

Received: 2012.02.23  
Accepted: 2012.04.25  
Published: 2012.05.23

## Kliniczne znaczenie receptora chemokinowego CXCR4

### Clinical relevance of chemokine receptor CXCR4

Katarzyna Gębura, Katarzyna Bogunia-Kubik

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu

#### Streszczenie

Czynnik pochodzenia stromalnego 1 (stromal cell-derived factor-1 – SDF-1/CXCL12) uruchamia szlaki przekazywania sygnału kluczowe dla mobilizacji, migracji, proliferacji oraz przeżycia wielu typów komórek, ekspresjonujących na swojej powierzchni CXCR4 – receptor chemokinowy o motywie CXC, należący do rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G. Choć CXCR4 wraz ze swoim ligandem pełni podstawowe funkcje w tak ważnych procesach jak embriogeneza, różnicowanie komórek czy regeneracja zniszczonych narządów, aktywowane za jego pośrednictwem szlaki przekazywania sygnałów nie zostały do końca zbadane. Ich poznanie utrudnia dodatkowo to, iż niektóre z aktywowanych poprzez CXCR4 szlaków zdają się niezależne od białek G. CXCR4 ulega ekspresji na wielu typach komórek, w tym limfocytach, hematopoetycznych komórkach macierzystych (hematopoietic stem cells – HSC), komórkach śródbłonkowych i nabłonkowych, a także komórkach rakowych. Nadekspresję tego receptora zaobserwowano w nowotworach różnego typu. Wykazano, iż szlak SDF-1/CXCR4 wpływa zarówno na postęp choroby, jak i angiogenezę, metastazę czy przeżycie komórek rakowych. Z tego też powodu rosnąca liczba leków przeciwnowotworowych bazuje na zakłóceniu interakcji między SDF-1 a CXCR4, bądź też hamowaniu ich białek efektorowych. Na zakłóceniu oddziaływań SDF-1/CXCR4 oparta jest również kliniczna mobilizacja hematopoetycznych komórek macierzystych (HSC), będąca coraz popularniejszą metodą pozyskiwania materiału przeszczepowego do przeprowadzenia transplantacji hematopoetycznych komórek progenitorowych. Podanie dawcy czynnika stymulującego wzrost kolonii granulocytów (granulocyte colony-stimulating factor – G-CSF) skutkuje zakłóceniem interakcji między CXCR4 a jego ligandem, co z kolei objawia się uwolnieniem komórek HSC do krwi obwodowej.

W pracy przedstawiono kliniczne znaczenie białka CXCR4 i polimorfizmu jego genu w różnych schorzeniach.

**Słowa kluczowe:** CXCR4 • SDF-1/CXCL12 • HSC • mobilizacja • odnowa hematologiczna • nowotwory

#### Summary

Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) induces intracellular signaling pathways crucial for mobilization, migration, proliferation and survival of many cell types via CXCR4, a chemokine CXC-motif receptor, member of the G protein-coupled receptor family. Despite playing a key role in such major processes as embryogenesis, cell differentiation and organ regeneration, molecular mechanisms underlying CXCR4 signaling remain elusive, even more so, as CXCR4 seems to activate both G-protein-dependent and G-protein-independent pathways. CXCR4 is expressed on multiple cell types including lymphocytes, hematopoietic stem cells, endothelial and epithelial cells, and cancer cells. In fact, overexpression of this receptor has been detected in many different types of cancer. The SDF-1/CXCR4 axis is also involved in tumor progression, angiogenesis, metastasis, and survival. This pathway is therefore a target for therapeutics that can block the SDF-1/CXCR4 interaction or inhibit downstream intracellular signaling. Clinical mobilization of hematopoietic stem cells (HSC), a nowadays popular method of collecting material for

hematopoietic progenitor stem cell transplantation, is also dependent on the SDF-1/CXCR4 axis. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), administered to a transplant donor during clinical treatment, violates interactions between CXCR4 and its ligand, which results in degradation of HSC anchorage in bone marrow and the release of these cells into peripheral blood.

In this paper we describe the clinical significance of CXCR4 and its ligand, as well as the role of CXCR4 and its gene polymorphisms in disease susceptibility.

**Key words:** CXCR4 • SDF-1/CXCL12 • HSC • mobilization • homing • hematological recovery • cancer

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=997815>

**Word count:** 5423

**Tables:** –

**Figures:** 8

**References:** 107

**Adres autorki:** dr hab. Katarzyna Bogunia-Kubik, prof. PAN, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: bogunia@iitd.pan.wroc.pl

## WSTĘP

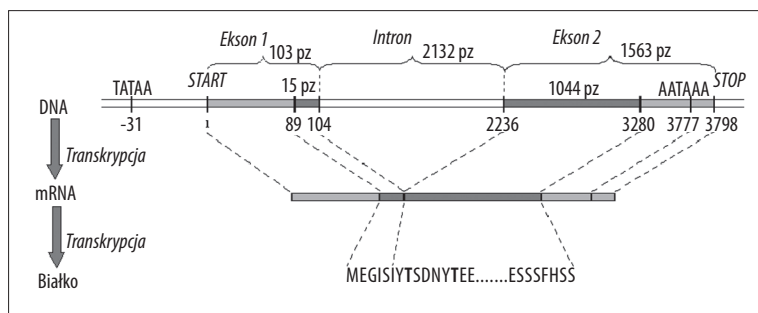
Wzajemne oddziaływanie SDF-1/CXCR4 (stromal cell derived factor-1 – SDF-1; chemokine CXC motif ligand 12 – CXCL12; chemokine CXC motif receptor 4 – CXCR4) ma istotne znaczenie w procesie prawidłowej embriogenezy, zwłaszcza w kardiogenezie i rozwoju naczyń krwionośnych. Białka te uczestniczą także w migracji i adhezji komórek macierzystych w niszach szpikowych [37]. Zaburzenia w przekazywaniu sygnału za pośrednictwem SDF-1/CXCR4 powodują uwalnianie hematopoetycznych komórek macierzystych do krwi obwodowej [61], co wykorzystywane jest podczas pozyskiwania materiału do przeszczepu tych komórek metodą ich mobilizacji do krwiobiegu (peripheral blood progenitor cell transplantation – PBPC), indukowanej podaniem czynnika stymulującego wzrost kolonii granulocytów (granulocyte-colony stimulating factor – G-CSF). Wzajemne oddziaływanie SDF-1/CXCR4 odpowiada ponadto za kontrolę różnicowania komórek (promują przejście z fazy  $G_0$  do  $G_1$ ), ich przeżycie i odbudowę układu hematologicznego oraz regenerację zniszczonych tkanek i narządów. Białka te mają także wpływ na hematopoezę zarówno u zdrowych myszy, jak i u osobników poddanych przeszczepowi [61]. Wykazano również ich udział w angiogenezie *in vitro* [73] i neoangiogenezie [60], a także antyapoptotyczną rolę w limfopoezie [61]. Ponadto chemokina SDF-1 ekspresjonowana jest przez krążące we krwi komórki  $CD34^+CD38^+$  i nadekspresjonowana w odpowiedzi na uszkodzenia tych komórek. Wskazuje to na rolę powyższego białka oraz jego receptora w procesach, w których udział biorą przebywające w krwiobiegu hematopoetyczne komórki macierzyste. Ponadto SDF-1 wyczuła komórki na działanie cytokin. Szlak SDF-1/CXCR4 pełni ważną rolę również w rozwoju pierwotnego i przerzutowego raka piersi oraz innych nowotworów złośliwych, takich jak rak płuc, mózgu czy prostaty [69].

Dogłębne zrozumienie roli, jaką w organizmie ludzkim odgrywa SDF-1 oraz jego receptor, a także mechanizmów regulujących przekazywanie sygnałów przez powyższe białka, ma jednak podstawowe znaczenie nie tylko dla rozwoju transplantologii, ale także w leczeniu schorzeń, których rozwój powiązany jest z ekspresją receptora CXCR4.

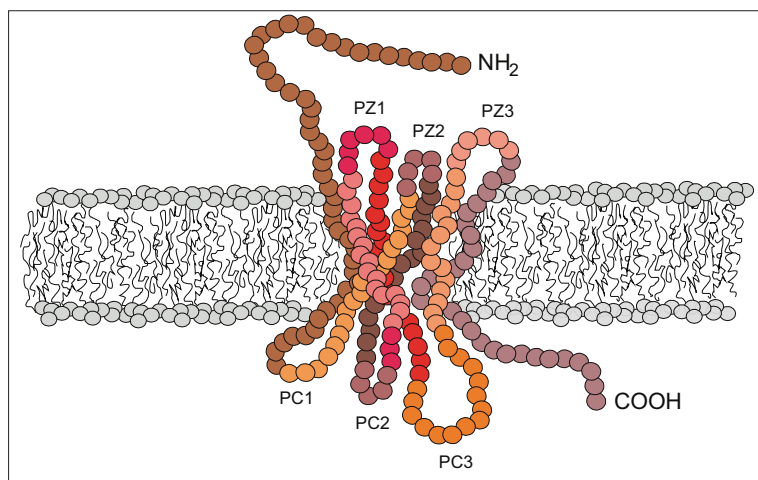
## CHARAKTERYSTYKA BIAŁKA CXCR4

Białko CXCR4 (chemokine CXC motif receptor 4, nazywane również antygenem CD184 lub LESTR, leucocyte-derived seven transmembranedomain receptor) jest receptorem dla czynnika pochodzenia stromalnego 1 (stromal cell derived factor-1 – SDF-1; chemokine CXC motif ligand 12 – CXCL12). Szlaki przekazywania sygnału, bazujące na oddziaływaniach SDF-1/CXCR4, pełnią istotną rolę w procesie migracji komórek ekspresjonujących na swojej powierzchni receptor CXCR4. Należą do nich głównie nieukierunkowane tkankowo komórki macierzyste oraz komórki hematopetyczne. Te ostatnie służą coraz częściej za materiał transplantacyjny podczas przeszczepu komórek hematopoetycznych, mobilizowanych ze szpiku do krwi obwodowej. CXCR4 pełni wraz ze swoim ligandem główne funkcje zarówno przy mobilizacji komórek macierzystych do krwiobiegu, jak i podczas homingu, a więc zasiedlania przez powyższe komórki nisz szpikowych po przeszczepie.

CXCR4 jest jednym z nielicznych receptorów chemokinowych, który oddziałuje z jednym charakterystycznym dla siebie ligandem: SDF-1. Pozostałe receptory tej rodziny wchodziły zwykle w interakcje z wieloma białkami. CXCR4 nie jest jednak jedynym naturalnym receptorem oddziałującym z SDF-1; drugim jest receptor CXCR7. Zjawisko to jest powszechne w świecie chemokin – większość z nich oddziałuje z wieloma receptorami, tworząc swoistą sieć połączeń i zależności. Zarówno CXCR4 jak i CXCR7 wykazują wysokie powinowactwo do SDF-1, jednak receptor CXCR7 może wiązać także inne białka tej rodziny, co odróżnia go od CXCR4. Na uwagę zasługuje to, iż (mimo wiązania białka SDF-1 przez dwa receptory) transgeniczne myszy o genotypie SDF-1<sup>-/-</sup> lub CXCR4<sup>-/-</sup> charakteryzowały się bardzo podobnymi defektami różnych organów, np. serca, naczyń krwionośnych, centralnego układu nerwowego, układu pokarmowego, a także zaburzeniami hematopoezy [69,77,106]. Gryzonie te cierpiały ponadto na niedobór limfocytów i monocytów. Powyższe zmiany okazały się letalne. Niedawne badania wykazujące, iż białko CXCR7 nie bierze udziału w procesie hematopoezy, potwierdzają istotne znaczenie CXCR4 jako receptora dla SDF-1 [41].



