

REVIEWS

Adv Clin Exp Med 2006, 15, 6, 1139–1147
ISSN 1230-025X

© Copyright by Silesian Piasts
University of Medicine in Wrocław

MARCIN WÓJTOWICZ

Fibronectin and Its Fragments in Health and Disease

Fibronektyna i jej fragmenty w zdrowiu i chorobie

Chair and Department of Chemistry and Immunochemistry, Silesian Piasts University of Medicine, Wrocław, Poland

Streszczenie

Fibronektyna (FN) jest glikoproteiną adhezyjną powszechnie występującą w ludzkim organizmie. Obserwacje dotyczące roli tego białka w procesach zapalnych oraz mechanizmów prowadzących do jej fragmentacji pozwoliły wykazać istniejącą zależność między obecnością fragmentów fibronektyny a niektórymi chorobami, głównie o etiologii zapalnej. Zależności tego rodzaju odnoszą się w znacznym stopniu do patologii dotyczących tkanki łącznej. Ponieważ procesy chorobowe nie zachodzą w tkankach w sposób izolowany i nie pozostają bez wpływu na otaczające struktury tkankowe, możliwe jest odnalezienie fragmentów zdegradowanej fibronektyny, które poddane analizie jakościowej stanowiłyby marker pomocny w diagnozowaniu i monitorowaniu chorób. W artykule omówiono przykłady kilku jednostek chorobowych, którym towarzyszyło pojawienie się fragmentów fibronektyny (FNf): zapalenie włókniste płuc, zmiany patologiczne w obrębie stawów, niepłodność, nowotwory, choroba niedokrwienna serca, choroby dziąseł oraz zapalenie kłębuszków nerek (*Adv Clin Exp Med 2006, 15, 6, 1139–1147*).

Słowa kluczowe: fibronektyna, fragmenty fibronektyny, procesy chorobowe.

Abstract

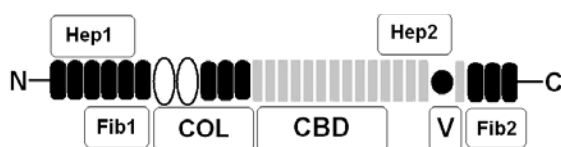
Fibronectin (FN) is a widespread glycoprotein of a human organism. A number of investigations on fibronectin, mainly in inflammatory processes, with emphasis on its degradation process and presence of fibronectin fragments, showed association between the presence of fibronectin fragments and inflammatory diseases related mainly to the pathologies of connective tissue. Considering the fact, that diseases affect a specific type of tissue with adjacent tissues, finding the specific fragments of degraded fibronectin is possible. Recognized fragments could be useful markers for disease diagnosis and monitoring. In this article few examples of diseases related to the presence of fibronectin fragments (FNf) were shown: pulmonitis, arthritis, infertility, tumors, ischaemic disease, gingivitis and glomerulonephritis (*Adv Clin Exp Med 2006, 15, 6, 1139–1147*).

Key words: fibronectin, fibronectin fragments, diseases.

Fibronektyna ludzka (FN), powszechnie obecna na powierzchni komórek, w macierzy wewnątrz- i zewnątrzkomórkowej różnych typów tkanki łącznej oraz w płynach biologicznych organizmu, jest białkiem względnie konserwatywnym o budowie mozaikowej. Podstawowa jednostka FN jest dimerem zbudowanym z podobnych lub identycznych podjednostek. Oba protomery FN są połączone wiązaniami dwusiarczkowymi na C-końcach łańcuchów białkowych. Wielkość masy cząsteczkowej podjednostek oscyluje w granicach 220–250 kDa. Każdy z monomerów jest wynikiem ekspresji tylko jednego genu kodującego to białko, różnice w masach cząsteczkowych natomiast wynikają z obecności lub braku ekspresji

regionów zmiennych oraz stopnia glikozytacji. FN jest zarówno N-, jak i O-glikoproteiną. W zależności od pochodzenia i lokalizacji FN odsetek cukrowców stanowi 4–9% masy cząsteczkowej FN [1, 2].

FN charakteryzuje się zdolnością do polimeryzacji, co przejawia się występowaniem obok monomerów i dimerów tego białka również form oligo- i polimerycznych. W organizmie ludzkim FN istnieje w formie rozpuszczalnej (dimerycznej), obecnej w osoczu, produkowanej głównie przez hepatocyty oraz w formie nierozpuszczalnej (oligo- lub polimerycznej), powszechnej w macierzy zewnątrzkomórkowej i obecnej na powierzchni komórek, wytwarzanej przez szerokie spektrum



Ryc. 1. Schemat budowy monomeru FN.

Moduły typu I przedstawiono za pomocą czarnych owali, moduły typu II obrazują białe owale, moduły typu III przedstawiają szare prostokąty, czarne koło symbolizuje segment zmienny V. Skróty: N – N-końiec, Hep1, Hep2 – domeny wiążące heparynę, Fib1, Fib2 – domeny wiążące fibrynę, COL – domena wiążąca kolagen, CBD – domena wiążąca komórki, V – rejon zmienny, C – C-końiec

Fig. 1. Picture of fibronectin monomer.

Type I modules are black filled ovals, type II module are white filled ovals, type II modules are gray rectangles, black circle shows V segment. Abbreviations: N – N-end, Hep1, Hep2 – heparin-binding domains, Fib1, Fib2 – fibrin-binding domains, COL – collagen-binding domain, CBD – cell-binding domain, V – variable segment, C – C-end

komórek, takich jak: chondrocyty, makrofagi, fibroblasty, komórki śródbłonka i niektóre komórki nabłonkowe [1].

