

616-001.28-002:547.96

ÚLOHA ADHEZNÍCH MOLEKUL V MECHANISMECH ROZVOJE ZÁNĚTLIVÝCH POSTRADIAČNÍCH ZMĚN – II: INTEGRINY

¹Jan ÖSTERREICHER, ²Viktor MEINEKE, ¹Pavel PETÝREK, ¹Aleš MACELA, ²Dirk van BEUNINGEN¹Ústav radiobiologie a imunologie Vojenské lékařské akademie J. E. Purkyně, Hradec Králové²Institut für Radiobiologie, Sanitätsakademie der Bundeswehr, München, Německá spolková republika

Souhrn

Tato práce předkládá současné poznatky o klasifikaci, obecných funkcích a interakcích molekul integrinové rodiny. Od původního objevu integrinové rodiny, tj. od konce 80. let, byly popsány mnohé účinky integrinů týkající se hojení ran, zánětlivé odpovědi, karcinogeneze a vzniku metastáz. V této práci jsou popsány možnosti ovlivnění exprese integrinů a jejich současná úloha v radiobiologii.

Klíčová slova: Adhezní molekuly; Integriny; Radiobiologie.

The Role of Adhesion Molecules in Inflammatory Postradiation Change Development Mechanisms Part II – Integrins

Summary

This paper presents current knowledge about classification, general functions, and interactions of integrin superfamily molecules. Since the initial characterization of the integrin family in the late 1980s, there have been numerous reports of integrin modulation during such processes as the development of wound healing, inflammation, carcinogenesis, and metastasis. The possible ways of integrin expression changes and the present and future role of integrins in radiobiology are described herein.

Key words: Adhesion molecules; Integrins; Radiobiology.

Úvod

Bylo již definováno, že adhezními molekulami nazýváme proteiny umožňující vazbu mezi příslušnou, zpravidla imunokompetentní buňkou, endoteliemi, komponentami extracelulární matrix a také mezi buňkami navzájem. V této práci bude charakterizována role integrinů sloužících jako receptory adhezních molekul, plazmatických proteinů a komponent extracelulární matrix.

Klasifikace integrinů

Integriny jsou ubiquitárně přítomné heterodimerové receptory, které zprostředkovávají adhezi buněk mezi sebou vazbou buněčných adhezních molekul, jako jsou VCAM-1, MAdCAM-1, ICAM-1, 2 a 3. Dále umožňují vazbu buněk ke komponentám extracelulární matrix a plazmatickým proteinům, jako jsou fibronectin, vitronectin, kolageny, laminin, osteonectin, trombospondin, fibrinogen, von Willebrandův faktor, koagulační faktor X a iC3b složka komplementu (3).

Integriny usnadňují penetraci imunokompetentních buněk skrz vaskulární bariéru do intersticia. Integriny jsou heterodimery složené z větší alfa podjednotky a menšího beta řetězce, jenž jsou k sobě nekovalentně vázány. Jedná se o proteiny, které jsou za běžného stavu situovány v cytoplazmě a po spuštění příslušného signálu v buňce se transportují na membrány aktivované buňky (14). Podle typu řetězce beta podjednotky lze integriny dělit na základní tři skupiny: beta 1-integriny (CD29), beta 2-integriny (CD18) a beta 3-integriny (CD61) (27).

Beta 1 podskupina integrinů představuje soubor receptorů schopných vázat komponenty extracelulární matrix, fibronectin, laminin a kolagen. Beta 1-integriny jsou exprimovány zejména na endoteliálních a leukocytárních membránách (27). Tato skupina molekul je označována jako VLA (Very Late Activation), protože dvě z nich, VLA-1 a VLA-2, se objevují na lymfocytárním povrchu za 2–4 týdny po stimulaci *in vitro* (13).

Mezi beta 2-integriny zahrnujeme zejména LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11b/CD18; CD54) a p150,95 (CD11c/CD18) (11). Tyto molekuly mají společný beta řetězec (CD18) a variabilní alfa řetě-

zec (CD 11a-c) (2). LFA-1 a Mac-1 mají afinitu k ICAM-1, ačkoli tyto molekuly vykazují rozdílnou funkci v interakcích mezi leukocyty a fibroblasty na jedné straně a leukocyty a endoteliálními buňkami na druhé straně. Mac-1 je také schopen vázat proteiny extracelulární matrix (27, 29). Avšak funkce p 150,95 je dosud nejasná.