Ryc. 1. Schemat budowy i ekspresji genu *CXCR4* (na podstawie [17,104])



Ryc. 2. Schemat budowy rodziny receptorów GPCR. Składają się one z siedmiu helis transmembranowych, połączonych pętlami cytoplazmatycznymi (PC) oraz zewnątrzkomórkowymi (PZ). N – koniec białka zawieszony jest w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, natomiast C – koniec w cytoplazmie

*CXCR4* ulega ekspresji przede wszystkim na komórkach hematopetycznych i nieukierunkowanych tkankowo komórkach macierzystych. Jest ponadto obecny na powierzchni dojrzałych komórek krwi: limfocytów, monocytów, płytek krwi [61], również na komórkach śródbłonna, podścieliska oraz komórkach pigmentowych siatkówki, mięśniowych komórkach satelitarnych, wątrobowych komórkach owalnych, macierzystych komórkach nerwowych, komórkach grasicy, mózgu, śledziony, żołądka czy jelita cienkiego [42,69].

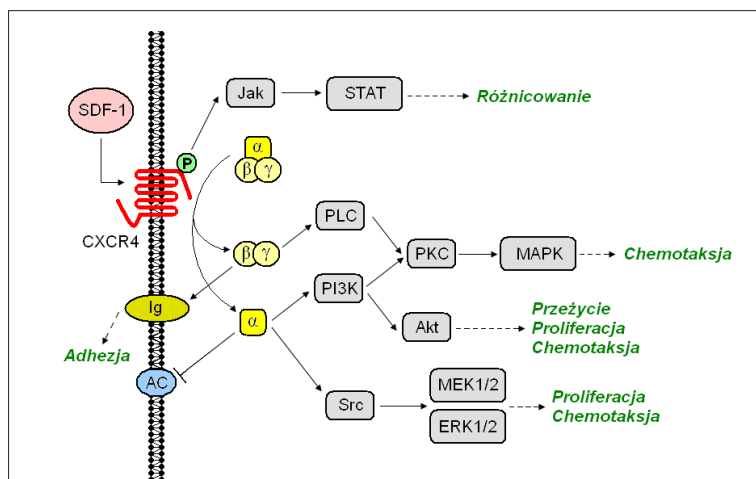
Oba receptory wiążące SDF-1, *CXCR4* oraz *CXCR7*, należą do tej samej rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G (G protein-coupled receptor – GPCR). Jest to zarazem najliczniejsza i najbardziej zróżnicowana rodzina receptorów, licząca około 1 000 białek. U człowieka receptory te kodowane są przez 1% genów i biorą udział w przekazywaniu różnych typów sygnałów, między innymi hormonalnych, wzrokowych czy zapachowych.

Gen kodujący białko *CXCR4* znajduje się na chromosomie 2 w pozycji 2q21 (<http://www.genome.jp/kegg>). Składa się z dwóch eksonów, z których pierwszy jest znacznie krótszy (103 pary zasad, z których pierwsze 88 nie ulega translacji, zaś 15 jest kodujących), a drugi dłuższy (1563 pary zasad, z których translacji ulega 1044, począwszy od kodonu szóstego), rozdzielonych pojedynczą sekwencją intronową liczącą 2132 pary zasad (nukleotydy 104-2235) [17]. Miejsce startu transkrypcji znajduje się na 32 parze zasad za kasetą TATA, zaś jej koniec stanowi 3798 nukleotydy [104]. Kodony sygnału poliadenylacji (AATAAA) rozpoczynają się od 3777 nukleotydu. Ekson pierwszy koduje 5 aminokwasów, zaś ekson drugi – 348 aminokwasów. Sześć par zasad za ostatnim kodonem pierwszego eksonu zidentyfikowano miejsce alternatywnego składania (splicing),

przypominające opisane wcześniej podobne miejsce w genie mysiego *CXCR4*, umożliwiające powstawanie dwóch potencjalnych transkryptów [17].

Sam łańcuch białkowy liczy 352 aminokwasowy [14]. Wszystkie receptory GPCR zbudowane są podobnie. Na jedną cząsteczkę receptora składa się zawsze pojedynczy, długi łańcuch polipeptydowy. Uformowany jest on w siedem helis transmembranowych, stąd wzięta jest inna nazwa tych białek: receptory 7TM (7 transmembranedomain receptors). Odcinki transbłonowe, ponumerowane od H1 do H7, są silnie konserwatywne ewolucyjnie. O różnorodności i swoistości receptorów decydują ich pętle cytoplazmatyczne oraz zewnątrzkomórkowe. N-końiec białka *CXCR4*, podobnie jak w przypadku pozostałych receptorów tej rodziny, znajduje się w przestrzeni międzykomórkowej. Zawiera on potencjalne miejsca glikozylacji: Asn11 oraz Asn176 [14]. Zamiana asparaginy w pozycji 11 na glutaminę bądź leucynę zakłóca wiązanie SDF-1 z receptorem, a więc i przekazywanie sygnału. Natomiast na C-końcu białka, zawieszonym w cytoplazmie komórki, znajdują się potencjalne miejsca fosforylacji.

Aby zapoczątkować kaskadę przekazywania sygnału, ligand musi się związać z receptorem w jego części hydrofobowej, tworzącej tak zwaną „kieszę”. Białko G przyłączone jest w rejonie trzeciej pętli cytoplazmatycznej. Gdy chemokina SDF-1 wchodzi w interakcję z receptorem *CXCR4*, inicjowana jest wymiana GDP na GTP w podjednostce  $\alpha$  białka G. Prowadzi to do rozpadu powyższego białka na podjednostkę  $\alpha$  oraz kompleks  $\beta\gamma$ . Aktywowane w ten sposób podjednostki zapoczątkują różnorakie kaskady reakcji. W przypadku receptora *CXCR4* i jego liganda SDF-1, są to przede wszystkim szlaki fosfolipazy C/PLC oraz kinazy



Ryc. 3. Schemat przekazywania sygnału przez parę białek SDF-1/CXCR4 (na podstawie [14,37,61])

fosfatydyloinozytolowej-3 (PI3K)/AKT. Ich aktywacji przyspiguje się propagacją przeżycia komórki, a więc działanie antyapoptotyczne oraz proliferację [56], migrację komórek pod wpływem gradientu SDF-1 [22,82] i ich adhezję [14]. Ponadto aktywowany jest szlak kinaz MEK/MAP (mitogen-activated protein kinase), zwiększających ekspresję genów promujących proliferację i przeżycie komórek [61], również rakowych [19]. Aktywacji ulegają także białka z rodziny kinaz tyrozynowych Src, promujących adhezję [14,45]. Uważa się ponadto, iż kompleks SDF-1/CXCR4 może aktywować szlak kinaz białkowych Jak/STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription), bez pośrednictwa białek G [14].

Wyniki badań wskazują, iż przekazywanie sygnału przez parę białek SDF-1/CXCR4 jest procesem niezwykle złożonym i delikatnym, zależnym od typu komórek i środowiska.

Zahamowanie przekazywania sygnału przez receptor CXCR4 odbywa się za pośrednictwem odwracalnej endocytozy tego białka do wnętrza komórki po wcześniejszym odłączeniu się jego liganda [61]. Proces ten ma podstawowe znaczenie w migracji hematopoetycznych komórek macierzystych między szpikiem kostnym a krwią. Podobnie regulacja przekazywania sygnału zachodzić może poprzez zahamowanie białek efektorowych receptora CXCR4 [69].

### ZWIĄZEK CXCR4 Z PODATNOŚCIĄ NA CHOROBY NOWOTWOROWE

Uważa się, iż zarówno czynnik pochodzenia stromalnego 1 (SDF-1), jak i jego receptor CXCR4, pełnią ważne funkcje w procesie nowotworowym. W wielu nowotworach różnego pochodzenia wykryto wzmożoną ekspresję białka CXCR4, np. w raku trzustki [59], nerek [95], jajników [96] czy w glejaku wielopostaciowym (glioblastoma multiforme) [85]. Co ciekawe, jest to receptor chemokinowy najczęściej występujący na komórkach rakowych [102]. Na przykład w komórkach raka wątrobowokomórkowego (pierwotny rak wątroby, hepatocellular carcinoma – HCC) wykryto nadekspresję obu białek (SDF-1 i CXCR4) oraz opisano ich związek z rozwojem choroby [62,66,98]. Białka te wpływają zarówno na proliferację komórek rakowych, jak i ich angiogenezę oraz metastazę.

Wykazano wzmożoną ekspresję białka CXCR4 w komórkach raka piersi, a także jego udział w powstawaniu

przerzutów nowotworu do płuc [69]. Podobnie SDF-1 jest wydzielany w dużych ilościach przez tkanki zwykle objęte przerzutami. Białko CXCR4 jest nieobecne lub występuje w niewielkich ilościach w zdrowych komórkach piersi, lecz jego ekspresja wzrasta w miarę rozwoju nowotworu. Badania wykazały także zwiększoną ekspresję SDF-1 oraz CXCR4 w przerzutach nowotworu do kości w porównaniu do pierwotnych komórek raka nerek [105] oraz raka jamy ustnej [69]. Ponadto prace poświęcone zależności rozwoju nowotworu od występowania CXCR4 sugerują, iż białko to może być zwiastunem ciężkiego przebiegu choroby [55,63].

Podobnie zaburzenia w oddziaływaniu SDF-1/CXCR4 mają znaczenie w rozwoju ostrej białaczki szpikowej (acute myeloid leukemia - AML) oraz ostrej białaczki limfoblastycznej linii komórek B (B-lineage acute lymphoblastic leukemia – ALL) [61,76], a także w innych zmianach patologicznych komórek B [36]. Wśród pacjentów cierpiących na AML zdecydowanie mniejszą przeżywalnością i częstszymi nawrotami choroby charakteryzują się osoby, u których obserwowana jest nadekspresja CXCR4 na komórkach CD34<sup>+</sup> [86]. Wykazano, iż oddziaływanie tego receptora z jego ligandem kierują zasiedlaniem i przeżyciem komórek rakowych, przyczyniając się do ich oporności na apoptozę indukowaną przez chemioterapię. Z tego też powodu zaproponowano antagonistów oddziaływać SDF-1/CXCR4 jako potencjalne leki m.in. w terapii ostrej białaczki limfocytowej. Substancje te miałyby zmniejszyć czułość komórek rakowych na obecność SDF-1, co z kolei obniżyłoby efekt proliferacyjny i antyapoptotyczny tej chemokiny [52].

Czynnikami potencjalnie wpływającymi na rozwój nowotworu (np. przez wywołanie nadmiernej ekspresji CXCR4 czy SDF-1) mogą być polimorfizmy genów kodujących powyższe białka. Jedną z przebadanych mutacji była zamiana pojedynczego nukleotydu w genie *SDF-1* (rs1801157). Polimorfizm ten, znajdujący się na końcu 3'UTR genu, polega na substytucji guaniny na adeninę w łańcuchu DNA. W populacji europejskiej powyższą zamianą w genotypie charakteryzuje się około 20% osób. Stwierdzono, iż częstość występowania allelu zmutowanego (A) była znacznie większa u pacjentów cierpiących na pierwotnego raka wątroby (hepatocellular carcinoma – HCC), niż u osób zdrowych [18]. Wykazano również, iż spośród pozostałych,

wziętych pod uwagę potencjalnych czynników rozwoju choroby, takich jak płeć czy grupa etniczna, jedynie wiek miał istotne znaczenie. Nasza grupa badawcza wykryła ponadto związek między występowaniem powyższego polimorfizmu a podatnością na chłoniaki nieziarnicze (non-Hodgkin's lymphoma – NHL) [40]. Zaobserwowano znacznie częstsze występowanie zmutowanego allelu A u pacjentów chorych na NHL niż u osób zdrowych.

Polimorfizm receptora CXCR4, będący cichą mutacją w jego genie (rs2228014, Ile>Ile), także stał się przedmiotem badań. Chang i wsp. [18] przestudowali częstość występowania tej mutacji u osób cierpiących na raka wątrobowokomórkowego. Nie stwierdzili związku badanego polimorfizmu genu CXCR4 z podatnością i przebiegiem choroby. Teng i wsp. [102], badając rolę tej mutacji w rozwoju raka jamy ustnej, także nie odnaleźli znaczących różnic między częstością występowania alleli CXCR4-T u chorych i zdrowych osób. Zaobserwowali jednak, iż pacjenci posiadający przynajmniej jeden zmutowany allel T znacznie częściej charakteryzowali się przerzutami do węzłów chłonnych i III lub IV stadium choroby.