Specyficzną cechą budowy FN jest obecność powtórzeń homologicznych sekwencji aminokwasów budujących cząsteczkę tego białka. Noszą one miano modułów i występują w trzech odmianach (ryc. 1). Moduł typu I o długości około 45 aminokwasów występuje na N- i C-końcu cząsteczki. Tworzą go dwie antyrównoległe struktury β ponad trzema antyrównoległymi strukturami β , połączone dwoma wiązaniami S–S. Moduł typu II, zbudowany z około 60 reszt tworzą dwie antyrównoległe struktury β umieszczone ponad dwiema antyrównoległymi strukturami β i połączone dwoma wiązaniami dwusiarczkowymi. Moduł typu III ma długość około 60 aminokwasów. Tworzą go cztery antyrównoległe struktury β ponad trzema antyrównoległymi strukturami β pozbawione wiązań dwusiarczkowych. Kombinacje wyżej wymienionych sekwencji modułów I–III tworzą funkcjonalne domeny cząsteczki FN: wiążącą komórki (CBD – *cell-binding domain*), dwie domeny wiążące heparynę (Hep1, Hep2), dwie domeny wiążące fibrynę (Fib1, Fib2) oraz jedną wiążącą kolagen. Niezależnie od umiejscowienia w tkankach lub komórkach, cząsteczki FN powielają w znacznym stopniu podany powyżej schemat budowy [2].

Znanych jest około 20 izoform FN występujących w organizmie ludzkim. U podłoża występowania izoform leżą różnice w sekwencji oraz glikozylacji białka. Różnice w sekwencji aminokwasów budujących łańcuch białka dotyczą w znacznym stopniu odcinków pozostających poza obrębem wymienionych powyżej funkcjonal-

nych domen. Dodatkowo, różnice w budowie łańcuchów są efektem molekularnego składania (*alternative splicing*) mRNA w obrębie sekwencji jednego genu [3]. Różnorodność form FN warunkuje również istnienie przynajmniej trzech zidentyfikowanych miejsc zmiennych. Dwa z nich występują między 7 a 8 i 11 a 12 modułem typu III nazywanych domenami dodatkowymi (ED – *extra domains*) odpowiednio typu ED-A oraz ED-B. Trzecia domena, określana jako zmienny region V (*variable*), jest zlokalizowana między modułem 14 a 15 typu III. Domena V różni się od dwóch pierwszych bardziej skomplikowanym mechanizmem molekularnego składania mRNA, który warunkuje ekspresję kilkunastu różnych typów fibronektyny [1, 4]. Obecność dodatkowych domen dotyczy tylko jednego z łańcuchów formujących dimer [5].

Fragmentacja fibronektyny

Istotną właściwością FN jest podatność na fragmentację w miejscach łączących domeny przy zachowaniu względnej oporności na proteolizę w obrębie sekwencji domen. Szczególnie wrażliwa jest FN na czynniki termiczne oraz proteolizę indukowaną enzymami z grupy proteaz serynowych uczestniczącymi w kaskadzie enzymatycznej procesów zapalnych oraz apoptozie [6]. Ekspozycja FN na działanie wysokich temperatur lub na enzymy z grupy proteaz ujawnia znaczącą niestabilność tego białka. Potwierdza to wiele doświadczeń, w których natywną FN poddawano działaniu rozmaitych czynników degradujących, jakimi były: temperatura, enzymy, zmiana pH, czynniki chemiczne [7].

Miekką [7] oceniał stopień fragmentacji natywnej FN na podstawie intensywności pasm fragmentów FN (FNf) uzyskanych w elektroforezie żelowej. W temperaturze 60°C fibronektyna wykazywała stabilność, pierwsze oznaki fragmentacji natomiast były widoczne w temperaturze 70°C. Wraz ze wzrostem temperatury obserwowano zmniejszenie intensywności pasma o masie cząsteczkowej 225 kDa odpowiadającego masie monomeru natywnej FN, a intensywność nowo powstałych pasm pofragmentowanej cząsteczki wzrastała wraz ze zwiększeniem temperatury [7]. W zestawieniu z degradacją termiczną enzymy z grupy proteaz charakteryzują się bardziej precyzyjnym i powtarzalnym rezultatem fragmentacji FN. Ograniczona proteoliza pozwoliła na ujawnienie FNf o aktywnościach niewykazywanych dotychczas przez natywną cząsteczkę FN. Inkubacja nienaruszonej FN z różnymi enzymami z grupy proteaz (stromelizyna, kolagenaza) powodo-

wała powstawanie fragmentów o zbliżonej masie cząsteczkowej, wykazujących aktywności poszczególnych funkcjonalnych domen. Zarejestrowano obecność czterech fragmentów o masach: 1) 50–80 kDa odpowiadających funkcjonalnie połączonym domenom Fib1 oraz wiążącej kolagen; 2) 40–70 kDa zawierających połączone domeny wiążące heparynę oraz Fib2, 3) 17–30 kDa odpowiadających Fib2 oraz 4) 120 kDa, czyli domeny wiążącej komórki [8].

Interesująca wydaje się obecność swego rodzaju dodatkiego sprzężenia zwrotnego. Powstające FNf towarzyszące niektórym procesom chorobowym są czynnikami „napędzającymi” dalszy rozpad elementów budujących macierz zewnątrzkomórkową, w tym i samej FN. W warunkach zapalenia lub nasilenia procesów proteolitycznych można otrzymać „pełne” i „funkcjonalne” FNf zawierające odpowiednie domeny, jakkolwiek mogą one wykazywać zupełnie inny typ aktywności funkcjonalnej w zestawieniu z właściwościami fizykochemicznymi nienaruszonej cząsteczki FN [9].

Charakterystyka fragmentów FN

Fragmenty FN pochodzące z domeny wiążącej komórki

Domena wiążąca komórki (CBD) jest zbudowana z pierwszych jedenastu modułów typu III. Jest największą funkcjonalną domeną FN odpowiadającą za interakcję z powierzchnią komórek. Masa cząsteczkowa tej domeny FN wynosi w przybliżeniu 120 kDa [9].

