

Received: 2006.05.24
Accepted: 2006.10.23
Published: 2006.11.16

Budowa i funkcja midkiny, nowego czynnika wzrostu wiążącego heparynę

Structure and function of midkine, a novel heparin-binding growth factor

Małgorzata Krzystek-Korpacka, Małgorzata Matusiewicz, Teresa Banaś

Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej Akademii Medycznej we Wrocławiu

Streszczenie

Midkina to wielofunkcyjny peptyd, który wraz z plejotrofiną stanowi strukturalnie odrębną rodzinę czynników wzrostu i różnicowania wiążących heparynę. W pracy przedstawiono budowę midkiny wraz z sekwencją aminokwasową i funkcją poszczególnych domen oraz różnicami strukturalnymi między fizjologicznymi i odkrytymi w nowotworach postaciami tego peptydu. Omówiono umiejscowienie genu midkiny wraz z jej tkankową ekspresją w życiu płodowym i u organizmów dojrzałych. Szczegółowo przedyskutowano dostępne do tej pory informacje dotyczące receptorów midkiny, którymi wydają się głównie proteoglikany zawierające siarczan heparanu i siarczan chondroityny, mogące wchodzić w skład wielkocząsteczkowych kompleksów receptorowych wiążących midkinę. Różnorodność receptorów midkiny prawdopodobnie odpowiada za zróżnicowanie aktywności biologicznej peptydu. Praca przedstawia aktualne poglądy na temat biologicznej aktywności midkiny zarówno na poziomie komórkowym (własności mitogenne, udział w apoptozie, procesach różnicowania, migracji i adhezji komórek, ich zmianach morfologicznych oraz w stymulacji syntezy chemokina), jak i tkankowym (udział w organogenezie, regeneracji i ochronie tkanek oraz formowaniu i degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej).

Słowa kluczowe:

midkina • czynnik wzrostu • organogeneza • angiogeneza • różnicowanie • kwas retinowy • neurokina • cytokina

Summary

Midkine is a multifunctional peptide which, together with pleiotrophin, forms a structurally distinct family of heparin-binding growth factors. The paper presents the structure of midkine together with its amino-acid sequence and the functions of its domains as well as structural differences between the physiological forms of this peptide and those found in tumors. The localization of the midkine gene and its tissue expression both in embryonic life and in mature organisms is described. The available information on midkine receptors is discussed in detail. Most often they seem to be proteoglycans containing heparan sulfate and chondroitin sulfate, which can also be a part of the multimolecular receptor complexes binding midkine. The variety of midkine receptors is probably responsible for the diverse biological activity of this peptide. The paper presents up-to-date views on the biological activity of midkine both at the cellular (mitogenic properties, participation in apoptosis, and cellular migration, adhesion, morphological differentiation, and chemokine synthesis stimulation) and tissue levels (participation in organogenesis, tissue regeneration and protection and in the formation and degradation of extracellular matrix).

Key words:

midkine • growth factor • organogenesis • angiogenesis • differentiation • retinoic acid • neurokine • cytokine

Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_60/9830.pdf
Word count:	3469
Tables:	–
Figures:	4
References:	114

Adres autorki: dr Małgorzata Krzystek-Korpacka, Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej, Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich, ul. Chałubińskiego 10, 50-368 Wrocław; e-mail: krzystek@bioch.am.wroc.pl

WSTĘP

Midkina zastała odkryta w 1988 roku przez zespół prof. Takashi Muramatsu, jako produkt genu kontrolowanego przez kwas retinowy, podlegający przejściowej ekspresji podczas embriogenezy myszy [25,95] oraz we wczesnym okresie różnicowania komórek EC (embryonal carcinoma) [27]. Nazwa midkiny (z ang. midkine) jest skrótem utworzonym od opisu występowania tego czynnika: “mid-gestation embryo and kidney” [25,99]. Midkina wraz z plejotrofiną, inną cytokiną podlegającą ekspresji pod wpływem kwasu retinowego w czasie embriogenezy [41], stanowią strukturalnie odrębną rodzinę czynników wzrostu i różnicowania wiążących heparynę [56,96]. Midkina jest peptydem wielofunkcyjnym, który, podobnie jak i inne cytokiny, charakteryzuje plejotropia i redundancja. Dokładne mechanizmy działania midkiny na poziomie komórkowym nie są znane i stanowią przedmiot prowadzonych na świecie badań. Wydaje się jednak, że ich różnorodność odpowiada za zróżnicowanie aktywności biologicznych midkiny [26,59].

BUDOWA

Midkina jest peptydem sekrecyjnym o masie około 14 kDa [95,96], zbudowanym ze 121 aminokwasów tworzących domenę C- i N-kończową [11]. Przy każdej z domen istnieją krótkie odcinki łańcucha polipeptydowego nazwane „ogonkami”, których funkcja polega na zapewnieniu właściwej orientacji obu domen [1]. Każda z domen zawiera trzy przeciwroównoległe β -arkusze o dużym stopniu homologii. Domenę C, odpowiedzialną za aktywność biologiczną midkiny, wyróżnia obecność dwóch skupisk aminokwasów zasadowych. W midkinie ludzkiej skupisko I domeny C formują aminokwasy K⁷⁹R⁸¹K¹⁰² a skupisko II aminokwasy K⁸⁶K⁸⁷R⁸⁹ [21]. Schemat budowy midkiny przedstawiono na ryc. 1.

Sekwencja aminokwasowa midkiny jest bogata w reszty cysteiny, lizyny i argininy [95]. Mostki disiarczkowe zaangażowane w tworzenie obu domen znajdują się między resztami cystein: C₁₅-C₃₉, C₂₃-C₄₈, C₃₀-C₅₂, C₆₂-C₉₄ i C₇₂-C₁₀₄ [21]. Większa część sekwencji, szczególnie aminokwasy zasadowe, jest chroniona międzygatunkowo [99]. Wiele z tych aminokwasów jest obecnych również w plejotrofinie, z którą midkina dzieli około 50% homologii [1,21]. W plejotrofinie zachowany jest także podobny układ domen i mostki disiarczkowe [41]. Obszar o stosunkowo małej homologii znajduje się przy końcu C, co umożliwiło wytworzenie swoistych przeciwciał przeciwko obu peptydom [55]. Mimo obecności wielu aminokwasów konserwatywnych, domenę N udało się przypisać jedynie funkcję ochronną i stabilizującą strukturę domeny C [21,55].

W niektórych nowotworach midkina jest obecna w pełni funkcjonalnej postaci skróconej, składającej się jedynie z domeny C [28,67]. Dotychczas nie wykazano obecności nowotworowej postaci skróconej w tkankach niezmiennych. Podczas prawidłowej embriogenezy zaobserwowano jednakże przejściowe pojawianie się krótszej postaci midkiny, jednak innej niż nowotworowa. Jej ekspresja prawdopodobnie wiąże się z wyborem przez komórki proliferacji lub różnicowania [7].

Miejsce wiążące heparynę i aktywność biologiczna midkiny wiążą się z obecnością zasadowych skupisk w domenie C [1,2,55]. Ukierunkowana mutagenesa wykazała, że aminokwasy zasadowe skupiska I i II są odpowiedzialne za promowanie formowania neurytów i ich ukierunkowany wzrost, natomiast zdolność midkiny do wzmocnienia aktywności fibrynolitycznej aktywatora plazminogenu zależy od aminokwasów skupiska II [1]. Reszty lizyny skupiska I są natomiast niezbędne do indukcji migracji neuronów [44] oraz sekrecji midkiny [1].

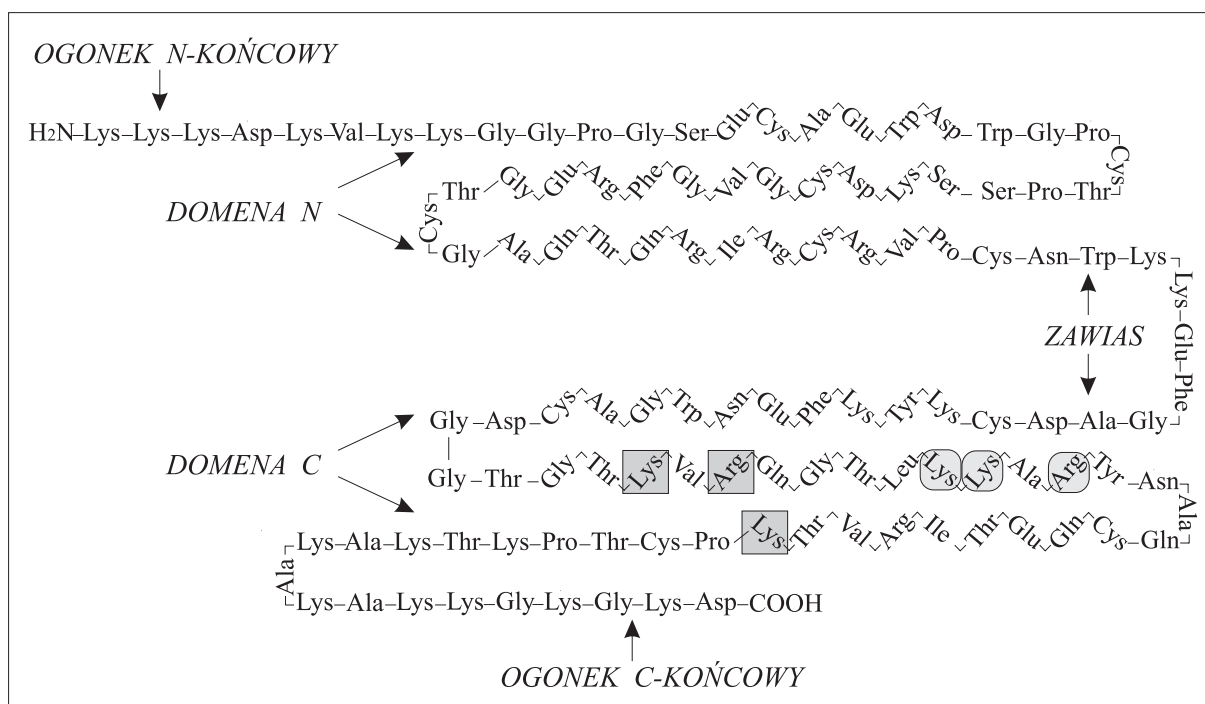
Midkina może występować w postaci monomeru lub dimeru. Dimeryzacja wzmacnia jej aktywność i chroni przed proteolizą [46], choć uczestniczące w tworzeniu dimerów reszty glicyny nie są chronione [26]. Stymulowana przez heparynę dimeryzacja midkiny odbywa się za pośrednictwem niekwalencyjnej asocjacji lub kowalencyjnie, w reakcji z transglutaminazą C, której ekspresja również znajduje się pod kontrolą kwasu retinowego [47].

