianta mare (320 KDa), nu. În plus, varianta de 220 KDa scade adezivitatea pentru celule când se cuplează la fibronectină, dar contribuie la adezivitate când se cuplează pe pereții acoperiți de fibronectină. Se crede că activitatea biologică a TN-C este dependentă de modelul splicing specific tisular. Izoforma TN-C mai mică joacă un rol structural și adeziv, pe când izoforma mare se exprimă preferențial în țesuturi maligne și deci are un rol în metastazare. (34)

S-a urmărit expresia TN-C în 33 osteosarcoame primare incluse în parafină. Expresia sa la cei cu metastaze este mai înaltă decât la cei fără, cu diferențe semnificative. (35)

Pierderea morfologiei epiteliale și achiziția de caractere mezenchimale sunt tipice pentru celulele carcinomului în timpul progresiei tumorii. În carcinoamele mamare umane, se observă suprareglarea TN-C și vimentinei, în mod frecvent corelându-se cu malignitatea crescută. Este astfel posibil ca TN-C să se coexprime cu vimentina în celulele canceroase care suferă tranziția epitelial-mezenchimală. În 128 cazuri de cancer mamar s-a arătat că celulele sunt o sursă masivă de TN-C și vimentină. Statistic se constată o asociere semnificativă între expresia TN-C și vimentină în celulele canceroase. Expresia TN-C se corelează pozitiv cu supraexpresia oncoproteinei c-erb B-2 și cu subreglarea receptorului estrogen. Se consideră deci, că TN-C și vimentina când se exprimă în celulele carcinomului mamar, reprezintă gene reglatoare implicate în tranziția epitelial-mezenchimală, în timpul carcinogenezei mamare. (36)

Tumorile mamare sunt cele mai frecvente la femelele de câine, și pot avea un model histologic complex, cu participarea celulelor epiteliale și fuziforme la procesul transformării.

Un aspect frecvent al acestor tumori este metaplazia condroidă sau osoasă a matricei ce apare dominant în ariile celulelor fuziforme proliferante, probabil de origine mioepitelială. TN este prezent în cele 186 probe de țesut mamar, cu o creștere a expresiei în situațiile remodelării și în leziuni neoplazice.

Expresia TN în matrice este de asemenea, abundentă în ariile metaplazice condroide inițiale, și cu extinderea variabilă în aproape toate insulele de cartilaj din tumori mixte. În ariile secretorii bine diferențiate, numai granulele apicale ale celulelor luminale sunt pozitive, sugerând un model diferit al expresiei TN în timpul diferențierii secretorii.

TN nu poate fi folosit ca un marker al transformării sau al malignității în oncologia mamară canină, dar această moleculă joacă un rol important în proliferarea și diferențierea proceselor din glanda mamară canină. (37)

În variate carcinoame s-a raportat supraexpresia anexinei II, o proteină ce cuplează fosfolipidul dependent de Ca^{2+} . Unul din liganzii săi este TN-C, o glicoproteină a matricei având calități antiadezive predominante, care este și marker de prognostic pentru câteva carcinoame. Anexina II se exprimă în linii metastazice. În 29,5% din cazuri se observă supraexpresia anexinei II și în 49,5% din cazuri, a proteinei TN-C. Supraexpresia anexinei II se corelează semnificativ cu tipul histologic al tumorii, cu dimensiunea ei și profunzimea invaziei, pe când supraexpresia TN-C se corelează semnificativ cu tipul histologic, profunzimea invaziei, invazia limfatică și venoasă, cu metastaza ganglionilor limfatici. Expresia anexinei II este semnificativ corelată cu a lui TN-C. Supraexpresia anexinei II și TN-C în carcinomul avansat de colon, se poate lega de progresia și dimensiunea metastazei acestui cancer. (38)

La 30 de pacienți cu adenocarcinom colorectal s-a urmărit expresia TN, ca și în ficat. Imunocolorarea TN este pozitivă în zonele de sub membrană și în noul țesut conjunctiv din tumora primară și în jurul sinusoidelor hepatice. Depozitarea în jurul sinusoidelor, a TN, era mai frecventă la cei cu tumori bine diferențiate. Prezența metastazelor este însoțită de depozitarea scăzută a TN. Depozite ultrastructurale de TN există în jurul celulelor tumorale singulare și glandulare din tumorile primare și intime cu celulele hepatice stelate. Depozitele de TN au rol în stimularea proliferării celulelor tumorale și mobilității acestora. (39)

TN-C se exprimă intens în stroma tumorală, inhibă activarea in vitro a limfocitelor T, ridică posibilitatea de a contribui in vivo la imunosupresia indusă de tumoră. A fost identificată o regiune minimală a TN-C, care poate inhiba activitatea T. O proteină recombinată care înconjoară domeniul fibronectinei tip III al TN-C (TnFn III A-D), inhibă riguros evenimentele de activare timpurie și târzie a limfocitelor, respectiv activarea TCR/CD8 de joasă modulare, producția de citokine și sinteza DNA. TN-C recombinat (care are regiunea „spliced alternativ”) supresează activarea T, pe când TN-C care nu are această regiune, nu supresează activitatea. A fost identificat și domeniul TnFn III A₁A₂ ca regiune minimă ce supresează activitatea T. Acest domeniu mediază abilitatea TN-C de a inhiba in vitro activitatea T și de asemenea, oferă explicații în activitatea imunosupresivă a TN-C in vitro. (40)

Progresia neoplaziilor maligne este însoțită de alterarea compoziției matricei extracelulare. TN-C este o moleculă care modulează adeziunea, astfel că expresia și distribuția sa pot influența semnificativ proliferarea și invazivitatea celulelor tumorale.

S-a urmărit distribuția TN-C în probe de cancer. În cancerul laringeal în stadiile inițiale ale creșterii tumorale, se observă o producție marcat amplificată a tenascinului în interfaza tumorii gazdă. În stadiile mai târzii ale progresiei tumorii, un număr mare de vase de sânge localizate în țesuturile tumorale, sunt de asemenea puternic marcate pentru tenascin. În jurul acestor vase sunt numeroase celule tumorale proliferante. Din contră, în cancerul hipofaringian, modelul colorației asociată vascularizării, se observă numai în stadiile foarte

timpurii ale dezvoltării tumorale. În ambele tipuri de cancer, suprareglarea tenascinului se corelează puternic cu formarea metastazelor, cu recurența timpurie a tumorii și cu faza letală a bolii. În concluzie, datele clinice și imunohistochimice arată acumularea tenascinului în vasele de sânge tumorale și este un factor de prognostic în aceste două cancere. (41)

Creșterea expresiei tenascinului s-a găsit în țesuturi patologice în care apare angiogeneza. Zece membrane coroidale neovasculare prelevate de la 10 pacienți cu degenerarea maculei datorată vârstei (n = 6) și cu coroidite multifocale (n = 4), au fost evaluate imunohistochimic folosind Ac monoclonali anti TN-C și factorul VIII. Toate membranele erau pozitive pentru TN-C care se exprimă diferit în matricea extracelulară. În concluzie, TN-C are un rol în proliferarea celulelor și neovascularizația la om. Este un marker al angiogenezei și ar putea folosi la terapia farmacologică în boli neovasculare. (42)

TN și izoformele sale sunt proteine multidomenice ale matricei extracelulare care se crede că sunt implicate în reglarea interacțiunii stromal epiteliale. Unele interacțiuni între TN și celule sunt mediate de integrine. În răni bucale de 3 zile, imunoreactivitatea pentru integrina α 9 arată că este localizată abundant în celulele epiteliale migrate la baza rănii. (43)

TN-C reprezintă subiectul unor modele complexe spațiale și temporale ale expresiei, în sensul variatelor procese angiogenetice și anume celor implicate în interacțiuni epitelial mezenchimale.

În intestin, TN, în special TN-C se exprimă diferit în timpul dezvoltării intestinului subțire adult și mucoasei colonice, ca și în neoplasm.

În glanda mamară, TN-C se exprimă mai ales în timpul embriogenezei și carcinogenezei, iar în culturi celulare reglează expresia genei β -casein. Sunt reglați de TN-C și hormonii lactogenici, în celulele epiteliale mamare. (44)

TN-C se asociază cu patologia cardiovasculară. Este implicat în proliferarea, migrarea și diferențierea celulară. S-a observat că supraexpresia TN-C în valvele aortice stenotice umane poate sugera că această boală este mai curând una activă decât un proces degenerativ. (45)

S-a urmărit expresia TN-C și în ficat, normal și fibrotic, de șobolan. Fibroza hepatică indusă la șobolan cu CCl₄, a fost divizată în trei stadii: stadiul injuriei hepatice (4 săptămâni), stadiul timpuriu al fibrozei (8 săptămâni) și stadiul târziu al fibrozei (12 săptămâni). În țesutul hepatic normal, TN-C se colorează imunohistochimic slab, iar în 2 stadii semnalul mRNA și imonocolorația pentru TN-C sunt semnificativ crescute. În stadiul târziu de fibroză, imunocolorațiile sunt scăzute în comparație cu injuria și fibroza timpurie. Sursa celulară de TN-C în ficat este dominant restrictivă în celulele mezenchimale. Deci TN-C este un component al matricei țesutului hepatic; joacă un rol în organizarea timpurie a matricei în timpul fibrogenezei ficatului. (46)

În plămâni, tenascin C se exprimă în stadiul fetal, în timpul morfogenezei ramificate, în tumorile pulmonare benigne și maligne, în fibroza pulmonară idiopatică, sarcoidoză și astm. A fost studiată exprimarea TN-C și în pneumonia interstițială obișnuită, un tip de fibroză pulmonară. Tenascin s-a dovedit crescut prin studii imunohistochimice în toate tipurile de maladii fibrotice pulmonare și pleurale, incluse în studiu. În pneumonia interstițială obișnuită, tenascin este activ sintetizat la siturile epiteliale recente, sugerând că are un rol important în fibrogeneza plămânilor. (47)

Se crede că expresia tenascinului ar putea crește în plămânul uman în cazul bolilor neonatale, precum sindromul insuficienței respiratorii la copii și displazia bronhopulmonară. După analiza a 7 cazuri, s-a constatat că expresia TN-C este scăzută lângă epiteliiu alveolar și bronhiolilor, moderată în intima venelor și puternică în jurul condrocitelor. În sindromul insuficienței respiratorii, expresia este moderată sau puternică în jurul bronhiolilor și în epiteliiu alveolar datașat de pe membrana hialină din peretele alveolelor dilatate. Pacienții cu

sindromul insuficienței respiratorii, care au supraviețuit o zi sau mai multe, exprimă puternic TN-C în perețele alveolelor. La cei cu displazia bronhopulmonară, TN-C este foarte puternic exprimat în pereții alveolari fibrotici remodelați în jurul epiteliului regenerativ. În concluzie, TN-C este înalt exprimat în pereții alveolari și bronhiolari din sindromul insuficienței respiratorii și displazia bronhopulmonară, sugerând o asociere între expresia acestei proteine și prezența acestor boli. (48)

Tenascin se exprimă în focare din leziuni recente ale mugurilor fibrotici încorporați sau intraluminali. Celulele ce exprimă mRNA TN sunt localizate în și sub noul epiteliu format. Colorația imunohistochimică arată că celulele noului epiteliu format sunt puternic pozitive pentru citokeratină, regenerând astfel pneumocitele tip III, pe când celulele de sub epiteliu nou format sunt pozitive pentru actina α din mușchiul neted și aparent pentru miofibroblaste. Expresia mRNA TN este mai puternică și frecventă în miofibroblaste decât în pneumocitele tip II. Expresia slabă a mRNA TN s-a observat și în epiteliul de tip metaplazic bronhiolar și în macrofagele alveolare. Deci TN este sintetizat activ în leziunile fibrotice timpurii în pneumoniile interstițiale obișnuite. Interacțiunea între epiteliu și țesutul conjunctiv joacă un rol semnificativ în sinteza TN și, de asemenea, miofibroblastele sunt în principal responsabile de sinteza sa în focarele fibroblastice din pneumoniile interstițiale obișnuite.

Tenascin a fost caracterizat în anul 1980, de atunci fiind publicate sute de articole privind prezența tenascinului în țesuturile normale, în cele patologice reactive și în carcinoame. În studii recente s-a folosit material proaspăt, urmărindu-se în special implicarea tenascinului în reacțiile tisulare patologice și în carcinogeneză.

S-a demonstrat că imunoreactivitatea tenascinului în celulele carcinomului mamar, poate fi un indicator al metastazelor și supraviețuirii. Studii recente au arătat că exprimarea tenascinului la limita invazivă a cancerului mamar timpuriu este corelată cu un risc crescut al recurențelor locale. Aceste rezultate implică o largă aplicare a anticorpilor pentru tenascin în patologia mamară.

Expresia tenascinului poate sugera situații în care chiar și carcinoamele mamare mici, pot necesita terapie complementară intensivă (chemoterapie etc.)

S-a aratat că tenascinul este semnificativ crescut și în membrana bazală a căilor aeriene la astmatici și descrește rapid prin inhalare de steroizi. Tenascinul poate fi deci utilizat pentru a monitoriza stadiul bolii și necesitățile terapeutice, în diferite tipuri de astm.

Tenascinul este exprimat în stroma multor tumori, incluzând gliomele, tumorile de sân, carcinoamele celulare scuamoase. (48)

1. Sahlberg C., Aukhil I., Thesleff I., *Tenascin-C in developing mouse teeth: expression of splice variants and stimulation by TGF beta and FGF*, 109(2), 114-24, 2001.
2. Martinez E. F., Machado de Souza S. O., Correa L., Cavalanti de Araujo V., *Immunohistochemical localization of tenascin, fibronectin, and type III collagen in human dental pulp*, 26(12), 708-11, 2000.
3. Samosa 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 tibiae in rats*, 32(10), 591-8, 2000.
4. Cifuentes-Diaz C., Faille L., Goudou D., Schachner M., Rieger F., Angaut-Petit D., *Abnormal reinnervation of skeletal muscle in a tenascin-C – deficient mouse*, 67(1), 93-9, 2002.
5. Jones P. I., 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*, 282(1), 126-351, 2002.