O kluczowej właściwości nienaruszonej domeny CBD decyduje sekwencja RGD, zlokalizowana w dziesiątym module typu III. Zapewnia ona efektywne wiązanie z integrzynami – głównie $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ oraz $\alpha_v\beta_3$ -obecnymi na powierzchni większości komórek. Nie jest to jedyny typ sekwencji odpowiedzialny za integrację z komórką [10]. Sekwencją wzmacniającą jest kombinacja aminokwasów PHSRN znajdująca się w dziewiątym module typu III [11, 13]. Domena CBD charakteryzuje się wyższą od pozostałych domen podatnością na degradację. W wyniku degradacji proteolitycznej lub termicznej są produkowane fragmenty o zidentyfikowanych masach. O ile jednak segmenty o masie 110 kDa oraz mniejszej są w większym stopniu charakterystyczne dla agresywnej proteolizy, o tyle wysokie temperatury są raczej odpowiedzialne za powstawanie FNf o masach powyżej 110 kDa [6]. Okazało się, że fragmenty CBD o masie cząsteczkowej powyżej 75 kDa wykazywały równe w zestawieniu z nienaruszoną FN po-

winowactwo do integrzyn. Potwierdziły to doświadczenia z domeną CBD i jej fragmentami o masach cząsteczkowych 110, 70 i 45 kDa, w których tylko obecność sekwencji RGD gwarantowała adhezję. FNf zawierające sekwencję RGD o masie cząsteczkowej około 11,5 kDa oraz syntetyczne peptydy charakteryzowały się spadkiem powinowactwa (20-, a nawet 100-krotnym) do powierzchni komórek [11].

Wyzolowana domena wiążąca komórki o masie 120 kDa wykazuje silne właściwości chemotaktyczne w stosunku do makrofagów. Jest też czynnikiem aktywującym przebudowę nabłonka przewodów gruczołu mlecznego. Obecność fragmentów CBD stwierdzono w płynach biologicznych u osób ze schorzeniami o etiologii zapalnej przebiegającymi w obrębie tkanki łącznej [14].

Fragmenty FN pochodzące z domeny oddziaływujących z macierzą zewnątrzkomórkową

Fragmenty domeny wiążącej fibrynę

W skład domen wiążących fibrynę wchodzi dwa odcinki Fib1 i Fib2 położone na N- i C-końcu cząsteczki FN. Tworzą je odpowiednio moduł o masie cząsteczkowej 37 kDa typu I na N-końcu wchodzący w skład odcinka o masie cząsteczkowej 70 kDa oraz moduły 10–12 typu I z sekwencjami na C-końcu sąsiadującymi z mostkiem dwusiarczkowym.

Na podstawie doświadczeń z pojedynczo syntetyzowanymi fragmentami wiążącymi fibrynę Ichihara et al. [15] wykazali brak jakiegokolwiek aktywności wiążącej elementy macierzy zewnątrzkomórkowej. Wynika stąd teza o synergistycznym sprzężeniu zwrotnym dodatnim domen C- i N-końcowych. W świetle powyższych eksperymentów wydaje się dość niezwykle, że izolowany fragment o masie cząsteczkowej 70 kDa wykazywał zdolność hamowania adhezji do ECM, podczas gdy fragment masie 15 kDa, zlokalizowany na C-końcu i złożony z modułów typu I od 10 do 12, nie wykazywał tej właściwości [16]. Niektóre badania nad rekombinowaną FN pozbawioną jedynie modułów 10–12 typu I wykazały, że ich utrata także nie wpływa znacząco na właściwości wiązania macierzy zewnątrzkomórkowej [17]. Istotną rolę w wiązaniu fibryny przypisuje się też resztom, które tworzą sekwencje łączące oba monomery. Potwierdzają to doświadczenia z induk-

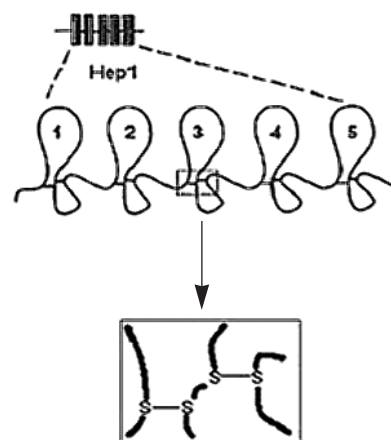
waną mutagenezą, gdzie zamiana reszt cysteiny tworzącej mostki dwusiarczkowi na reszty seryny znacznie obniża zdolności oddziaływania FN z macierzą.

Fragmenty domeny wiążącej kolagen

Domena wiążąca kolagen składa się z modułów 7–9 typu I oraz dwóch modułów typu II. Moduły typu II nie występują w żadnej innej domenie. Wydaje się, że znaczącą rolę w wiązaniu kolagenu pełnią moduły typu II, chociaż niezbędne dla ich aktywności jest sąsiedowność z 6 i 7 modułem typu I [18]. Połączone moduły 6 i 7 typu I stanowią prawdopodobnie najmniejszą funkcjonalnie strukturę zdolną do skutecznego wiązania kolagenu. Potwierdzają to doświadczenia z fragmentami domeny wiążącej kolagen złożonymi z modułów: II2–I7, I8–I9 oraz I6–II1, które wykazały znaczące zmniejszenie powinowactwa do kolagenu [10]. Dotychczasowe badania potwierdziły zdolność do łączenia kolagenu typu I, ale niewykluczone, że domena ta może również wiązać inne typy cząsteczek kolagenu. Obecność modułów typu II sąsiadujących z modułami typu I w strukturze innych białek (metaloproteinazy, kolagenazy, czynniki krzepnięcia) jest czynnikiem odpowiedzialnym za współzawodnictwo o wiązanie kolagenu, co indukuje specyficzne kaskady enzymatyczne, w których obecność domeny FN wiążącej kolagen o masie cząsteczkowej 45 kDa oraz N-końcowego FNf o masie cząsteczkowej 29 kDa, nasila degradację macierzy zewnątrzkomórkowej tkanki łącznej przez metaloproteinazy.