Z kolei nasze badania nad mutacją rs2228014 w genie *CXCR4* dotyczyły pacjentów poddanych auto- lub alogransplantacji komórek mobilizowanych do krwi oraz ich zdrowych dawców przeszczepów alogenicznych zmutowany allel CXCR4-T wykryto u 47,5% osób. Stanowi to znacznie większy odsetek występowania mutacji rs2228014 genu *CXCR4*, niż w populacji tajwańskiej, przebadanej przez Tenga [102] oraz Changa i wsp. [18].

#### RECEPTOR CXCR4 A INFЕКCJE WIRUSOWE ORAZ NIEDOBORY ODPORNOŚCI

Nie mniej ważny jest udział receptora dla SDF-1 w procesie zarażenia limfocytów ludzkim wirusem niedoboru odporności (human immunodeficiency virus – HIV). Dowiedziono, iż CXCR4 pełni rolę koreceptora i niezbędny jest podczas wnikanania wirusów HIV typu T-limfotropowego (X4) do komórki [4,27]. Natomiast w przypadku wirusów HIV typu M oraz R5 funkcję koreceptora spełnia białko CCR5 [94]. Nie dziwi więc, iż z tego powodu leki przeciw AIDS są przeważnie inhibitorami któregoś z tych białek.

Mutacje genu CXCR4 analizowano także u osób cierpiących na rzadki zespół niedoboru odporności, nazywany WHIM (warts, hypogammaglobulinemia, recurrent bacterial infection and myelokathexis) [3]. Trzy z nich to mutacje nonsensowne, jedna zaś powoduje przesunięcie ramki odczytu [14]. Każdy z tych polimorfizmów skutkuje skróceniem C-końca receptora CXCR4 przez usunięcie 10–19 aminokwasów z łańcucha białkowego, co prowadzić może do straty potencjalnych miejsc fosforylacji. Białko pozbawione miejsc fosforylacji charakteryzuje się zaburzeniami zarówno aktywacji jak i inaktywacji, a także wzmocnioną chemotaksją.

#### ZWIĄZEK RECEPTORA CXCR4 Z PODATNOŚCIĄ NA INNE SCHOROZENIA

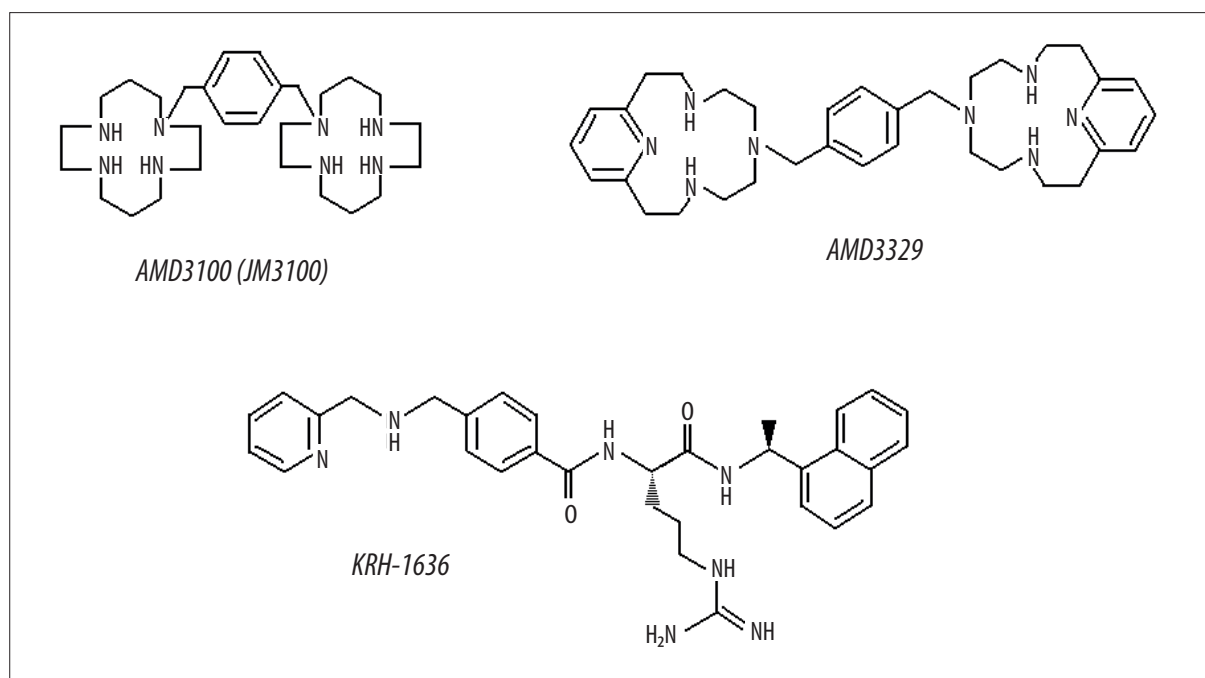
Oddziaływania SDF-1/CXCR4 pełnią ponadto główną rolę w akumulacji limfocytów T CD4<sup>+</sup> w błonie maziowej

chorych cierpiących na reumatoidalne zapalenie stawów (rheumatoid arthritis – RZS, znane także pod nazwą gośćca przewlekłe postępujące) [78]. Choroba ta dotyka 1–2% społeczeństwa i ma podłoże autoimmunologiczne. Jednym z kryteriów oceny tego schorzenia jest występowanie czynnika reumatoidalnego (RF). Coraz częściej oznaczane są ponadto przeciwciała przeciwko cyklicznemu cytrulinowemu peptydowi (anty-CCP), najbardziej swoistemu markerowi tej choroby. W ostatnich latach molekuly adhezyjne zaangażowane w rozwój RZS zostały opisane, jednak rola chemokin w powyższym schorzeniu wciąż pozostaje niewyjaśniona. Badania w tym kierunku podjęli Nanki i wsp., którzy przebadali ekspresję 11 różnych receptorów chemokinowych w chorobowo zmienionej tkance [78]. Stwierdzili, iż CXCR4 jest nadekspresjonowany w limfocytach T pamięci (CD4<sup>+</sup>) zaatakowanej schorzeniem błony maziowej. Czynniki pochodzenia stromalnego 1 (SDF-1), obecny w chorej błonie, kieruje migracją tych komórek jednocześnie uodparniając je na apoptozę.

Trwają ponadto badania nad rolą szlaku SDF-1/CXCR4 w rozwoju astmy i zapaleń indukowanych alergenem [68]. Wydaje się, że zastosowanie cząsteczek o podobnym działaniu do SDF-1 czy CXCR4 zwiększa szansę wyleczenia chorób, u podłoża których leży zakłócenie interakcji między tymi białkami.

#### MOLEKULY O DZIAŁANIU ANALOGICZNYM DO SDF-1

Trzyczłonowa struktura białka SDF-1 została poznana zarówno za pośrednictwem krystalografii jak i spektroskopii NMR [16,21,30]. Obecnie wiadomo, iż chemokina ta ma trzy główne domeny: N-kończową (zawierającą reszty kluczowe dla wiązania i aktywacji CXCR4), centralną (złożoną z trzech antyrównoległych struktur β) oraz C-kończową (amfilofilową α-helise) [21,49]. Analogi tej chemokiny bada się w celu ich potencjalnego wykorzystania jako czynników mielosupresyjnych. Mogłyby mieć zastosowanie np. w chemioterapii. Badania dowodzą, iż analogi zawierające reszty aminokwasowe 1–8, 1–9 (w tym przypadku analog może mieć postać zarówno monomeru jak i dimeru), 1–17 oraz 5–14 N-końca łańcucha SDF-1, mają zdolność wiązania się z CXCR4, choć wydajność tej reakcji jest mniejsza niż w przypadku białka natywnego [50,67]. Inny analog, w którym reszty 5–14 białka połączone zostały z resztami 55–67 C-końca za pomocą czterech reszt glicyny, ma podwyższoną aktywność biologiczną w porównaniu do analogu zawierającego jedynie reszty końca N [70]. Wyniki te zostały potwierdzone przez Tudana i wsp. [103]. Przebadali oni analogi, w których reszty 1–14 N-końca połączone zostały łańcuchem czterech glicyn z C-kończowymi resztami 55–67. Były to dwa analogi laktamowe: *cyclo(Lys<sup>20</sup>-Glu<sup>24</sup>)-sdf-(1-31)-NH<sub>2</sub>* i *cyclo(Glu<sup>24</sup>-Lys<sup>28</sup>)-sdf-(1-31)-NH<sub>2</sub>* oraz analog liniowy: *sdf-(1-31)-NH<sub>2</sub>*. Analog liniowy, podobnie jak to wykazali Luo i wsp. [70], zdolny był do wiązania receptora, jednak w znacznie mniejszym stopniu niż natywny SDF-1. Laktamowy charakter pozostałych analogów (zapewniający stabilizację C-końcowej α-helisy) pozwolił natomiast podwyższyć tę aktywność stukrotnie, niemal do poziomu natywnego SDF-1. Oznacza to, iż choć reszty N-końca konieczne są do wiązania CXCR4 – α-helikalna konformacja C-końca dodatkowo podwyższa powinowactwo analogu do receptora. Natomiast swoiste reszty na C-końcu łańcucha SDF-1 zdają się nie mieć



Ryc. 4. Przykłady związków pochodnych bicyclam, wykazujących działanie antagonistyczne w stosunku do CXCR4

wpływu na oddziaływanie SDF-1/CXCR4. Przyjmuje się jednak, iż odgrywają one ważną rolę w procesie wiązania tej chemokiny do komórek docelowych, choć zjawisko to wciąż pozostaje niewyjaśnione [72]. Stwierdzono ponadto, iż C-koniec białka SDF-1 podnosi CXCR4-zależną aktywność tej chemokiny, jednak prawdopodobnie nie za pośrednictwem silniejszego oddziaływania z receptorem, a poprzez wiązanie heparyny [70].

#### MOLEKUŁY ZAKŁÓCAJĄCE ODDZIAŁYWANIE SDF-1 Z JEGO RECEPTOREM

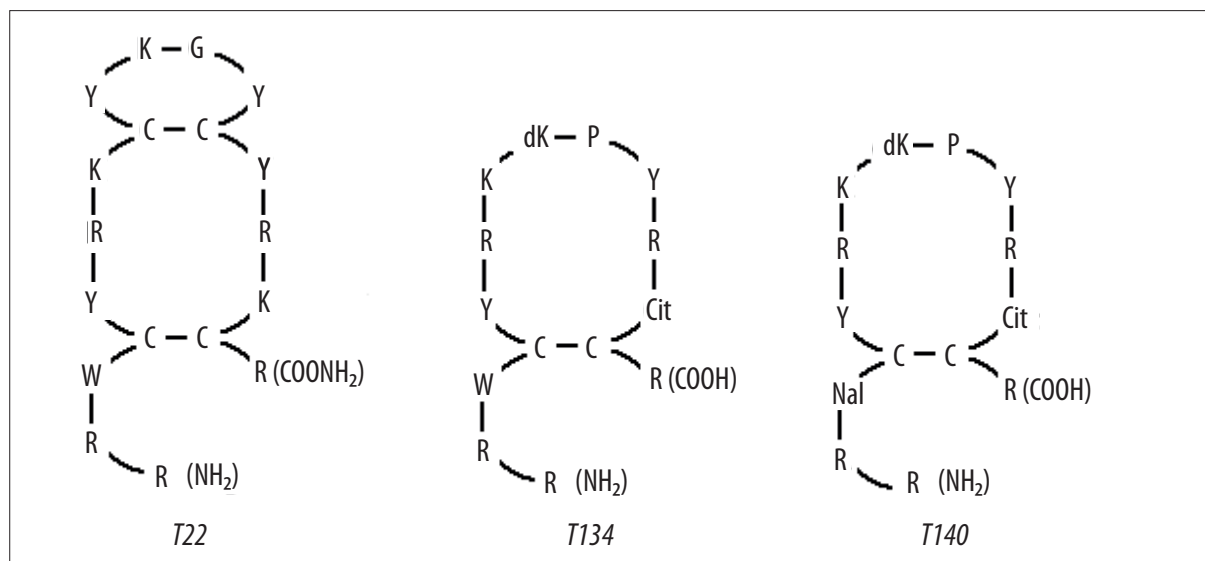
Jak wspomniano wcześniej, CXCR4 jest jednym z podstawowych białek zaangażowanych w proces wnikania wirusa HIV do komórki. Dlatego też badania nad antagonistami SDF-1/CXCR4, a więc związkami zakłócającymi interakcje między tymi białkami, mają na celu przede wszystkim znalezienie nowych, aktywniejszych i bezpieczniejszych leków w terapii anty-HIV. Niektóre ze związków o powyższym działaniu wykazują ponadto inne aktywności, które mogą znaleźć potencjalnie zastosowanie w praktyce klinicznej.