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*, 26(2), 131-44, 2002.
7. Joester A., Faissner A., *The structure and function of tenascin in the nervous system*, 20(1), 13-22, 2001.
8. Fukamachi F., Alhara O., Kusakabe M., *Internalization and down regulation of muscarinic acetylcholine receptors in cerebellar granule cells of tenascin-gene deficient mice*, 36(2), 153-8, 2000.
9. Garcion E., Faissner A., Ffrench-Constant C., *Knockout mice reveal a contribution of the extracellular matrix molecule tenascin-C to neural precursor proliferation and migration*, 128(13), 2485-96, 2001.
10. Yuasa S., *Development of astrocytes in the mouse embryonic cerebrum tracked by tenascin-C gene expression*, 64(1), 119-26, 2001.
11. Soussand J., Jahke R., Simon-Assmann P., Stoeckel M. E., Schimchowitsch S., *Tenascin and laminin function in target recognition and central synaptic differentiation*, 12(5), 1073-6, 2001.
12. Peshera P., Probstmeier R., *Association of tenascin-R with murine brain myelin membranes*, 283(3), 165-8, 2000.
13. Probstmeier R., Braunewell K., Peheva P., *Involvement of chondroitin sulfates on brain derived tenascin-R in carbohydrate dependent interactions with fibronectin and tenascin C*, 863(1-2), 42-51, 2000.
14. Probstmeier R., Nellen J., Gloor S., Wernig A., Pesheva P., *Tenascin-R is expressed by Schwann cells in the peripheral nervous system*, 64(1), 70-8, 2001.
15. 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*, 104(2), 359-69, 2001.
16. Minamitani T., Ariga H., Matsumoto K. I., *Transcription factor Sp1 activates the expression of the mouse tenascin -X gene*, 267(21), 626-31, 2000.
17. Matsumoto K., Takayama N., Ohnishi J., Ohnishi E., Shirayoshi Y., Nakatsuji N., Ariga H., *Tumour invasion and metastasis are promoted in mice deficient in tenascin-X*, 6(12), 1101-11; 2002.
18. Elefteroiu F., Exposito J. Y., Garrone R., Lethias C., *Binding of tenascin – X to decorin*; 495 (1-2), 44-7, 2001.
19. Lethias C., Elefteroiu F., Parsieglia G., Exposito J. Y., Garrone R., 276(19), 16432-8, 2001.
20. 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*, 66(3); 439-47, 2001.
21. Tucker R. P., Hagios C., Santiago A., Chiquet-Ehrismann., *Tenascin-Y is concentrated in adult nerve roots and has barrier properties in vitro*, 66(3), 439-47, 2001.
22. Mav 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*, 30(4), 421-5, 2002.
23. Zagzag D., Capo V., *Angiogenesis in the central nervous system: a role for vascular endothelial growth factor/ vascular permeability factor and tenascin-C. Common molecular effectors in cerebral neoplastic and non-neoplastic <angiogenic diseases>*, 17(1), 301-21, 2002.
24. Riekkki R., Jukkola A., Oikarinen A., Kallioinen M., *Radiation therapy induces tenascin expression and angiogenesis in human skin*, 81(5), 329-33, 2001.
25. Wallner K., Shah P. K., Sharifi B. G., *Balloon catheterization induces arterial expression of new tenascin-C isoform*, 161(1), 75-83, 2002.
26. 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*, 159(1), 321-7, 2001.
27. Imanaka-Yoshida K., Matura 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*, 439(2), 185-90, 2001.

28. Imanaka-Yoshida K., Hiroe M., Nishikawa T., Ishiyama S., Shimajo T., Ohta Y., Sakakura T., Yoshida T., *Tenascin-C modulates adhesion of cardiomyocytes to extracellular matrix during tissue remodeling after myocardial infarction*, 81(7), 1015-24, 2001.
29. Sato I., Shimada K., *Quantitative analysis of tenascin in chordae tendineae of human left ventricular papillary muscle with aging*, 183(5), 443-8, 2001.
30. Salmenkivi K., Haglund C., Arola J., Heikkila P., *Increased expression of tenascin in pheochromocytomas correlates with malignancy*, 25(11), 1419-23, 2001.
31. Herold-Mende C., Muller M. M., Bonsanto M. M., Schmitt H. P., Kunze S., Steiner H. N., *Clinical impact and functional aspects of tenascin-C expression during glioma progression*, 98(3), 362-9, 2002.
32. 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*, 61(4), 306-14, 2001.
33. Ghert M. A., Qi W. N., Erikson H. P., Block J. A., Scully S. P., *Tenascin-C splice variant adhesive/anti adhesive effects on chondrosarcoma cell attachment to fibronectin*, 26(3), 179-87, 2001.
34. Tanaka M., Zamazaki T., Araki N., Zoshikawa H., Yoshida T., Sakakura T., 5(5), 505-10, 2000.
35. 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*, 193(2), 181-9, 2001.
36. Faustino A. M., van Garderen E., Schalken J. A., Nederbragt H., *Tenascin expression in normal, hyperplastic, dysplastic and neoplastic canine mammary tissues*, 126(1), 1-8, 2002.
37. 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*, 92(6), 1419-26, 2001.
38. Gulugova M. V., Vlaykova T., *Tenascin immunoreactivity in the large bowel and the liver in patients with colorectal cancer*, 33(2), 111-20, 2001.
39. Puente Navazo M. D., Valmori D., Ruegg C., *The alternatively spliced domain TnFn III A₁A₂ of the extracellular matrix protein tenascin-C suppresses activation induced T lymphocyte proliferation and cytokine production*, 167(11), 6431-40, 2001.
40. Huhasy A., Bardos H., Repassay G., Adamy R., *Characteristic distribution pattern of tenascin in laryngeal and hypopharyngeal cancers*, 110(1), 84-92, 2000.
41. Nicolo M., Piccolino F., Zardi L., Giovannini A., Mariotti C., *Detection of tenascin-C in surgically excised choroidal neovascular membranes*, 238(2), 107-11, 2000.
42. Hakkinen L., Hildebrand H. C., Berndt A., Kosmehl H., Larjava H., *Immunolocalization of tenascin-C, alpha 9 integrin subunit, and alpha beta 6 integrin during wound healing in human oral mucosa*, 48(17), 985-98, 2000.
43. Cella N., Chiquet-Ehrismann R., Hynes N. E., *Lactogenic hormones and tenascin-C regulate C/EBP alpha and beta in mammary epithelial cells*, 76(3), 394-403, 2000.
44. Satta J., Mulkko 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*, 39(1), 96-101, 2002.
45. Yao Dk. Dk., Li S., Kong Xt X. T., Ye Tj T. J., Fan Jg J. G., Yhong L., Wang Gl G. L., Tian Ly L. Y., Wu Ws W. S., Li Ms M. S., *Dynamic expression of tenascin in rat liver during liver fibrogenesis induced by CCl₄*, 10(1), 40-2, 2002.
46. Riitta Kaarteenaho-Wiik., *Tenascin expression and distribution in pulmonary and pleural fibrotic disorders*, 24 (11), 329-33, 1999.
47. Paakko P., Kaarteenaho-Wiik R., Pollanen R., Soini Y., *Tenascin mRNA expression at the foci of recent injury in usual interstitial pneumonia*, 161(3), 967-72, 2000.
48. Christel Herold-Mende, Mario Bonsanto, Annette Buttler, Stefan Kunze, Haus-Herbert Steiner, *Expression of tenascin splice variants in gliomas*, 503, 1999.

LAMININA (LN)

Matricea extracelulară (ECM) reprezintă o rețea complexă de carbohidrați și proteine ce ocupă spațiile interstițiale. Considerată inițial drept un suport inert ce oferă doar stabilitate fizică țesutului, ECM se relevă azi, ca o structură dinamică ce joacă un rol esențial în dezvoltarea, migrarea, proliferarea, forma și funcțiile metabolice ale celulelor cu care se află în contact permanent.

În ECM sunt prezente polizaharide de tipul glicozaminoglicanilor (GAG), care, de regulă, sunt legate covalent de molecule proteice, formând proteoglicani. Proteinele fibrilare constituie cea de a doua componentă a matricei. Se disting două tipuri de proteine fibrilare:

- proteine structurale (colagenul și elastina);
- proteine de adeziune (fibronectina și laminina).

Arhitectura, elementele componente, cât și rolul matricei extracelulare diferă în funcție de tipul tisular. La interfața dintre țesutul epitelial și țesutul conjunctiv subiacent, se află o structură specializată a ECM, numită membrana (lamina) bazală, care mediază contactul dintre cele două țesuturi.

Moleculele componente ale laminei bazale sunt sintetizate de către celulele epiteliale, endoteliale și mezenchimale. Deși compoziția laminei bazale variază de la un țesut la altul, colagenul de tip IV, proteoglicanii (heparan sulfatul) și laminina sunt elemente comune tuturor acestor structuri.

Laminina este localizată pe fața densă dinspre membrana plasmatică a laminei densa, mediind legarea membranei bazale de suprafața celulară. Molecula de 850.000 KDa este alcătuită din trei lanțuri polipeptidice; un lanț lung α (230 KDa și peste 3.000 aminoacizi) și două lanțuri mai scurte: β (230 KDa) și γ (200 KDa), fiecare cu câte 1.500 aminoacizi.

Lanțurile sunt unite prin punți disulfidice într-o structură cruciformă. Cele trei brațe scurte ale moleculei de laminină prezintă câte o pereche de domenii globulare, iar brațul lung are un singur domeniu. Domeniile funcționale prezintă:

- două situsuri de legare a colagenului IV;
- un situs de legare a proteoglicanilor sulfatilor;
- două sau mai multe situsuri de legare a receptorilor de membrană.

Receptorii pentru laminină diferă de tipul celular, dar cel puțin o parte a acestora aparțin familiei integrinelor.

Familia lamininelor este vastă datorită lanțurilor din care este constituită: 5 tipuri de lanțuri α , 3 tipuri de lanțuri β și 3 tipuri de lanțuri γ , care se pot combina pentru a forma izoforme diferite.

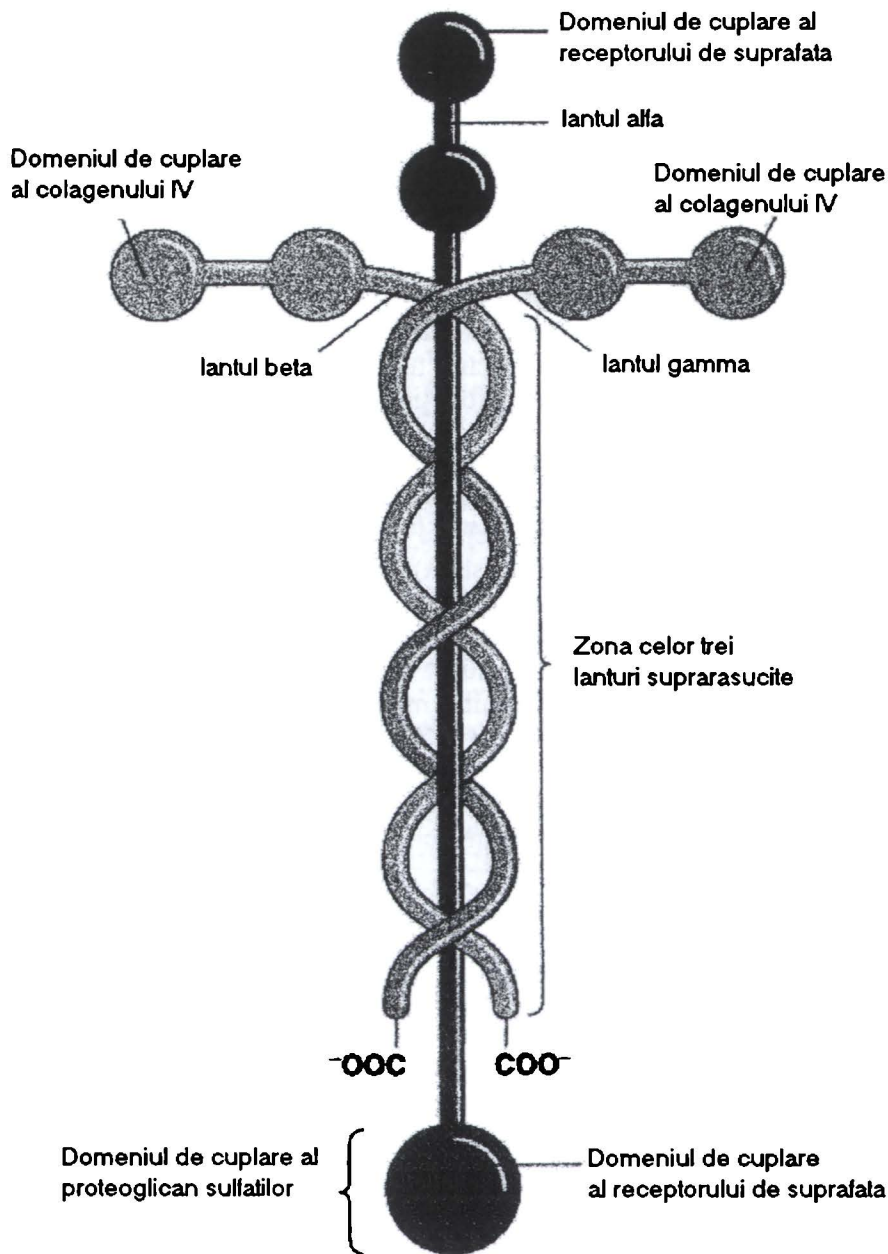
Laminina a fost originar izolată din matrixul celular al tumorilor și este posibil a fi prima proteină de adeziune care apare în dezvoltarea embrionară; un fragment a fost izolat în stadiul de două celule la șoarece.

Lanțul LN α 5 prezent în membrana bazală embrionară și la adult este cel mai larg exprimat.

Genele codificante pentru laminină se află pe cromosomul 18 pentru lanțul α și pe cromosomul 1 pentru lanțurile β și γ .

Lamininele au ca proprietate majoră, legarea componentelor matricei extracelulare între ele, dar și cu membrana celulară (împreună cu alte glicoproteine ca fibronectina, trombospondina, tenascina). De asemenea, se crede a fi implicate în procesul de angiogeneză, (producând alinierea celulelor endoteliale în tuburi capilare), precum și în producerea metastazelor.

Structura lamininei



Familia lamininelor (LN)

Lamininele sunt o familie vastă de glicoproteine (GP) heterotrimerice mari, cu roluri fundamentale în arhitectura și funcțiile membranei bazale. Cele mai bine caracterizate izoforme sunt: LN-1 ($\alpha 1\beta 1\gamma 1$), LN-2 ($\beta 1\alpha 3\gamma 1$), LN-5 ($\beta 3\alpha 3\gamma 2$), LN-8 ($\alpha 4\beta 1\gamma 1$), LN-9 ($\alpha 4\beta 2\gamma 1$), LN-10 ($\alpha 5\beta 1\gamma 1$).

Lanțul LN $\alpha 4$ este în mare măsură distribuit atât în țesutul adult, cât și în țesutul în dezvoltare ca: țesutul cardiac, țesutul muscular scheletic și fibrele musculare netede, endoteliul vascular, plămâni și nervi. Lanțul $\alpha 4$ este în mare măsură, distribuit în asociere cu lanțurile $\beta 2/\gamma 1$ pentru a forma LN-9 și cu lanțurile $\beta 1/\gamma 1$ pentru a forma LN-8. [16]

Capătul C-terminal al lanțului α al LN conține un tandem de 5 domenii G-linke (LG) și este implicat în diferite funcții biologice. Domeniul pereche LG4-LG5 al lanțului LN $\alpha 2$ poartă situsuri de legare pentru heparină și pentru receptorii de la suprafața celulei (α -destroglicani) și este în proporție de 41% identic cu fragmentul E3 al lanțului LN $\alpha 1$.

LG 4 și LG 5 sunt aranjate în formă de U și legate prin o răsucire de 110° , de un ax care trece prin apropierea domeniului terminal. Un segment prelungit N-terminal este legat disulfidic cu LG 5 și stabilizează domeniul pereche. Există și doi atomi de Ca^{+2} , câte unul în fiecare domeniu LG 5 și LG 4.

Modelele LG 4 și LG 4-5 sunt mai active pentru legarea celulelor, pe când modelul LG 5 singur arată o slabă legare. Heparina inhibă legarea celulelor la modelul LG 4-5, ceea ce nu face EDTA. [141]

Aceste rezultate sugerează că modelul LG 4-5 interacționează cu receptorii de suprafață care conțin heparan sulfat, dar nu și cu integrinele.

Un segment LG 4-5 purificat din lanțul laminina $\alpha 3$ a realizat adeziunea celulelor prin interacția cu proteoglicanul heparan-sulfat și a promovat diseminarea celulelor în combinație cu LM5 μ sau LM6 δ LG 4-5. Aceste rezultate demonstrează că domeniul LG 4-5 din molecula LM6, supresează adeziunea celulară, în timp ce LG 4-5 liber o promovează.

Merozina (LN 2) este o izoformă a lamininei alcătuită din lanțurile $\alpha 2$, $\beta 1$, $\gamma 2$. În populația Europei, jumătate din pacienții cu distrofii musculare congenitale prezintă mutații ale genelor LAMA 2 (6q22-23) și o prezență redusă sau absența lanțului $\alpha 2$.