Fragmenty domeny wiążącej heparynę

Domeny wiążące heparynę (Hep) i domeny wiążące fibrynę są umiejscowione na przeciwstawnych końcach cząsteczki FN: Hep1 na N-końcu oraz Hep2 na C-końcu łańcucha [19]. Domena Hep1 o masie cząsteczkowej 29 kDa składa się z pięciu modułów typu I zawierających mostki dwusiarczkowe, tworzących tzw. „palce fibronektynowe” (ryc. 2). Domena ta jest zdolna do wiązania kolagenu, trombospondyny oraz TNF- α . Kluczową dla wiązania heparyny resztą wydaje się lizyna w pętli trzeciego modułu typu I. Indukowana mutagenezą, z zastąpieniem zasadowej reszty lizyny przez glutaminę, wykazała utratę zdolności wiązania heparyny. Wydaje się również, że oprócz reszty lizyny, istotna dla skutecznego wiązania he-



Ryc. 2. Fragment Hep1 z „palcami fibronektynowymi”. Powiększono część „palca” trzeciego z mostkami disiarczkowymi

Fig. 2. Part of Hep1 with “fibronectin fingers”. Outlined and enlarged 3rd “fibronectin finger” with disulfide bridges

paryny jest także obecność zasadowych reszt w obrębie „elastycznych” pętli tworzących „palce fibronektynowe” [19, 20]. Potwierdzać może to brak miejsc o wysokim powinowactwie do heparyny w obrębie pojedynczej pętli [20]. Brak ten sugeruje, że miejsce wiążące heparynę jest wynikiem sterycznego ułożenia pętli w obrębie domeny. Podstawienie zasadowych reszt aminokwasów w obrębie pętli omega tworzących wspomnianą strukturę (pętle 1, 2 oraz 3) całkowicie znosi zdolność wiązania heparyny przez Hep1. Wynika z tego hipoteza o współdziałaniu poszczególnych reszt zasadowych w interakcjach z heparyną. Domena Hep1 wykazuje ponadto znaczną oporność na proteolizę z użyciem enzymów z grupy proteaz serynowych.

Druga, znajdująca się na C-końcu, domena wiążąca heparynę składa się z przynajmniej jednego modułu typu III, pozbawionego mostków dwusiarczkowych. Tworzą ją moduły typu III od dwunastego po czternasty. Domena ta, o masie cząsteczkowej około 14 kDa, wykazuje również właściwość pośredniczenia we wzroście komórek nerwowych oraz w interakcjach z powierzchnią komórek [21]. W odróżnieniu jednak od CBD hamuje wiązanie FN do powierzchni komórek. Odcinkiem bezpośrednio odpowiedzialnym za inhibicję jest sekwencja YTIYVIAL, określana mianem krytycznego miejsca funkcjonalnego FN [22]. Ze względu na niewielkie, w zestawieniu z pozostałymi domenami, rozmiary obu domen wiążących heparynę są one mniej podatne na degradację. Syntetyczne peptydy, będące fragmentami tych domen, odgrywają rolę we wspomaganie adhezji komórek nowotworowych czerniaka oraz zmianach w obrębie cytoszkieletu [23].

Charakterystyka fragmentów fibronektyny w zdrowiu i chorobach

Patologie układu ruchu z uwzględnieniem stanów zapalnych stawów

Choroby układu ruchu – a zwłaszcza choroba zwyrodnieniowa stawów i kości (OA – *osteoarthritis*) oraz reumatoidalne zapalenia stawów (RA – *rheumatic arthritis*) stanowią jeden z najlepiej udokumentowanych przykładów schorzeń, którym towarzyszy obecność fragmentów fibronektyny.

Choroby stawów należą do grupy chorób degeneracyjnych wywołanych zaburzeniami odnowy (wiek, choroby metaboliczne, niedostateczne zaopatrzenie przez układ krwionośny, powtarzające się urazy) tkanki łącznej formującej stawy. Za nasilony rozpad elementów tkanki łącznej są odpowiedzialne wszystkie FNf produkowane w wyniku procesów degeneracyjnych [24]. W rezultacie zwiększa się pula zdegradowanych składników macierzy zewnątrzkomórkowej, co może zwiększać intensywność dalszej jej degradacji. Obserwowany wzrost ilości zarówno natywnej FN, jak i jej fragmentów jest rezultatem nasilonych procesów degeneracyjnych i towarzyszących im procesów naprawczych. Zwiększenie ilości FN w macierzy zewnątrzkomórkowej jest również związane ze wzrostem jej stężenia w płynie stawowym. Fragmenty FN generowane w przebiegu zapalenia stawów wykazują cechy zupełnie odmienne od identycznych domen w nienaruszonej cząsteczce FN. Należą do nich: zwiększenie uwalniania elastazy z monocytów, nasilone uwalnianie proteaz przez neutrofile i wzrost ekspresji MMP w płynie stawowym. Zjawisko to udokumentował eksperyment z podaniem do wnętrza torebki stawowej izolowanego FNf wiążącego kolagen o masie cząsteczkowej 29 kDa. Iniekcja 29 kDa FNf wywołała znaczny spadek puli nienaruszonej FN w ciągu kilku dni [25]. Szlak oddziaływania FNf na odpowiedź w postaci nasilonej ekspresji metaloproteinaz jest kaskadą enzymatyczną prowadzącą od fragmentu FN do komórkowej odpowiedzi na ten fragment. Szlak ten obejmuje szeroki zakres czynników aktywujących wraz z cząsteczkami pośredniczącymi w przekazaniu sygnału do efektorów, więc zależnie od fragmentu FN bądź typu metaloproteinazy aktywacja tych enzymów przebiega poprzez interakcję z cytokinami lub podąża szlakiem alternatywnym. Alternatywna droga aktywacji przebiega z udziałem receptorów integryn $\alpha_4\beta_1$, przez fosforylację bogatej w prolinę sekwencji PYK-2 kinazy tyrozynowej [26].