Do najpopularniejszych antagonistów receptora CXCR4 należą wielotlenowe nieorganiczne związki, takie jak HPA-23 [(NH<sub>4</sub>)<sub>18</sub>(NaW<sub>21</sub>Sb<sub>9</sub>O<sub>86</sub>)<sub>17</sub>], JM1493 [H<sub>4</sub>SiW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>], JM1590 {K<sub>13</sub>[Ce(SiW<sub>11</sub>O<sub>39</sub>)<sub>2</sub>·2.26H<sub>2</sub>O]} czy JM2820 {[Me<sub>3</sub>NH]<sub>18</sub>[Si<sub>2</sub>W<sub>18</sub>Nb<sub>6</sub>O<sub>77</sub>]} [25,88]. Pod względem struktury, cząsteczki te przypominają polianionowe sfery lub kule. Atomy tlenu, noszące ładunek ujemny, rozmieszczone są na obrzeżach molekuly [26]. Pierwotnie związków tych używano jako inhibitorów replikacji DNA wirusa HIV w kulturach komórkowych, nigdy jednak nie zastosowano ich w klinicznym leczeniu AIDS, gdyż potencjalnie mogłyby ulegać akumulacji w narządach (np. wątrobie) i przyczyniać się do rozwoju nowotworów. Aby wyeliminować cytotoksyczność podjęto badania nad analogicznymi kompleksami metaloorganicznymi, jednak nie

wykazywały one większej selektywności ani aktywności niż nieorganiczne pierwowzory [97].

Interesujące wyniki dały badania nad analogami cyklam [28,29]. Większość jego pochodnych pozbawiona była aktywności anty-HIV, jednak udało się wyodrębnić również substancje o wyraźnych właściwościach inhibicyjnych w stosunku do wirusa HIV, np. bicyklam JM1657 i JM2763, a także AMD3329 [12]. Dalsze badania, prowadzone w celu potencjalnego doustnego podania bicyklamów jako związków o działaniu anty-HIV, doprowadziły do odkrycia kolejnych aktywnych analogów: AMD070 [91] oraz KRH-1636 [51].

Na szczególną uwagę zasługuje tu bicyklam o nazwie JM3100 [26,27], wykazujący aktywność anty-HIV już przy stężeniu około 0,005 µg/ml. Związek ten w sposób pośredni oddziałuje z glikoproteiną gp120, obecną na powierzchni otoczki wirusowej, co przyczynia się do zahamowania infekcji wirusa związanego już z błoną komórkową. W początkowym stadium infekcji gp120 wchodzi w interakcje z antygenem CD4, a następnie CXCR4, pełniącym rolę pomocniczego receptora przy wnikaniu wirusów HIV typu T-limfotropowego (X4) do komórki. To właśnie CXCR4 jest właściwym celem ataku bicyklam JM3100 (nazywanego również AMD3100), który działa analogicznie do właściwego liganda CXCR4: SDF-1. AMD3100 zakłóca przekazywanie sygnału przez parę białek SDF-1/CXCR4 [33,93,94], stąd hamuje on także infekcję małpiego wirusa niedoboru odporności (simian immunodeficiency virus – SIV), o ile jest on CXCR4-zależny [92]. Z tego samego powodu AMD3100 nie wykazuje aktywności wobec wirusów HIV typu M oraz R5 (w przypadku których funkcję koreceptora spełnia białko CCR5) [94]. Antagonista ten zapobiega ponadto apoptozie zdrowych komórek w odpowiedzi na obecność białek otoczki wirusa [8]. Oddziaływanie AMD3100 z CXCR4 oparte jest na elektrostatycznych interakcjach między dodatnio



Ryc. 5. Polihemuzyny – krótkie polipeptydy wykorzystywane jako antagoniści CXCR4

naładowanymi atomami inhibitora, a ujemnie naładowanymi resztami asparaginianu w pozycjach 171, 182, 193 i 262 łańcucha receptora [39,47]. Co ciekawe AMD3100 wiąże się z CXCR4 niezależnie od typu komórki [46]. Do niedawna uważano, iż nie wchodzi w interakcje z innymi receptorami tej rodziny, jednak ostatnie badania temu przeczą [54,58]. Możliwe więc, że AMD3100 wpływa także na inne, CXCR4-niezależne, szlaki przekazywania sygnału. Ważne jest ponadto, iż inhibitor ten pozwala jednocześnie na interakcje niektórych agonistów CXCR4, np. RSVM i ASLW, poprzez ich wiązanie z receptorem w swoich miejscach, różnych od miejsca wiązania AMD3100 [89]. Przeprowadzone badania kliniczne potwierdzają skuteczność tego inhibitora w leczeniu pacjentów zarażonych wirusem HIV [90].

Wykryto także inne właściwości AMD3100. Obiecujące wyniki dały m.in. badania nad inhibicją SDF-1-zależnej migracji komórek chłoniaków niezziarniczych, poprzez zwiększenie apoptozy i zatrzymanie proliferacji tych komórek [80].

Na uwagę zasługują również wyniki badań nad liniami komórek białaczkowych (U937, HL-60, MO7e, KG1a oraz K562) [58]. W tym wypadku liczba migrujących komórek także znacznie spadła na skutek traktowania ich AMD3100 lub innym antagonistą CXCR4 – T140. Badacze stwierdzili jednak, iż AMD3100 znacznie zwiększa proliferację badanych linii białaczkowych *in vitro*, wprowadza większą liczbę komórek w fazę S cyklu komórkowego, a także zmniejsza stopień ich apoptozy o około 1/3. Wykazano jednocześnie, iż za stymulację proliferacji tych komórek odpowiedzialne są najpewniej nie oddziaływania AMD3100 z CXCR4, a z CXCR7 – drugim z receptorów dla SDF-1.

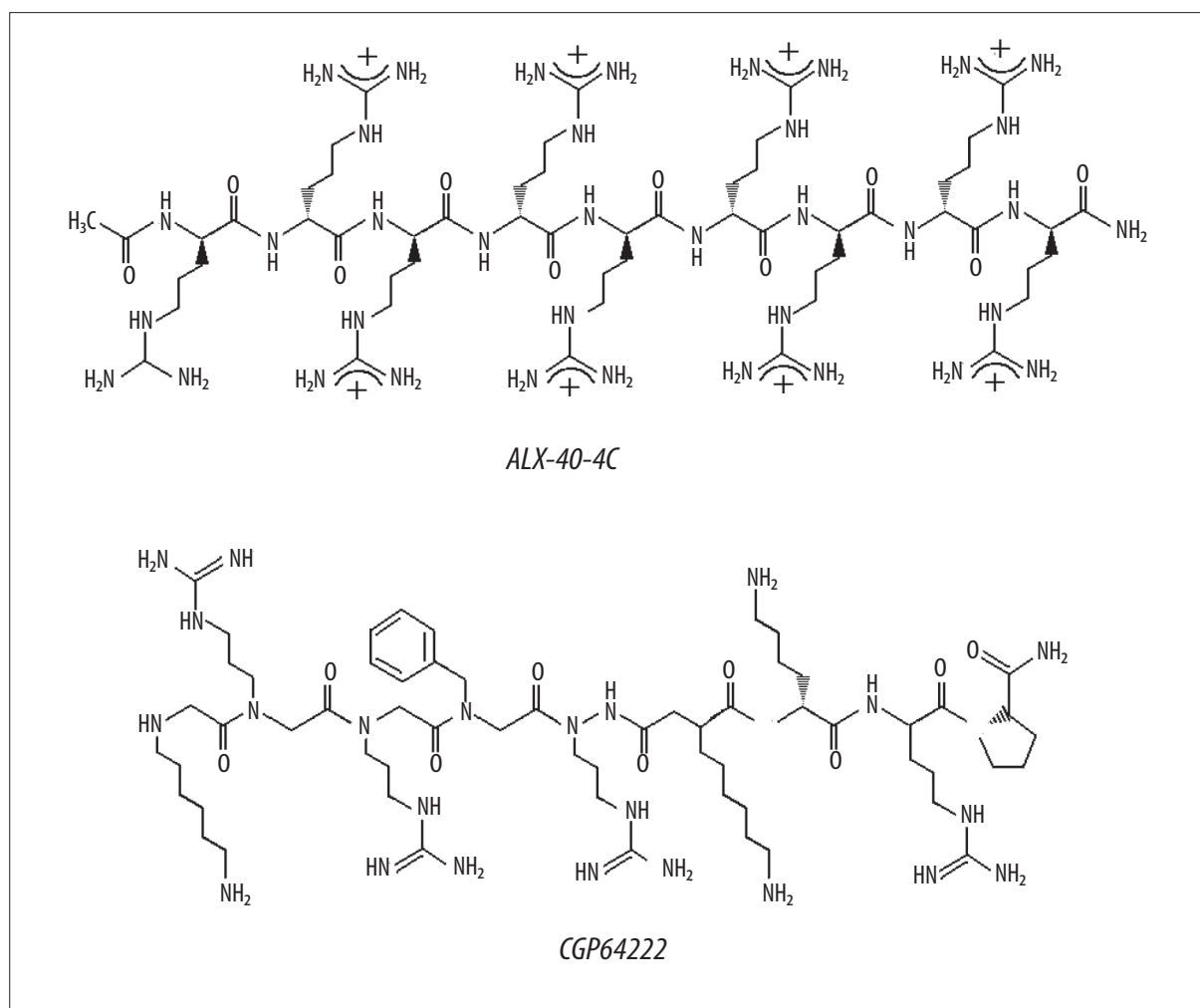
Inne grupy badawcze zaobserwowały ponadto wzrost liczby hematopoetycznych komórek macierzystych CD34<sup>+</sup> we krwi obwodowej w odpowiedzi na traktowanie AMD3100 [48], zarówno u myszy [13], jak i u ludzi [64]. Okazało się, iż związek ten oddziałuje w sposób synergiczny z czynnikiem stymulującym wzrost kolonii granulocytów (G-CSF), mobilizując komórki macierzyste do krwiobiegu [24,65].

Optymalne rezultaty mobilizacji za pośrednictwem G-CSF otrzymano podając jednorazowo AMD3100 w piątym dniu, w którym przeprowadzono leukaferezę. Odkrycie to otwiera nowe możliwości wykorzystania tego inhibitora jako czynnika mobilizującego podczas pobierania materiału przeszczepowego. Obecnie trwają badania nad wprowadzeniem go do praktyki klinicznej [6].

Kolejną grupą związków stosowanych jako antagoniści CXCR4 są polihemuzyny (polyphemusins), krótkie polipeptydy wyizolowane po raz pierwszy z hemocytów skrzyplacza amerykańskiego (*Limulus polyphemus*) [74], znane przede wszystkim ze swoich właściwości przeciwbakteryjnych i przeciwwgrzybiczych, a także hamujących infekcję wirusa HIV. Najpopularniejszymi antagonistami CXCR4 w tej grupie związków są: T22 ([Tyr-5,12, Lys-7]-polyphemusin-2) oraz aktywniejsze a za razem mniej toksyczne T134 (des-[Cys(8,13), Tyr(9,12)]-[D-Lys10, Pro11, L-citrulline16]-T22) i T140 oraz ich pochodne ([L-3-(2-naphthyl)alanine3]-T134) [1,99,100,101]. Niektóre z tych inhibitorów całkowicie hamują chemotaksję wywołowaną SDF-1, a także tłumią migrację komórek pre-B ostrej białaczki limfoblastycznej do stromy szpiku kostnego [53].