STRUKTURA GENU

Gen midkiny (*MDK*) jest umiejscowiony na chromosomie 11p.11.2 w sąsiedztwie genów kodujących kinazę diacyloglicerolową ζ i muskarynowy receptor acetylocholino-owy [26]. *MDK*, podobnie jak gen plejotrofiny, składa się z czterech kodujących eksonów [100]. Sekwencja promotora zawiera elementy wiążące m.in.: kwas retinowy [68], czynniki transkrypcyjne NF- κ B i AP-1 [100], receptor hormonów steroidowych i hormonów tarczycy [100] oraz dwa elementy wiążące czynnik supresji transkrypcji WT1 [26]. Wykazano, że ekspresja genu midkiny w życiu płodowym jest modulowana nie tylko przez kwas retinowy [25,95], ale i glukokortykoidy [31].

WYSTĘPOWANIE

Midkina została odkryta jako produkt genu podlegającego ekspresji w środkowym okresie życia płodowego u myszy [25]. Jej ekspresja jest początkowo równomierna, a od chwili rozpoczęcia organogenezy, silniejsza w niektórych regionach (soczewki, komory mózgu, przedni płat przysadki, górna i dolna szczęka, płuca, kończyny, jelito cien-



Ryc. 1. Schemat budowy midkiny; kwadratami zaznaczono aminokwasy skupiska I, okręgami – aminokwasy skupiska II

kie, trzustka i ząchatki nerek [25]. Midkina jest obecna na powierzchni komórek różnicujących się lub w błonach podstawnych wielu narządów, tam, gdzie zachodzą oddziaływania nabłonek–mezenchyma. Ponieważ transkrypty midkiny są silniej wyrażane w mezenchymie a peptyd w nabłonku, w oddziaływaniach nabłonek–mezenchyma sugeruje się parakryny mechanizm działania midkiny [52]. Wraz z rozwojem embrionu jej ekspresja podlega coraz silniejszej restrikcji [25]. W okresie po zakończeniu życia płodowego stwierdzono silną ekspresję midkiny w narządach kontynuujących rozwój po urodzeniu, takich jak mózg [87], narządy zmysłów [23] i płuca [50]. W dorosłym organizmie ludzkim słaba ekspresja midkiny jest ograniczona do niektórych narządów i tkanek (m.in. nerek i pęcherza moczowego, jąder, żołądka, jelita cienkiego, tarczycy, skóry, śródbłonna naczyń [5,20,73,90]). Jest jednak indukowana przejściowo podczas procesów naprawy i regeneracji, zaś w wielu stanach patologicznych podlega ekspresji w sposób konstytutywny [59].

Oprócz powierzchni komórki, midkina występuje również wewnątrz komórki, a jej obecność obserwowano w cytoplazmie [32], jądrze [9,83,86,91] i jąderku [42].

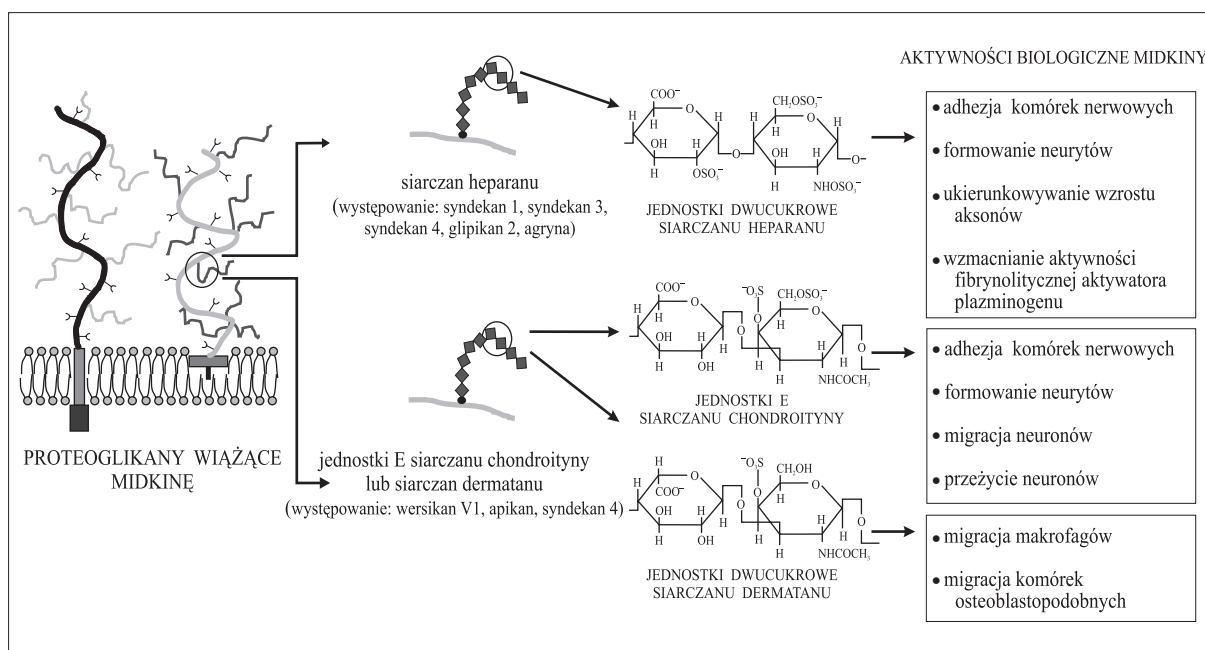
RECEPTORY I MECHANIZMY PRZEKAZYWANIA SYGNAŁU

Ze względu na obecność miejsc wiążących heparynę w strukturze midkiny, naturalnymi jej receptorami wydają się proteoglikany zawierające łańcuchy siarczanu heparanu (HS-PG). Midkina wykazuje jednak duże powinowactwo zarówno do HS-PG [37,40,60], jak i proteoglikanów zawierających siarczan chondroityny (CS-PG) [10,44,102,113]. Z midkiną silnie wiążą się proteoglikany związane z błonami komórkowymi (syndekany, glipikany) [37,40,60], proteoglikany będące składnikami macierzy komórkowej (wersykan) [113] oraz błony podstawnej (agryna) [112].

W oddziaływaniu midkiny z proteoglikanami zawierającymi siarczan heparanu pośredniczą domeny heparynopodobne w łańcuchach HS [30]. Strukturalne wymagania miejsca wiążącego midkiny określono badając jej interakcje z pochodnymi heparyny o różnej długości łańcucha i różnym stopniu usiarczanowania. Minimalna długość łańcucha została ustalona na 22 jednostki, z resztami siarczanowymi przyłączonymi w pozycjach N- i 6-O glukozy oraz 2-O kwasu iduronowego. Obecność trzech reszt siarczanowych w dwucukrowej jednostce jest wymagana do maksymalnego oddziaływania z midkiną [29].

Udział poszczególnych struktur proteoglikanów w biologicznej aktywności midkiny przedstawiono na ryc. 2.

Interakcje midkiny z HS-PG uczestniczą w tworzeniu sieci neuronalnej (w adhezji komórek nerwowych, formowaniu i ukierunkowywaniu neurytów) [30] oraz we wzmacnianiu przez midkinę aktywności fibrynolitycznej aktywatora plazminogenu [1]. W izolowanych z mózgu HS-PG potwierdzono obecność silnie usiarczanowanych jednostek dwucukrowych [114]. Spośród występujących w mózgu HS-PG, istotne dla formowania się ośrodkowego układu nerwowego są przede wszystkim interakcje midkiny z syndekanami: syndekaniem 1 [60], syndekaniem 3 [60] i syndekaniem 4 [37]. Wśród pozostałych klas HS-PG dowiedziono interakcji midkiny z glipikanami, tj. glipikaniem 2, podlegającym, podobnie jak midkina, czasowej ekspresji w czasie rozwoju mózgu [40]. Jednakże pomimo koekspresji i kolokalizacji glipikanu 2 i midkiny na szlakach wzrostu aksonów oraz mimo wiązania midkiny przez glipikan 2 z siłą porównywalną z syndekaniem 3, tylko syndekan 3 jest obecny na filopodiach, strukturach najważniejszych w kontroli formowania i ukierunkowania aksonów. Glipikan 2 pełni funkcję pomocniczą, bądź uczestniczy w innych aspektach aktywności midki-



Ryc. 2. Udział poszczególnych struktur proteoglikanów w aktywnościach biologicznych midkiny

ny względem komórek nerwowych, np. w promowaniu ich przeżycia [40].