Stanton et al. [26] wykazali, że iniekcja domeny wiążącej kolagen, o masie 45 kDa, indukowała nasiloną syntezę metaloproteinaz MMP-13 (o działaniu degradującym kolagen typu II), MMP-3, a także uwalnianie MMP-2. W odróżnieniu jednak od fragmentów o masach cząsteczkowych 29 kDa oraz 120 kDa, również aktywujących ekspresję MMP-3 oraz MMP-13, tylko domena wiążąca kolagen o masie 45 kDa wykazywała zdolność do aktywacji działania MMP-3 [27]. Niektóre badania udowodniły zdolność fragmentu o masie 29 kDa do aktywacji MMP-3 [27]. Intensywna ekspresja MMP-3 nie jest charakterystyczna wyłącznie dla reumatycznego zapalenia stawów, może być jednak wiarygodnym markerem RA ze względu na ograniczenie syntezy MMP-3 praktycznie tylko w obrębie torebki stawowej. Nasilona ekspresja MMP jest również obserwowana w przypadkach tocznia trzewnego oraz w łuszczycowym zapaleniu stawów [28]. Pojawienie się powyższych FNf może odzwierciedlać proces chorobowy toczący się w stawach.

Choroby nerek oraz układu moczowego Regulacja odpowiedzi zapalnej w zapaleniu kłębuszków

Niektóre FNf charakteryzują się zdolnością pobudzenia aktywności egzokrynnej wielu komórek, prowadzi to do uruchomienia kaskady procesów modulujących funkcjonowanie innych komórek. Dzięki możliwości aktywacji cytokin prozapalnych FNf mogą modulować odpowiedź na czynniki uszkodzające tkanki. Udowodniły to eksperymenty oznaczające aktywność FNf o masach cząsteczkowych 29 kDa (fragment N-końca), 31 kDa (fragment C-końca), 80 kDa oraz nienaruszonej FN w przypadkach zapalenia kłębuszków nerek [29].

Założeniem wyjściowym był udział FNf w tworzeniu złogów składających się z elementów macierzy zewnątrzkomórkowej. Obecność ich ujawniono zarówno w obrębie kłębuszków nerkowych, jak i w moczu. Zidentyfikowano kilkanaście typów FNf tworzących złogi. Seria eksperymentów analizujących wpływ wielkości FNf na odpowiedź zapalną oraz syntezę FN *de novo* wykazała, że najbardziej prawdopodobnym kandydatem może być fragment o wielkości 80 kDa, będący częścią domeny wiążącej komórki. Fragment ten wykazywał, niezależnie od zastosowanego stężenia, najwyższą zdolność syntezy TNF- α przez poddane jego działaniu hodowle komórek [30]. Dotychczas jednak nie określono sekwencji aminokwasowej FNf bezpośrednio odpowiedzialnej za

nasilenie procesów produkcji cytokin przez komórki układu odpornościowego. Przypuszcza się, że może być nim triplet RGD (nie miały go fragmenty o masach cząsteczkowych 29 kDa i 31 kDa), choć nieznaczna zaledwie odpowiedź na stymulację komórek przez nietkniętą cząsteczkę FN komplikuje wyjaśnienie tej kwestii. Dodatkowo, syntetyczny peptyd o sekwencji GRGDS wykazuje w niewielkich porównywalnych stężeniach zdolność aktywacji przewyższającą właściwości fragmentu o masie cząsteczkowej 80 kDa.

Nowotwory

Wpływ na wzrost i unaczynienie guzów

Badania Yi oraz Ruoslahti [30] wykazały, że formy spolimeryzowanej FN charakteryzują się znaczącymi w kontekście klinicznym właściwościami hamowania przerzutów nowotworów oraz wzrostu guzów. Okazuje się jednak, że to białkowy czynnik wymagany do jej polimeryzacji jest odpowiedzialny za hamowanie metastazy. Związek ten nazwany anasteliną jest peptydem o długości 76 aminokwasów i stanowi sekwencję wykazującą podobieństwo do pierwszego modułu typu III w domenie FN wiążącej komórki (stąd nazwa: peptyd III-1C). Obserwowane spowolnienie wzrostu guzów było dodatnio sprzężone ze zmniejszeniem się gęstości utkania sieci naczyń krwionośnych w obrębie guza [30]. Istnieje zależność między możliwością rozsiewu komórek nowotworowych a rozmiarem pierwotnego guza oraz jego unaczynieniem. W świetle tej teorii guzy o ograniczonej wielkości i unaczynieniu mają niewielkie szanse na wysiew komórek nowotworowych do krążenia oraz osiedlenie się ich w różnych miejscach organizmu. Kryterium oceny aktywności antymetastatycznej przeprowadzono raz na dwa tygodnie na podstawie oceny wielkości guzów nowotworów pochodzących z linii komórkowych: C1861 (czerniak) i KRIB (kostniakomięsak). Hodowle prowadzono na podłożu pozbawionym inhibitorów wzrostu guza oraz w obecności kilku czynników charakteryzujących się zdolnością do hamowania metastazy: anasteliny, peptydu wywodzącego się z jedenastego modułu typu III – analogu anasteliny oraz superfibrynogenu. Przeprowadzone obserwacje i pomiary pozwoliły na potwierdzenie hamujących przerzuty właściwości anasteliny. Okazuje się również, że ma ona nawet większą skuteczność hamowania wzrostu w przypadku guzów piersi niż superfibrynogen, który jest uznawany za jeden z najskuteczniejszych środków hamujących metastazę [30].