Octan amidu N- $\alpha$ -acetylo-nona-D-argininy, ALX-40-4C, także blokuje receptor CXCR4, przez co zapobiega infekcji wirusa HIV [35], jednak badania kliniczne nie potwierdziły jego skuteczności jako leku na AIDS [34]. Również peptoid CGP-64222 blokuje CXCR4 [23], co jednak nie dziwi ze względu na jego podobieństwo do innych antagonistów tego receptora, takich jak T22, T134, T140 czy ALX-40-4C.

Antagoniści CXCR4, charakteryzujący się wysoką selektywnością oraz wydajnością, znajdują potencjalne zastosowanie nie tylko w leczeniu osób zarażonych wirusem HIV. Substancje te mogą okazać się efektywnymi lekami także podczas terapii przeciwnowotworowej, jako że receptor dla SDF-1 ekspresjonowany jest na powierzchni wielu rodzajów komórek rakowych [102] i uważa się, iż ma wpływ na powstawanie przerzutów [75]. Odkryto również, że wzajemne oddziaływania białek SDF-1/CXCR4 mogą



Ryc. 6. Przykładowe peptoidy wykazujące działanie antagonistyczne w stosunku do CXCR4

mieć wpływ na rozwój innych schorzeń, takich jak choćby kolagenozależne zapalenie stawów czy alergię. Terapia z użyciem inhibitorów CXCR4 może mieć więc w przyszłości znaczenie w leczeniu tych chorób.

#### **UDZIAŁ RECEPTORA CXCR4 W UWALNIANIU KOMÓREK HSC DO KRWI OBWODOWEJ ORAZ W PROCESIE ICH ZASIEDLANIA W NISZACH SZPIKOWYCH BIORCY**

Kliniczna mobilizacja progenitorowych komórek macierzystych ze szpiku do krwi obwodowej przypomina naturalny proces uwalniania tych komórek do krwi w odpowiedzi na sygnały zapalne lub uszkodzenie komórki [20]. Obecnie ta metoda pozyskania materiału przeszczepowego cieszy się największym zainteresowaniem ze względu na bezpieczeńszą dla dawcy procedurę jej przeprowadzenia w porównaniu z protokołem przeszczepienia szpiku. Osiągnięto to zarówno poprzez eliminację ryzyka związanego z zabiegiem operacyjnym jak i brak działań niepożądanych.

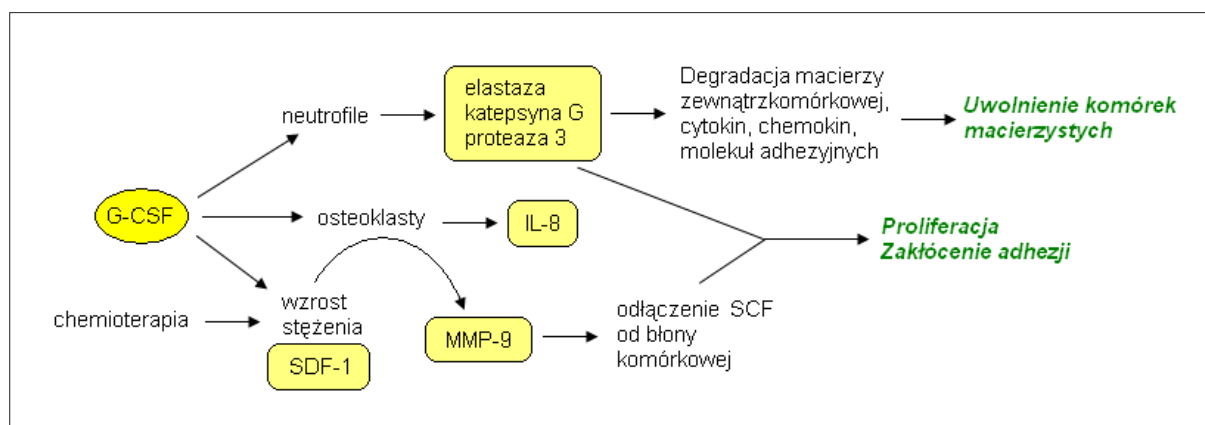
Proces mobilizacji zapoczątkowany jest przez indukowaną czynnikami stresowymi aktywację neutrofilów i osteoklastów. Efekt ten uzyskuje się dzięki podaniu cytokin: czynnika stymulującego wzrost kolonii granulocytów (G-CSF) oraz czynnika stymulującego wzrost kolonii granulocytów i makrofagów (granulocyte-monocyte colony stimulating

factor – GM-CSF). Jedynie te dwa białka zostały dopuszczone przez FDA (Food and Drug Administration) do użycia w procedurach pobrania materiału przeszczepowego, mimo iż przebadano pod tym kątem również wiele innych cytokin oraz ich kombinacji. Białko G-CSF może być stosowane samodzielnie, natomiast mobilizacja za pośrednictwem GM-CSF wymaga dodatkowego podania G-CSF, gdyż wydajność procesu nie jest wystarczająca. Podobnie efekt mobilizacyjny uzyskać można przez zastosowanie chemioterapii (zniszczenie DNA komórki indukuje jej reakcję na stres) czy niektórych leków. Proces mobilizacji hematopoetycznych komórek macierzystych do krwi obwodowej został szczegółowo przedstawiony na ryc. 7.

Ciąg następujących po sobie wydarzeń, powtarzany i intensywniejszy z każdym kolejnym cyklem klinicznej stymulacji czynnikiem G-CSF, owocuje mobilizacją komórek macierzystych ze szpiku kostnego do krwi obwodowej. Po osiągnięciu odpowiedniego stężenia we krwi, komórki te są następnie separowane za pośrednictwem leukaferozy i podawane biorcy.

Niestety w praktyce klinicznej rzadko zdarza się, aby już w pierwszym preparacie leukaferetycznym uzyskano wystarczającą liczbę komórek CD34<sup>+</sup> do przeprowadzenia transplantacji. Zwykle cały proces mobilizacji trzeba





Ryc. 7. Mechanizm procesu klinicznej mobilizacji komórek macierzystych ze szpiku do krwi obwodowej. Chemioterapia oraz prozapalne cytokiny, takie jak G-CSF, powodują krótkotrwały wzrost stężenia SDF-1 w szpiku kostnym, jako chemokiny promującej przeżycie komórki w sytuacji stresu. Białko SDF-1 pobudza następnie osteoklasty do wytwarzania metaloproteaz (matrix metalloproteinase – MMP-9). Enzymy te pośredniczą w odłączaniu się cytokiny SCF (stromal cell factor) od błony komórkowej, co w połączeniu z aktywnością proteazy 3 skutkuje proliferacją komórek progenitorowych, reorganizacją macierzy zewnątrzkomórkowej szpiku kostnego oraz zakłóceniem oddziaływań wielu molekuł adhezyjnych, cytokin oraz chemokin, w tym także pary białek CXCR4/SDF-1 (poprzez częściową degradację zarówno SDF-1 jak i jego receptora). Powoduje to spadek aktywności SDF-1, będącego chemoatraktantem komórek CD34<sup>+</sup>, wobec czego promowane jest uwalnianie HSC do krwi obwodowej (na podstawie [20,41,61,71])

powtórzyć, czasem nawet 5- czy 6-krotnie. Dlatego też sposoby poprawy wydajności mobilizacji cieszą się obecnie dużym zainteresowaniem.

Jednym z istotnych czynników wpływających na wydajność mobilizacji u osób chorych jest postawiona diagnoza [40]. Nasze badania wykazały, iż pacjenci ze szpiczakiem mnogim charakteryzują się znacznie lepszą wydajnością mobilizacji niż ci z chłoniakami czy ziarnicą złośliwą [40,42].

Basak i wsp. badali mobilizację u pacjentów cierpiących na szpiczaka mnogiego [4], a także ziarnicę złośliwą i chłoniaki niezziarnicze [5]. Badania miały na celu porównanie wydajności mobilizacji u osób poddanych wcześniej autologicznemu przeszczepowi komórek mobilizowanych ze szpiku do krwi obwodowej (pierwsza grupa) z pacjentami poddawaniymi procedurze mobilizacji po raz pierwszy (druga grupa). Do usprawnienia mobilizacji komórek macierzystych użyto Plerixaforu (AMD3100), nowego leku będącego inhibitorem CXCR4, opisanego pokrótce w poprzednim rozdziale. Wykazano, iż podanie Plerixaforu w połączeniu z terapią G-CSF podnosi wydajność mobilizacji przez zwiększenie liczby uwolnionych komórek CD34<sup>+</sup>, co umożliwia przeprowadzanie leukaferazy z uzyskaniem większej liczby komórek w preparacie [31,32]. Inhibitor ten wydaje się obecnie najefektywniejszym czynnikiem mobilizacyjnym, szczególnie u osób, u których inne procedury zawiodły [4,15]. Niestety, nawet mimo zastosowania tak usprawnionej procedury, wydajność mobilizacji u pacjentów cierpiących na chłoniaki niezziarnicze lub poddanych wcześniej radioterapii okazała się niewystarczająca do przeprowadzenia autotransplantacji [5].

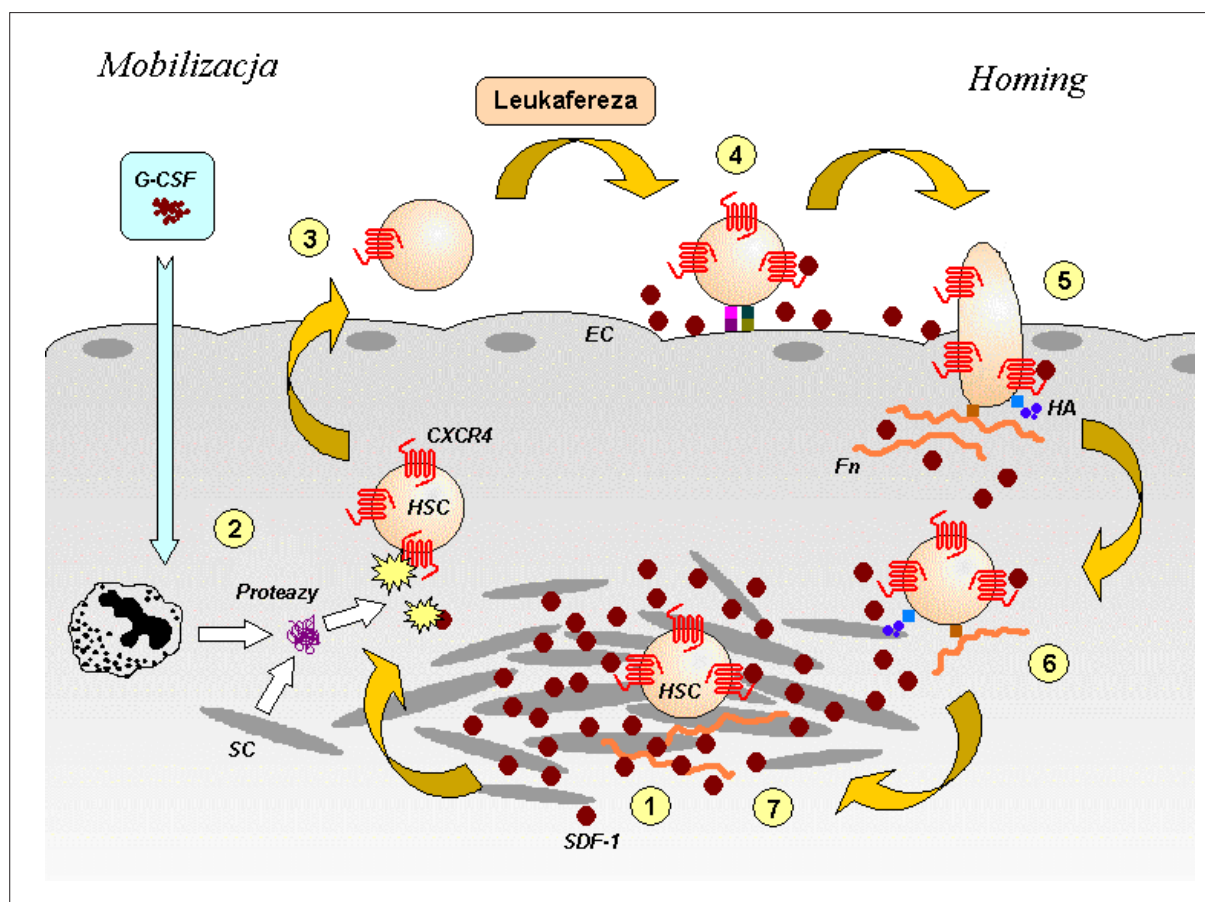
Nasze badania wykazały, iż także czynniki immunogenetyczne mogą mieć wpływ na wydajność indukowanej klinicznie mobilizacji komórek macierzystych ze szpiku do krwi obwodowej. Polimorfizm genu *SDF-1* (rs1801157), będący zamianą guaniny na adeninę w pozycji 801 na końcu 3'-UTR genu, ma związek z większą wydajnością mobilizacji komórek CD34<sup>+</sup> uwalnianych do krwi obwodowej

[11]. Liczba komórek progenitorowych, uzyskanych w wyniku leukaferazy, okazała się znacznie większa u zdrowych dawców przeszczepów alogenicznych, obdarzonych allelem CXCL12-3'A, szczególnie w przypadku homozygot (CXCL12-3'AA). Co więcej, do przeprowadzenia transplantacji z użyciem materiału pobranego od dawców będących homozygotami GG konieczne było wykonanie większej liczby leukaferaz w porównaniu do dawców o genotypie AA. Związek powyższego polimorfizmu z wydajnością mobilizacji u osób zdrowych został opisany także przez innych badaczy [7,71].