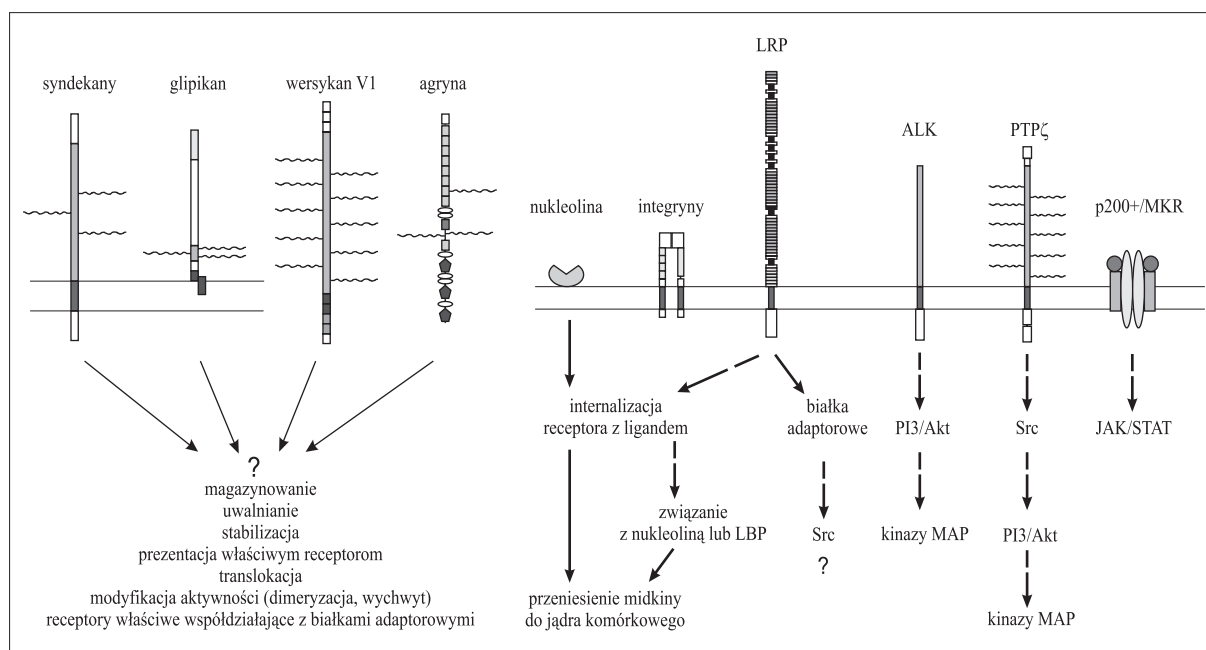
Mniej jednoznaczne jest oddziaływanie midkiny z proteoglikanami zawierającymi siarczan chondroityny. Jedyne motywy typu E (CS-E), zawierające po dwie, rzadziej trzy, grupy siarczanowe na jednostkę dwucukrową wiążą midkinę ze znacznym powinowactwem [101]. Oddziaływanie midkiny ze strukturami typu E wydaje się istotne dla indukowanej przez nią migracji [113] i adhezji neuronów [101] oraz formowania neurytów [8] i ochrony komórek nerwowych przed śmiercią [59]. Dokładna budowa CS-PG mózgu, a więc i obecność struktur typu E, nie jest znana. Jedynym dotychczas poznany CS-PG zawierający znaczące (>14%) ilości jednostek E jest apikan z komórek glejaka [98], który właśnie dzięki strukturalnym E-CS wiąże się z midkiną [102].

Porównanie CS z mózgowi embrionów świni i dorosłych osobników wykazało, że do silnego oddziaływania z midkiną konieczny jest kwas iduronowy, obecny niemal wyłącznie w embrionalnych CS [4]. W wersykanie V₁ miejscem przyłączenia midkiny są prawdopodobnie łańcuchy hybrydowe CS, zawierające domeny o strukturze siarczanu dermatanu (DS), a nie jednostki E, obecne jedynie w niewielkim stopniu [113]. Siarczan dermatanu jest także inhibitorem indukowanej przez midkinę migracji makrofagów [13] i komórek osteoblastopodobnych [72].

Pełne znaczenie oddziaływania midkiny z proteoglikanami nie jest znane. Wiadomo, że wiązanie czynników wzrostu z resztami cukrowymi proteoglikanów jest istotne dla ich magazynowania, uwalniania i stabilizacji [29]. Komponent cukrowy proteoglikanów może również pełnić funkcję ko-receptora i pośredniczyć w prezentacji i/lub translokacji czynników wzrostu do właściwych receptorów. Może także modyfikować ligand, np. przez dimeryzację, co pozwala na uzyskanie pełnej aktywności biologicznej czynnika [3]. Nie można też wykluczyć, że wychwyt midkiny przez

niektóre proteoglikany stanowi mechanizm hamowania aktywności midkiny. Wersykan, z którym midkina wiąże się z dużym powinowactwem, uczestniczy prawdopodobnie w hamowaniu formowania neurytów i migracji neuronów [113]. Badania ostatnich lat nad proteoglikanami wykazały, że mimo braku własnej aktywności kinazowej, niektóre z nich mogą także pełnić rolę funkcjonalnych receptorów powierzchniowych, współdziałających z białkami adaptorowymi [3,35]. Zaobserwowano np., że wiązanie plejotrofiny z syndekaniem 3 aktywuje szlak niereceptorowych kinaz tyrozynowych z rodziny Src (c-Src i Fyn) [35].

Proteoglikany mogą także wchodzić w skład wielocząsteczkowych kompleksów receptorowych wiążących midkinę. Dotychczas wykazano, że składnikami takich kompleksów są receptoropodobne fosfatazy fosfotyrozynowe białek PTP ζ /RPTP β [80] oraz białka pokrewne receptorowi LDL (białka LRP) [57] (ryc. 3). PTP ζ w swojej strukturze zawiera łańcuchy siarczanu chondroityny, wiążące midkinę z dużym powinowactwem [44]. Wewnątrzkomórkowa domena PTP ζ ma aktywność kinazy tyrozynowej, aktywującej za pośrednictwem kinazy Src szlak kinaz MAP. Oddziaływanie midkiny z PTP ζ wiąże się z aktywnością chemotaktyczną wobec neuronów embrionalnych [44] i komórek osteoblastopodobnych [72], a także promowaniem przeżycia komórek nerwowych [80]. Natomiast wiązanie midkiny z białkami z rodziny receptorów LDL sugeruje podwójny mechanizm przekazywania sygnału przez midkinę. Rodzina receptorów LDL jest bezpośrednio zaangażowana w przekazywanie sygnałów komórkowych, ponieważ stanowią one strukturalne komponenty kompleksów receptorowych (m.in. Wnt, pokrewny kadherynie receptor neuronalny i apoE2) [59], a ich cytoplazmatyczne domeny zawierają motywy wiążące białka adaptorowe, które ulegają fosforylacji przez kinazy Src i uruchamiają kaskadę Ras [43]. Są to jednak receptory podlegające internalizacji i uczestniczące w przeniesieniu czynnika do jądra komórki [43].



Ryc. 3. Receptory midkiny oraz prawdopodobne drogi przekazywania sygnału. Budowę receptorów przedstawiono symbolicznie bez zachowania proporcji między receptorami. LRP – białka pokrewne receptorowi LDL; ALK – kinaza z chłoniaka anaplastycznego; PTPz – receptoropodobne fosfatazy fosfotyrozynowe białek; p200+/MKR – niezidentyfikowany receptor błonowy midkiny o masie >200 kDa; LBP – prekursor białka wiążącego lamininę; Src – kinaza tyrozynowa Src

Za istnieniem mechanizmu bezpośredniego przeniesienia midkiny do jądra komórkowego przemawia jej potwierdzone jądrowe umiejscowienie [9] oraz oddziaływanie z białkami transportującymi czynniki do jądra komórkowego: nukleoliną [86,94] i prekursorem białka wiążącego lamininę (LBP) [83]. Wykazano, że internalizacja midkiny związanej z receptorem LRP i przeniesienie do jądra komórkowego za pośrednictwem nukleoliny są najważniejsze do osiągnięcia przez midkinę pełnej aktywności antyapoptotycznej [86]. Wydaje się jednak, że midkina może również bezpośrednio wiązać się z nukleoliną jako receptorem o małym powinowactwie [79]. Tym bardziej że obecność nukleoliny wykazano na powierzchni komórek nowotworowych. Związanie midkiny przez nukleolinę inicjuje internalizację i prawdopodobnie pośredniczy w mitogenicnej aktywności midkiny wobec komórek transformowanych [24].

Midkina wiąże się także z integrzynami $\alpha_4\beta_1$ oraz $\alpha_6\beta_1$, glikoproteinami, które prawdopodobnie również stanowią komponenty wielkocząsteczkowych receptorów midkiny. Oddziaływanie midkiny z integrzynami $\alpha_4\beta_1$ i $\alpha_6\beta_1$ jest istotne w formowaniu neurytów i migracji komórek nerwowych [58].