Zaburzenia płodności

FNf wykrywano dotychczas w stanach związanych z chorobami i uważano, że wzmożona fragmentacja jest oznaką schorzenia. Procesy zapalne lub niewłaściwa ekspresja białek adhezyjnych obniżają stabilność FN, co może przejawiać się wzmożoną jej degradacją. Obecność FNf w plazmie nasienia męskiego jest dotychczas jedynym znanym przykładem, w którym fragmenty FN mają związek z fizjologią [31]. Rola FN w niepłodności jest w świetle ówczesnych badań kontrowersyjna. Jakościowa i ilościowa analiza próbek plazmy nasienia pobranych od mężczyzn z upośledzoną płodnością w zestawieniu z próbkami plazmy nasienia mężczyzn zdrowych i płodnych potwierdziła fragmentację FN w plazmie nasienia. Jednocześnie wykazano istotne zmiany w składzie oraz stężeniu poszczególnych FNf. Wspólną cechą próbek zarówno normalnej, jak patologicznej plazmy nasienia była obecność FNf w zakresie mas cząsteczkowych 60–200 kDa, chociaż próby patologiczne charakteryzowały się większym stopniem degradacji. Oba typy próbek zawierały FNf o masach 60, 90, 100 oraz 120 kDa. Plazma nasienia nieprawidłowego też była pozbawiona FNf o masach 95, 125, 150, 160 oraz 200 kDa, ale wykazywała niezarejestrowaną w przypadku próbek prawidłowych obecność fragmentów o masie 75 kDa. Poza tym, względne stężenie fragmentów o masie 60, 90 i 100 kDa było 2-, nawet i 3-krotnie wyższe w zestawieniu z nasieniem prawidłowym [32].

Schorzenia układu krwionośnego

Choroba niedokrwienna serca

Obecność FNf wykazano również w przypadku choroby niedokrwiennej serca. Rezultaty badań Trial et al. [33] wskazują na korzystną rolę FNf w procesie hamowania nasilonej odpowiedzi zapalnej w niedokrwionym mięśniu sercowym oraz przywracaniu prawidłowego ukrwienia w obszarze mięśnia sercowego zagrożonego martwicą z przyczyn niedokrwienych. Ochrona komórek mięśnia sercowego przed niszczącym działaniem monocytów napływających do miejsca zmienionego zapalnie opiera się na modyfikacji receptorów powierzchniowych VLA-5 monocytów przez interakcję z FNf. Ponadto obecność FNf w stężeniach rzędu 10^{-6} mol/l hamowała migrację monocytów, nanomolarne stężenia natomiast tych samych FNf stanowiły dla nich czynnik chemotaktyczny. Istotnym dla ochrony mięśnia sercowego fragmentem

fibronektyny okazała się domena wiążąca komórki o masie cząsteczkowej 120 kDa. Zestawienie skutków oddziaływania FNf o masie 120 kDa z reakcją monocytów na fragment wiążący kolagen o masie 40 kDa potwierdziło teorię o szczególnej roli tego fragmentu w ochronie mięśnia sercowego. Przyczyną hamowania chemotaksji monocytów jest nie tyle związanie z wysyceniem receptorów VLA-5 na monocytach przez odsłonięcie podczas degradacji miejsc kryptycznych wiążących komórki, co indukowana taką interakcją proteoliza łańcucha α_5 tego receptora [34]. Sugeruje się, że przyczyną inaktywacji receptorów VLA-5, oprócz hamowania ich ekspresji na powierzchni monocytów, jest proteoliza, gdyż dodatek inhibitorów proteaz serynowych (np. PMSF), CdCl_2 lub bestatyny nie hamował procesu niszczenia uszkodzonego wcześniej mięśnia sercowego [33].

Schorzenia układu oddechowego

Postęp idiomatycznego włóknienia płuc

Ilustracją schorzenia w obrębie układu oddechowego, związanego z obecnością FNf, jest samoistne włóknienie płuc [34]. Jest ono jedną z najgorzej rokujących postaci samoistnego śródmiąższowego zapalenia płuc. Charakteryzuje się nasilonym przechodzeniem przez błony podstawne fibroblastów włóknistych oraz normalnych, co uszkadza tkankę śródmiąższową płuc. Na poziomie molekularnym wyraża się to przez konkurencję nienaruszonej FN i jej fragmentów o wiązanie z integrzynami (głównie podjednostkami α_4 oraz α_5). Obserwacja migracji fibroblastów włóknistych oraz normalnych w obecności nienaruszonej FN oraz fragmentów domeny wiążącej komórki o masie 110 kDa oraz fragmentu 110 kDa zintegrowanego z odcinkiem łączącym (CS-1) wykazała [34] hamowanie migracji fibroblastów normalnych przy obecności nienaruszonej FN oraz wzrost migracji fibroblastów włóknistych i hamowanie migracji fibroblastów normalnych przez błonę podstawną w obecności CS-1 [34].

Schorzenia jamy ustnej

Rola fragmentów fibronektyny w zapaleniu przyzębia

Fibronektyna jako jeden ze składników tkanki łącznej budującej aparat zawieszeniowy przyzębia jest szczególnie podatna na działanie enzymów z grupy proteaz degradujących elementy białkowe