Beta 3-integriny jsou méně známou skupinou molekul integrinové rodiny. Jejimi zástupci jsou gpIIb/IIIa (CD41/CD61) a vitronektinový receptor (CD51/CD61) schopné vázat fibrinogen, von Willebrandův faktor, vitronektin a trombospodin. Úloha beta 3-integrinu v mechanismech rozvoje zánětlivých změn je však doposud neobjasněna.

Byl však popsán vliv ionizujícího záření na expresi beta 3-integrinů.

Bylo zjištěno, že zvýšená funkční aktivita beta 3-integrinu koreluje se zvýšenou tvorbou hematogenních metastáz (1, 21), přičemž zvýšené hladiny alfaIIb/beta 3-integrinu byly vyvolány dávkami gamma záření v rozmezí mezi 0,25–2,0 Gy. Dávky 2,5 Gy a vyšší naopak tlumily adhezivitu nádorových buněk (24).

Inhibice tohoto účinku beta 3-integrinu byla zprostředkována použitím blokující protilátky proti beta 3-integrinu, což se následně projevilo snížením adherence a metastazováním melanomových buněk (8, 24).

Role integrinů v rozvoji zánětlivých mechanismů

Migrace neutrofilů skrz endoteliální buňky je závislá na souboru interakcí mezi aktivovanými endoteliálními buňkami a neutrofily (18). K tomu napomáhají zejména beta 2 integriny. Jejich úloha je z větší části dána jejich funkcí, tj. vazbou ICAM-1 a E-selektinu umožňují adhezi a penetraci leukocytů přes endoteliální bariéru do cílové tkáně (19).

Za fyziologického stavu exprimují cirkulující neutrofily minimální množství beta 2-integrinu a mají nízkou afinitu k neaktivovaným endoteliálním buňkám. Aktivaci endoteliálních buněk mohou vyvolat cytokiny, 5a složka komplementu nebo lipopolysacharidy, což se následně může projevit i zvýšenou produkcí beta 2-integrinu v neutrofilních granulocytech (17, 18). Zvýšená přítomnost a funkční aktivita beta 2-integrinu vyvolává následně adhezi neutrofilů k endoteliálním buňkám prostřednictvím vazby s ICAM-1 (20).

Beta 1 a beta 2-integriny poté umožňují adhezi neutrofilů k proteinům extracelulární matrix, jako jsou laminin, fibronectin, kolagen a denaturované proteiny (5, 7, 22). Z experimentálních výsledků vyplývá nezbytnost přítomnosti obou typů integrinů, beta 1 i beta 2, v průběhu migrace neutrofilů intersticiální tkáně (12).

Zvýšení přítomnosti integrinů na endoteliální membráně se projeví již po několika minutách po spuštění příslušného signálu. Tento fenomén se vysvětluje účinkem proteinů souhrnně označovaných jako fokální adhezní komplex (FAK). Tento termín zahrnuje aktin asociované proteiny vyjma aktinu samotného, tj. beta 1-integriny, talin, vinkulin, paxilin a alfa-actinin (6). FAK interaguje s cytoplazmaticky lokalizovanými integriny a vytváří můstky mezi nimi a aktinovými cytoskeletárními proteiny (6), a tvoří tak cestu rychlého transferu integrinových molekul na povrch membrány (16). Účinek FAK byl pozorován 15 minut po stimulaci, přičemž přítomnost beta 1-integrinu na endoteliálních membránách se poté zvýšila 50násobně (26). Vzhledem k tomuto mechanismu je umožněn takřka okamžitý transport leukocytů do cílové tkáně.

Ovlivnění exprese integrinů

Ovlivnění produkce integrinů bylo doposud prováděno v *in vitro* experimentech. Byl zjištěn stimulační účinek TGF beta na produkci beta 1-integrinů (17). Dále bylo potvrzeno, že TGF beta zvyšuje produkci beta 1-integrinu na mRNA i proteinové úrovni (15, 30). Navíc, TGF beta může inhibovat vliv ostatních cytokinů, které také mohou z části podporovat tvorbu beta 1-integrinů (14).