Również inny przebadany przez naszą grupę polimorfizm wpływał na efektywność mobilizacji u biorców autologicznych przeszczepów PBPC [10,40]. Była to zamiana zasady C na T w intronie genu izoformy 3 receptora dla czynnika stymulującego wzrost kolonii granulocytów (*G-CSF3R*): rs3917924. Zaobserwowaliśmy zależność między obecnością mutacji (allelu T) i mniejszą wydajnością mobilizacji komórek CD34<sup>+</sup>. Podobne wyniki uzyskała też grupa Martin-Antonio i wsp. badając osoby zdrowe. Obserwowali oni wyraźny spadek wydajności mobilizacji u osób obdarzonych genotypem TT [71].

Martin-Antonio i wsp. opisali ponadto wpływ polimorfizmu rs2680880 genu *CXCR4* (obejmującego zamianę adeniny na tyminę w intronie) na wydajność mobilizacji komórek macierzystych, traktowanych czynnikiem G-CSF, do krwi obwodowej [71]. Częstość występowania tej mutacji waha się od 0 – w przypadku populacji azjatyckiej – do prawie 60% wśród Europejczyków. U dawców posiadających oba allele dzikie (AA), liczba uzyskanych podczas pierwszej separacji komórek CD34<sup>+</sup>/kg masy ciała była znacznie niższa niż u osób charakteryzujących się genotypem TT lub TA. Podobnie mniejsza była całkowita liczba komórek CD34<sup>+</sup> uzyskanych podczas pierwszej separacji.

Nasza grupa przeanalizowała z kolei relację wydajności mobilizacji z innym, wspomnianym już polimorfizmem *CXCR4*: rs2228014. Polega on na zamianie reszty cytozyny



Ryc. 8. Mobilizacja i zasiedlanie (homing) hematopoetycznych komórek macierzystych (HSC) w niszach szpikowych. 1) Komórki HSC zakotwiczone są w niszach szpikowych przede wszystkim za pośrednictwem oddziaływań pomiędzy SDF-1 (nieustannie wytwarzanym przez komórki zrębu, SC) i jego receptorem, CXCR4, ekspresjonowanym na powierzchni komórek HSC. 2) Kliniczne podanie G-CSF skutkuje lokalną produkcją proteaz (MMP, elastazy i katepsyny G) przez leukocyty lub komórki zrębu (SC). Molekuły te zakłócają interakcje VLA-4/VCAM-1, c-Kit/SCF i CXCR4/SDF-1, degradując zarówno SDF-1 jak i jego receptor. 3) Brak mocowania do komórek zrębu w połączeniu z utratą aktywności SDF-1 promuje uwalnianie HSC do krwi obwodowej, skąd mogą zostać pozyskane w wyniku leukaferazy i podane biorcy. 4) SDF-1, wytwarzany przez komórki śródbłonna (endotelium, EC), ściąga komórki HSC do jego powierzchni. Wiązanie SDF-1 do CXCR4 indukuje aktywację integrzyn VLA-4 i LFA-1 i ich wiązanie z VCAM-1 i ICAM-1 (obecnymi na komórkach EC), przyczyniając się do silnej adhezji. 5) Zatrzymanie HSC przy powierzchni nabłonka endotelium i stymulacja polimeryzacji aktyny prowadzi do migracji HSC przez nabłonek. Pośredniczą w niej integryny VLA-4 i VLA-5 w obecności fibronektyny (Fn). 6) HSC ulegają następnie polaryzacji i migrują zgodnie z gradientem SDF-1 – który jest stale wytwarzany przez komórki zrębu (SC) – aż osiągną niszę hematopoetyczną. Migracja indukowana SDF-1 powiązana jest z obecnością CD44 – receptora kwasu hialuronowego (HA). 7) Kotwiczenie HSC w niszach szpikowych zależy głównie od interakcji z komórkami zrębu i macierzą zewnątrzkomórkową (Fn, HA) (na podstawie [20,41,61,79,81], zmodyfikowano)

na tymie w łańcuchu DNA, co jednak nie prowadzi do zmiany w łańcuchu aminokwasowym (Ile138Ile). Nie stwierdziliśmy jednak związku tego polimorfizmu z wydajnością mobilizacji, ani w grupie pacjentów poddanych autotransplantacji PBPC, ani u osób zdrowych – dawców alogenicznych komórek mobilizowanych do krwi [9].

Progenitorowe komórki macierzyste, uzyskane od dawcy w wyniku mobilizacji indukowanej G-CSF, są następnie podawane biorcy w celu odbudowy jego układu krwiotwórczego. Proces zasiedlania szpiku kostnego przez komórki hematopoetyczne (homing) jest wieloetapowy i obejmuje wiązanie tych komórek do komórek śródbłonna (endothelial cells – EC), ich migrację przez śródbłonek i kotwiczenie w niszach szpikowych [61]. Wzajemne oddziaływanie SDF-1/CXCR4 leży u podstaw homingu, jest więc podstawowe także dla przyjęcia się przeszczepu [41,61]. Szczegółowo proces ten przedstawiono na ryc. 8.

Zasiedlanie hematopoetycznych komórek macierzystych w niszach szpikowych zależy przede wszystkim od ich interakcji z komórkami zrębu szpiku kostnego oraz z macierzą zewnątrzkomórkową. Proces ten podtrzymywany jest nieustannym wytwarzaniem czynnika SDF-1 przez komórki zrębu. Badania dowodzą, iż przedtransplantacyjne traktowanie chemioterapią bądź radioterapią, a więc czynnikami indukującymi stan stresu, pobudza komórki do wzmożonego wytwarzania przeciwzapalnej chemokiny SDF-1, przyspieszając zasiedlanie przeszczepionych komórek [83].

Odzwierciedleniem procesu zasiedlania nisz szpikowych przez komórki CD34<sup>+</sup> po przeszczepieniu jest odnowa hematologiczna granulocytów i płytek krwi. Z tego też powodu przedmiotem naszych badań była również analiza zależności między polimorfizmem genów kodujących takie białka jak SDF-1, jego receptor CXCR4 i receptor dla

G-CSF oraz tempem odnowy hematologicznej po przeszczepieniu PBPC.

Tempo odnowy granulocytów (liczba komórek  $>500/\mu\text{l}$ ) i płytek krwi ( $>20 \times 10^3/\mu\text{l}$ ) było szybsze u biorców autologicznych przeszczepów PBPC z allelem A genu kodującego SDF-1 (rs1801157; 3'UTR-801 G>A) [42] lub nosiciele niezmutowanego genu *G-CSF* (rs3917924) [10,40]. Nie stwierdziliśmy jednak wpływu mutacji w genie *CXCR4* (rs2228014) na tempo odnowy hematologicznej u pacjentów poddanych autotransplantacji. Zaobserwowaliśmy natomiast związek tego polimorfizmu genu *CXCR4* z tempem odnowy płytek krwi, które znacznie wzrasta u biorców alogenicznego przeszczepu posiadających przynajmniej jeden dziki allel T. Niezależny wpływ *CXCR4-T* na odnowę płytek potwierdzono wykonując wieloczynnikową analizę statystyczną, uwzględniającą takie czynniki jak wiek i płeć pacjenta, polimorfizm *CXCR4* i liczbę przeszczepionych komórek CD34<sup>+</sup> [9].

### MEDYCYNA REGENERACYJNA I INŻYNIERIA TKANKOWA

Stale pogłębiająca się wiedza z zakresu biologii komórki i dziedzin pokrewnych stwarza nowe możliwości regeneracji zniszczonych tkanek i narządów. Medycyna regeneracyjna i inżynieria tkankowa, wykorzystujące w tym celu komórki macierzyste, dają nadzieję na wyzdrowienie i normalne życie między innymi pacjentom cierpiącym na cukrzycę, wrodzone choroby serca czy chorobę Parkinsona [38]. Miałyby to nastąpić przez podanie biorcy niezróżnicowanych bądź też częściowo zróżnicowanych *in vitro* komórek, które w organizmie uległyby proliferacji i ostatecznemu różnicowaniu do komórek uszkodzonych tkanek lub narządów, przyspieszając ich regenerację, zasklepiając rany bądź też przejmując funkcję upośledzonych lub zniszczonych komórek.

Największym zainteresowaniem w tej dziedzinie cieszą się mezenchymalne komórki macierzyste (mesenchymal stem cells – MSC). Są to komórki multipotencjalne, zdolne do różnicowania w wiele typów komórek, na przykład osteoblasty (kości), chondrocyty (tkanka chrzęstna), czy adypocyty (tkanka tłuszczowa). Izoluje się je głównie ze szpiku kostnego, jednak ich źródło może być wiele. Co ciekawe, zestaw ekspresjonowanych na ich powierzchni białek może bardzo się różnić ze względu na źródło tych komórek czy też typ prowadzonej hodowli komórkowej. Na przykład antygen CD34<sup>+</sup> nie jest obecny w hodowlach komórek MSC *in vitro*, jednak występuje na komórkach płodowych pochodzących z płuc oraz w świeżo pobranym szpiku kostnym [2]. Należy w tym miejscu zwrócić uwagę, iż opisano kilka linii komórek niehematopoetycznych, obecnych w materiale pobranym ze szpiku kostnego, z których każda charakteryzuje się odmiennym fenotypem. Mezenchymalne komórki macierzyste oraz inna linia komórek, także wyizolowana ze szpiku kostnego (bardzo małe zarodkowopodobne komórki macierzyste, very small embryonic like stem cells – VSEL), wykazują ekspresję *CXCR4* [84]. Uważa się, iż dzięki obecności tego receptora powyższe komórki zdolne są do migracji zgodnie z gradientem stężenia SDF-1, uwalnianego przez uszkodzone tkanki.

Idealne do celów medycyny regeneracyjnej byłyby komórki pluripotencjalne (pluripotent stem cells – PSC), zdolne do

różnicowania we wszystkie typy tkanek. Do takich komórek zalicza się komórki embrionalne, jednak ich pozyskiwanie z zarodków wiąże się z wieloma problemami natury etycznej. Z tego też względu trwają badania nad ich pozyskaniem z tkanek osób dorosłych oraz nad odróżnicowaniem zróżnicowanych już komórek. Uważa się, iż w pełni wykształconych tkankach można wciąż znaleźć przedstawicieli wielu linii komórkowych o mniejszym stopniu różnicowania, w tym i komórki pluripotencjalne [84]. Wobec faktu, iż nie wykryto obecności PSC we wszystkich tkankach, większość badaczy skłania się ku teorii, zgodnie z którą komórki te są uwalniane do krwiobiegu w odpowiedzi na zniszczenie tkanek lub stan zapalny. Dzięki temu mogą migrować do miejsc, gdzie ich obecność jest konieczna do regeneracji uszkodzonych narządów. Stwierdzono podwyższoną liczbę niehematopoetycznych pluripotencjalnych komórek macierzystych w krwiobiegu po zawale serca, udarze mózgu, czy podczas uszkodzenia takich narządów jak wątroba, nerki oraz mięśnie [43,107]. Za powyższą migrację odpowiedzialne są najprawdopodobniej receptory chemokinowe ekspresjonowane na powierzchni komórek macierzystych, w tym także *CXCR4*.