Innym receptorem midkiny jest kinaza tyrozynowa z chłoniaka anaplastycznego (kinaza ALK), która aktywuje szlak kinaz PI3 i ERK [88]. Midkina wiąże się również z dużym powinowactwem do niezidentyfikowanego receptora błonowego o masie >200 kDa (p200+/MKR), obecnego na powierzchni komórek linii nowotworu Wilmsa. Związanie midkiny z p200+/MKR aktywuje szlak JAK/STAT i pośredniczy w autokrynej aktywności mitogenicnej midkiny wobec komórek nowotworu Wilmsa [73]. W innym typie nowotworu, ameloblastomie, w mitogenicnej aktywności midkiny uczestniczyły kinazy MAP. Natomiast antyapoptotyczne własności midkiny wobec komórek ameloblastomy wiążą się prawdo-

podobnie z aktywacją szlaku PI3/Akt [84]. Aktywacja kinaz Akt [51] oraz szlaku JAK/STAT [75], towarzyszy także międzykomórkowemu „przekazywaniu” oporności na leczenie chemioterapeutyczne, w które zaangażowana jest midkina.

Podsumowanie dotychczasowego stanu wiedzy na temat receptorów midkiny i wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnału przedstawiono na ryc. 3.

Wygaszanie informacji niesionej przez midkinę odbywa się przez trawienie zinternalizowanych aktywnych receptorów midkiny zarówno w lizosomach, jak i proteosomach, przy czym system degradacji proteosomalnej wydaje się szczególnie zaangażowany w desensytyzację przekazywania sygnałów drogą jądrową [91].

AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA MIDKINY NA POZIOMIE KOMÓRKI

Własności mitogenne midkiny

Midkina jest czynnikiem wzrostu stymulującym proliferację i promującym przeżycie komórek przez zapobieganie apoptozie. Własności mitogenne midkiny zostały potwierdzone wobec multipotencjalnych komórek karcynogenicznych [56,96], keratynocytów [20], fibroblastów [56,61], mioblastów [17], hepatocytów [62], komórek zrębowych endometrium [15] oraz wobec komórek śródbłonna naczyń [49,90] i wielu różnych linii komórek nowotworowych [49,67,73,84].

Mechanizm aktywacji proliferacji komórek śródbłonna przez midkinę polega na indukcji ekspresji interleukiny 8 w komórkach mięśni gładkich naczyń [90]. Natomiast mechanizm aktywacji proliferacji w komórkach nowotworowych jest bezpośredni i autokryny [73], zapewniający samowy-

starczalność w zakresie sygnałów stymulujących wzrost. Związanie midkiny z receptorem o dużym powinowactwie, umiejscowionym na powierzchni komórek wywodzących się z nowotworu Wilmsa, powoduje fosforylację reszt tyrozynowych kompleksu receptora i następnie białek JAK1, JAK2 i STAT1 α , członków szlaku przekazywania sygnałów JAK/STAT [73], pośredniczącego w proliferacji, różnicowaniu, migracji, apoptozie i przeżyciu komórek [74]. Stwierdzono, że w innych liniach komórkowych (nowotworowej SW-13, neuroblastomy i glioblastomy oraz nienowotworowych liniach śródbłonka naczyń i fibroblastów) stymulacja proliferacji przez midkinę odbywa się za pośrednictwem kinazy ALK jako receptora i szlaków kinaz PI3/Akt i MAP [88].

W mezenchymie zęba midkina działała antyproliferacyjnie, a w obecności FGF-2 proproliferacyjnie, co sugeruje, że midkina może zarówno promować, jak i hamować proliferację, w zależności od obecności w środowisku innych czynników wzrostu [52]. Takie zachowanie midkiny może tłumaczyć nie zawsze udane próby wykazania własności mitogennych midkiny wobec fibroblastów [45,105].

Midkina i apoptoza

Midkina promuje przeżycie komórek, chroniąc przed apoptozą neuronów embrionalne [56,61], dojrzałe komórki układu nerwowego [12], komórki fotoreceptorowe [26,59] oraz komórki nowotworowe [64,71]. Ochronie komórek nerwowych *in vitro* towarzyszy aktywacja kaskady kinaz MAP (kinaz ERK1 i 2) [80], wywołana związaniem midkiny z receptorem PTP ζ , co prowadzi do zahamowania aktywności kaspazy 3 [65,66]. Aktywacja szlaku kinaz MAP jest prawdopodobnie poprzedzona aktywacją kinazy Src i przeniesieniem sygnału na szlak kinaz PI3/Akt [51,80]. Wykazano również, że w przekazywaniu antyapoptotycznego sygnału przez midkinę pośredniczy może receptor LRP [57]. W badaniach *in vivo* na modelach zwierzęcych, midkina, właśnie przez związanie z receptorem LRP [81], chroniła neurony przed śmiercią spowodowaną przejściowym niedokrwieniem, prawdopodobnie zapobiegając wzrostowi stężenia wapnia wewnątrzkomórkowego [109]. W komórkach nowotworowych pochodzących z nowotworu Wilmsa, midkina zwiększa ekspresję Bcl-2, chroniąc przed zachodzącą szlakiem mitochondrialnym apoptozą indukowaną cisplatiną [71]. Natomiast w komórkach linii komórkowej nowotworu wątroby, midkina hamuje szlak zewnętrzny apoptozy przez inhibicję aktywności kaspazy 3 [64].

Midkina i różnicowanie

Kwas retinowy jest jednym z głównych czynników promujących różnicowanie, a MDK jednym z genów indukowanych przez niego we wczesnym okresie różnicowania [27]. Wykazano zdolność midkiny do indukcji różnicowania w liniach P19 [61] i HM-1 [96] multipotencjalnych komórek karcynoembrionalnych, w linii multipotencjalnych embrionalnych komórek macierzystych [61] oraz liniach ludzkich mioblastów [17] i komórek neuroblastomy [39]. Midkina powoduje także różnicowanie komórek mezenchymy w związkach zęba [52] oraz – poprzez indukcję ekspresji miokardyny – różnicowanie komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych [76]. Midkina wespół z receptorowym aktywatorem liganda NF- κ B (RANKL), podobnie jak M-CSF, indukuje różnicowanie makrofagów w osteoklasty [48].

Migracja komórek

Midkina promuje migrację komórek prozapalnych, takich jak makrofagi [13] i neutrofile [93], działając jako chemoatraktant lub czynnik haptotaktyczny. Stymuluje również migrację komórek mięśniówki gładkiej ścian naczyń krwionośnych [16]. Midkina jako czynnik haptotaktyczny indukuje także migrację neuronów [30,44], astrocytów [104] i osteoblastów [72], w której pośredniczy receptor PTP ζ . Natomiast stymulacja migracji makrofagów nie wiąże się z PTP ζ , ale pośredniczy w niej inny receptor o podobnej budowie, zawierający bogate w reszty siarczanowe struktury siarczanu chondroityny typu E z domeną siarczanu dermatanu [13]. Związanie midkiny zarówno z receptorem PTP ζ , jak i nieznanym receptorem makrofagów, aktywuje te same szlaki wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnałów: szlaki kinaz MAP (ERK1 i 2), kinazy PI3 oraz Src [13,72]. Prawdopodobny mechanizm zakłada aktywację kinazy Src i PI3/Akt i dalszą aktywację kinaz MAP. Kinazy MAP, przez aktywację kinazy łańcuchów lekkich miozyny, indukują następnie zmiany w strukturze cytoszkieletu prowadzące do migracji komórek [72].

Adhezja komórek

Midkina pośredniczy w adhezji komórek układu nerwowego, takich jak neurony embrionalne [56], neurony [101] i komórki oligodendrogleju [78], prawdopodobnie przez interakcję z obecnym na powierzchni komórek nerwowych receptorem PTP ζ [78].

Zmiany morfologiczne

Midkina indukuje zmiany morfologiczne w komórkach, prawdopodobnie przez zmiany w organizacji cytoszkieletu. W komórkach nerwowych stymuluje wyrastanie neurytów z embrionalnych neuronów i ukierunkowuje ich wzrost [30,47,56]. Natomiast w fibroblastach midkina stymuluje formowanie pseudopodiów [89].

Stymulacja syntezy cytokin

W wielu aktywnościach biologicznych midkiny pośredniczą inne chemokiny i czynniki wzrostu. Midkina stymuluje syntezę interleukiny 8 w komórkach mięśni gładkich ścian naczyń krwionośnych [90] i komórkach nabłonka kanalików nerkowych [85], syntezę TGF- β w fibroblastach [105] oraz syntezę MIP-2 i MCP-1 przez komórki nabłonka kanalików nerkowych [85]. Jest również zaangażowana w fibrynolizę, gdyż stymuluje ekspresję aktywatora plazminogenu uPA a hamuje ekspresję PAI-1, inhibitora aktywatora plazminogenu [36,38].

Herradon i wsp. [14] zasugerowali niedawno nową funkcję midkiny polegającą na kontroli swoistej tkankowo ekspresji genu plejotrofiny.

AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA MIDKINY NA POZIOMIE TKANKI

Organogeneza

Midkina uczestniczy przede wszystkim w rozwoju ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego przez stymulację adhezji i migracji neuronów [30,56] i astrocytów [104] oraz przez ochronę komórek nerwowych przed obumar-

ciem [12,56,61]. Midkina indukuje wyrastanie neurytów [30,56] i steruje ich wzrostem, będąc obecną w wypustkach neurogleju, wzdłuż których migrują neurony [30]. Jest też czynnikiem indukującym tworzenie synaps w połączeniach nerwowo-mięśniowych [112].