Această formă este în general cunoscută ca deficiență de merozină și este caracterizată prin implicarea nu numai a musculaturii scheletice, ci și a SNC și SNP. Pacienții cu anomalități structurale ca: girare cortico-cerebrală anormală, hiperplazia cerebelului și a punții și dilatarea ventriculelor, dar fără retardare mentală. [27]

S-a imunopurificat sinapsa electrică de organ care este omoloagă cu joncțiunile neuromusculare găsindu-se pe suprafața organelor două LN de 740, respectiv 900 KDa. LN de 740 KDa este compusă din lanțurile $\alpha 4\beta 2\gamma 1$ (LN-9). S-a lansat ipoteza că LN-9 în membrana bazală sinaptică se atașează la canalele de Ca^{2+} , la rândul lor atașate de spectrina citosolică, care apoi poate organiza grupuri de vezicule sinaptice prin legarea proteinelor asociate veziculelor. [38]

Plachetele sanguine conțin LN-8 ($\alpha 4\beta 1\gamma 1$), o izoformă LN recent descrisă, dar originea ei este necunoscută și poate fi sintetizată de megacariocite. [8]

În timpul embriogenezei, lanțul $\alpha 5$ are rol în diferite procese de dezvoltare, incluzând închiderea tubului neural, septarea și formarea placentei.

S-a analizat dezvoltarea rinichiului în embrionii LN5 mutanți și s-a găsit un defect izbitor în glomerulogeneză, asociat cu o membrană bazală glomerulară (GMB) anormală. Aceasta este corelată cu eșuarea schimbării în timpul dezvoltării, în depozitarea lanțului LN α , în care $\alpha 5$ înlocuiește $\alpha 1$ în GMB și demonstrează că LN $\alpha 5$ este important în dezvoltarea timpurie a rinichilor. [26]

LN10/11, izoforme care conțin lanțul $\alpha 5$ sunt componente majore ale membranei bazale a multor țesuturi fetale și adulte. [14]

În mucoasa intestinală normală, distribuția izoformelor de LN definește 3 zone ale membranei bazale epiteliale. Componente ale LN-5 ($\alpha 3$ și $\beta 3$) au fost găsite la suprafața membranei bazale epiteliale, lanțul LN $\alpha 2$ a fost găsit selectiv pe fundul criptelor și lanțul LN $\alpha 5$ a fost singurul lanț de tip α din criptele de mijloc ale membranei bazale. [15]

Adeziunea LN1 plus nidogen-1 (entactin) sau LN1 singur induce la celule epiteliale mamare, producerea de β -cazeină (fosfoproteină care reprezintă partea cea mai importantă a substanțelor azotate din lapte). Nidogen-1 nu induce sinteza β -cazeinei în celulele epiteliale, dar sporește capacitatea de inducere a LN1. Aceste date sugerează ca nidogen-1 poate coopera cu LN1 pentru a regla expresia β -cazeinei.

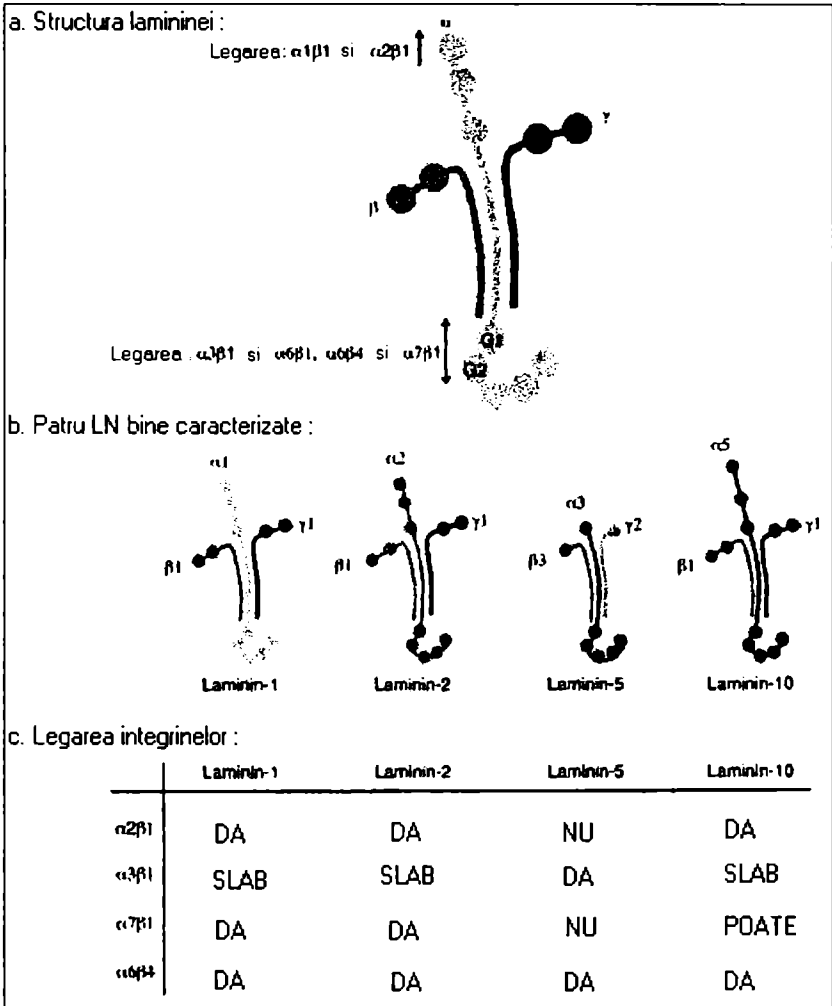
Nidogenul-1, un component cheie al membranei bazale, acționează ca punte între moleculele LN și colagenul IV și astfel participă la asamblarea membranei bazale. Nidogenul 1 și 2 sunt componenți obișnuiți ai membranei bazale în rinichiul șoarecilor, mai mult chiar, o fracțiune substanțială a lor este colocalizată cu LN-1. În embrionul timpuriu nidogen 1 poate fi exprimat de celula mezenchimală și epitelială contribuind la formarea membranei bazale embrionare și astfel servind la sterilizarea acesteia „in vivo”. [34]

LN 6 și LN 5, care au în comun un domeniu de legare a integrinei în LN α 3 se crede că cooperează în reglarea funcțiilor celulei. Ele au activități biologice distincte, dar pot coopera în suportul adeziunii celulare. Procesarea proteolitică a lanțului α 3 pare să regleze funcțiile fiziologice ale LN 6.

În conformitate cu multe studii, componentele integrale ale membranei bazale, incluzând laminina, colagenul IV și proteoglicanul heparan-sulfat, au fost localizate într-un număr de tumori, câștigând teren în rolul lor în neoplazie.

Pe măsură ce complexitatea ECM devine mai evidentă, rolul ei în menținerea homeostaziei și în biologia tumorală este pus sub semnul întrebării.

Pentru a explora semnificația biologică a transcriptelor alternative γ 2, s-a izolat cDNA codificator pentru transcriptul LN γ 2 de la șoareci și s-a caracterizat capătul 3' al genei LAMC-2 murină studiindu-se expresia transcriptelor alternative γ 2 în câteva țesuturi. Comparându-se expresia modelului transcriptului LN γ 2 cu cea a lanțului γ 2, s-a observat o distribuție tisulară similară, dar cu o diferență semnificativă a nivelului de exprimare. Transcriptul mai lung γ 2 este mai abundent decât varianta mai scurtă γ 2. Transcriptele umane γ 2 și γ 2* rezultă prin folosirea alternativă a exonilor capătului 3' al genei LAMC-1. [1]



LN-molecule de adeziune celulară

ECM se leagă cu integrinele, molecule de adeziune specifice. Acest complex de adeziune este responsabil pentru integritatea țesuturilor și semnalizarea celulară. [42]

Moleculele de adeziune celulară mediază interacțiunile celulelor cu alte celule și cu componentele ECM. Astfel de interacții pot fi importante în dezvoltarea invaziei tumorale și metastazării. În general, majoritatea tumorilor exprimă puțină sau deloc adeziune la laminină sau colagen, dar câteva tumori au arătat o marcată adeziune la fibronectină. [9]

S-a încercat identificarea secvențelor de adeziune celulară din lanțul LN β 1 de la șoarece, prin testarea celulelor fibrosarcomului HT-1080 și celulelor melanomului B16-F10, pentru legarea a 187 peptide sintetice supraspiralate, care au acoperit întregul lanț β 1.

Din cele 17 peptide active identificate în lanțul LN β 1, 8 sunt grupate în domeniul aminoterminal globular, sugerând un rol important în legarea celulară pentru acest domeniu, care poate fi multifuncțional. Aceasta demonstrează că lanțul β 1 are multiple situsuri active pentru adeziunea celulară, dintre care unele sunt specifice tipului celular.

În particular, coada intracelulară a subunității integrinei α 3 controlează formarea de complexe de adeziune în celulele aderente la LN. [31]

LN 5 a fost identificată ca o proteină cheie în ancorarea filamentelor membranei bazale (filamentele de ancorare conectează membrana bazală cu celulele epiteliale formând împreună un complex epitelial de adeziune). Tulburări în complexul de adeziune epitelială se realizează în dermatoza buloasă subendotelială.

Carcinoamele scvamoase orale au o pierdere importantă a LN-5 și receptorilor celulari. Ca rezultat al acestei observații, LN-5 a fost sugerată ca o cale de invazie. [11]

Supraexpresia p300 conduce la o scădere a producerii de LN-5 în celulele epiteliale ale sânului, astfel scăzând adeziunea. Studii de imunofluorescență, ca și experimente folosind matrixul normal, au confirmat că scăderea adeziunii celulelor care supraexprimă p300, se datorează ECM deficientă în LN-5 și nu datorită scăderii receptorilor LN-5. [25]

LN 10/11 purificate din mediul condiționat al celulelor carcinomului pulmonar uman au efecte puternice în medierea adeziunii celulelor carcinomului, într-o manieră dependentă de integrina α 3 β 1. [14]

Examinând defectele unui panou de anticorpi antiintegrine care blochează funcțiile integrinelor implicate în adeziunea LN10/11 la diferite tipuri celulare, s-a stabilit că: anticorpii antiintegrina β 1 inhibă adeziunea tuturor tipurilor celulare testate, iar anticorpii antiintegrina α 3 inhibă adeziunea celulelor de carcinom și gliom, dar nu și a celulelor fibroblastice. Acestea indică faptul că LN10/11 sunt liganzi de adeziune puternici și multilaterali în membrana bazală, capabili să lege integrinele α 3 β 1, α 6 β 1 și α 6 β 4 cu mare aviditate. [16]

Receptori ai LN

Membranele bazale sunt cele mai timpurii produse ale ECM în timpul embriogenezei. Ele rezultă din sinteza și asamblarea într-o arhitectură supramoleculară definită a mai multor componente, incluzând: laminina, colagen IV, nidogenul și proteoglicanii.

Studii "in vitro" au permis propunerea unui model de asamblare bazat pe polimerizarea LN și colagenului IV în două rețele separate, asociate prin nidogen.

O proprietate foarte importantă a componentelor membranei bazale este generarea de semnale de control a activității celulelor adiacente. Transferul informației este mediat de

interacțiile cu receptorii suprafeței celulelor, printre care integrinele. Studii genetice la șoarece au demonstrat că absența acestei interacții nu este compatibilă cu dezvoltarea, ca și deleția lanțului LN γ 1 sau lanțului integrinei β 1, care duce la moartea embrionului în stadiul de implantare. Aceasta indică faptul că, lanțul β 1 al integrinelor este necesar pentru inițierea formării membranei bazale, prin aplicarea unei reglări feed-back asupra exprimării lanțului LN α 1 și altor componente ale membranei bazale. [3]

Integrinele care mediază adeziunea celulelor la LN8 au fost identificate folosind anticorpi monoclonali. Specificitățile integrinelor au fost descoperite ca fiind diferite de LN1. Integrina α 6 β 1 este un mediator major al adeziunii la HT-1080 și la celulele endoteliale capilare cultivate cu LN8. [16]

Destroglicicanul este o proteină de legare a LN, care generează o legătură între citoscheletul subsarcolemal și ECM. Este, de asemenea, implicat în organizarea membranei bazale. Până în prezent organizarea genomică a genei DAG1 a destroglicicanului nu a fost complet investigată. S-a realizat clonarea și secvențierea a 164 Kb din genomul DNA de câine, care conține gene DAG1 complete, de aproximativ 71Kb, genom alcătuit din 3 exoni cu codonul START de translocăție localizat în exonul 2. [19]

În celulele Schwann, glicoproteina transmembranară, β -destroglicicanul formează complexul destroglican împreună cu glicoproteina extracelulară α -destroglicicanul, care leagă LN2, component major al membranei bazale a celulelor Schwann. Astfel, complexul destroglican este implicat în adeziunea membranei externe a celulelor Schwann cu membrana bazală sugerând că acest complex joacă un rol important în procesul de mielinizare prin interacția cu LN2. [24]

Destroglicicanul α este un receptor laminină/agrină (LN2) exprimat în mușchiul scheletal, dar și în sistemul nervos unde participă la organizarea sinapsei și asamblarea membranei bazale retiniene. [42]

Legătura între LN5 și receptorii ei, integrinele α 1 β 1, α 3 β 1 și α 6 β 4, a fost implicată în progresia și invazia carcinoamelor. Imunoreactivitatea lanțului LN α 1, component al LN1, și LN3, nu a fost observată în adenoame sau carcinoame. Imunoreactivitatea pentru lanțurile integrinei α 2, α 6, β 1 și β 4 a fost descoperită în toate tumorile, iar cea pentru integrina α 3 în toate adenoamele și majoritatea carcinoamelor, adesea colocalizată cu LN5.

În carcinoamele invazive, LN-5 este un component major al membranei bazale și celulare folosind complexul integrină α 3 β 1 pentru adeziunea la LN5. [22]

Principala integrină de legare a LN din musculatura scheletală, netedă și cardiacă este integrina α 7 β 1, care este înrudită cu α 6 β 1. Există un răspuns selectiv al integrinelor α 6 și α 7 la adeziunea celulară controlată de LN1 și LN2, ceea ce indică roluri diferite în migrarea și adeziunea celulelor controlate de LN. [36]

Rolul LN în semnalizare

Proteinele ECM, fibronectina (FN) și laminina (LN) sunt cunoscute ca intervenind în controlul creșterii și diferențierii celulelor musculare netede vasculare (VSMC).

S-a analizat relația dintre factorii de creștere și calea de semnalizare integrină în VSMC. Cultivarea celulelor musculare netede ale arterelor coronare de la porcine pe FN și LN, conduce la efecte diferite asupra proliferării și exprimării proteinelor contractile. Astfel, celulele cultivate pe LN arată nivele crescute de exprimare a lanțurilor grele de miozină din musculatura netedă (marker al diferențierii celulelor musculare) decât celulele cultivate pe FN.

FN și LN susțin migrarea celulelor ca răspuns la PDGF. Acestea arată o diferență în abilitatea de semnalizare prin intermediul kinazei de adeziune focală (FAK). Celulele cultivate pe LN arată activare slabă sau absentă a FAK, ca răspuns la PDGF sau EGF. Calea de semnalizare a integrinei are un efect profund asupra proliferării și diferențierii VSMC, iar FAK este un intermediar important în această cale. Sunt discutate implicațiile acestei căi de semnalizare în stări patologice ca: ateroscleroza și restenoza. [29]

Adeziunea celulelor epiteliale conjunctivale umane la izoforme diferite de LN, activează diferite căi de semnalizare intracelulară și asigură suport pentru ipoteza că moleculele ECM pot modula diferențierea celulelor epiteliale ale suprafeței oculare prin căi alternative de semnalizare.