Innymi komórkami mogącymi znaleźć zastosowanie w medycynie regeneracyjnej są komórki progenitorowe śródbłonka (endothelial progenitor cells – EPC). Stanowią one heterogenną subpopulację komórek izolowaną ze szpiku kostnego bądź krwi obwodowej. Zdolne są do różnicowania w linie komórek śródbłonka. W odpowiedzi na uraz skutkujący niedokrwieniem uwalniane są ze szpiku kostnego za pośrednictwem czynników wzrostu i cytokin, by następnie zasiedlić uszkodzone miejsce i stać się zaczątkiem nowych naczyń krwionośnych [57]. Z tego też powodu ta linia komórek może być potencjalnie użyteczna w leczeniu niedokrwienia czy transporcie leków przeciw-rakowych (w obrębie nowotworowo zmienionej tkanki proces angiogenezy zachodzi szczególnie intensywnie) [87]. Przykładem niech będą badania Grapensparra i wsp. [44], którzy zaproponowali użycie komórek progenitorowych śródbłonka jako części terapii leczenia cukrzycy typu 1. Schorzenie to, nazywane także cukrzycą insulinozależną, dotyka komórki  $\beta$  trzustki (wytwarzające insulinę), które są sukcesywnie niszczone przez układ immunologiczny chorego. Na skutek tego procesu metabolizm glukozy w organizmie zostaje zaburzony. W zaproponowanej przez badaczy terapii komórki EPC, podane z innymi komórkami macierzystymi, miałyby zwiększyć unaczynienie trzustki, co z kolei wspomogłoby przeżycie i proliferację komórek  $\beta$ .

### PODSUMOWANIE

Receptor chemokinowy *CXCR4* wraz ze swoim ligandem pełni ważne funkcje zarówno w procesach zachodzących w zdrowym organizmie, jak i w czasie choroby. Wykazano powiązanie szlaku SDF-1/*CXCR4* z rozwojem wielu schorzeń, zarówno nowotworowych jak i nienowotworowych. Przykładem może być tu choćby zarażanie limfocytów T wirusem HIV, gdzie *CXCR4* pełni funkcję koreceptora. Badania dowiodły, iż – spośród wszystkich receptorów ekspresjonowanych na komórkach rakowych – *CXCR4* występuje w największej liczbie. Przekazanie sygnału za pośrednictwem tego receptora powoduje migrację komórek nowotworowych zgodnie z gradientem SDF-1 (a więc powstawanie przerzutów) oraz ich oporność na apoptozę

indukowaną chemioterapią. Ważną funkcją, jaką szlak SDF-1/CXCR4 pełni w procesie rakotworzenia oraz w innych schorzeniach, skłania naukowców do poszukiwania nowych związków hamujących przekazywanie sygnału za pośrednictwem CXCR4.

Nie mniej znaczący jest udział szlaku SDF-1/CXCR4 w przeszczepianiu hematopoetycznych komórek macierzystych w przypadku osób z defektami procesu hematopozyzy. Częściowa degradacja zarówno liganda jak i jego receptora, inicjowana na skutek klinicznego podania G-CSF, prowadzi do uwalniania hematopoetycznych komórek progenitorowych z nisz szpikowych i ich migracji do krwioobiegu, skąd komórki te mogą zostać pozyskane w wyniku leukaferozy, a następnie podane biorcy. Powyższa metoda transplantacji komórek hematopoetycznych jest obecnie

najpopularniejsza, jednak przeprowadzenie mobilizacji z wystarczającą wydajnością wciąż pozostaje problemem. Wnikliwe badania nad szlakami przekazywania sygnału poprzez parę SDF-1/CXCR4, a także analiza ekspresji genów obu tych białek oraz genu receptora dla G-CSF (CSF3R), mogłyby rzucić nowe światło na to zagadnienie i pomóc w optymalizacji procedur transplantacyjnych. Mamy nadzieję, iż prowadzone przez nas badania nad polimorfizmem genów *SDF-1*, *CXCR4*, *G-CSF* oraz *CSF3R*, a także nad ekspresją powyższych białek u osób poddanych transplantacji hematopoetycznych komórek macierzystych oraz u zdrowych dawców, przyczynią się zarówno do lepszego zrozumienia procesów zachodzących podczas mobilizacji i homingu tych komórek, jak również pozwolą na ulepszenie procedur przeszczepowych. Zwiększyłyby to zarówno powodzenie przeszczepu, jak i komfort dawców.

## PIŚMIENICTWO

- Arakaki R., Tamamura H., Premanathan M., Kanbara K., Ramanan S., Mochizuki K., Baba M., Fujii N., Nakashima H.: T134, a small-molecule CXCR4 inhibitor, has no cross-drug resistance with AMD3100, a CXCR4 antagonist with a different structure. *J. Virol.*, 1999; 73: 1719–1723
- Bajek A., Olkowska J., Drewa T.: Mesenchymal stem cells as a therapeutic tool in tissue and organ regeneration. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2011; 65: 124–132
- Balkwill F.: The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Semin. Cancer Biol.*, 2004; 14: 171–179
- Basak G.W., Jaksic O., Koristek Z., Mikala G., Basic-Kinda S., Mayer J., Masszi T., Giebel S., Labar B., Wiktor-Jedrzejczak W.: Haematopoietic stem cell mobilization with plerixafor and G-CSF in patients with multiple myeloma transplanted with autologous stem cells. *Eur. J. Haematol.*, 2011; 86: 488–495
- Basak G.W., Knopinska-Posluszny W., Matuszak M., Kisiel E., Hawrylecka D., Szmigielska-Kaplon A., Urbaniak-Kujda D., Dybko J., Zielinska P., Dabrowska-Iwanicka A., Werkun J., Rzepecki P., Wroblewska W., Wiktor-Jedrzejczak W.: Hematopoietic stem cell mobilization with the reversible CXCR4 receptor inhibitor plerixafor (AMD3100)-Polish compassionate use experience. *Ann. Hematol.*, 2011; 90: 557–568
- Basak G.W., Mikala G., Koristek Z., Jaksic O., Basic-Kinda S., Cegledi A., Reti M., Masszi T., Mayer J., Giebel S., Hübel K., Labar B., Wiktor-Jedrzejczak W.: Plerixafor to rescue failing chemotherapy-based stem cell mobilization: it's not too late. *Leuk. Lymphoma*, 2011; 52: 1711–1719
- Ben Nasr M., Reguaya Z., Berraies L., Maamar M., Ladeb S., Ben Othmen T., Mellouli F., Béjaoui M., Domenech J., Jenhani F.: Association of stromal cell-derived factor-1-3'A polymorphism to higher mobilization of hematopoietic stem cells CD34<sup>+</sup> in Tunisian population. *Transplant. Proc.*, 2011; 43: 635–638
- Blanco J., Barretina J., Henson G., Bridger G., De Clercq E., Clotet B., Esté J.A.: The CXCR4 antagonist AMD3100 efficiently inhibits cell-surface-expressed human immunodeficiency virus type 1 envelope-induced apoptosis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2000; 44: 51–56
- Bogunia-Kubik K., Gębura K., Gieryng A., Lange A.: CXC chemokine receptor 4 gene polymorphism affects the haematological recovery after transplantation of peripheral blood progenitor cells. *Bone Marrow Transplant.*, 2011; 46(Suppl.1): S122 (P526)
- Bogunia-Kubik K., Gębura K., Gieryng A., Lange A.: Significance of the G-CSF receptor gene polymorphism in transplantation of autologous peripheral blood progenitor cells. XIV Congress of Polish Society of Experimental and Clinical Immunology, 16-18.06.2011; Gdańsk, Polska
- Bogunia-Kubik K., Gieryng A., Dlubek D., Lange A.: The CXCL12-3'A allele is associated with a higher mobilization yield of CD34 progenitors to the peripheral blood of healthy donors for allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 2009; 44: 273–278
- Bridger G.J., Skerlj R.T., Padmanabhan S., Martellucci S.A., Henson G.W., Struyf S., Witvrouw M., Schols D., De Clercq E.: Synthesis and structure-activity relationships of phenylenebis(methylene)-linked bis-azamacrocycles that inhibit HIV-1 and HIV-2 replication by antagonism of the chemokine receptor CXCR4. *J. Med. Chem.*, 1999; 42: 3971–3981
- Broxmeyer H.E., Hangoc G., Cooper S., Bridger G.: ASH Annual Meeting, Orlando, Florida, USA, 7–11 December 2001. Abstracts, no. 3371. *Blood*, 2001; 98: 811a
- Busillo J.M., Benovic J.L.: Regulation of CXCR4 signaling. *Biochim. Biophys. Acta*, 2007; 1768: 952–963
- Calandra G., McCarty J., McGuirk J., Tricot G., Crocker S.A., Badel K., Grove B., Dye A., Bridger G.: AMD3100 plus G-CSF can successfully mobilize CD34<sup>+</sup> cells from non-Hodgkin's lymphoma, Hodgkin's disease and multiple myeloma patients previously failing mobilization with chemotherapy and/or cytokine treatment: compassionate use data. *Bone Marrow Transplant.*, 2008; 41: 331–338
- Caprino L.A.: 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. *J. Am. Chem. Soc.*, 1993; 115: 4397–4398
- Caruz A., Samsom M., Alonso J.M., Alcami J., Baleux F., Virelizier J.L., Parmentier M., Arenzana-Seisdedos F.: Genomic organization and promoter characterization of human CXCR4 gene. *FEBS Lett.*, 1998; 426: 271–278
- Chang C.C., Chen S.C., Hsieh Y.H., Chen Y.C., Chen T.Y., Chu Y.H., Ma H.J., Chou M.C., Tsai H.T., Yang S.F.: Stromal cell-derived factor-1 but not its receptor, CXCR4, gene variants increase susceptibility and pathological development of hepatocellular carcinoma. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2009; 47: 412–418
- Chang L., Karin M.: Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 2001; 410: 37–40
- Cottler-Fox M.H., Lapidot T., Petit I., Kollet O., DiPersio J.F., Link D., Devine S.: Stem cell mobilization. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, 2003; 1: 419–437
- Crump M.P., Gong J.H., Loetscher P., Rajarathnam K., Amara A., Arenzana-Seisdedos F., Virelizier J.L., Baggolini M., Sykes B.D., Clark-Lewis I.: Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J.*, 1997; 16: 6996–7007
- Curnock A.P., Sotsios Y., Wright K.L., Ward S.G.: Optimal chemotactic responses of leukemic T cells to stromal cell-derived factor-1 requires the activation of both class IA and IB phosphoinositide 3-kinases. *J. Immunol.*, 2003; 170: 4021–4030
- Daelemans D., Schols D., Witvrouw M., Pannecouque C., Hatse S., van Dooren S., Hamy F., Klimkait T., de Clercq E., VanDamme A.M.: A second target for the peptoid Tat/transactivation response element inhibitor CGP64222: inhibition of human immunodeficiency virus replication by blocking CXC-chemokine receptor 4-mediated virus entry. *Mol. Pharmacol.*, 2000; 57: 116–124
- Dale D.C., Srour E.F., Broxmeyer H., Liles W.C., Badel K., Calandra G.: International Society of Hematology Meeting, Quebec, Canada, 5–9 July 2002. Abstracts
- De Clercq E.: Antiviral therapy for human immunodeficiency virus infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1995; 8: 200–239