Důležitou prací z oblasti inhibice efektu integrinů a migrace polymorfonukleárů skrz endoteliální a fibroblastovou bariéru je práce Kima a Yamady (17). Tito autoři sledovali procento migrujících polymorfonukleárních buněk přes bariéry synoviálních a dermálních fibroblastů a také přes monolayer endoteliálních buněk po stimulaci C5a. Největšího efektu inhibice migrace polymorfonukleárů přes bariéru lidských synoviálních fibroblastů, tj. snížení penetrujících polymorfonukleárů ze 65 % (u kontrolní skupiny) na cca 25 %, způsobila aplikace kombinace protilátek blokujících jak beta 1, tak beta 2-integriny. Při měření penetrace polymorfonukleárů přes bariéru lidských dermálních fibroblastů byly naměřeny podobné výsledky. Po aplikaci kombina-

ce protilátek proti beta 1 a beta 2-integrinům migrovalo přes bariéru cca 15 % buněk oproti výsledkům kontrolní skupiny, kdy penetrovalo 55 % polymorfonukleárů. Při sledování průniku přes bariéru monolayeru endoteliálních buněk u kontrolní skupiny byla zjištěna penetrace u cca 65 % polymorfonukleárů, zatímco po podání kombinace protilátek pouze proti LFA-1 a Mac-1 a po aplikaci protilátek proti všem beta 2-integrinům byla zjištěna migrace jen u 5 % sledovaných buněk. Z jejich výsledků vyplývá, že po stimulaci polymorfonukleárů C5a se proces migrace jeví beta 2-integrin dependentní, ale že třetí člen rodiny beta 2-integrinů, p 150,95 (CD11c/CD18), se na migraci polymorfonukleárů přes bariéry fibroblastů a endoteliálních buněk významně nepodílí.

Ovlivnění produkce integrinů bylo také pozorováno po podání některých léčiv. Účinek spočívá zejména v přerušení známých signálních mechanismů. Mezi takové preparáty patří forbol estery (10), inhibitor tyrosinové kinázy – Genistein (28), forskolin, který zvyšuje hladinu cyklického AMP (9), gossypol (bifenolová sloučenina ze stromu *Portia*, která je užívána jako protizánětlivý a protitumorózní přípravek) (4), thalidomid (23) a dexametazon (31).

Při sledování účinku xantinových derivátů, které zvyšují intracelulární hladinu cAMP, bylo zjištěno při *in vitro* experimentu na buněčné linii potkaních mikroglií, že tato skupina léčiv tlumí nadprodukci jak beta 1-integrinů, tak ICAM-1, které byly vyvolány podáním lipopolysacharidu a IFN gama (32).

Úloha integrinů v radiobiologii

Effekt integrinů jako proteinů podílejících se na migraci leukocytů do cílových tkání má svůj význam i v radiobiologické problematice, zejména u postradiačních změn zánětlivého charakteru, kde je zánětlivá odpověď organismu negativním faktorem. Jako příklady takových postradiačních změn lze uvést radiační dermatitidu a radiační pneumonitidu.

Doposud není zcela objasněn vliv ionizujícího záření na produkci integrinů, ale z našich doposud nepublikovaných výsledků vyplývá, že k expresi beta 1-integrinů na melanomové linii IPC-298 dochází již za 10 minut po ozáření dávkami 1 a 5 Gy RTG záření. Nadprodukce integrinů je dále očekávána ve fázi migrace leukocytů do ozářené tkáně.

Víme-li, že transport integrinů na membrány aktivovaných buněk probíhá řádově v minutách a že

latentní stadia zmíněných postradiačních změn trvají dny až měsíce, bude velice obtížné blokovat tento účinek integrinů po dobu celých latentních stadií těchto zánětlivých postradiačních změn. Takové ovlivnění by vyžadovalo dlouhodobou terapii některým výše zmíněným léčivem.

Mechanismus inhibice tvorby integrinů použitím xantinových derivátů a dexametazonu by mohl být dalším vysvětlením již publikovaných výsledků z *in vivo* studií o pozitivním efektu podávání pentoxifylinu, kdy byla pozorována inhibice rozvoje známek radiační pneumonitidy s významným zlepšením histologického obrazu ozářených plic (25).

Effekt ionizujícího záření na expresi beta 3-integrinu (24) je velmi zajímavým poznatkem, který je nutné ověřit na *in vivo* pokusech. Bude nezbytné zjistit vliv ionizujícího záření na expresi integrinů v *in vivo* modelech. Je také nutné objasnit úlohu beta 3-integrinů v zánětlivých pochodech. Pokud by se potvrdila domněnka o zvýšené expresi integrinů po ozáření malými dávkami gama záření do velikosti 1 Gy, jednalo by se o závažnou skutečnost z hlediska plánování vojenských misí, zejména v oblastech s nízkým dávkovým příkonem.