Teste de adeziune celulară, experimente de grupare a integrinelor și experimente de blocare a funcției integrinelor, au demonstrat că integrinele β , dar nu și cele β_4 , mediază adeziunea celulelor epiteliale conjunctivale umane la izoformele de LN placentare (LN10-11) și induce fosforilarea TK de adeziune focală (FAK). [20]

Primul pas în inducerea semnalului de transducție al LN1 este inițiat de formarea complexelor de adeziune specifice integrina $\alpha\beta_1$. În contrast, la alte izoforme LN, complexe de adeziune sunt specifice pentru integrina $\alpha_3\beta_1$, datorită unei reglări transdominante a integrinei $\alpha\beta_1$, de către integrina $\alpha_3\beta_1$. Alte studii au demonstrat că citodomeniul subunității integrină β_1 interacționează cu o afinitate scăzută cu coada citoplasmatică a subunității integrină α_3 , dar nu și cu alte subunități α incluzând și α_6 . Aceste rezultate demonstrează rolul critic al cozilor citoplasmatică ale subunității α a integrinei în transducția semnalului indus de integrine. În particular, coada intracelulară a subunității α_3 a integrinei controlează formarea de complexe de adeziune în celulele aderente la LN. [17]

Rolul LN în țesuturile normale

Metaloproteinazele (MMP) matrixului sunt implicate în degradarea acestuia și joacă un rol important în invazia celulelor trofoblastice în endometrul maternal în timpul placentăției. Citotrofoblastele trimestrului I sunt capabile să producă abundant LN și FN, dar nu s-a detectat secreția de colagen I și IV. Aceasta indică faptul că MMP, derivate din trofoblaste, și inhibitorii lor sunt reglați intrinsec pe parcursul dezvoltării. [44]

Astrocitele produc LN5 în culturi celulare, producție mărită de celulele endoteliale. Contactul celular direct care necesită o integrină β sau un component al matrixului insolubil este responsabil de inducția secreției de LN din astrocite. Hipoxia, de asemenea, influențează producerea de LN matriciale. [42]

LN joacă un rol major în diferențierea, migrarea și supraviețuirea neuronală. Proteina prion celulară (PrPc) este un receptor de înaltă afinitate pentru LN, interacțiunile PrPc-LN fiind implicate în neurogeneza indusă de NGF. [10]

Implantarea embrionului de șoarece depinde de interacțiunile complexe dintre celulele trofoblaste embrionare și mediul uterin care este bogat în matrice extracelulară cu o cantitate crescută de laminină.

Injecția intrauterină a anticorpilor de legare a LN (0,4mg la 1ml) în partea stângă a uterului în ziua a treia a gestației, inhibă semnificativ implantarea embrionului, în comparație cu partea dreaptă, care a fost injectată cu Ig G normală. O secțiune realizată în ziua a 5-a a arătat că embrionul din partea dreaptă a uterului s-a implantat normal și s-a dezvoltat sănătos, în timp ce embrionul din partea stângă este dezintegrat sau chiar absent. [45]

Studiile au sugerat că membrana bazală singură poate induce diferențieri ductale și morfogeneza în pancreasul embrionar nediferențiat. LN-1 este importantă în inducerea diferențierii exocrine (ducte și acini) în pancreas. Mai mult, s-a demonstrat că:

1. morfogeneza ductului pancreatic pare să necesite LN1 din membrana bazală și nu receptorii integrine ce conțin $\alpha 6$,
2. regiunile suprspiralate ale LN sunt locusuri biologic active, necesare pentru morfogeneza ductului pancreatic,
3. citodiferențierea duct-specifică, în contextul expresiei anhidrazei carbonice II, nu este obligatoriu cuplată cu morfogeneza ductului,
4. membrana bazală poate conține factori de creștere, care pot susține atât expresia anhidrazei carbonice II, cât și capacitatea de a forma ducturi, în ciuda absenței acestora [6].

Adiția LN1 la neuronii simpatici de șobolan a cauzat avansarea microtubulilor și legarea lor în conul de creștere inițial și apoi dezvoltarea axonilor subțiri, cu creștere rapidă. Astfel, microtubulii sunt o țintă directă pentru LN1 în conul de creștere, cu consecințe importante pentru creșterea axonală.

Lanțul LN $\alpha 2$ este un component al merozinei, membru al familiei de molecule LN, care este exprimat în special în mușchiul striat. Gena acestui lanț (lama2) la șoarecii mutați (dy/dy) determină distrofie musculară congenitală. În asociație cu distrofia musculară, limfocitele CD4+, CD8+ dublu pozitive, dispar prin apoptoză, în timp ce limfocitele CD4+, CD8+, CD8- sau CD4- rămân. Pentru a studia mecanismele care conduc la moartea selectivă a celulelor dublu pozitive în absența merozinei, s-a analizat rolul interacțiilor dintre VLA-6, (un ligand al merozinei în timus) și merozină (LN2). [40]

In vitro, supraviețuirea limfocitelor de la șoarecii normali a fost menținută prin adăugarea fie a anticorpilor monoclonali anti-VLA-6 (activarea foarte târzie a antigenului) fie merozinei. [13]

Celulele miogenice LN $\alpha 2$ negative au fost detectate la șoarecii distrofici dy/dy, sugerând implicarea altor lanțuri α LN în diferențierea miogenică timpurie cum sunt LN $\alpha 4$ și $\alpha 5$, ambele exprimate tranzitiv în membrana bazală a microtubulilor nou formați. [37]

Laminina, nidogenul, agrina, colagenul IV și XVIII sunt constituenți majori ai membranei bazale a retinei. Cu toate acestea, doar agrina este sintetizată de retină, pe când ceilalți constituenți sunt originari din celulele corpului ciliar, iris și cristalin.

Sinteza din țesuturile extraretinale presupune faptul că proteinele membranei bazale retiniene trebuie să fie eliminate din țesutul lor de origine, în corpul vitros și de aici legate de proteine receptori furnizate de neuroepiteliul retinei. Faptul că toate proteinele tipice ale membranei bazale retiniene sunt abundente în corpul vitros și că o nouă membrană bazală este formată numai când acesta este direct adiacent retinei, sugerează că el intervine în formarea membranei bazale retiniene. [12]

Joncțiunile miotendinoase (MTJ) joacă, de asemenea, un rol important în separarea mușchilor în timpul morfogenezei. În MTJ la adult au fost detectate doar cantități vestigiale de lanțuri LN $\alpha 1$ și $\alpha 5$. Pe baza datelor de co-distribuție, se speculează că lanțul LN $\alpha 1$ suportă o schimbare de izoformă, în formarea MTJ, de la LN1 la LN3. [33]

Studii de regenerare a nervilor realizate asupra joncțiunilor neuromusculare (NMJ) sugerează că: componentele membranei bazale sinaptice dictează axonului unde să localizeze mașinăria de eliberare a neurotransmițătorilor. Buni candidați pentru aceste componente sunt lamininele sinaptice care conțin lanțurile $\alpha 4$, $\alpha 5$ sau $\beta 2$.

Expresia izoformelor de LN și legăturile lamininei la receptorii integrine, cunoscută a se realiza în mușchi, a fost investigată în timpul regenerării miogenice după lezări accidentale.

LN α 1 nu a fost detectată în musculatura scheletală, iar LN α 2 este prezentă în membrana bazală a miofibrilelor mature și a miotubulilor nou formați. [38]

LN și cancerul

Folosind o procedură imunohistochimică, s-au studiat posibilele relații dintre distribuția glicoproteinelor LN în membrana bazală și tipurile histologice sau modelul creșterii infiltrative în țesutul înconjurător, în 78 cazuri de cancer gastric timpuriu. Modelele pentru LN și FN din membrana bazală au fost clasificate în: continuu (C), discontinuu (D) și negativ (N), studiul sugerând că dispariția LN în cancerul gastric este un factor important în invazia submucoasei sau în determinarea modelului de creștere infiltrativă a tumorilor în țesutul ambiant. [7]

Modelele creșterii tumorale sunt două: creștere expansivă (dilatativă și creștere infiltrativă). În ce privește relația dintre modelele LN și tipurile histologice ale tumorilor, modelul C a fost cel mai frecvent în adenocarcinomul tubular, dar absent în cel slab diferențiat, iar modelul N a fost semnificativ mai scăzut în adenocarcinomul tubular decât în cel slab diferențiat. Frecvent, modelul N a fost semnificativ mai scăzut în creșterea expansivă (23,5%), decât în cea infiltrativă (68%).

Proteaza cistein-capsină B este crescută într-o varietate de tumori, îndeosebi în cele invazive, ea putând degrada proteine ale ECM cum ar fi colagenul IV și LN și poate activa formarea precursorului pentru uPA, astfel inițiind o cascadă celulară proteolitică. În general, majoritatea tumorilor exprimă slabă sau deloc adeziune la LN sau colagen, deși câteva tumori arată o marcată adeziune la fibronectina.

Colagenul tip XV, IV și LN au fost detectate în toate zonele membranei bazale a țesutului epitelial normal, muscular, adipos, neural și vascular. În adenomiocarcinoamele invazive moderat diferențiate, LN și colagen IV sunt uneori observate ca depozite continue, liniare, în jurul unor glande maligne, dar mai frecvent au fost observate în depozite discontinui sau au lipsit complet.

În contrast, tipul XV de colagen a fost caracterizat ca virtual absent în zona membranei bazale glandelor maligne în tumorile moderat diferențiate. Toate cele trei proteine au fost, de obicei, prezente în stroma și membrana bazală vasculară adiacentă care înconjoară glandele invazive. În conformitate cu multe studii, componentele integrale ale membranei bazale, incluzând LN, colagen IV și proteoglicanul heparan sulfat, au fost localizate într-un număr de tumori, câștigând teren în rolul lor în neoplazie. [2]

Legătura între LN5 și receptorii ei, integrinele α 2 β 1, α 3 β 1 și α 6 β 4 a fost implicată în progresia și invazia carcinoamelor.

În carcinoame, în toate gradele de diferențiere, LN se observă în tumorile membranei bazale, unde colagenul VII este aproape absent. LN5 pare a se acumula de-a lungul marginilor invazive ale carcinoamelor, în timp ce LN10 este mai mult absentă.

Imunoreactivitatea pentru lanțul α 1LN, un component al LN1 și LN3, nu a fost observată în adenoame sau carcinoame. Imunoreactivitatea pentru lanțurile integrinelor, α 2, α 6, β 1 și β 4 a fost descoperită în toate tumorile, iar cea pentru α 3 în toate adenoamele și majoritatea carcinoamelor, adesea în colocalizare cu LN5. În carcinoamele invazive LN5 produs de celulele acestora, este un component major al membranei bazale celulele folosind complexul integrină α 3 β 1 pentru adeziunea la LN5. [22]

LN și alte relații

Helicobacter pilory este agentul cauzal pentru gastrita cronică, ulcer peptic și malignități gastrice. Au fost descriși un număr de factori de virulență, incluzând câteva azeine, o citotoxină, proteine activatoare a neutrofilelor și proteinelor de legare a matrixului extracelular, precum: colagenul tip IV, laminina și vitronectina. [21]

Grupul de streptococi β aderă la receptorii de suprafață ai celulelor epiteliale, receptori care includ fibronectina și laminina. [39]

A fost determinată și aderența exemplarelor de *Haemophilus influenzae* neîncapsulați, izolați clinic de la bolnavii cu bronșită cronică, la componente distincte imobilizate ale ECM. Exemplarele au putut fi divizate în două grupe: unele care arată un alt nivel de aderență la laminina și colagen tip I, ca și aderență la fibronectină și altele care arată doar un nivel moderat de adeziune la laminine și un nivel scăzut de adeziune la fibronectină. [4]

Legarea *Trypanosoma cruzi* la laminină este amplificată de către galactină 3, lectina ce leagă β -galactozide și este inhibată de lactoză. Galactina 3 se leagă de proteinele de suprafață de 45, 32 și 30 KDa rezultând că ele interacționează cu galactina 3 pentru a crește adeziunea *Trypanosoma* la laminină.

Laminina reprezintă și pentru *Toxoplasma gondii* o punte de legătură între parazit și gazdă. [28]

1. Airene T., Lin Y., Olsson M., Ekblom P., Vainio S., Tryggvason K., *Differential expression of mouse LN $\gamma 2$ and $\gamma 2'$ chain transcripts*, Cell & Tissue Research, 2000 Apr.
2. Amenta P. S., Briggs K., Xu K., Gamboa E., *Type XV collagen in human colonic adenocarcinomas*, Human Pathology 2000 Mar.
3. Aumailley M., Pesch M., Tunggal L., *Altered synthesis of LN1 and absence of basement membrane component deposition in $\beta 1$ integrin – deficient embryoid bodies*, Journal of cell Science. 2000 Jan.
4. Bresser P., Virkola R., *Interaction of clinical isolates of nonencapsulated Haemophilus influenzae with mammalian ECM proteins*, FEMS Immunology & Medical Microbiology 2000 Jun.
5. Castera L., Hartaman D. J., Chapel F., Guettier C., Mall F., Lons T., *Serum LN and type IV collagen are Markers of histologically severe alcoholic hepatitis in patients with cirrhosis*, Journal of hepatology. 32(3): 412- 8, 2000 Mar.
6. Crisera C. A., Kadison A. S., Breslow G. D., Maldonado T. S., Longaker M. T., Gittes G. K., *Expression and role of LN1 in mouse pancreatic organogenesis*, Diabets. 2000 Jun.
7. Fujita J., *Correlation between LN and fn on the basement membrane and tumor progression in early gastric cancer*, Hokkaido Igaku Yasshi - Hokkaido Journal of Medical Science, 2000 Jan.
8. Geberhiwot T., Ingerpuu S., Pedraza C., *Erythromegakaryocytic cells synthesize LN 8*, Experimental Cell Research 2000 Jan. 10
9. Gilcrease M. Z., Niehans G., *Adhesion of aspirated tumor cells to extracellular matrix proteins*, Cancer 2000 Apr.
10. Graner E., Mercadante A. F., Zanata S. M., Forlenza O. V., Cabral A. L., Veiga S. S., Juliano M. A., Roesler R., Walz R., Minetti A., Izquierdo I., Martins V. R., Brentani R. R., *Cellular prion protein binds LN and mediates neuritegenesis*, Brain Research. Molecular Brain Research. 2000 Mar. 10.
11. Haas M., Berndt A., Hyckel P., *LN5 in diseases of the oral cavity*, Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie 2000 Jan.