Midkina jest również zaangażowana w nefrogenezę [70], a jej brak, podobnie jak w niedoborze witaminy A, powoduje powstanie o połowę mniejszej liczby nefronów [103]. Potwierdzono także udział midkiny w rozgałęziającej morfogenezie płuc [97], formowaniu załączków zębów [52] i chondrogeniezie [63]. W angiogenezie midkina uczestniczy w sposób parakryny i autokryny [49], przez stymulację proliferacji komórek śródbłonna naczyń krwionośnych [49,90], przez stymulację migracji [16] i różnicowania [76] komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych. Midkina indukuje również formowanie się warstw komórek śródbłonna i syntezę glikoaminoglikanów [90]. Także rekrutacja neutrofilów i makrofagów, wydzielających proangiogenne czynniki VEGF-A i IL-8 [111], pośrednio przyczynia się do stymulacji tworzenia nowych naczyń krwionośnych. Ponadto midkina w komórkach endotelium indukuje ekspresję aktywatora plazminogenu (uPA) a hamuje ekspresję jego inhibitora (PAI-1), co pozwala na przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej [69]. Degradacja i przebudowa macierzy umożliwia migrację komórek w czasie angiogenezy i inwazji, m.in. w warunkach patologicznych, np. w nowotworowej chorobie przerzutowej [77].

Midkina odgrywa również istotną rolę w rozmnażaniu, gdyż jak wykazano, bierze udział w dojrzewaniu oocytów bydłych [19], a także ochrania krowie embriony, stymulując wydzielanie czynników „przeżyciowych” przez komórki warstwy żółtej pęcherzyka Graffa [18].

Regeneracja i ochrona tkanek

Midkina jest obecna w miejscach uszkodzenia tkanek, zwłaszcza tkanki nerwowej, stąd implikuje się jej udział w procesach naprawczych i regeneracji tkanek, gdzie tryb jej ekspresji stanowi odzwierciedlenie embriogenezy [63]. Niedokrwienie w mózgu osobników dorosłych [53], lecz nie embrionów [34], powoduje w początkowej fazie zawstępnienie wzrost ekspresji midkiny w tkance otaczającej martwicę [108] lub w sąsiednich astrocytach [53,104]. Midkina chroni neurony przed opóźnioną śmiercią na skutek niedokrwienia [12,92], prawdopodobnie przez obniżanie stężenia wapnia wewnątrzkomórkowego [109]. Badania prowadzone przez Takadę i wsp. [92] wskazują na możliwości wykorzystania midkiny w terapii genetycznej ograniczającej uszkodzenia po niedokrwieniu mózgu, gdyż, jak wykazali badacze, transfer genu midkiny do mózgu po przejściowym niedokrwieniu zmniejsza rozmiary martwicy. Midkina bierze także udział w regeneracji zaburzeń nerwowo-mięśniowych, ponieważ podlega ekspresji w sarkoplazmie regenerujących się włókien o małej średnicy [17]. Nadekspresja midkiny towarzyszy także uszkodzeniom nerwów obwodowych, w których zapobiega śmierci komórki działając autokrynie za pośrednictwem receptora LRP [81]. Implikuje się również działanie ochronne midkiny w chorobach neurodegeneracyjnych. Wykazano obecność midkiny w płytkach starczych [106] oraz surowicy [82] pacjentów z chorobą Alzheimera, a jednocześnie zaobserwowano zdolność midkiny do hamowania agrega-

cji [54] i cytotoksyczności β -amyloidu [110]. Silną ekspresję midkiny stwierdza się także w mózgach pacjentów z innymi postaciami demencji [107] oraz w mózgach dotkniętych atrofią wieloukładową [33].

Midkina uczestniczy także w przebudowie układu oddechowego w odpowiedzi na hipoksję. Jej ekspresja zwiększa się w komórkach nabłonka i mięśni gładkich płuc i oskrzeli, gdzie midkina stymuluje ekspresję miokardyny powodując muskularyzację małych arterii płucnych [76]. Po częściowej hepatoktomii midkina uczestniczy w dalszych etapach regeneracji wątroby, ponieważ jej brak powoduje wstrzymanie procesu regeneracji, prawdopodobnie przez zahamowanie proliferacji hepatocytów [62]. Bierze także udział w procesie gojenia głębokich wrzodów żołądka uczestnicząc w formowaniu ziarniny [45]. Z kolei uwolnienie, po oparzeniu, midkiny z komórek tłuszcznych skóry, gdzie jest akumulowana, powoduje infiltrację rany aktywnymi leukocytami, które, m.in. przez sekrecję midkiny, zapobiegają obumarciu komórek i stymulują proliferację [22]. Midkina uczestniczy w naprawie złamań kości, choć nie w stanie zapalnym inicjującym proces naprawczy, podlega natomiast silnej ekspresji w proliferujących chondrocytach [63].

Midkina okazała się także silnym inhibitorem infekcji wirusem HIV we wczesnym okresie zakażenia. Prawdopodobny mechanizm działania polega na zapobieganiu przyłączenia się i zamocowywania cząsteczek wirusa do nukleoliny i proteoglikanów błony komórkowej [6].

Macierz zewnątrzkomórkowa

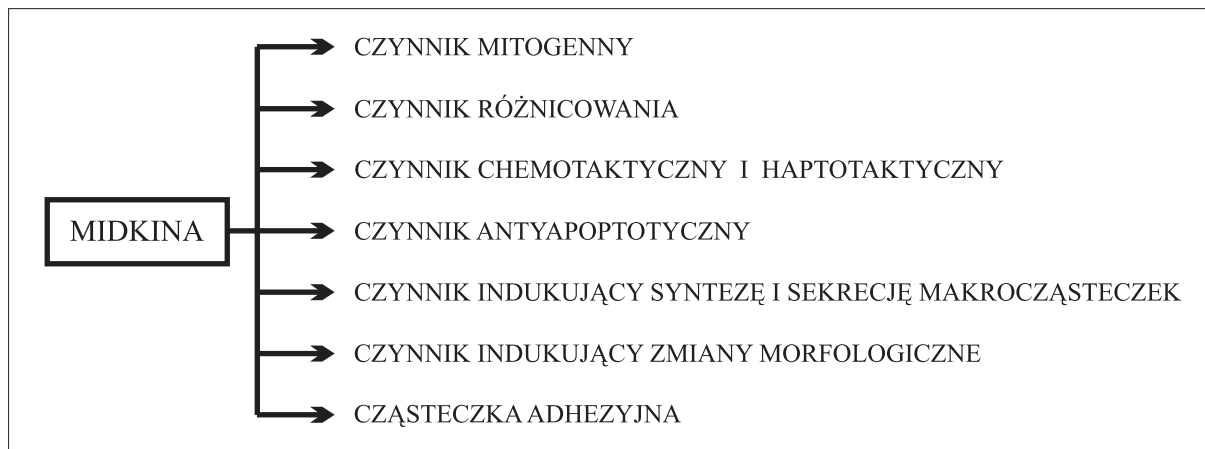
Midkina uczestniczy w formowaniu macierzy zewnątrzkomórkowej, m.in. przez stymulację syntezy kolagenów II, III i VI oraz syntezy glikoaminoglikanów, takich jak hialuronian [105] i agrekan [63]. Jako czynnik indukujący syntezę MMP-2 [105] oraz syntezę aktywatora plazminogenu [38], pośredniczy także w degradacji macierzy. Wykazano, że w działaniach tych przynajmniej częściowo pośredniczy TGF- β [105].

Niektóre własności midkiny budzą pewne kontrowersje, gdyż nie udaje się ich wywołać we wszystkich modelach badawczych. Ohta i wsp. [63] wykazali, że istotny jest sposób wprowadzenia midkiny do badanego układu – o ile jest to skuteczne przez transfekcję komórek cDNA midkiny powodującą endogenną jej ekspresję, to egzogenne wprowadzenie midkiny do środowiska zazwyczaj zawodzi.

Informacje na temat omówionych wyżej funkcji ujęte zostały na rycinie 4.

PERSPEKTYWY

Prowadzone na świecie badania dotyczą przede wszystkim wyjaśnienia mechanizmów przekazywania sygnału niesionego przez midkinę oraz roli jaką pełni w patogenezie wielu chorób wraz z możliwościami wykorzystania jej w procesie leczenia. Badane są m.in. możliwości zastosowania midkiny w terapii genowej choroby nowotworowej oraz uszkodzeń mózgu spowodowanych zawałem lub chorobami neurodegeneracyjnymi. Obiecujące są wyniki badań nad zastosowaniem mid-



Ryc. 4. Aktywność biologiczna midkiny

kiny jako biomarkera chorób nowotworowych. Wydaje się więc, że badania nad rolą midkiny w procesie nowotworzenia i innych stanach patologicznych oraz nad możliwościami zastosowań terapeutycznych midkiny będą kontynuowane.

PODZIĘKOWANIA

Autorzy pragną bardzo serdecznie podziękować Pani Profesor Janinie Kwiatkowskiej-Korczak za życzliwe uwagi i krytyczną ocenę pracy.