V neposlední řadě, uvažovaná úloha adhezních molekul jako celku nespočívá pouze v jejich participaci na zánětlivých mechanismech. Tyto molekuly se také podílejí na vzniku nových hematogenních metastatických ložisek při vaskulární diseminaci primárního nádorového ložiska prostřednictvím adheze nádorových buněk k endotelu.

To je důležité hlavně z pohledu radioterapeutických zásahů v průběhu léčby maligních nádorů. Pokud by se v *in vivo* experimentech potvrdila domněnka o zvýšené metastatické aktivitě karcinomů ozářených dávkami v rozmezí 0,25–2,5 Gy (24), bylo by nutné přehodnotit současné radioterapeutické postupy používající frakcionovaného ozáření s jednotlivými frakcemi o velikosti 2 Gy.

Literatura

1. ALBELDA, SM. – METTE, SA. – ELDER, DE., et al.: Integrin distribution in malignant melanoma association of the beta 3 subunit with tumor progression. *Cancer Res.*, 1990, vol. 50, p. 6757–6764.
2. ARNAOUT, MA.: Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood*, 1990, vol. 75, p. 1037–1050.
3. BAZZONI, G. – HEMLER, ME.: Are changes in integrin affinity and conformation overemphasized? *Trends Biochem. Sci.*, 1998, vol. 23, p. 30–34.