12. Halfeter W., Dong S., Schurer B., Osanger A., Schneider W., Ruegg M., Cole G. J., *Composition synthesis and assembly of the embryonic chick retinal basal lamina*, *Developmental Biology.*, 2000 Apr. 15.
13. Iwao M., Fukada S., Harada T., Yagita H., *Interaction of merosin (LN2) with very late activation antigen-6*, *Immunology*, 2000 Apr.
14. Kikkawa Y., Sanzen N., Fujiwara H., Sonnenberg A., Sekiguchi K., *Integrin binding specificity of LN 10/11*, *Journal of Cell Science*, 2000 Mar.
15. Korhonen M., Ormio M., Burgeson R. E., Virtanen I., *Unaltered distribution of LN, fn and tenascin in celiac mucosa*, *Journal of histochemistry and cytochemistry*, 2000 Jul.
16. Kortesmaa J., Yurchenco P., Trzggvason K., *Recombinant LN8*, *Journal of Biological Chemistry*, 2000 Mar.
17. Laplantine E., Vallar L., Mann K., *Interaction between the cytodomains of the $\alpha 3$ and $\beta 1$ integrin subunits regulates remodelling of adhesion complexes on LN*, *Journal of Cell Science*, 2000 Apr.
18. Lazarova Z., Hsu R., Yee C., Yancey B. C., *Human anti-LN5 autoantibodies induce subdermal blisters in an experimental human skin graft model*, *Journal of Investigative Dermatology*, 2000 Jan.
19. Leeb T., Neumann S., Deppe A., Breen M., *Genomic organization of the dog dystroglycan gene DAG1 locus*, *Genome Research*, 2000 Mar.
20. Lin L., Daneshvar C., *Evidence for differential signaling human conjunctival epithelial cells adherent to LN isoforms*, *Experimental Eye Research*, 2000 Apr.
21. Ljungh A., *Helicobacter pylori interactions with plasminogen*, *Methods*, 2000 Jun.
22. Lohi J., Oivula J., Kivilacso E., *Basment membrane LN5 is deposited in colorectal adenomas and carcinomas and serves as a ligand for $\alpha 3 \beta 1$ integrin*, *APMIS*, 2000 Mar.
23. Mai J., Waisman D. M., Sloane B. F., *Cell surface complex of cathepsin B/annexin II tetramer in malignant progression*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000 Mar. 7
24. Masaki T., Matsumura K., Saito F., Sunada Y., *Expression of dystroglycan and LN 2 in peripheral nerve under axonal degeneration and regeneration*, *Acta Neuropathologica* 2000 Mar.
25. Miller K. A., Chung J., Lo D., Jones J. C., *Inhibition of LN 5 production in breast epithelial cells by overexpression of p 300*, *Journal of Biological Chemistry*, 2000 Mar. 17
26. Miner J. H., Li C., *Defective glomerulogenesis in the absence of LN $\alpha 5$* , *Developmental Biology*, 2000 Jan. 15
27. Miyagoe-Suzuki Y., Nakagawa M., Takeda S., *Mersin and congenital muscular dystrophy*, *Microscopy Research & Technique*, 2000 Feb.
28. Moody T. N., Ochieng J., Villalta F., *Novel mechanism that Trypanosoma cruzi uses to adhere to ECM mediated by human galectin-3*, *FEBS Lettes*, 2000 Mar.
29. Morla A. O., Mogford J. E., *Control of smooth cell proliferation*, *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2000 May.
30. Mouchles H., Roque R., Carbonetto S., *α dystroglycan isoforms are differentially distributed in adult rat retina*, *Journal of Comparative Neurology*, 2000 May.
31. Nomizu M., Kuratomi Y., Ponce M. L., Song S. Y., Mizoshi K., Otake A., Powell S. K., Hoffinan M. P., Kleinman H. K., Yamada Y., *Cell adhesive sequences in mouse LN $\beta 1$ chain*, *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 2000 Jun. 15.
32. Olivero P., Chassagne C., Salichon N., Corbier A., *Expression of LN $\alpha 2$ chain during normal and pathological growth of myocardium in rat and human*, *Cardiovascular Research*, 2000 May.
33. Pedrosa-Domelof F., Tiger C. F., Virtanen I., *LN chains in developing and adult human miotendinous junction*, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2000 Feb.
34. Pujuguet M., Simian M., Liaw J., Timpl R., *Nidogen-1 regulates LN 1 – dependent mammary – specific gene expression*, *Journal of Cell Science*, 2000 Mar.

35. **Schmehl K., Florian S., Jacobasch G., Salomon A., Korber,** *Deficiency of epithelial basement membrane LN in ulcerative colitis affected human colonic mucosa*, International Journal of Colorectal Disease, 2000 Feb.
36. **Schober S., Mielenz D., Hapke S.,** *The role of extracellular and cytoplasmic splice domains of $\alpha 7$ - integrin in cell adhesion and migration on LN*, Experimental Cell Research, 2000 Mar. 15.
37. **Sorokin L. M., Maley M. A., Moch H., von der Mark H., von der Mark K., Cadalbert L., Karosi S., Davies M. J., McGeachie T. K., Grounds M. D.,** *LN $\alpha 4$ and integrin $\alpha 6$ are upregulated in regenerating *dy/dy* skeletal muscle*, Experimental Cell Research, 2000 May 1.
38. **Sunderland W. J., Son Y. J., Miner J. H., Sanes J. R.,** *The presynaptic calcium channel is part of a transmembrane complex linking a synaptic LN with non-erythroid spectrin*, Journal of Neuroscience, 2000 Feb. 1
39. **Tang D., Goldberg D. J.,** *Bundling of microtubules in the growth cone induced by LN*, Molecular & Cellular Neurosciences, 2000 Mar.
40. **Tamura G. S., Nittayajarn A.,** *Group β streptococci and other gram-positive cocci bind to cytokeratin 8*, Infection & Immunity, 2000 Apr.
41. **Tisi D., Talts J. F., Timpi R., Hohenester E.,** *Structure of the C-terminal LN G-like domain pair of the LN $\alpha 2$ chain*, EMBO Journal, 2000 Apr. 3
42. **Wagner S., Gardner H.,** *Modes of regulation of LN5 production by rat astrocytes*, Neuroscience Letters, 2000 Apr.
43. **Walsh C. M., Fletcher A., Morris A. J.,** *Basement membrane peptides as markers of liver disease in chronic hepatitis C*, Journal of Hepatology, 2000 Feb.
44. **Xu-P., Wang Y. L., Zhu S. J., Luo S. Y.,** *Expression of matrix metalloproteinase -2, -9 and -14, tissue inhibitors of metalloproteinase-1 and matrix proteins in human placenta*, Biology of Reproduction, 2000 Apr.
45. **Zhang C., Duan E., Cao Y., Jiang G., Zeng G.,** *Effect of 32/67 Kda LN-binding protein antibody on mouse embryo implantation*, Journal of Reproduction & Fertility, 2000 May.

VIRUSUL EPSTEIN-BARR (EBV)

Virusul Epstein-Barr (EBV) este un membru al familiei Herpesviridae și unul dintre cele mai comune virusuri umane, foarte mulți indivizi fiind infectați de-a lungul vieții.

Cum a fost descoperit virusul Epstein-Barr (EBV)?

În 1961, un medic chirurg din Uganda, Denis Burkitt, în urma cercetărilor efectuate, a semnalat prezența la copiii africani a unei anumite tumori, cu o anumită distribuție geografică corespunzătoare. Aceste tumori, care afectează 8 din 100.000 copii din Africa și Noua Guinee, sunt cunoscute ca limfomul Burkitt.

În 1964, cercetătorii M. A. Epstein, Y. M. Barr și B. G. Achong au identificat, folosind microscopul electronic, un membru necunoscut al familiei herpesvirusurilor care ulterior a fost denumit virusul Epstein-Barr (EBV).

Morfologia EBV

Morfologia EBV este identică celei a celorlalte herpesvirusuri.

Genomul EBV este linear, de 172kDa, genom care se circularizează în celulele infectate. Secvențele terminale (TR) sunt repetări în tandem de aproximativ 540pb. Un număr variabil de IR (*internal repeats*) de aproximativ 3,1pb leagă o regiune scurtă de regiunea lungă unică. Câteva alte ripituri sunt răspândite în genom. Doi clusteri de ripituri în tandem de 125 și respectiv 102pb prezintă omologie parțială și au aceeași orientare în genom. Fiecare este flancat de o regiune înalt conservată de 1pb. Aceste regiuni duplicate din stânga și din dreapta sunt notate DL și DR și sunt localizate la aproximativ 100pb una de cealaltă în genomul viral.

Întregul genom viral persista în limfocitele aflate în proliferare ca DNA linear integrat și circular închis.

Infecția latentă

Ca și alte herpesvirusuri, EBV persistă în gazdele sale prin capacitatea de a stabili o infecție latentă ce se reactivează periodic.

EBV stabilește infecția latentă ca acid nucleic extracromosomal ce se reproduce singur.

Se cunosc tipurile de latență I, II și III.

Prima forma de latență descoperită a fost **tipul III** în care se exprimă toate antigenele nucleare specificate de EBV (EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C și proteina lider EBNA-LP) și trei proteine latente de membrana (LMP-1, -2A, -2B).

Toate EBNA-urile sunt polimorfe, structura lor fiind diferită de la o specie la alta. Ele sunt codificate de ARNm individuale generate de splicing-ul alternativ al aceluiași transcript lung exprimat de promoterul Bam HI W.

LMP-1 este exprimată de partea stângă, iar LMP-2B este exprimată de partea dreaptă a promotorului bidirecțional din regiunea Bam HI. LMP-2A este codificat de un transcript cu originea într-un promotor separat și care are un prim exon diferit ce nu există în ARNm al LMP-2B.

Această formă de latență a fost descoperită în grupul III de linii celulare din limfomul Burkitt și în linii celulare limfoblastoide transformate de EBV.

Tipul I de latență a fost identificat ulterior în liniile celulare din limfomul Burkitt ce rețin în mod stabil fenotipul original din biopsia tumorală din grupul I și au fost toate pozitive pentru EBNA-1. Acesta este translatat din ARNm cu o îmbinare unică a structurii Bam HI-Q/U/K. Reprezintă singura proteină sintetizată în tipul I de latență. S-a considerat că este dirijată de un promotor din regiunea Bam HI F, ceea ce nu s-a confirmat.

Tipul II de latență se caracterizează prin exprimarea tuturor LMP-urilor și a EBNA1 și este prezent în tumorile non-B (carcinom nazofaringeal, tumori T-celulare, boala Hodgkin).

EBNA-1, LMP-1 și LMP-2 sunt cel mai frecvent observate în celulele B infectate latent și în țesuturile din bolile asociate cu infecția cu EBV. De aici, rezultă rolul lor în persistența infecției latente în replicarea virală și în bolile asociate cu EBV.

Trăsătura comună tuturor tipurilor de latență este transcrierea abundentă de EBER DNA nepoliadenilat, necodificator, cu funcție necunoscută.

Răspunsul sistemului imunitar

EBV produce aproximativ 100 antigene diferite în faza activă a ciclului viral, iar în faza inactivă are doar 10 antigene, printre care și antigenele nucleare EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3 și proteinele membranare LMP (ex. LMP-1).

EBNA-1

Antigenul nuclear 1 al virusului Epstein-Barr (EBNA-1) este singura proteină virală detectabilă, exprimată în limfoamele Burkitt (BL) pozitive, cu genom viral. Studii recente au sugerat că liniile virale cu modificări particulare ale secvenței EBNA-1 sunt, în mod preferențial, asociate cu aceste tumori și astfel, la un pacient, variantele tumorale asociate pot determina „de novo“ o mutantă rară a liniei dominante EBV preexistente.

Au fost supuse analizei liniile virale asociate BL provenite din trei arii geografice diferite (Africa de Est, Europa și Noua Guinee), alături de izolate virale provenite de la donori-control din regiuni corespunzătoare geografic. S-au folosit modificările secvenței în două regiuni separate ale genei EBNA-1 (codonii N-terminali 1 până la 60 și codonii C-terminali de la 460 la 510), pentru a identifica subtipul EBNA-1 pentru fiecare virus. Arii geografice diferite manifestă spectre diferite ale subtipurilor EBNA-1, doar cu o suprapunere limitată între ele; chiar și liniile virale tip II, ce tind a fi mult mai omogene decât tipul I corespunzător, arată diferențe geografice ale locusului EBNA-1. Și mai important este că, în interiorul oricărei arii, subtipurile EBNA-1 asociate BL au fost găsite ca fiind, în general, prevalente în populație. De aceea, nu s-a găsit nici o evidență că geneza limfomului Burkitt implică o selecție pentru liniile EBV cu modificări particulare ale secvenței EBNA-1(1).

Patru promotori - Cp, Wp, Fp și Qp - sunt cunoscuți că participă la transcrierea genetică a antigenului nuclear 1 al virusului Epstein-Barr (EBNA-1) în liniile celulare infectate cu EBV. Promotorii sunt folosiți diferențial în cursul diferitelor faze ale infecției și

în stabilirea stadiilor de latență. Aceasta ridică probleme asupra reglării promotorilor și mecanismelor moleculare ce stau la baza schimbărilor dintre promotori.

Pentru a obține o măsură a activității diferitelor unități transcripționale EBNA-1 în liniile celulare transformate de EBV, cu fenotipuri diferite, probele RNA au fost construite astfel încât să permită detectarea și cuantificarea relativă, prin analiza protejată a RNA-zei, a transcriptelor EBNA-1 inițiate de Fp și Qp și, indirect, de Cp/Wp. Protejarea RNA-zei și metoda PCR au fost realizate cu RNA citoplasmatic din linii de celule limfoide B, în stadii de latență I, II și III și după inducerea ciclului litic al virusului. Experimentele demonstrează că, în plus față de transcriptele EBNA-1 identificate anterior, liniile celulare de toate tipurile de latență conțin diferiți mRNA ce poartă secvențe din EBNA-1 codificatoare ale exonului K. Inducerea ciclului litic al virusului este determinată de nivelele reduse ale transcriptelor "spliced" FpQ/ U/ K. Totuși, a existat o creștere masivă a transcriptelor "spliced" FpQ și FpQ/ U cu secvențe 3' (2).

EBNA-2

Antigenul nuclear 2 al virusului Epstein-Barr (EBNA-2), o proteină implicată în transformarea celulară, interferează cu răspunsul celular la interferonii tip I (IFN-alfa/ beta). Expriarea lui EBNA-2 conduce la activarea transcripțională atât a genelor stimulate endogen, cât și transferate IFN (ISG).

În căutarea unui mecanism molecular pentru inducerea transcripțională a ISG s-a observat o sinteză dependentă de EBNA-2 a IFN-beta ARNm la niveluri scăzute și secreția unor mici cantități de IFN. Un promotor IFN-beta transferat, răspunde la activarea EBNA-2, iar o secvență foarte asemănătoare cu situsul de legare al RBP-j-Kappa a fost evidențiată ca o țintă potențială a activității EBNA-2. EBNA-2 dependent de inducerea transcripțională a promotorului IFN-beta apare în celulele limfoamelor Burkitt EBV-negative, indicând că alte gene EBV nu sunt necesare pentru inducerea sintezei IFN-beta (3).

EBV infectează și transformă in vitro limfocitele B primare. Infecția virală inițiază intrarea în ciclul celular a limfocitelor B rămase neafectate. Menținerea proliferării în celulele infectate este dependentă strict de funcționalitatea lui EBNA-2.

S-a demonstrat că LMP-1 și c-myc sunt direct activate de EBNA-2, indicând astfel că, toți factorii celulari esențiali pentru inducerea acestor gene de către EBNA-2 sunt prezenți în celulele rămase neafectate. Din contră, inducerea reglatorilor ciclici celulari, ciclina D2 și cdk4, sunt evenimente secundare ce necesită sinteze proteice „de novo“ (4).

Proteinele nucleare ale EBV – și anume EBNA-LP și EBNA-2 sunt primele două proteine exprimate în infecția latentă a limfocitelor B primare. EBNA-2 este esențială pentru transformarea limfocitelor și EBNA-LP este cel puțin critică. În timp ce EBNA-2 activează promotori specifici virali și celulari, rolul lui EBNA-LP este încă obscur.

În studiul respectiv s-a demonstrat că EBNA-LP stimulează activarea lui EBNA-2, a promotorului LMP-1 și a elementului reglator transcripțional bidirecțional LMP-1/ LMP-2B. EBNA-LP singură, are doar un efect negativ.

De vreme ce ambele elemente reglatoare virale pot lega proteina celulară RBP-j-Kappa asociată EBNA-2, situsurile de legare consens RBP-j-Kappa au fost poziționate în capătul superior al promotorului timidin-kinază al virusului simplex-herpes tip1 și au fost găsite a fi suficiente pentru coactivarea EBNA-LP și EBNA-2.