PIŚMIENICTWO

- [1] Akhter S., Ichihara-Tanaka K., Kojima S., Muramatsu H., Inui T., Kimura T., Kaneda N., Talukder A.H., Kadomatsu K., Inagaki F., Muramatsu T.: Clusters of basic amino acids in midkine: roles in neurite-promoting activity and plasminogen activator-enhancing activity. *J. Biochem.*, 1998; 123: 1127–1136
- [2] Asai T., Watanabe K., Ichihara-Tanaka K., Kaneda N., Kojima S., Iguchi A., Inagaki F., Muramatsu T.: Identification of heparin-binding sites in midkine and their role in neurite-promotion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997; 236: 66–70
- [3] Bandtlow C.E., Zimmermann D.R.: Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol. Rev.*, 2000; 80: 1267–1290
- [4] Bao X., Nishimura S., Mikami T., Yamada S., Itoh N., Sugahara K.: Chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid chains from embryonic pig brain, which contain a higher proportion of L-iduronic acid than those from adult pig brain, exhibit neuritogenic and growth factor binding activities. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 9765–9776
- [5] Boorjian S., Scherr D.S., Mongan N.P., Zhuang Y., Nanus D.M., Gudas L.J.: Retinoid receptor mRNA expression profiles in human bladder cancer specimens. *Int. J. Oncol.*, 2005; 26: 1041–1048
- [6] Callebaut C., Nisole S., Briand J.P., Krust B., Hovanessian A.G.: Inhibition of HIV infection by the cytokine midkine. *Virology*, 2001; 281: 248–264
- [7] Chen Q., Yuan Y., Lin S., Chang Y., Zhuo X., Wei W., Tao P., Ruan L., Li Q., Li Z.: Transiently truncated and differentially regulated expression of midkine during mouse embryogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005; 330: 1230–1236
- [8] Clement A.M., Sugahara K., Faissner A.: Chondroitin sulfate E promotes neurite outgrowth of rat embryonic day 18 hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.*, 1999; 269: 125–128
- [9] Dai L., Xu D., Yao X., Lu Y., Xu Z.: Conformational determinants of the intracellular localization of midkine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005; 330: 310–317
- [10] Deepa S.S., Yamada S., Zako M., Goldberger O., Sugahara K.: Chondroitin sulfate chains on syndecan-1 and syndecan-4 from normal murine mammary gland epithelial cells are structurally and functionally distinct and cooperate with heparan sulfate chains to bind growth factors. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 37368–37376
- [11] Fabri L., Maruta H., Muramatsu H., Muramatsu T., Simpson R.J., Burgess A.W., Nice E.C.: Structural characterization of native and recombinant forms of the neurotrophic cytokine MK. *J. Chromatogr.*, 1993; 646: 213–225
- [12] Harvey B.K., Shen H., Chen G.-J., Yoshida Y., Wang Y.: Midkine and retinoic acid reduce cerebral infarction induced by middle cerebral artery ligation in rats. *Neurosci. Lett.*, 2004; 369: 138–141
- [13] Hayashi K., Kadomatsu K., Muramatsu T.: Requirement of chondroitin sulfate/dermatan sulfate recognition in midkine-dependent migration of macrophages. *Glycoconj. J.*, 2001; 18: 401–406
- [14] Herradon G., Ezquerro L., Nguyen T., Silos-Santiago I., Deuel T.F.: Midkine regulates pleiotrophin organ-specific gene expression: Evidence for transcriptional regulation and functional redundancy within the pleiotrophin/midkine developmental gene family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005; 333: 714–721
- [15] Hirota Y., Osuga Y., Koga K., Yoshino O., Hirata T., Harada M., Morimoto C., Yano T., Tsutsumi O., Sakuma S., Muramatsu T., Taketani Y.: Possible implication of midkine in the development of endometriosis. *Hum. Reprod.*, 2005; 20: 1084–1089
- [16] Horiba M., Kadomatsu K., Nakamura E., Muramatsu H., Ikematsu S., Sakuma S., Hayashi K., Yuzawa Y., Matsuo S., Kuzuya M., Kaname T., Hirai M., Saito H., Muramatsu T.: Neointima formation in a restenosis model is suppressed in midkine-deficient mice. *J. Clin. Invest.*, 2000; 105: 489–495
- [17] Hu J., Higuchi I., Yoshida Y., Shiraishi T., Osame M.: Expression of midkine in regenerating skeletal muscle fibres and cultured myoblasts of human skeletal muscle. *Eur. Neurol.*, 2002; 47: 20–25
- [18] Ikeda S., Ichihara-Tanaka K., Azuma T., Muramatsu T., Yamada M.: Effects of midkine during *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent developmental competence. *Biol. Reprod.*, 2000; 63: 1067–1074
- [19] Ikeda S., Kitagawa M., Imai H., Yamada M.: The roles of vitamin A for cytoplasmic maturation of bovine oocytes. *J. Reprod. Dev.*, 2005; 51: 23–35
- [20] Inazumi T., Tajima S., Nishikawa T., Kadomatsu K., Muramatsu H., Muramatsu T.: Expression of the retinoid-inducible polypeptide, midkine, in human epidermal keratinocytes. *Arch. Dermatol. Res.*, 1997; 289: 471–475
- [21] Iwasaki W., Nagata K., Hatanaka H., Inui T., Kimura T., Muramatsu T., Yoshida K., Tasumi M., Inagaki F.: Solution structure of midkine, a new heparin-binding growth factor. *EMBO J.*, 1997; 16: 6936–6946
- [22] Iwashita N., Muramatsu H., Toriyama K., Torii S., Muramatsu T.: Expression of midkine in normal and burn sites of rat skin. *Burns*, 1999; 25: 119–124
- [23] Jia X.Q., Nakashima T., Kadomatsu K., Muramatsu T.: Expression of midkine in the cochlea. *Hear. Res.*, 2001; 160: 10–14