tej tkanki. Enzymy proteolityczne są wydzielane przez wiele bakterii z grupy Gram-ujemnych: *Bacteroides fragilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Peptococcus prevotii*, *Clostridium sporogenes*, *Bacteroides asaccharolyticus* i *Propionibacterium acnes* oraz bakterie charakterystyczne dla flory jamy ustnej, takie jak: *Prevotella intermedia*, *Bacteroides intermedius*, *Prevotella loescheii* i *Porphyromonas gingivalis* [35]. Ostatni z wymienionych szczep bakteryjny jest bezsprzecznie związany z pogłębianiem się chorób przyzębia, mającym swe źródło w postępującej enzymatycznej degradacji tkanki łącznej. Za kluczową rolę *Porphyromonas gingivalis* w chorobach przyzębia przemawiają zdolności adhezji szczepów *P. gingivalis* na powierzchni macierzy tkanki łącznej bogatej w FN [36], duża aktywność fibronektynolityczna ekstraktów z *P. gingivalis* uzyskanych metodą sonifikacji [37] oraz obecność rozpuszczalnych pozakomórkowych pęcherzyków o aktywności fibronektynolitycznej w hodowlach *P. gingivalis* [38]. Lantz et al. [35] dążyli do oszacowania degradującego wpływu oraz kinetyki interakcji enzymów z grupy proteaz z poszczególnymi składnikami tkanki łącznej, w tym znakowanej ^{125}I fibronektyny. W czasie badań zdołano ustalić, że FN uległa degradacji na wiele niewielkich fragmentów. Największy z zidentyfikowanych fragmentów miał masę cząsteczkową 97 kDa [36]. Fragmenty FN o masie 97 kDa wraz z nienaruszoną FN pozostawały w asocjacji z komórkami *P. gingivalis*, podczas gdy znaczące ilości znajdowano w supernatancie. Badania w warunkach przedłużonej inkubacji wykazały zupełną degradację FN w supernatancie oraz brak jakichkolwiek jej fragmentów zasocjowanych z komórkami [35, 38]. Rezultaty doświadczeń sugerują, że proteazy *P. gingivalis* w mniejszym stopniu generują fragmenty zdolne wiązać komórki bakteryjne. Fragmentacja FN przez enzymy bakteryjne może stanowić model porównawczy dla zmian zapalnych w tkance łącznej zachodzących z udziałem komponenty bakteryjnej.

Podsumowanie

Przedstawione w niniejszym artykule niektóre właściwości nienaruszonej FN oraz jej fragmentów z pewnością nie wyczerpują wszystkich możliwych aktywności prezentowanych przez wyżej wymienione cząsteczki. Znamienna jest różnica możliwości prezentowanych przez izolowane domeny FN w zestawieniu z domenami pozostającymi w pełnych molekułach. Prawdopodobnie wynika ona z odsłonięcia nowych N- oraz C-końców fragmentów lub też zmiany trójwymiarowej struk-

tury wynikającej z utraty otaczających fragmenców, co może być przyczyną zmiany konformacji oraz odsłonięcia nowych, biologicznie aktywnych sekwencji, co stwarza nowe możliwości interakcji z otaczającymi molekułami. Charakterystyczna jest również wielokierunkowość zmian wywołanych oddziaływaniem FNf. W przypadku procesów zapalnych istnieje współzawodnictwo między kata-

bolizmem a anabolizmem FN. O kierunku zmian, w sensie przewagi syntezy lub rozpadu FN, decydują stężenia zdegradowanej oraz nienaruszonej FN. Wyznaczenie możliwego kierunku zachodzących procesów utrudnia jednak istnienie dodatkowego sprzężenia zwrotnego, w którym istnienie zdegradowanej FN indukuje nasiloną jej syntezę, a ekspresja nowej puli FN przyspiesza jej degradację.

Składam podziękowania pani prof. dr hab. Iwonie Kątnik-Prastowskiej za zainteresowanie tematem, poświęcony czas oraz pomoc.

Piśmiennictwo

- [1] **Johansson S, Svineng G, Wennerberg K, Armulik A, Lohikangas L:** Fibronectin-integrin interactions. *Front Biosci* 1997, 2, 126–146.
- [2] **Pankov R, Yamada KM:** Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* 2002, 115, 3861–3863.
- [3] **Xu J, Clark RA:** Extracellular matrix alters PDGF regulation of fibroblast integrins. *J Cell Biol* 1996, 132, 239–249.
- [4] **Kątnik-Prastowska I, Przybysz M:** Wielofunkcyjność fibronektyny. *Postępy Hig Med Dośw* 2001, 55, 5, 699–713.
- [5] **Burton-Wurster N, Gendelman R, Chen H, Gu D, Tetreault JW, Lust G, Schwarzbauer JE, Macleod J:** The cartilage-specific (V-C) – fibronectin isoform exists primarily in homodimeric and monomeric configurations. *J Biochem* 1999, 341, 555–651.
- [6] **Johnson KJ, Sage H, Briscoe G, Erickson HP:** The compact conformation of fibronectin is determined by intramolecular ionic interactions. *J Biol Chem* 1999, 274, No. 22, 15473–15479.
- [7] **Miekka SI:** Heat-induced fragmentation of human plasma fibronectin. *Acta Biochim Biophys* 1983, 748, 374–380.
- [8] **Fukai F, Ohtaki M, Furii N, Yajima H, Ishii T, Nishizawa Y, Miyazaki K, Katayama T:** Release of biological activities from quiescent fibronectin by a conformational change and limited proteolysis by matrix metalloproteinases. *Biochemistry* 1995, 34, 11453–11459.
- [9] **Homandberg GA:** Potential regulation of cartilage metabolism in osteoarthritis by fibronectin fragments. *Front Biosci* 1999, 4, 713–730.
- [10] **Steffensen B, Xu X, Martin PA, Zardenetaab G:** Human fibronectin and MMP-2 collagen binding domains compete for collagen binding sites and modify cellular activation of MMP-2. *Matrix Biol* 2002, 21, 399–414.
- [11] **Beumer S, Heijnen-Snyder GJ, Ijsseldijk MJW, de Groot PG, Sigma JJ:** Fibronectin in an extracellular matrix of cultured endothelial cells supports platelet adhesion via its ninth type III repeat. A comparison with platelet adhesion to isolated fibronectin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, 20, 16–25.
- [12] **Romberger DJ:** Fibronectin. *Int J Biochem Cell Biol* 1997, 29, 939–943.
- [13] **Aota S, Nomizu M, Yamada KM:** The short amino acid sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in human fibronectin enhances cell-adhesive function. *J Biol Chem* 1994, 269, 24756–24761.
- [14] **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. *J Cell Sci* 2000, 113, 795–806.
- [15] **Ichihara-Tanaka K, Titani K, Sekiguchi K:** Role of the carboxyl-terminal Fib2 domain in fibronectin matrix assembly. *J Cell Sci* 1995, 108, 907–915.
- [16] **Quade BJ, McDonald JA:** Fibronectin's amino-terminal matrix assembly site is located within the 29-kDa amino-terminal domain containing five type I repeats. *J Biol Chem* 1988, 263, 19602–19609.
- [17] **Sottile J, Mosher DF:** Assembly of fibronectin molecules with mutations or deletions of the carboxyl-terminal type I module. *Biochemistry* 1993, 32, 1641–1647.
- [18] **Skorstengaard K, Holtet T, Etzerodt M, Thogersen HC:** Collagen-binding recombinant fibronectin fragments containing type II domains. *FEBS Lett* 1994, 343, 47–50.
- [19] **Kishore R, Samuel M, Yahiya Khan M, Hand J, Frenz DA, Newman SA:** Interaction of the NH 2-terminal domain of fibronectin with heparin. Role of the V-loops of the type I module. *J Biol Chem* 1997, 272, 17078–17085.
- [20] **Cardin AD, Weintraub HJ:** *Arteriosclerosis* 1989, 9, 21–32.
- [21] **Ingham KC, Brew SA, Migliorini MM, Busby TF:** Binding of heparin by type III domains and peptides from the carboxy terminal hep-2 region of fibronectin. *Biochemistry* 1993, 32, 12548–12553.
- [22] **Watanabe K, Takahashi H, Habu Y, Kamiya-Yoshiburo N, Kamiya S, Nakamura H, Ishii T, Katayama T, Miyazaki K, Fukai F:** Interaction with heparin and matrix metalloproteinase 2 cleavage expose cryptic anti-adhesive site of fibronectin. *Biochemistry* 2000, 39, 7138–7144.
- [23] **Moyano JV, Maqueda A, Albar JP, Garcia-Pardo A:** A synthetic peptide from the heparin-binding domain III (repeats III4-5) of fibronectin promotes stress-fibre and focal-adhesion formation in melanoma cells. *J Biochem* 2003, 15, 565–571.
- [24] **Malemud CJ:** Fundamental pathways in osteoarthritis: an overview. *Front Biosci* 1999, 4, 659–661.
- [25] **Homandberg GA, Meyers R, Williams JM:** Intraarticular injection of fibronectin fragments causes severe depletion of cartilage proteoglycans *in vivo*. *J Rheumatol* 1993, 20, 1378–1382.