Activitatea stimulatorie a EBNA-LP rezidă în repetarea aminoacidului 66 din domeniul amino-terminal. Aminoacidul 45 din capătul carboxi-terminal pare să regleze efectele EBNA-LP. Primii 11 aminoacizi din cei 45 au un efect puternic negativ, în timp ce ultimii 10 sunt critici pentru abilitatea ultimilor 34 de a înlocui efectul negativ. Aceste rezultate arată că rolul critic al EBNA-LP în transformarea creșterii celulare mediata de EBV constă în stimularea (și probabil reglarea) activării transcripționale mediate de EBNA-2 (5).

EBNA-3

EBNA-3 (denumit și EBNA-3A) este una dintre antigenele nucleare codificate de EBV, necesare pentru transformarea celulelor B. Este cunoscută ca țintește RBP, proteine nucleare ce interacționează și ele cu EBNA-2, EBNA-4 și EBNA-6 (6).

Două regiuni ale proteinei EBNA-3A aparținând EBV au fost evidențiate a fi capabile să se lege de proteina celulară RBP-Jk, o componentă a căii de semnalizare Notch.

Modelele curențe pentru EBNA-3 funcțională au afectat reprimarea transcripției prin intermediul legării de RBP-Jk, dar este considerată o schemă alternativă în care rolul legării lui EBNA-3A, -3B și -3C la RBP-Jk este de a tampona nivelurile proteinei EBNA-3 active. Comportarea lui EBNA-3A este modificată de către EBNA-LP, indicând un nivel nou, suplimentar, de interpunere între proteinele EBNA (7).

Familia de gene a antigenului nuclear 3 (EBNA-3, EBNA-4 și EBNA-6) al EBV este importantă pentru EBV ce induce menținerea și supraviețuirea limfocitelor B. Totuși, este foarte puțin ceea ce se știe despre cum este reglată exprimarea acestor gene. Fiecare dintre cele 3 gene constă din doi exoni separați printr-un mic intron. Revers-transcriptaza din metoda PCR relevă că marea majoritate a lor exprimate în celulele B infectate cu EBV reține secvențele intronice. Datele obținute arată că secvențele intronice pot influența exprimarea proteinei EBNA-3 și sugerează că retenția intronului poate furniza un sens pentru exprimarea individuală a familiei de gene EBNA-3 (8).

Pentru a găsi proteine celulare ce se asociază cu EBNA-3 (EBNA-3A), unul din virusurile EBV a fost asociat cu proteine nucleare. Interacțiunea a fost confirmată arătând că o proteină fuzională GST precipită în mod specific EBNA-3 din celulele CV1 infectate cu virus vaccinia recombinat ce exprimă EBNA-3. Regiunea de interacție a fost cartată spre domeniul apical al lui TCP-1 epsilon.

Studiul arată că proteinele mari, transformate prin codificare virală, precum EBNA-3, pot primi ajutor prin plierea lor inițială în complexe Chaperone. Recunoașterea complexului Chaperone apare mult mai probabilă prin intermediul interacției specifice cu una din subunități. Se sugerează că EBNA-3 în devenire, poate recunoaște complexul TCP-1 prin interacțiunea cu regiunea apicală a subunității epsilon (9).

Proteina EBNA-3C este un reglator transcripțional al genelor virale și celulare. Ea poate inhiba transcrierea prin intermediul unei asocieri cu DNA celular legat de proteina J-kappa, funcție pe care o împarte cu EBNA-3B.

În studiul menționat a fost prezentat un mecanism prin care EBNA-3C, în conjuncție cu EBNA-2, poate activa transcrierea de la nivelul promotorului LMP-1 a EBV. O proteină mutantă EBNA-3C incapabilă să lege J-kappa activează transcripția la fel de eficient ca și tipul-sălbatic, EBNA-3 indicând că EBNA-3C poate regla transcripția prin intermediul unui mecanism independent de J-kappa.

În plus, activarea promotorului LMP-1 este o funcție unică a lui EBNA-3C. Elementul DNA prin intermediul căruia EBNA-3C activează promotorul LMP-1 include un situs de legare spi-1/ spi-B. Atât EBNA-2 cât și EBNA-3C sunt necesare pentru transcripția mediată prin intermediul unei regiuni de 41bp a promotorului LMP-1 ce conține situsul de legare spi. (10)

LMP-1

Proteina 1 latent membranară (LMP-1) este o proteină membranară codificată de EBV tip III cu potențial oncogenic și este exprimată mult mai consecvent în diferite afecțiuni asociate EBV. Spre deosebire de multe alte proteine EBV, s-a demonstrat că anticorpii LMP-1 apar rar în cazul unor boli asociate EBV.

Rezultatele obținute în anumite studii au demonstrat că, în opoziție cu noțiunile cunoscute, LMP-1 induce importante răspunsuri imune umorale în cazuri maligne asociate cu EBV, mai ales la pacienți cu carcinom nasofaringeal (NPC), la care un procent mai mare de 70% din ser este pozitiv pentru acești anticorpi, și titrurile lor se corelează cu starea clinică a tumorilor.

Foarte interesant este faptul că anticorpii anti-LMP-1 ai izotipului IgA au fost găsiți doar la pacienți cu NPC. Acești anticorpi erau absenți în serul pacienților cu mononucleoză infecțioasă și infecția cronică cu EBV, în timp ce o mică fracție (aprox. 5%) din indivizii sănătoși EBV sero-pozitivi, erau pozitivi pentru acești anticorpi.

Studiile efectuate au arătat, pentru prima dată, semnificația potențială a anticorpilor LMP-1 în diagnosticarea și prognosticul afecțiunilor asociate EBV, în special NPC (11).

LMP-1 este singura proteină a EBV detectată în carcinomul nasofaringeal (NPC), cancer asociat intim cu EBV.

Studii anterioare in vitro au demonstrat ca LMP-1 poate regla superior receptorul factorului de creștere epidermal (EGFR) în celulele epiteliale. Nu s-a stabilit dacă aceste efecte celulare există în NPC. Pentru a aprecia asocierea dintre LMP-1 și EGFR în țesuturile NPC, 60 specimene NPC au fost examinate imunohistochimic folosind anticorpi anti-LMP-1 (CS 1-4) și anticorpi anti-EGFR (EGFR 1, EGFR 1005). Rezultatele au arătat că 41 specimene au fost imunopozitive pentru LMP-1 și 44 specimene supraexprimau EGFR. În plus, corelarea dintre LMP-1 și EGFR a fost, din punct de vedere statistic, semnificativă. În final, datele au arătat că supraexprimarea acestuia este un fenomen comun în NPC, și că acel EGFR este co-exprimit cu LMP-1 în NPC. Astfel, EBV poate juca un rol în geneza tumorii NPC prin intermediul efectelor LMP-1 și EGFR (12).

Studiile in vitro au arătat că variantele cu delețiile perechilor de baze 30 și 69 ale genei LMP-1 a EBV au o capacitate de transformare mai crescută decât varianta tipului sălbatic.

Mai recent, aceste studii au urmărit analiza in vivo pentru asemenea variante cu potențial oncogenic, în țesuturile limfoide.

Detecția moleculară a variantelor oncogenice ale genei LMP-1 prin biopsia unui nodul limfatic, ca un indicator al agresivității EBV-ului asociat bolii limfoproliferative, trebuie să fie urmărită cu atenție. Frecvența relativ crescută a variantei perechii de baze 69 reflectă, probabil, o incidență diferită a variantelor LMP-1 în populația sănătoasă provenită din arii geografice diferite (13).

Cadrul de citire deschis BNFL-1 al EBV codifică două proteine înrudite, LMP-1 și LMP-1 litică (ly LMP-1). LMP-1 este o proteină latentă necesară pentru imortalizarea celulelor B umane de către EBV, în timp ce ly LMP-1 este exprimată în cursul ciclului litic și este găsită în virionul de EBV. În contrast cu LMP-1, ly LMP-1 este stabilă, cu un timp de

înjumătățire de mai mult de 20 ore în celule B 95-8 tratate cu tetradecanoil forbol acetat și butirat. Deși LMP-1 însuși are efecte neglijabile asupra activității NF-Kappa B, ea inhibă activarea acestuia prin intermediul LMP-1 într-o manieră dependentă de doză.

Modularea LMP-1 ce activează căile de semnalizare este prima activitate biologică identificată, asociată cu LMP-1, activitate ce poate contribui la progresia ciclului litic al EBV (14).

Oncoproteina LMP-1 a EBV este necesară pentru menținerea proliferării celulelor B infectate și prezintă unele caracteristici comune cu CD40, TNF-R1 și receptorii de legătură. Membrii acestei familii pot lega molecule TRAF și TRADD și pot activa NF-kappa B și AP-1 la fel ca și LMP-1. În timp ce CD40 și TNF-R1 sunt dependenți de legarea liganzilor lor pentru semnalizare, LMP-1 în mod aparent, nu este dependentă. LMP-1 se poate comporta ca un lider al proliferării celulare și, de aceea, își limitează propriile sale activități. Această inhibiție a proliferării determinată de LMP-1 nu este mediată de apoptoză, dar rezultă din citostaza a 4 linii celulare testate. Jumătatea structurală a LMP-1 ce o distinge de CD40 și TNF-R1 este reprezentată de segmentele sale amino-terminale, ca și de cele ce strabat membrana (15).

EBV prezintă trei proteine latente membranare (LMP) și anume LMP-1, LMP-2a și LMP-2b - ce sunt exprimate în carcinomul nasofaringeal.

Folosind linii celulare de keratinocite ce exprimă LMP-2a și LMP-2b și coexprimă LMP-1/LMP-2a, s-au analizat modificările morfologice și exprimarea moleculelor de adeziune CAM-1, alfa 2, alfa 3, alfa 5, beta 1 și alfa 6-beta4 integrine, laminina 5, E-cadherina și desmoplakina. Celulele care exprimă LMP-2a sau LMP-2b prezentau deficiențe ale capacității de maturare și progresie spre o stratificare normală scvamoasă, în comparație cu liniile celulare parentale. Celulele care coexprimă LMP-1/LMP-2a au prezentat suplimentar o „pseudoinvazie” în suportul dermic echivalent. A existat o creștere consistentă și dramatică a reglării în exprimarea suprabazală a lamininei 5 și integrinelor alfa 6-beta 4 și beta 1 în liniile celulare ce exprimă LMP. Exprimarea integrinelor alfa 3 și alfa 5 era, de asemenea, puternic reglată în liniile celulare care exprimă LMP, în timp ce alfa 2 a demonstrat o reducere a exprimării lor în stratul bazal normal. Modelele de exprimare a E-cadherinei și desmoplakinei erau neschimbate în esență.

Concluziile privind cele trei tipuri de LMP au fost că, LMP-2a și LMP-2b singure, precum și LMP-1/LMP-2a coexprimate sunt capabile să altereze exprimarea moleculelor de adeziune ale keratinocitelor, consecvent cu carcinomul nasofaringeal (16).

Boli induse de EBV

Mononucleoza infecțioasă

EBV produce mononucleoza infecțioasă, care se mai numește și „boala sărutului” deoarece virusul este transmis prin salivă. În SUA mai mult de 95% dintre adulții de 35-40 ani au fost infectați cu acest virus.

Marea majoritate a indivizilor sunt infectați în copilărie, probabil prin intermediul mamelor, însă infecția nu este vizibilă. Pe de altă parte, populația infectată pentru prima dată în cursul, sau după adolescență, are 50% șanse să facă febra ganglionară.

Simptomele mononucleozei infecțioase sunt febra, dureri de gât, mărirea ganglionilor limfatici.

Afecțiuni ale inimii sau ale SNC sunt rare. De asemenea, infecția activă cu EBV nu duce la pierderea sarcinii și nu provoacă defecte ale nou-născutului.

Deși simptomele mononucleozei infecțioase dispar în 1-2 luni, EBV rămâne dormant sau latent în celulele din gât și sânge pentru tot restul vieții. Periodic, virusul poate fi reactivat și adesea poate fi găsit în saliva persoanelor infectate.

Carcinomul nazofaringeal

Carcinomul nasofaringeal (NPC), intim asociat cu EBV, este o tumoră malignă puternic metastazantă. O activitate importantă în invazia tumorală și metastază o are collagenaza sau gelatinaza tip IV de 92KDa și metaloproteinaza 9 matriceală (MMP-9) ce mediază degradarea membranei bazale și matricea extracelulară. Exprimarea lui MMP-9 s-a demonstrat că este sporită de oncoproteina EBV-LMP-1. LMP-1, ce este exprimată în NPC are două domenii de semnalizare esențiale în capătul carboxil-terminal numite CTAR-1 și CTAR-2.

Studiul a relevat faptul că, fiecare domeniu de semnalizare poate activa promotorul MMP-9 și induce activitatea acesteia; totuși, mutantele cu LMP-1 deletată, lipsite fie de CTAR-1, fie de CTAR-2 au avut o abilitate redusă în inducerea exprimării MMP-9. Deleția ambelor regiuni activate abolește complet inducerea activității MMP-9, în timp ce cotransfecția mutantelor deletate CTAR-1 și CTAR-2 restabilește activitatea MMP-9 la niveluri produse de LMP-1, tipul dominant.

În NPC, LMP-1 poate contribui la invazivitate și metastază prin intermediul inducerii transcripției MMP-9 și activității enzimatice (17).

Serul de la pacienți cu carcinom nasofaringeal arată titruri crescute de anticorpi IgA pentru antigenul capsidal viral Epstein-Barr. Pentru a cerceta care este mai bun pentru diagnosticul NPC, titrarea serului IgA/antigen capsidal viral (VCA) sau EBNA-2, s-au examinat aceleași titruri serice. 16 cazuri de NPC în care titrurile anticorpilor EBNA-2 serici au fost testate, au fost cercetate pentru titrurile anticorpilor IgA/VCA serici înainte și după tratamentul cu radiații. Toate cazurile de NPC au arătat reacții pozitive la o colorare imunofluorescentă indirectă și titrul mediu a fost de 252. 12 cazuri normale, 5 pacienți cu carcinom nasofaringeal, 4 pacienți cu carcinom hipofaringeal, 4 pacienți cu carcinom laringeal și 6 cu limfom malign, au fost de asemenea examinați, dar ei au prezentat titruri negative sau relativ reduse. Un studiu foarte atent a evidențiat că titrurile IgA/VCA și NPC rămân în mare parte stabile.

Aceste rezultate indică o relație strânsă între IgA/VCA și NPC ; totuși, prognoza se corelează mai bine cu titrurile EBNA-2 decât cu cele de IgA/VCA (18).

Maladii limfoproliferative

Infecția celulelor B umane cu EBV este observabilă în activarea ciclului celular și în creșterea celulară. Pentru a interpreta mecanismele prin care EBV activează celula, s-au analizat multe proteine implicate în controlul fazelor G0 și G1 ale ciclului celular, și în reglarea apoptozei. În infecția cu EBV, majoritatea modificărilor incluzând inducția precoce a ciclului D2 sunt dependente de exprimarea genelor EBV, dar o alterare în profilul E2-F4 a fost, în parte, independentă de exprimarea genelor virale.

Analize cantitative au demonstrat o legătură directă temporală între nivelurile proteinelor LMP-1 și NF-kappa B activate în cursul infecției (19).

S-a demonstrat că alfa (v) integrinele joacă un rol important în migrarea celulelor de origine epitelială, în creșterea celulară și invazia tumorală/metastaze; totuși, rolul lor asupra celulelor de origine hematopoietică este mai puțin clar.