- [24] Joo E.J., ten Dam G.B., van Kuppevelt T.H., Toida T., Linhardt R.J., Kim Y.S.: Nucleolin: a chondroitin sulfate-binding protein on the surface of cancer cells. *Glycobiology*, 2005; 15: 1–9
- [25] Kadomatsu K., Huang R. P., Sugauma T., Murata F., Muramatsu T.: A retinoic acid responsive gene MK found in the teratocarcinoma system is expressed in spatially and temporally controlled manner during mouse embryogenesis. *J. Cell Biol.*, 1990; 110: 607–616
- [26] Kadomatsu K., Muramatsu T.: Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer. *Cancer Lett.*, 2004; 204: 127–143
- [27] Kadomatsu K., Tomomura M., Muramatsu T.: cDNA cloning and sequencing of a new gene intensely expressed in early differentiation stages of embryonal carcinoma cells and in mid-gestation period of mouse embryogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988; 151: 1312–1318
- [28] Kaname T., Kadomatsu K., Aridome K., Yamashita S., Sakamoto K., Ogawa M., Muramatsu T., Yamamura K.: The expression of truncated MK in human tumors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1996; 219: 256–260
- [29] Kaneda N., Talukder A.H., Ishihara M., Hara S., Yoshida K., Muramatsu T.: Structural characteristics of heparin-like domain required for interaction of midkine with embryonic neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1996; 220: 108–112
- [30] Kaneda N., Talukder A.H., Nishiyama H., Koizumi S., Muramatsu T.: Midkine, a heparin-binding growth/differentiation factor, exhibits nerve cell adhesion and guidance activity for neurite outgrowth *in vitro*. *J. Biochem.*, 1996; 119: 1150–1156
- [31] Kaplan F., Comber J., Sladek R., Hudson T.J., Muglia L.J., Macrae T., Gagnon S., Asada M., Brewer J.A., Sweezey N.B.: The growth factor midkine is modulated by both glucocorticoid and retinoid in fetal lung development. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2003; 28: 33–41
- [32] Kato M., Maeta H., Kato S., Shinozawa T., Terada T.: Immunohistochemical and *in situ* hybridization analyses of midkine expression in thyroid papillary carcinoma. *Mod. Pathol.*, 2000; 13: 1060–1065
- [33] Kato S., Shinozawa T., Takikawa M., Kato M., Hirano A., Awaya A., Ohama E.: Midkine, a new neurotrophic factor, is present in glial cytoplasmic inclusions of multiple system atrophy brains. *Acta Neuropathol.*, 2000; 100: 481–489
- [34] Kikuchi-Horie K., Kawakami E., Kamata M., Wada M., Hu J.G., Nakagawa H., Ohara K., Watabe K., Oyanagi K.: Distinctive expression of midkine in the repair period of rat brain during neurogenesis. *Immunohistochemical and immunoelectron microscopic observations. J. Neurosci. Res.*, 2004; 75: 678–687
- [35] Kinnunen T., Kaksonen M., Saarinen J., Kalkkinen N., Peng H.B., Rauvala H.: Cortactin-Src kinase signaling pathway is involved in N-syndecan-dependent neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 10702–10708
- [36] Kojima S., Inui T., Muramatsu H., Kimura T., Sakakibara S., Muramatsu T.: Midkine is a heat and acid stable polypeptide capable of enhancing plasminogen activator activity and neurite outgrowth extension. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1995; 216: 574–581
- [37] Kojima T., Katsumi A., Yamazaki T., Muramatsu T., Nagasaka T., Ohsumi K., Saito H.: Human ryudocan from endothelial-like cells binds basic fibroblast growth factor, midkine, and tissue factor pathway inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 5914–5920
- [38] Kojima S., Muramatsu H., Amanuma H., Muramatsu T.: Midkine enhances fibrinolytic activity of bovine endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 9590–9596
- [39] Koshizawa S.H., Matsumura T., Kadono Y., Sawada T., Kadomatsu K., Muramatsu H., Muramatsu T.: Alteration of midkine expression associated with chemically-induced differentiation in human neuroblastoma cells. *Cancer Lett.*, 1997; 111: 117–125
- [40] Kurosawa N., Chen G., Kadomatsu K., Ikematsu S., Sakuma S., Muramatsu T.: Glypican-2 binds to midkine: The role of glypican-2 in neuronal cell adhesion and neurite outgrowth. *Glycoconj. J.*, 2001; 18: 499–507
- [41] Li Y.S., Milner P.G., Chauhan A.K., Watson M.A., Hoffman R.M., Kodner C.M., Milbrandt J., Deuel T.F.: Cloning and expression of a developmentally regulated protein that induces mitogenic and neurite outgrowth activity. *Science*, 1990; 250: 1690–1694
- [42] Lie-A-Ling M., Bakker C.T., Deurholt T., Hoekstra R., Wesseling J.G., Afford S.C., Bosma P.J.: Selection of tumor specific promoters for adenoviral gene therapy of cholangiocarcinoma. *J. Hepathol.*, 2006; 44: 126–133
- [43] Lillis A.P., Mikhailenko I., Strickland D.K.: Beyond endocytosis: LRP function in cell migration, proliferation and vascular permeability. *J. Thromb. Haemost.*, 2005; 3: 1884–1893
- [44] Maeda N., Ichihara-Tanaka K., Kimura T., Kadomatsu K., Muramatsu T., Noda M.: A receptor-like protein-tyrosine phosphatase PTP ζ /RPTP β binds a heparin-binding growth factor midkine. Involvement of arginine 78 of midkine in the high affinity binding to PTP ζ . *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 12474–12479
- [45] Maekawa T., Waki S., Okada A., Fukui H., Kinoshita Y., Chiba T.: Midkine gene expression in the healing process of gastric ulcer. *J. Lab. Clin. Med.*, 1999; 133: 349–352
- [46] Mahoney S.-A., Perry M., Seddon A., Bohlen P., Haynes L.: Transglutaminase forms midkine homodimers in cerebellar neurons and modulates the neurite-outgrowth response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1996; 224: 147–152
- [47] Mahoney S.-A., Wilkinson M., Smith S., Haynes L.W.: Stabilization of neurites in cerebellar granule cells by transglutaminase activity: identification of midkine and galectin-3 as substrates. *Neuroscience*, 2000; 101: 141–155
- [48] Maruyama K., Muramatsu H., Ishiguro N., Muramatsu T.: Midkine, a heparin-binding growth factor, is fundamentally involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2004; 50: 1420–1429
- [49] Mashour G.A., Ratner N., Khan G.A., Wang H.L., Martuza R.L., Kurtz A.: The angiogenic factor midkine is aberrantly expressed in NF1-deficient Schwann cells and is a mitogen for neurofibroma-derived cells. *Oncogene*, 2001; 20: 97–105
- [50] Matsura O., Kadomatsu K., Takei Y., Uchimura K., Mimura S., Watanabe K., Muramatsu T.: Midkine expression is associated with postnatal development of the lungs. *Cell Struct. Funct.*, 2002; 27: 109–115
- [51] Mirkin B.L., Clark S., Zheng X., Chu F., White B.D., Green M., Rebbaa A.: Identification of midkine as a mediator for intracellular transfer of drug resistance. *Oncogene*, 2005; 24: 4965–4974
- [52] Mitsiadis T.A., Muramatsu T., Muramatsu H., Thesleff I.: Midkine (MK), a heparin-binding growth/differentiation factor, is regulated by retinoic acid and epithelial-mesenchymal interactions in the developing mouse tooth, and affects cell proliferation and morphogenesis. *J. Cell Biol.*, 1995; 129: 267–281
- [53] Mochizuki R., Takeda A., Sato N., Kimpara T., Onodera H., Itoyama Y., Muramatsu T.: Induction of midkine expression in reactive astrocytes following rat transient forebrain ischemia. *Exp. Neurol.*, 1998; 149: 73–78
- [54] Monji A., Yoshida I., Tashiro K., Hayashi Y., Matsuda K., Tashiro N.: Inhibition of A β fibril formation and A β -induced cytotoxicity by senile plaque-associated proteins. *Neurosci. Lett.*, 2000; 278: 81–84
- [55] Muramatsu H., Inui T., Kimura T., Sakakibara S., Song X.J., Maruta H., Muramatsu T.: Localization of heparin-binding, neurite outgrowth and antigenic regions in midkine molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994; 203: 1131–1139
- [56] Muramatsu H., Muramatsu T.: Purification of recombinant midkine and examination of its biological activities: functional comparison of new heparin binding factors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991; 177: 652–658
- [57] Muramatsu H., Zou K., Sakaguchi N., Ikematsu S., Sakuma S., Muramatsu T.: LDL-receptor related protein as a component of the midkine receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000; 270: 936–941
- [58] Muramatsu H., Zou P., Suzuki H., Oda Y., Chen G.-Y., Sakaguchi N., Sakuma S., Maeda N., Noda M., Takada Y., Muramatsu T.: $\alpha_5\beta_1$ - and $\alpha_6\beta_1$ -integrins are functional receptors for midkine, a heparin-binding growth factor. *J. Cell Sci.*, 2004; 117: 5405–5415
- [59] Muramatsu T.: Midkine and pleiotrophin: two related proteins involved in development, survival, inflammation and tumorigenesis. *J. Biochem.*, 2002; 132: 359–371
- [60] Nakanishi T., Kadomatsu K., Okamoto T., Ichihara-Tanaka K., Kojima T., Saito H., Tomoda Y., Muramatsu T.: Expression of syndecan-1 and -3 during embryogenesis of the central nervous system in relation to binding with midkine. *J. Biochem.*, 1997; 121: 197–205
- [61] Nurcombe V., Fraser N., Herlaar E., Heath J.K.: MK: a pluripotential embryonic stem-cell-derived neuroregulatory factor. *Development*, 1992; 116: 1175–1183
- [62] Ochiai K., Muramatsu H., Yamamoto S., Ando H., Muramatsu T.: The role of midkine and pleiotrophin in liver regeneration. *Liver Int.*, 2004; 24: 484–491
- [63] Ohta S., Muramatsu H., Senda T., Zou K., Iwata H., Muramatsu T.: Midkine is expressed during repair of bone fracture and promotes chondrogenesis. *J. Bone Miner. Res.*, 1999; 14: 1132–1144