- [26] **Stanton H, Ung L, Fosang AJ:** The 45 kDa collagen-binding fragment of fibronectin induces matrix metalloproteinase-13 synthesis by chondrocytes and aggrecan degradation by aggrecanases. *J Biochem* 2002, 364, 181–190.
- [27] **Homandberg GA, Hui F:** Association of proteoglycan degradation with catabolic cytokine and stromelysin release from cartilage cultured with fibronectin fragments. *Arch Biochem Biophys* 1996, 334, 325–331.
- [28] **Posthumus MD, Limburg PC, Swetra J, Cats HA, Steward RE, van Leeuwen MA, van Rijswijk MH:** Serum levels of matrix metalloproteinase 3 in relation to the development of radiological damage in patients with early rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 1999, 38, 1081–1087.
- [29] **Lopez-Armada MJ, Gonzalez E, Gomez-Guerrero C, Egido J:** The 80-kDa fibronectin fragment increases the production of fibronectin and tumour necrosis factor-alpha (TNF α) in cultured mesangial cells. *Clin Exp Immunol* 1997, 107, 398–403.
- [30] **Yi M, Ruoslahti E:** A fibronectin fragment inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98, 620–624.
- [31] **Lilja H, Oldbring J, Rannevik G, Laurell CB:** Seminal vesicle-secreted proteins and their reactions during gelation and liquefaction of human semen. *J Clin Invest* 1987, 80, 281–285.
- [32] **Kątnik-Prastowska I, Przybysz M, Chelmońska-Soyta A:** Fibronectin fragments in human seminal plasma. *Acta Biochim Pol* 2005, 52, 557–560.
- [33] **Trial J, Baughn RE, Wagant JN, McIntyre, BW, Birdsall HH, Youker KA, Evans A, Entman ML, Rossen RD:** Fibronectin fragments modulate monocyte VLA-5 expression and monocyte migration. *J Clin Invest* 1999, 104, 419–430.
- [34] **White ES, Thannickal VJ, Carskadon SL, Dickie EG, Livant DL, Markwart S, Toews GB, Arenberg DA:** Integrin $\alpha 4\beta 1$ regulates migration across basement membranes by lung fibroblasts. A role for phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10. *Am J Resp Crit Care Med* 2003, 168, 436–442.
- [35] **Lantz MS, Allen RD, Duck LW, Blume JL, Switalski LM, Hook M:** Identification of *Porphyromonas gingivalis* components that mediate its interactions with fibronectin. *J Bacteriol* 1991, 173, 4263–4270.
- [36] **Winkler JR, Jon SR, Kramer RH, Hoover CI, Murray PA:** Attachment of oral bacteria to a basement membrane-like matrix and to purified matrix proteins. *Infect Immun* 1987, 5, 2721–2726.
- [37] **Pellat B, Planchenault T, Pellerin C, Keil-Diouha V:** A comparison of fibronectinolytic activities of oral bacteria. *J Biol Buccale* 1989, 17, 255–262.
- [38] **Smalley JW, Birss AJ, Shuttleworth CA:** The degradation of type I collagen and human plasma fibronectin by the trypsin-like enzyme and extracellular membrane vesicles of *Bacteroides gingivalis* W50. *Arch Oral Biol* 1988, 33, 323–329.

Adres do korespondencji:

Marcin Wójtowicz
Chair and Department of Chemistry and Immunochemistry
Silesian Piasts University of Medicine
ul. Bujwida 44a
50-345 Wrocław
Poland
e-mail: heymdall@immchem.am.wroc.pl

Conflict of interest: None declared

Praca wpłynęła do Redakcji: 28.01.2006 r.

Po recenzji: 28.06.2006 r.

Zaakceptowano do druku: 9.11.2006 r.

Received: 28.01.2006

Revised: 28.06.2006

Accepted: 9.11.2006