EBV, un herpesvirus uman asociat cu câteva afecțiuni limfoproliferative la om, induce exprimarea alfa (v) integrinelor asupra limfocitelor B transformate.

Studiile efectuate au arătat că infecția cu EBV crește subunitățile mRNA-alfa (v), beta 3 și beta 5 integrale, la fel ca și reglarea exprimării proteinei alfa v-beta 3 integrina asupra celulelor B umane. Printre alte 9 proteine EBV diferite, exprimate în celule B infectate tardiv (asociate cu membrana nucleară și plasmatică), doar LMP-1, LMP-2A și EBNA-2 au demonstrat că transactivează selectiv promotorul alfa (v) integralei. Tratamentul celulelor B transformate de EBV cu oligonucleotide antisens alfa (v) reduce în mod specific suprafața celulară de exprimare a alfa (v) integrinelor și inhibă creșterea celulară.

Studiile au arătat că alfa (v) integrinele joacă un rol important în proliferarea limfocitelor B. Strategii de interferare cu exprimarea și/sau funcționarea alfa (v) integralei pot fi de o potențială valoare în tratamentul afecțiunilor limfoproliferative asociate cu EBV (20).

Imunitatea mediată celulară, în special a limfocitelor T citotoxice (CTL), furnizează rezistență la EBV, așa cum s-a demonstrat, din întâmplare, în cazul unui posttransplant într-o boală limfoproliferativă la un pacient imunosupresat. S-au folosit celule dendritice (DC) pentru a obține anti-EBV specific CTL din cultură. DC au fost apoi infectate cu vaccinia recombinat cu EBNA-3A. Infecția cu vaccinia reduce semnificativ viabilitatea DC imature după trei zile de cultură, dar are un efect slab asupra restabilirii celulelor DC mature. Pentru a reduce aceste efecte citopatice și pentru a extinde potențiala utilizare a vectorilor vaccinia în terapia DC la pacienți imunocompromiși, s-au folosit cu succes psoralen și virus inactivat u.v. DC mature încărcate cu virus vaccinia viu sau inactivat pot elimina EBNA-3A specifice CTL. De aceea, DC mature sunt stimulatori puternici ai CTL, iar producții complexului major de histocompatibilitate clasa I pot fi chiar încărcăți cu vaccinia inactivat u.v (21).

Liniile celulare T policlonale specifice pentru proteinele EBV au dovedit eficiență în prevenirea limfoamelor imunoblastice legate de EBV, după transplantarea de măduvă osoasă alogenică.

Pentru a stabili compoziția internă a EBV specific celulelor T ce asigură protecția pacientului, s-a realizat, pentru prima dată, o caracterizare extensivă a 8 linii celulare T citotoxice selectate in vitro împotriva EBV ce afectează linii celulare limfoblastoide autolog transformate. Aceste linii de celule T constau în 50-100 clone distincte ale celulelor T, dintre care 32-96% sunt specifice pentru BLCL autolog. În plus, s-a demonstrat că reactivitățile contra a 5 proteine EBV (BZLF-1, BMLF-1, EBNA-3A, EBNA-3C și LMP-2) acoperă 86% din specificitățile detectate (22).

A fost raportat un caz în care o fetiță de 11 ani, cu o infecție cronică cu EBV, a dezvoltat ulterior un limfom malign la nivelul plămânului. Ea prezenta un număr crescut de limfocite activate v alfa 2, v beta 8, CD3, CD4 și HLADR pozitive (20-30% din totalul limfocitelor) în sângele periferic. Un an mai târziu, ea a dezvoltat un limfom în plămâni, ce era v alfa 2, v beta 8, CD3, CD4, HLADR și IL2R beta-pozitiv. În acea perioadă, populația celulară din sângele periferic a crescut până la 40%, dar nu a existat nici o dovadă a limfomului în măduva osoasă. Hibridizarea in situ a evidențiat că celulele limfomului erau EBER-1 pozitive, dar gp 350/220 și LMP ARNm erau negative. Genomul EBV a fost detectat în tumoră, dar nu și în celulele T periferice.

Aceste rezultate arată că infecția cu EBV a celulelor T clonate, activate, este legată de trecerea de la o boala limfoproliferativă benignă la un limfom malign (23).

Infecția cronică cu EBV activ este manifestată clinic prin persistența unor simptome similare mononucleozei infecțioase sau complicațiilor acesteia, pentru o perioadă de la unu la câțiva ani. Acest sindrom poate include manifestări severe ale bolii și poate fi fatal. Rolul EBV în patogeneza infecției cronice cu EBV activă este încă neclar.

S-au cercetat doi pacienți japonezi cu o severă infecție cronică cu EBV activ, ce ulterior a evoluat în limfom al celulelor T, EBV pozitive. S-a găsit ca pacienții prezentau dovada infecției cu EBV în celulele T, CD4+ din sângele periferic, timp de 19 și respectiv 3 luni înainte ca limfomul T celular să fie diagnosticat. Limfoamele au fost infectate cu EBV

monoclonal și au exprimat gene latente EBNA-1, LMP-1 și LMP-2A aparținând EBV, un model viral latent, cu tipul de latență II. Studii genetice au arătat că virusul detectat în limfomul T nu se distingea de virusul din celulele T- CD4+ din sângele periferic. Aceste studii susțin un rol patogenetic important al infecției celulelor T cu EBV, în infecția cronică cu EBV activ și în limfomul T-EBV pozitiv, ce îi urmează (24).

HTLV-I este cunoscut ca un virus cauzator al leucemiei celulelor T mature (ATL). Câțiva factori adiționali ai infecției cu HTLV-I se presupune că sunt implicați în geneza completă a leucemiei.

S-a observat că HTLV-I infectează celulele T și celulele principale ATL exprimate prin receptor EBV/CD21 la suprafața celulară. De aceea, este posibil ca infecția cu EBV să fie unul din factori. În plus, s-a cercetat această posibilitate în 6 linii celulare T infectate cu HTLV-I și în celulele principale ATL provenite de la 18 pacienți ce prezentau leucemia celulelor T mature. Totuși, nici un genom EBV nu a fost detectat în liniile celulare T și în celulele principale ATL. EBV implicat în limfomul celulelor T are manifestări clinice unice în comparație cu limfoamele celulelor T neimplicând EBV. De aceea, este încă posibil ca un mic grup de pacienți ATL cu manifestări clinice unice să fie asociat cu EBV (25).

Sindromul limfoproliferativ X-linkat

Infecția primară cu EBV determină în mononucleoze infecțioase fatale o creștere cu 70% a procentului de bărbați afectați de sindromul limfoproliferativ X-linkat (XLP). Această boală rară este deseori asociată cu diverse celule NK, deficiențe ale celulelor B și T.

S-au făcut experimente ce testează dacă limfocitele B ale bărbaților afectați, joacă un rol în patogeniza XLP datorată unei susceptibilități reduse la imunitatea mediată de celulele T. Folosind transcrierea inversă în PCR (Polimerase Chain Reaction) și imunohistochimia, a fost detectată în aceste celule B, exprimarea proteinelor virale EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3C, LMP-1 și LMP-2A, ce furnizează ținte pentru celule T citotoxice.

S-a ajuns la concluzia că eșecul sistemului imunitar în eliminarea acestor virusuri ce infectează celulele B în XLP este în mod clar necauzat de un defect specific al celulelor B (26).

EBV și SNC

EBV este implicat în diferite sindroame ale sistemului nervos central (SNC). Receptorul celular major pentru EBV, receptorul complement tip 2 (CR2)-CD21-, este exprimat de diferite linii celulare astrocitare și astrocite fetale umane, sugerând susceptibilitatea lor la infectarea cu EBV.

S-a demonstrat infectarea a doua linii celulare de astrocite, T98 și CB193, la niveluri reduse. Cum infecția a fost mediată de CR2, s-au folosit două linii celulare astrocitare transfecte CR2 stabile (T98 CR2 și CB193 CR2) pentru a obține o infectare mult mai eficientă. S-a monitorizat exprimarea genetică a EBV pentru două luni și s-a observat infecția tranzientă a celulelor T98 și T98 CR2, ca și infecția persistentă a celulelor CB193 și CB193 CR2. O reactivare a ciclului litic a fost obținută în celulele CB193 CR2 prin adăugarea esterilor forbol.

Aceste studii identifică liniile celulare astrocitare ca ținte pentru infecția cu EBV și sugerează că această infecție poate juca un rol în patologia EBV din creier (27).

În opoziție cu limfoamele primare SNC (PCNSL) ce apar la pacienții imuno-competenți, majoritatea celor ce apar la pacienții imunopresesați sunt asociate cu EBV.

Proteinele legate de BCL-2 fie blochează, fie promovează moartea celulară, formând homo- sau heterodimeri cu fiecare în parte. LMP-1, proteină latentă a EBV, s-a demonstrat că

reglează puternic BCL-2 și BCL-XL. Aceste observații sugerează că aceste proteine pot fi implicate în procesul de transformare al celulelor infectate cu EBV.

S-au studiat 23 de cazuri de PCNSL: 12 pacienți erau imunosupresați și 11 erau imunocompetenți. Pentru toate cazurile s-au adunat informații clinice, date histologice și imunofenotipuri, și au fost testate pentru prezența EBV (EBER-1, LMP-1). Proteinele familiei BCL-2 (BCL-2, BCL-X, MCL-1 și BAX), ca și exprimarea p53 au fost studiate imunohistochimic pe suport de parafină. PCNSL la pacienți imunosupresați erau caracterizate prin asocierea cu EBV, necroză și macrofage numeroase. Nu a existat nici o diferență semnificativă între cele două grupuri privind rezultatele metodei. Din contră, PCNSL la pacienții imunosupresați au arătat exprimarea unor nivele crescute de BCL-2, BCL-X și BAX în mai mult de 80% din celulele tumorale. La pacienții imunocompetenți, doar un singur caz a arătat un nivel crescut al exprimării BCL-2 în mai mult de 80% dintre celule, în timp ce BCL-X și BAX erau supraexprimate în două cazuri. În afară de asocierea cu EBV și necroză, PCNSL legate de imunosupresie sunt caracterizate de o supraexprimare a proteinelor legate de BCL-2, dar fără o modificare dramatică a susceptibilității lor pentru apoptoză (28).

Leucemia cronică limfocitară (CLL) se poate transforma, în timp, într-un limfom difuz numit sindromul Richter. Pentru a evalua asocierea infecției EBV cu sindromul Richter, biopsiile și înregistrările clinice a 25 pacienți au fost evaluate retrospectiv pentru prezența EBV, prin colorarea cu imunoperoxidază pentru exprimarea LMP ca și a RNA și DNA aparținând EBV în celule; prin intermediul hibridizării in situ 4 din cei 25 pacienți au prezentat dovada existenței EBV în celulele aceluși limfom difuz, 3 pacienți cu un fenotip B celular au fost găsiți pozitivi pentru LMP, DNA și RNA aparținând EBV, și un pacient cu un fenotip T celular prezenta un RNA aparținând EBV pozitiv, în celulele limfomului. Un pacient ce prezenta EBV în celulele limfomului a fost tratat cu acyclovir ca terapie inițială. Supraviețuirea medie a pacienților EBV pozitivi a fost de trei luni, comparabilă cu cea de 9 luni pentru pacienții EBV negativi, dar această diferență nu a fost statistic semnificativă. Dovada legăturii infecției EBV cu sindromul Richter a fost prezentă la 16% din pacienți și poate fi asociată cu un rezultat nesatisfăcător. Terapia primară cu acyclovir nu pare să fie benefică, alte modalități terapeutice trebuind a fi explorate pentru pacienții cu sindrom Richter EBV pozitivi (29).

În populația sănătoasă, epiteliul oral și faringeal poartă preferențial EBV aparținând unui genotip ce posedă trei copii ale perechii de baze 29 repetate în primul intron al genei BZLF-1, în timp ce sângele periferic, în majoritatea cazurilor, poartă un genotip ce suportă doar două copii.

Nu s-a studiat dacă EBV arată un tropism diferențial în gazdele co-infectate HIV-1, ce sunt inclinate să dezvolte o leucoplakie păroasă orală.

Genotipul EBV predominant în sângele periferic, ca și în limbă, poartă două copii ale BZLF-1 repetate. În controale, deși genotipul BZLF-1 cu două copii a fost detectat exclusiv în sânge, genotipul cu trei copii predomină în limbă. Rezultatele nu pot fi corelate cu genotipul EBV conform mărimii polimorfismelor în genele EBNA-3C sau LMP-1. Secvențele DNA ale tuturor clonelor derivate din BZLF-1, din limba pacienților infectați cu HIV-1 erau identice cu cele din sânge (30).

Adenocarcinomul gastric

Aproximativ 10% din adenocarcinoamele gastrice din lumea întreagă sunt asociate cu EBV uman. Aceste carcinoame, în general nu exprimă LMP-1. Recent, altă gena EBV- BARF-1 s-a descoperit că ar avea capacități de transformare și de menținere a transformării. De aceea,

s-a urmărit exprimarea lui BARF-1 din adenocarcinoamele gastrice purtătoare de EBV în legătură cu exprimarea altor transcripse EBV latente.

Din cele 132 adenocarcinoame gastrice, 10 erau pozitive pentru EBV (folosind EBER ½ – RNA în hibridizarea în situ). Transcrierea genei BARF-1 s-a evidențiat în 9 adenocarcinoame gastrice purtătoare de EBV, folosind secvența acidului nucleic specifică BARF-1- bazată pe metoda amplificării. În plus, s-au detectat și alte transcripse EBV latente (ex: BARF-0, LMP-2A și Q/K). Nici o exprimare a LMP-1, EBNA-2 (fie la nivel transcripțional, fie la nivel proteic) nu a fost găsită. În plus, două cazuri au fost identificate pozitiv pentru transcripsele BARF-1, omologul bcl-2 viral. Astfel, împreună cu transcrierea BARF-1, un tip latent de EBV, unic și distinct, a fost găsit în adenocarcinoamele gastrice asociate cu EBV. Pentru că BARF-1 exercită efecte de menținere asupra celulelor epiteliale umane, in vitro, și în adenocarcinoamele gastrice purtătoare de EBV lipsite de exprimarea lui LMP-1, gena BARF-1 se poate comporta ca oncogenă virală în carcinoamele gastrice purtătoare de EBV. Gena BARF-1 oferă o cale alternativă pentru oncogeneza mediată de EBV, alta decât LMP-1 (31).

Deleția perechii de baze 30 din domeniul carboxil-terminal citoplasmic al genei LMP-1 a fost analizată în 37 de țesuturi înghețate, provenite de la pacienți cu EBV și cancer gastric. Deleția perechii de baze 30 a fost identificată în 33 din 36 cazuri de EBV legat de cancerul gastric (91,7%). Într-un caz de cancer gastric, o deleție adițională a perechii de baze 9 a fost identificată aval de deleția perechii de baze 30. Deși deleția și mutațiile unei singure baze a genei LMP-1 în cancere gastrice erau similare cu cele ale carcinomului nasofaringeal în Taiwan și China, mai multe mutații ale unei singure baze au fost găsite în sudul Japoniei (32).

Boala Hodgkin

Boala clasică Hodgkin (HD) este asociată cu infecția cu EBV. Deși în țările dezvoltate EBV poate fi evidențiat în celulele Hodgkin-Reed-Sternberg (HRS) în proporție de până la 95% din cazurile de HD, în țările industrializate, doar aproximativ 50% din cazurile de HD sunt asociate cu EBV.