- [64] Ohuchida T., Okamoto K., Akahane K., Higure A., Todoroki H., Abe Y., Kikuchi M., Ikematsu S., Muramatsu T., Itoh H.: Midkine protects hepatocellular carcinoma cells against TRAIL-mediated apoptosis through down-regulation of caspase-3 activity. *Cancer*, 2004; 100: 2430–2436
- [65] Owada K., Sanjo N., Kobayashi T., Mizusawa H., Muramatsu H., Muramatsu T., Michikawa M.: Midkine inhibits caspase-dependent apoptosis via the activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase in cultured neurons. *J. Neurochem.*, 1999; 73: 2084–2092
- [66] Owada K., Sanjo N., Kobayashi T., Kamata T., Mizusawa H., Muramatsu H., Muramatsu T., Michikawa M.: Midkine inhibits apoptosis via extracellular signal regulated kinase (ERK) activation in PC12 cells. *J. Med. Dent. Sci.*, 1999; 46: 45–51
- [67] Paul S., Mitsumoto T., Yamamoto I., Shinozawa T.: Molecular cloning, expression and purification of truncated midkine and its growth stimulatory activity on Wilms' tumor (G401) cells. *Cancer Lett.*, 2001; 163: 239–244
- [68] Pedraza C., Matsubara S., Muramatsu T.: A retinoic acid-responsive element in human midkine gene. *J. Biochem.*, 1995; 117: 845–849
- [69] Pepper M.S., Sappino A.P., Stocklin R., Montesano R., Orci L., Vassalli J.D.: Upregulation of urokinase receptor expression on migrating endothelial cells. *J. Cell Biol.*, 1993; 122: 673–684
- [70] Piscione T.D., Rosenblum N.D.: The molecular control of renal branching morphogenesis: current knowledge and emerging insights. *Differentiation*, 2002; 70: 227–246
- [71] Qi M., Ikematsu S., Ichihara-Tanaka K., Sakuma S., Muramatsu T., Kadomatsu K.: Midkine rescues Wilms' tumor cells from cisplatin-induced apoptosis: regulation of Bcl-2 expression by midkine. *J. Biochem.*, 2000; 127: 269–277
- [72] Qi M., Ikematsu S., Maeda N., Ichihara-Tanaka K., Sakuma S., Noda M., Muramatsu T., Kadomatsu K.: Haptotactic migration induced by midkine: Involvement of protein-tyrosine phosphatase ζ , mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 15868–15875
- [73] Ratovitski E.A., Kotzbauer P.T., Milbrandt J., Lowenstein C.J., Burrow C.R.: Midkine induces tumor cell proliferation and binds to a high affinity signaling receptor associated with JAK tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 3654–3660
- [74] Rawlings J.S., Rosler K.M., Harrison D.A.: The JAK/STAT signaling pathway. *J. Cell Sci.*, 2004; 117: 1281–1283
- [75] Rebbaa A., Chou P.M., Mirkin B.L.: Factors secreted by human neuroblastoma mediated doxorubicin resistance by activating STAT3 and inhibiting apoptosis. *Mol. Med.*, 2001; 7: 393–400
- [76] Reynolds P.R., Mucenski M.L., Le Cras T.D., Nichols W.C., Whitsett J.A.: Midkine is regulated by hypoxia and causes pulmonary vascular remodeling. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 37124–37132
- [77] Roszkowski K., Ziłkowska E.: Fibrynozylizacja w procesie nowotworowym. *Współczesna Onkologia Polska*, 2005; 9: 196–198
- [78] Rumsby M., Ichihara-Tanaka K., Kimura T., Scott M., Haynes L., Muramatsu T.: Bipolar undifferentiated CG-4 oligodendroglial line cells adhere, extend processes and disperse on midkine, a heparin-binding growth factor: orthovanadate and chondroitin sulphate E inhibit cell attachment. *Neurosci. Res. Commun.*, 2001; 28: 31–39
- [79] Said E.A., Krust B., Nisole S., Svab J., Briand J.P., Hovanessian A.G.: The anti-HIV cytokine midkine binds the cell surface-expressed nucleolin as a low affinity receptor. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 37492–37502
- [80] Sakaguchi N., Muramatsu H., Ichihara-Tanaka K., Maeda N., Noda M., Yamamoto T., Michikawa M., Ikematsu S., Sakuma S., Muramatsu T.: Receptor-type protein tyrosine phosphatase ζ as a component of the signaling receptor complex for midkine-dependent survival of embryonic neurons. *Neurosci. Res.*, 2003; 45: 219–224
- [81] Sakakima H., Yashida Y., Kadomatsu K., Yuzawa Y., Matsuo S., Muramatsu T.: Midkine expression in rat spinal motor neurons following sciatic nerve injury. *Dev. Brain Res.*, 2004; 153: 251–260
- [82] Salama R.H.M., Muramatsu H., Shimizu E., Hashimoto K., Ohgake S., Watanabe H., Komatsu N., Okamura N., Koike K., Shinoda N., Okada S., Iyo M., Muramatsu T.: Increased midkine levels in sera from patients with Alzheimer's disease. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 2005; 29: 611–616
- [83] Salama R.H., Muramatsu H., Zou K., Inui T., Kimura T., Muramatsu T.: Midkine binds to 37-kDa laminin-binding protein precursor, leading to nuclear transport of the complex. *Exp. Cell Res.*, 2001; 270: 13–20
- [84] Sandra F., Harada H., Nakamura N., Ohishi M.: Midkine induced growth of ameloblastoma through MAPK and Akt pathways. *Oral Oncol.*, 2004; 40: 274–280
- [85] Sato W., Kadomatsu K., Yuzawa Y., Muramatsu H., Hotta N., Matsuo S., Muramatsu T.: Midkine is involved in neutrophil infiltration into the tubulointerstitium in ischemic renal injury. *J. Immunol.*, 2001; 167: 3463–3469
- [86] Shibata Y., Muramatsu T., Hirai M., Inui T., Kimura T., Saito H., McCormick L.M., Bu G., Kadomatsu K.: Nuclear targeting by the growth factor midkine. *Mol. Cell. Biol.*, 2002; 22: 6788–6796
- [87] Smith F.I., Qu U., Hang S.J., Kim K.S., Gilmartin T.J., Head S.R.: Gene expression profiling of mouse postnatal cerebellar development using oligonucleotide microarrays designed to detect differences in glycoconjugate expression. *Gene Expr. Patterns*, 2005; 5: 740–749
- [88] Stoica G.E., Kuo A., Powers C., Bowden E.T., Sale E.B., Riegel A.T., Wellstein A.: Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 35990–35998
- [89] Sumi Y., Muramatsu H., Hata K., Ueda M., Muramatsu T.: Midkine enhances early stages of collagen gel contraction. *J. Biochem.*, 2000; 127: 247–251
- [90] Sumi Y., Muramatsu H., Takei Y., Hata K., Ueda M., Muramatsu T.: Midkine, a heparin-binding growth factor promotes growth and glycosaminoglycan synthesis of endothelial cells through its action on smooth muscle cells in an artificial blood vessel model. *J. Cell Sci.*, 2002; 115: 2659–2667
- [91] Suzuki N., Shibata Y., Urano T., Murohara T., Muramatsu T., Kadomatsu K.: Proteasomal degradation of the nuclear targeting growth factor midkine. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 17785–17791
- [92] Takada J., Ooboshi H., Ago T., Kitazono T., Yao H., Kadomatsu K., Muramatsu T., Ibayashi S., Iida M.: Posts ischemic gene transfer of midkine, a neurotrophic factor, protects against focal brain ischemia. *Gene Ther.*, 2005; 12: 487–493
- [93] Takada T., Toriyama K., Muramatsu H., Song X.J., Torii S., Muramatsu T.: Midkine, a retinoic acid-inducible heparin-binding cytokine in inflammatory responses: chemotactic activity to neutrophils and association with inflammatory synovitis. *J. Biochem.*, 1997; 122: 453–458
- [94] Take M., Tsutsui J., Obama H., Ozawa M., Nakayama T., Maruyama I., Arima T., Muramatsu T.: Identification of nucleolin as a binding protein for midkine (MK) and heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM). *J. Biochem.*, 1994; 116: 1063–1068
- [95] Tomomura M., Kadomatsu K., Matsubara S., Muramatsu T.: A retinoic acid-responsive gene, MK, found in the teratocarcinoma system. Heterogeneity of the transcript and the nature of the translation product. *J. Biol. Chem.*, 1990; 265: 10765–10770
- [96] Tomomura M., Kadomatsu K., Nakamoto M., Muramatsu H., Kondoh H., Imagawa K., Muramatsu T.: A retinoic acid responsive gene, MK, produces a secreted protein with heparin binding activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990; 171: 603–609
- [97] Toriyama K., Muramatsu H., Hoshino T., Torii S., Muramatsu T.: Evaluation of heparin-binding growth factors in rescuing morphogenesis of heparitinase-treated mouse embryonic lung explants. *Differentiation*, 1997; 61: 161–167
- [98] Tsuchida K., Shioi J., Yamada S., Boghosian G., Wu A., Cai H., Sugahara K., Robakis N.K.: Appican, the proteoglycan form of the amyloid precursor protein, contains chondroitin sulfate E in the repeating disaccharide region and 4-O-sulfated galactose in the linkage region. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 37155–37160
- [99] Tsutsui J., Uehara K., Kadomatsu K., Matsubara S., Muramatsu T.: A new family of heparin-binding factors: strong conservation of midkine (MK) sequences between the human and the mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991; 176: 792–797
- [100] Uehara K., Matsubara S., Kadomatsu K., Tsutsui J., Muramatsu T.: Genomic structure of human midkine (MK), a retinoic acid-responsive growth/differentiation factor. *J. Biochem.*, 1992; 111: 563–567
- [101] Ueoka C., Kaneda N., Okazaki I., Nandanaka S., Muramatsu T., Sugahara K.: Neuronal cell adhesion mediated by the heparin-binding neuroregulatory factor, midkine, is specifically inhibited by chondroitin sulfate E. Structural and functional implication of the oversulfated chondroitin sulfate. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 37407–37413
- [102] Umehara Y., Yamada S., Nishimura S., Shioi J., Robakis N.K., Sugahara K.: Chondroitin sulfate of appican, the proteoglycan form of amyloid precursor protein, produced by C6 glioma cells interacts with heparin-binding neuroregulatory factors. *FEBS Lett.*, 2004; 557: 233–238

- [103] Vilar J., Lalou C., van Huyen J.-P.D., Charrin S., Hardouin S., Raulais D., Merlet-Benichou C., Lelievre-Pegorier M.: Midkine is involved in kidney development and its regulation by retinoids. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2002; 13: 668–676
- [104] Wada M., Kamata M., Aizu Y., Morita T., Hu J., Oyanagi K.: Alteration of midkine expression in the ischemic brain of humans. *J. Neurol. Sci.*, 2002; 200: 67–73
- [105] Yamada H., Inazumi T., Tajima S., Muramatsu H., Muramatsu T.: Stimulation of collagen expression and glycosaminoglycan synthesis by midkine in human skin fibroblasts. *Arch. Dermatol. Res.*, 1997; 289: 429–433
- [106] Yasuhara O., Muramatsu H., Kim S.U., Muramatsu T., Maruta H., McGeer P.L.: Midkine, a novel neurotrophic factor, is present in senile plaques of Alzheimer disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993; 192: 246–251
- [107] Yasuhara O., Schwab C., Matsuo A., Kim S.U., Steele J.C., Akiguchi I., Kimura J., McGeer E.G., McGeer P.L.: Midkine-like immunoreactivity in extracellular neurofibrillary tangles in brains of patients with parkinsonism-dementia complex of Guam. *Neurosci. Lett.*, 1996; 205: 107–110
- [108] Yoshida Y., Goto M., Tsutsui J., Ozawa M., Sato E., Osame M., Muramatsu T.: Midkine is present in the early stage of cerebral infarct. *Dev. Brain Res.*, 1995; 85: 25–30
- [109] Yoshida Y., Ikematsu S., Moritoyo T., Goto M., Tsutsui J., Sakuma S., Osame M., Muramatsu T.: Intraventricular administration of the neurotrophic factor midkine ameliorates hippocampal delayed neuronal death following transient forebrain ischemia in gerbils. *Brain Res.*, 2001; 894: 46–55
- [110] Yu G.S., Hu J., Nakagawa H.: Inhibition of β -amyloid cytotoxicity by midkine. *Neurosci. Lett.*, 1998; 254: 125–128
- [111] Yu J.L., Rak J.W.: Host microenvironment in breast cancer development: inflammatory and immune cells in tumor angiogenesis and arteriogenesis. *Breast Cancer Res.*, 2003; 5: 83–88
- [112] Zhou H., Muramatsu T., Halfter W., Tsim K.W., Peng H.B.: A role of midkine in the development of the neuromuscular junction. *Mol. Cell Neurosci.*, 1997; 10: 56–70
- [113] Zou K., Muramatsu H., Ikematsu S., Sakuma S., Salama R.H., Shinomura T., Kimata K., Muramatsu T.: A heparin-binding growth factor, midkine, binds to a chondroitin sulfate proteoglycan, PG-M/versican. *Eur. J. Biochem.*, 2000; 267: 4046–4053
- [114] Zou P., Zou K., Muramatsu H., Ichihara-Tanaka K., Habuchi O., Ohtake S., Ikematsu S., Sakuma S., Muramatsu T.: Glycosaminoglycan structures required for strong binding to midkine, a heparin binding growth factor. *Glycobiology*, 2003; 13: 35–42