4. BENHAIM, P. – MATHES, SJ. – HUNT, TK., et al.: Induction of neutrophil Mac-1 integrin expression and superoxide production by the medicinal plant extract gossypol. *Inflammation*, 1994, vol. 18, p. 443–458.
5. BOHNSACK, JF. – ZHOU, X-N.: Divalent cation substitution reveals CD18- and very late antigen-dependent pathways that mediate human neutrophil adherence to fibronectin. *J. Immunol.*, 1992, vol. 149, p. 1340–1347.
6. BURRIDGE, K. – FATH, K. – KELLY, T., et al.: Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 1988, vol. 4, p. 487–525.
7. DAVIS, GE.: The Mac-1 and p 150,95 beta 2 integrins bind denatured proteins to mediate leukocyte cell-substrate adhesion. *Exp. Cell Res.*, 1992, vol. 200, p. 242–252.
8. FELDING-HABERMANN, B. – MUELLER, BM. – ROMERDAHL, CA., et al.: Involvement of integrin α_v gene expression in human melanoma tumorigenicity. *J. Clin. Invest.*, 1992, vol. 89, p. 2018–2022.
9. FELTRI, ML. – SCHERER, SS. – NEMMI, R., et al.: Beta 4 integrin expression in myelinating Schwann cells is polarized, developmentally regulated and axonally dependent. *Development*, 1994, vol. 120, p. 1287–1301.
10. FERREIRA, OC. jr. – VALINSKY, JE. – SHERIDAN, K., et al.: Phorbol-ester induced differentiation of U937 cells enhances attachment to fibronectin and distinctly modulates the alpha 5 and alpha 4 beta 1 fibronectin receptors. *Exp. Cell Res.*, 1991, vol. 193, p. 20–26.
11. GAO, J-X. – ISSEKUTZ, AC.: Mac-1 (CD11b/CD18) is the predominant beta2 (CD18) integrin mediating human neutrophil migration through synovial and dermal fibroblast barriers. *Immunology*, 1996, vol. 88, p. 463–470.
12. GAO, J-X. – WILKINS, J. – ISSEKUTZ, AC.: Migration of human polymorphonuclear leukocytes through a synovial fibroblast barrier is mediated by both beta2 (CD11/CD18) integrins and the beta 1 (CD29) integrins VLA-5 and VLA-6. *Cell Immunol.*, 1995, vol. 163, p. 178–186.
13. HEMLER, ME.: VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes. *Annu. Rev. Immunol.*, 1990, vol. 8, p. 365–400.
14. HYNES, RO.: Integrins: Versatility, modulation, and signalling in cell adhesion. *Cell*, 1992, vol. 69, p. 11–25.
15. IGNOTZ, RA. – MASSAGUE, J.: Cell adhesion protein receptors as targets for transforming growth factor-beta action. *Cell*, 1987, vol. 51, p. 189–197.
16. INGBER, D.: Integrins as mechanochemical transducers. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1991, vol. 3, p. 841–848.
17. KIM, LT. – YAMADA, KM.: The regulation of expression of integrin receptors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1997, vol. 214, p. 123–130.
18. LO, SK. – LEE, S. – RAMOS, RA., et al.: Endothelial-leukocyte integrin CR3 (CD11b/CD18, Mac-1, alpha m beta 2) on human neutrophils. *J. Exp. Med.*, 1991, vol. 173, p. 1493–1500.
19. LUSCINSKAS, FW. – KANSAS, GS. – DING, H., et al.: Monocyte rolling, arrest and spreading on IL-4 activated vascular endothelium under flow is mediated via sequential action of L-selectin, beta1-integrins, and beta2-integrins. *J. Cell Biol.*, 1994, vol. 125, p. 1417–1427.
20. MALIK, AB. – LO, SK.: Vascular endothelial adhesion molecules and tissue inflammation. *Pharmacol. Rev.*, 1996, vol. 48, p. 213–229.
21. MARSHALL, JF. – NESBITT, SA. – HELFRICH, MH., et al.: Integrin expression in human melanoma cell lines: heterogeneity of vitronectin receptor composition and function. *Int. J. Cancer*, 1991, vol. 49, p. 924–931.
22. MONBOISSE, J-C. – GARNOTEL, R. – RANDOUX, A., et al.: Adhesion of human neutrophils to and activation by type-1 collagen involving a beta 2 integrin. *J. Leukoc. Biol.*, 1991, vol. 50, p. 373–380.
23. NOGUEIRA, AC. – NEUBERT, R. – HELGE, H., et al.: Thalidomide and the immune system. 3. Simultaneous up- and down-regulation of different integrin receptors on human white blood cells. *Life Sci.*, 1994, vol. 55, p. 77–92.
24. ONODA, JM. – PIECHOCKI, MP. – HONN, KV.: Radiation-induced increase in expression of the $\alpha_{IIb} \beta_3$ in melanoma cells: Effects on metastatic potential. *Radiat. Res.*, 1992, vol. 130, p. 281–288.
25. ÖSTERREICHER, J. – VÁVROVÁ, J. – KNÍŽEK, J., et al.: Radiation Pneumonitis: The Influence of Pentoxifylline and Dexamethasone on the Alveolar Septal Thickness and the Amount of Neutrophil Granulocytes. *Voj. zdrav. Listy – Supl.* 2000, vol. 68, v tisku.
26. PLOPPER, G. – INGBER, DE.: Rapid induction and isolation of focal adhesion complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, vol. 193, p. 571–578.
27. SPRINGER, TA.: Adhesion receptors of the immune system. *Nature*, 1990, vol. 346, p. 425–434.
28. TIISALA, S. – MAJURI, ML. – CARPEN, O., et al.: Genistein enhances the ICAM-mediated adhesion by inducing the expression of ICAM-1 and its counter-receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994, vol. 203, p. 443–449.
29. WALZOG, B. – SCHUPPAN, D. – HEIMPEL, C., et al.: The leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) contributes to binding of human granulocytes to collagen. *Exp. Cell Res.*, 1995, vol. 218, p. 28–38.
30. ZAMBRUNO, G. – MARCHISIO, PC. – MARCONI, A., et al.: Transforming growth factor-beta 1 modulates beta 1 and beta 5 integrin receptors and induces the de novo expression of the alpha v beta 6 heterodimer in normal human keratinocytes: Implications for wound healing. *J. Cell Biol.*, 1995, vol. 129, p. 853–865.
31. ZHANG, Z. – TARONE, G. – TURNER, DC.: Expression of integrin alpha 1 beta 1 is regulated by nerve growth factor and dexamethasone in PC12 cells. Functional consequences for adhesion and neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, p. 5557–5565.
32. ZUCKERMAN, SH. – GUSTIN, J. – EVANS, GF.: Expression of CD54 (intercellular adhesion molecule-1) and the beta1 integrin CD29 is modulated by a cyclic AMP dependent pathway in activated primary rat microglial cell cultures. *Inflammation*, 1998, vol. 22, p. 95–106.

Korespondence: Kpt. doc. MUDr. Jan Österreicher, Ph.D.
Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyně
Třebešská 1575
500 01 Hradec Králové
e-mail: osterreicher@pmfhk.cz

Do redakce došlo 4. 4. 2000