O întrebare rămâne deschisă: dacă EBV în cazurile EBV-negative a scăpat detectării prin procedurile standard de screening datorită delețiilor din genomul viral asociate cu integrarea unor fragmente virale în genomul celulei gazdă. În urma numeroaselor experimente s-a ajuns la concluzia că nu există nici o evidență pentru prezența fragmentelor de genom viral integrate în genomul celulei gazdă, în cazurile LMP-1 negative. În plus, în cazurile LMP-1 pozitive, nici o deleție importantă din genomul viral nu a fost detectată.

Aceste rezultate arată că în HD, cazurile LMP-1 negative nu conțin DNA aparținând EBV în celule HRS. Mai rămâne de stabilit dacă, în aceste cazuri, un virus încă necunoscut contribuie la transformarea și menținerea fenotipului malign (33).

Depinzând de zona geografică și de vârsta pacientului, boala Hodgkin este asociată cu EBV, de cele mai multe ori cu tipul A de EBV în 20% până la 100% din cazuri. Prevalența cea mai crescută apare la copii din țările în curs de dezvoltare.

Analizele moleculare ale oncogenei ce codifică LMP-1 relevă o deleție a perechii de baze 30, într-o creștere a procentului la 46% a cazurilor de HD- EBV pozitive. S-a investigat prezența EBV într-o serie de HD mexicane și țesuturi limfoide reactive, la un spital privat și unul public, punându-se accent special asupra prevalenței deleției perechii de baze 30 și asupra tipului de EBV. Analiza moleculară a configurației genetice a LMP-1 a fost realizată prin intermediul PCR.

Rezultatele obținute sugerează că infecția cu EBV contribuie la patogeniza majorității cazurilor de boală Hodgkin din Mexic. Rolul specific tumorigenic al variantei LMP-1 deletate

este evident; totuși, este îndoielnică frecvența ei crescută în leziunile non-neoplazice. Mai mult, tipul B de infecție apare frecvent în HD mexicane și în țesutul limfoid reactiv, și este consecvent asociat cu tipul deleției evidențiind rolul patogen al acestui genotip combinat (34).

EBV și herpesvirusul-8-uman-HHV-8- asociat sarcomului Kaposi, sunt gamaherpes-virusuri asociate cu numeroase limfoame și boli proliferative umane. S-au realizat modele de exprimare a proteinelor litice și specific latente din genomul EBV în două linii celulare ale limfomului de bază din cavitățile corpului, BC-1 și BC-2, ce erau coinfectate cu EBV și HHV-8. Liniile celulare co-infectate sunt comparate cu două linii celulare individuale, infectate cu HHV-8 pentru a determina dacă anticorpii față de proteinele specifice EBV interacționează cu antigenele HHV-8. Toate liniile celulare infectate cu HHV-8 exprimă antigenul nuclear LANA. În toate liniile celulare infectate cu EBV sau EBV și HHV-8, serul uman cu anticorpi față de antigenele KSHV recunosc antigene virale specifice de aproximativ 110KDa și 41-42KDa, sugerând că anticorpii umani față de antigenele specifice HHV-8 pot reacționa cu antigene EBV similare. De aceea, aceste date sugerează că modelul EBV exprimat genetic în liniile celulare co-infectate este un model de tipul II de latență, observat și în alte tumori umane, incluzând carcinomul nasofaringeal și limfomul Hodgkin.

Acest model distinct de exprimare genetică litică și latentă în aceste linii celulare poate furniza dovezi în ceea ce privește selectarea pentru co-infecție, în limfoame ale cavității corpului, la gazde imunocompromise (35).

În căutarea unui vaccin

Ca și în cazul celor mai multe virusuri, cea mai bună cale de apărare contra EBV este vaccinarea. Și totuși, un vaccin nu este definitiv, pentru că, în parte, virusul eludează sistemul imunitar.

Pentru a preveni limfomul Burkitt sau carcinomul nasofaringeal, un vaccin trebuie să furnizeze o imunitate 100% sau să fie capabil să stabilească o populație de celule T ce recunoaște EBNA-1. Ambele abordări sunt extrem de dificile. Este posibil totuși, să se producă un vaccin contra febrei ganglionare și posttransplantului unei boli limfoproliferative, de vreme ce ambele produc antigene ce sunt recunoscute de celulele T.

De câțiva ani cercetătorii australieni s-au angajat într-un proiect în vederea producerii unui astfel de vaccin. Ei folosesc un vaccin prototip pe voluntari umani.

Unul din primii pași în apariția unui vaccin este de a defini antigenele virale ce sunt esențiale în controlul imunitar al acestuia. Antigenele stimulează fabricarea celulelor T: dacă ele – sau părțile lor cele mai importante – pot fi introduse artificial într-un individ, atunci sistemul imunitar poate fi eludat pentru a produce celule T ce vor recunoaște antigenul real în cazul în care infecția apare.

Cercetătorii au produs o peptidă identică cu o parte a antigenului EBNA-3 a EBV, peptidă ce constituie baza noului vaccin: prin injectarea acesteia la pacienți, cercetătorii speră să „inarmeze” organismul cu celule T în vederea unei invazii a unei boli reale.

O fază a procesului a fost deja încheiată; cercetătorii sunt încrezători că vaccinul nu va avea efecte dăunătoare asupra pacienților. Următoarea fază, ce este pe cale să se desfășoare, va determina eficiența vaccinului în prevenirea bolilor produse de virus.

Se fac încercări pentru a crește și extinde culturile de celule T în laborator în ideea vindecării diverselor cancere induse de forme variate de EBV. Această abordare poate fi folosită, în particular, la tratarea pacienților ce suferă în urma unui post-transplant în cazul unei boli limfoproliferative.

1. Habeshaw G., Yao Q. Y., Bell A. I., Morton D., Rickinson A. B., *Epstein Barr virus nuclear antigen 1 sequences in endemic and sporadic Burkitt's lymphoma reflect virus strains prevalent in different geographic areas*, Journal of Virology, 73 (2): 965-75, 1999.
2. Zetterberg H., Stenglein M., Jansson A., Ricksten A., Rymo L., *Relative levels of EBNA 1 gene transcripts from the C/W, F and Q promoters in Epstein-Barr virus-transformed lymphoid cells in latent and lytic stages of infection*, Journal of General Virology, 80 (Pt 2): 457-66, 1999.
3. Kanda K., Kempes B., Bornkamm G. W., Von Gabain A., Decker T., *The Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA 2) a protein required for B lymphocyte immortalization, induces the synthesis of type I interferon in Burkitt's lymphoma cell lines*, Biological Chemistry, 380 (2): 213-21, 1999.
4. Kaiser C., Laux G., Eick D., Jochner N., Bornkamm G. W., Kempkes B., *The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2*, Journal of Virology, 73 (5): 4481-4, 1999.
5. Harada S., Kieff E., *Epstein-Barr virus nuclear protein LP stimulates EBNA-2 acidic domain-mediated transcriptional activation*, Journal of Virology, 71 (9): 6611-8, 1997.
6. Kashuba E., Kashuba V., Pokrovskaja K., Klein G., Szekely L., *Epstein-Barr virus encoded nuclear protein EBNA-3 binds XAP-2, a protein associated with Hepatitis B virus X antigen*, 19 (14): 1801-6, 2000.
7. Cludts I., Farrell P. J., *Multiple functions within the Epstein-Barr virus EBNA-3A protein*, Journal of Virology, 72 (3): 1862-9, 1998.
8. Kienzle N., Young D. B., Liaskon D., Buck M., Greco S., Sculley T. B., *Intron retention may regulate expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen 3 family genes*, Journal of Virology, 73 (2): 1195-204, 1999.
9. Kashuba E., Pokrovskaya K., Klein G., Szekely L., *Epstein-Barr virus encoded nuclear protein EBNA-3 interacts with the epsilon-subunit of the T-complex protein 1 chaperonin complex*, Journal of Human Virology, 2 (1): 33-7, 1999.
10. Zhao B., Sample C. E., *Epstein-Barr virus nuclear antigen 3 C activates the latent membrane protein 1 promoter in the presence of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 through sequences encompassing an spi-1/Spi-B binding site*, Journal of Virology, 74 (11): 5151-60, 2000.
11. Xu J., Ahmad A., D'Addario M., Knafo L., Jones J. F., Prasad U., Dolcetti R., Vaccher E., Menezes J., *Analysis and significance of anti-latent membrane protein-1 antibodies in the sera of patients with EBV-associated diseases*, Journal of Immunology, 164 (5): 2815-22, 2000.
12. Sheen T. S., Huanq Y. T., Chang Y. L., Ko J. Y., Wu C. S., Yu Y. C., Tsai C. H., Hsu M. M., *Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 co-expresses with epidermal growth factor receptor in nasopharyngeal carcinoma*, Japanese Journal of Cancer Research, 90 (12): 1285-92, 1999.
13. Barozzi P., Luppi M., Cagossi K., Maiorana A., Marasca R., Artusi T., Poggi S., Pileri S. A., Torelli G., *The oncogenic 30 and 69 bp deletion variants of the EBV LMP-1 gene are common in HIV-negative lymphoproliferations, both malignant and benign*, Annals of Oncology, 10 (4): 467-9, 1999.
14. Erickson K. D., Martin J. M., *The late lytic LMP-1 protein of Epstein-Barr virus can negatively regulate LMP-1 signaling*, Journal of Virology, 74 (2): 1057-60, 2000.
15. Kaykas A., Sugden B., *The amino-terminus and membrane-spanning domains of LMP-1 inhibit cell proliferation*, Oncogene, 19 (11): 1400-10, 2000.
16. Farwell D. G., McDougall J. K., Coltera M. D., *Expression of Epstein-Barr virus latent membrane proteins leads to changes in keratinocyte cell adhesion*, Annals of Otolaryngology & Laryngology, 108 (9): 851-9, 1999.
17. Takeshita H., Yoshizaki T., Miller W. E., Sato H., Furukawa M., Pagano J. S., Raab-Traub N., *Matrix metalloproteinase 9 expression is induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 C-terminal activation regions 1 and 2*, Journal of Virology, 73 (7): 5548-55, 1999.
18. Shimakage M., Dezawa T., Chatani M., *Proper use of serum antibody titres against Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma: Ig A/ virus capsid antigen for diagnosis and EBV-related nuclear antigen-2 for follow-up*, Acta Oto-Laryngologica, 120 (1): 100-4, 2000.

19. Spender L. C., Cannel E. J., Hollyoake M., Wensing B., Gawn J. M., Brimmell M., Packham G., Farrell P. J., *Control of cell cycle entry and apoptosis in B lymphocytes infected by Epstein-Barr virus*, Journal of Virology, 73 (6): 4678-88, 1999.
20. Huang S., Stupack D., Liu A., Cheresch D., Nemerow G. R., *Cell growth and matrix invasion of EBV-immortalized human B lymphocytes is regulated by expression of alpha (V) integrins*, Oncogene, 19 (15): 1915-23, 2000.
21. Subklewe M., Chahroudi A., Schalyohn A., Kurilla M. G., Bhardway N., Steinman R. M., *Induction of Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses using dendritic cells pulsed with EBNA-3A peptides or UV-inactivated, recombinant EBNA-3A vaccinia virus*, Blood., 94 (4): 1372-81, 1999.
22. Ibisch C., Saulquin X., Gallot G., Vivien R., Ferrand C., Tiberghien P., Houssaint E., Vie H., *The T cell repertoire selected in vitro against EBV: diversity, specificity, and improved purification through early IL-2 receptor alpha-chain (CD25)-positive selection*, Journal of Immunology, 164 (9): 49240-32, 2000.
23. Nagasawa M., Hirai K., Mizutani S., Okawa H., Yata J., *EBV infection induced transformation of benign T lymphoproliferative state in patient with chronic active EBV infection into malignant lymphoma: implication of EBV infection as additive oncogenic factor in tumorigenesis*, Leukemia Research, 23 (11): 1071-8, 1999.
24. Kanegane H., Miyawaki T., Yachie A., Oh-Ishi T., Bhatia K., Tosato G., *Development of EBV-positive T-cell lymphoma following infection of peripheral blood T cells with EBV*, Leukemia & Lymphoma, 34 (5-6): 603-7, 1999.
25. Ohtsubo H., Arima N., Tei C., *Epstein-Barr virus (EBV) involvement in T-cell malignancy: significance in adult T-cell leukemia*, Leukemia & Lymphoma, 33 (5-6): 451-8, 1999.
26. Jager M., Benninger-Doring G., Prang N., Sylla B. S., Laumbacher B., Wank R., Wolf H., Schwarzmann F., *Epstein-Barr virus-infected B cells of males with the X-linked lymphoproliferative syndrome stimulate and are susceptible to T-cell-mediated lysis*, International Journal of Cancer, 76 (5): 694-701, 1998.
27. Menet A., Speth C., Larcher C., Prodinge W. M., Schwendinger M. G., Chan P., Jager M., Schwarzmann F., Recheis H., Fontaine M., Dierich M. P., *Epstein-Barr virus infection of human astrocyte cell lines*, Journal of Virology, 73 (9): 7722-33, 1999.
28. Camilleri-Broet S., Camparo P., Mokhtari K., Xuan K. H., Martin A., Arborio M., Hauw J. J., Raphael M., *Overexpression of BCL-2, BCL-X and BAX in primary central nervous system lymphomas that occur in immunosuppressed patients*, Modern Pathology, 13 (2): 158-65, 2000.
29. Ansell S. M., Li C. Y., Lloyd R. V., Phyliky R. L., *Epstein-Barr virus infection in Richter's transformation*, American Journal of Hematology, 60 (2): 99-104, 1999.
30. Triantos D., Leao J. C., Porter S. R., Scully C. M., Teo C. G., *Tissue distribution of Epstein-Barr virus genotypes in hosts coinfecting by HIV*, AIDS, 12 (16): 2141-6, 1998.
31. Zur Hausen A., Brink A. A., Craanen M. E., Middeldorp J. M., Meiyer C. J., Van der Brule A. J., *Unique transcription pattern of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-carrying gastric adenocarcinomas: expression of the transforming BARF 1 gene*, Cancer Research, 60 (10): 2745-8, 2000.
32. Mori S., Itoh T., Tokunaga M., Eizuru Y., *Deletions and single-base mutations within the carboxy-terminal region of the latent membrane protein 1 oncogene in Epstein-Barr virus-related gastric cancers of southern Japan*, Journal of Medical Virology, 57 (2): 152-8, 1999.
33. Staratschek-Jox A., Kotkowski S., Belge G., Rudiger T., Bullerdiek J., Diehl V., Wolf J., *Detection of Epstein-Barr virus in Hodgkin-Reed Sternberg cells-no evidence for the persistence of integrated viral fragments in latent membrane protein-1 (Lmp-1)-negative classical Hodgkin disease*, American Journal of Pathology, 156 (1): 209-16, 2000.
34. Dirnhofer S., Angeles-Angeles A., Ortiz-Hidalgo C., Reyes E., Gredler E., Krugmann J., Fend F., Quintanilla-Martinez L., *High prevalence of a 30bp deletion in the Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 1 gene and of strain type B EBV in Mexican classical Hodgkin's disease and reactive lymphoid tissue*, Human Pathology, 30 (7): 781-7, 1999.
35. Callahan J., Pai S., Cotter M., Robertson E. S., *Distinct patterns of viral antigen expression in Epstein-Barr virus and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus coinfecting body-cavity-based lymphoma cell lines: potential switches in latent gene expression due to coinfection*, Virology, 262 (1): 18-30, 1999.

VERIFICAT
2007

VERIFICAT
2017

BIBLIOTECA CENTRALA
UNIVERSITARA „CAROL I”



DE SPIRITU ET ANIMA

DATA RESTITUIRII

22 FEB. 2004		
15 IAN. 2006		
22 IAN. 2005		
16 FEB. 2005		
5 IAN. 2007		

120 000

ISBN 973-575-797-4

Lei 120000