- [26] De Clercq E.: Potential clinical applications of the CXCR4 antagonist bicyclam AMD3100. *Mini Rev. Med. Chem.*, 2005; 5: 805–824
- [27] De Clercq E.: The AMD3100 story: the path to the discovery of a stem cell mobilizer (Mozobil). *Biochem. Pharmacol.*, 2009; 77: 1655–1664
- [28] De Clercq E., Yamamoto N., Pauwels R., Baba M., Schols D., Nakashima H., Balzarini J., Debyser Z., Murrer B.A., Schwartz D., Thornton D., Bridger G., Fricker S., Henson G., Abrams M., Picker D.: Potent and selective inhibition of human immunodeficiency virus (HIV)-1 and HIV-2 replication by a class of bicyclams interacting with a viral uncoating event. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992; 89: 5286–5290
- [29] De Vreese K., Reymen D., Griffin P., Steinkasserer A., Werner G., Bridger G.J., Esté J., James W., Henson G.W., Desnyter J., Anné J., De Clercq I.: The bicyclams, a new class of potent human immunodeficiency virus inhibitors, block viral entry after binding. *Antiviral Res.*, 1996; 29: 209–219
- [30] Dealwis C., Fernandez E.J., Thompson D.A., Simon R.J., Siani M.A., Lolis E.: Crystal structure of chemically synthesized [N33A] stromal cell-derived factor 1 $\alpha$ , a potent ligand for the HIV-1 “fusin” coreceptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 6941–6946
- [31] DiPersio J.F., Micallef I.N., Stiff P.J., Bolwell B.J., Maziarz R.T., Jacobsen E., Nademanee A., McCarty J., Bridger G., Calandra G.: Phase III prospective randomized double-blind placebo-controlled trial of plerixafor plus granulocyte colony-stimulating factor compared with placebo plus granulocyte colony-stimulating factor for autologous stem-cell mobilization and transplantation for patients with non-Hodgkin’s lymphoma. *J. Clin. Oncol.*, 2009; 27: 4767–4773
- [32] DiPersio J.F., Stadtmayer E.A., Nademanee A., Micallef I.N., Stiff P.J., Kaufman J.L., Maziarz R.T., Hosing C., Früehauf S., Horwitz M., Cooper D., Bridger G., Calandra G.: Plerixafor and G-CSF versus placebo and G-CSF to mobilize hematopoietic stem cells for autologous stem cell transplantation in patients with multiple myeloma. *Blood*, 2009; 113: 5720–5726
- [33] Donzella G.A., Schols D., Lin S.W., Esté J.A., Nagashima K.A., Maddon P.J., Allaway G.P., Sakmar T.P., Henson G., De Clercq E., Moore J.P.: AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor. *Nat. Med.*, 1998; 4: 72–77
- [34] Doranz B.J., Filion L.G., Diaz-Mitoma F., Sitar D.S., Sahai J., Baribaud F., Orsini M.J., Benovic J.L., Cameron W., Doms R.W.: Safe use of the CXCR4 inhibitor ALX40-4C in humans. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 2001; 17: 475–486
- [35] Doranz B.J., Grovit-Ferbas K., Sharron M.P., Mao S.H., Goetz M.B., Daar E.S., Doms R.W., O’Brien W.A.: A small-molecule inhibitor directed against the chemokine receptor CXCR4 prevents its use as an HIV-1 coreceptor. *J. Exp. Med.*, 1997; 186: 1395–1400
- [36] Dürig J., Schmücker U., Dührsen U.: Differential expression of chemokine receptors in B-cell malignancies. *Leukemia*, 2001; 15: 752–756
- [37] Faber A., Roderburg C., Wein F., Saffrich R., Seckinger A., Horsch K., Diehlmann A., Wong D., Bridger G., Eckstein V., Ho A.D., Wagner W.: The many facets of SDF-1 $\alpha$ , CXCR4 agonists and antagonists on hematopoietic progenitor cells. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2007; 2007: 26065
- [38] Gage F.H., Verma I.M.: Stem cells at the dawn of the 21<sup>st</sup> century. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100(Suppl.1): 11817–11818
- [39] Gerlach L.O., Skerlj R.T., Bridger G.J., Schwartz T.W.: Molecular interactions of cyclam and bicyclam non-peptide antagonists with the CXCR4 chemokine receptor. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 14153–14160
- [40] Gębura K., Gieryng A., Bogunia-Kubik K., Lange A.: Genetic variant of the G-CSF receptor gene is associated with lower mobilization potential and slower recovery of granulocytes after transplantation of autologous peripheral blood progenitor cells (w druku)
- [41] Gieryng A., Bogunia-Kubik K.: Znaczenie interakcji między SDF-1 i CXCR4 w hematopoezie i mobilizacji macierzystych komórek hematopoetycznych do krwi obwodowej. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2007; 61: 369–383
- [42] Gieryng A., Bogunia-Kubik K., Lange A.: CXCL12 gene polymorphism and hematologic recovery after transplantation of peripheral blood progenitor cells. *Transplant. Proc.*, 2010; 42: 3280–3283
- [43] Gomperts B.N., Belperio J.A., Rao P.N., Randell S.H., Fishbein M.C., Burdick M.D., Strieter R.M.: Circulating progenitor epithelial cells traffic via CXCR4/CXCL12 in response to airway injury. *J. Immunol.*, 2006; 176: 1916–1927
- [44] Grapensparr L., Olerud J., Vasylovska S., Carlsson P.O.: The therapeutic role of endothelial progenitor cells in Type 1 diabetes mellitus. *Regen. Med.*, 2011; 6: 599–605
- [45] Hartmann T.N., Burger J.A., Glodek A., Fujii N., Burger M.: CXCR4 chemokine receptor and integrin signaling co-operate in mediating adhesion and chemoresistance in small cell lung cancer (SCLC) cells. *Oncogene*, 2005; 24: 4462–4471
- [46] Hatse S., Princen K., Bridger G., De Clercq E., Schols D.: Chemokine receptor inhibition by AMD3100 is strictly confined to CXCR4. *FEBS Lett.*, 2002; 527: 255–262
- [47] Hatse S., Princen K., Gerlach L.O., Bridger G., Henson G., De Clercq E., Schwartz T.W., Schols D.: Mutation of Asp(171) and Asp(262) of the chemokine receptor CXCR4 impairs its coreceptor function for human immunodeficiency virus-1 entry and abrogates the antagonistic activity of AMD3100. *Mol. Pharmacol.*, 2001; 60: 164–173
- [48] Hendrix C.W., Flexner C., MacFarland R.T., Giandomenico C., Fuchs E.J., Redpath E., Bridger G., Henson G.W.: Pharmacokinetics and safety of AMD-3100, a novel antagonist of the CXCR4 chemokine receptor, in human volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2000; 44: 1667–1673
- [49] Heveker N., Montes M., Germeroth L., Amara A., Trautmann A., Alizon M., Schneider-Mergener J.: Dissociation of the signalling and antiviral properties of SDF-1-derived small peptides. *Curr. Biol.*, 1998; 8: 369–376
- [50] Heveker N., Tissot M., Thuret A., Schneider-Mergener J., Alizon M., Roch M., Marullo S.: Pharmacological properties of peptides derived from stromal cell-derived factor 1: study on human polymorphonuclear cells. *Mol. Pharmacol.*, 2001; 59: 1418–1425
- [51] Ichiyama K., Yokoyama-Kumakura S., Tanaka Y., Tanaka R., Hirose K., Bannai K., Edamatsu T., Yanaka M., Niitani Y., Miyano-Kurosaki N., Takaku H., Koyanagi Y., Yamamoto N.: A duodenally absorbable CXC chemokine receptor 4 antagonist, KRH-1636, exhibits a potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 4185–4190
- [52] Juarez J., Bendall L.: SDF-1 and CXCR4 in normal and malignant hematopoiesis. *Histol. Histopathol.*, 2004; 19: 299–309
- [53] Juarez J., Bradstock K.F., Gottlieb D.J., Bendall L.J.: Effects of inhibitors of the chemokine receptor CXCR4 on acute lymphoblastic leukemia cells *in vitro*. *Leukemia*, 2003; 17: 1294–1300
- [54] Kalatskaya I., Berchiche Y.A., Gravel S., Limberg B.J., Rosenbaum J.S., Heveker N.: AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties. *Mol. Pharmacol.*, 2009; 75: 1240–1247
- [55] Kato M., Kitayama J., Kazama S., Nagawa H.: Expression pattern of CXC chemokine receptor-4 is correlated with lymph node metastasis in human invasive ductal carcinoma. *Breast Cancer Res.*, 2003; 5: R144–R150
- [56] Kayali A., Van Gunst K., Campbell I.L., Stotland A., Kritzik M., Liu G., Flodström-Tullberg M., Zhang Y.Q., Sarvetnick N.: The stromal cell-derived factor-1 $\alpha$ /CXCR4 ligand-receptor axis is critical for progenitor survival and migration in the pancreas. *J. Cell Biol.*, 2003; 163: 859–869
- [57] Khoo C.P., Pozzilli P., Alison M.R.: Endothelial progenitor cells and their potential therapeutic applications. *Regen. Med.*, 2008; 3: 863–876
- [58] Kim H.Y., Hwang J.Y., Oh Y.S., Kim S.W., Lee H.J., Yun H.J., Kim S., Yang Y.J., Jo D.Y.: Differential effects of CXCR4 antagonists on the survival and proliferation of myeloid leukemia cells *in vitro*. *Korean J. Hematol.*, 2011; 46: 244–252
- [59] Koshiba T., Hosotani R., Miyamoto Y., Ida J., Tsuji S., Nakajima S., Kawaguchi M., Kobayashi H., Doi R., Hori T., Fujii N., Imamura M.: Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression. *Clin. Cancer Res.*, 2000; 6: 3530–3535
- [60] Kryczek I., Lange A., Mottram P., Alvarez X., Cheng P., Hogan M., Moons L., Wei S., Zou L., Machelon V., Emilie D., Terrassa M., Lackner A., Curiel T.J., Carmeliet P., Zou W.: CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers. *Cancer Res.*, 2005; 65: 465–472
- [61] Lataillade J.J., Domenech J., Le Bousse-Kerdilès M.C.: Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCR4 couple plays multiple roles on hematopoietic progenitors at the border between the old cytokine and new chemokine worlds: survival, cell cycling and trafficking. *Eur. Cytokine Netw.*, 2004; 15: 177–188
- [62] Li W., Gomez E., Zhang Z.: Immunohistochemical expression of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) and CXCR4 ligand receptor system in hepatocellular carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 2007; 26: 527–533
- [63] Li Y.M., Pan Y., Wei Y., Cheng X., Zhou B.P., Tan M., Zhou X., Xia W., Hortobagyi G.N., Yu D., Hung M.C.: Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis. *Cancer Cell*, 2004; 6: 459–469

- [64] Liles W.C., Broxmeyer H.E., Rodger E., Hubel K., Cooper S., Hangoc G., Bridger G.J., Henson G.W., Calandra G., Dale D.C.: ASH Annual Meeting, Orlando, Florida, USA, 7–11 December 2001. Abstracts, no. 3071. *Blood*, 2001; 98: 737a
- [65] Liles W.C., Rodger E., Broxmeyer H.E., Srour E.F., Dehner C., Badel K., Calandra G., Christensen J., Wood B.: ASH Annual Meeting, Philadelphia, Pennsylvania, USA, 6–10 December 2002. Abstracts, no. 404. *Blood*, 2002; 100: 109a
- [66] Liu H., Pan Z., Li A., Fu S., Lei Y., Sun H., Wu M., Zhou W.: Roles of chemokine receptor 4 (CXCR4) and chemokine ligand 12 (CXCL12) in metastasis of hepatocellular carcinoma cells. *Cell. Mol. Immunol.*, 2008; 5: 373–378
- [67] Loetscher P., Gong J.H., Dewald B., Baggiolini M., Clark-Lewis I.: N-terminal peptides of stromal cell-derived factor-1 with CXC chemokine receptor 4 agonist and antagonist activities. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 22279–22283
- [68] Lukacs N.W., Berlin A., Schols D., Skerlj R.T., Bridger G.J.: AMD3100, a CXCR4 antagonist, attenuates allergic lung inflammation and airway hyperreactivity. *Am. J. Pathol.*, 2002; 160: 1353–1360
- [69] Luker K.E., Luker G.D.: Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer. *Cancer Lett.*, 2006; 238: 30–41
- [70] Luo J., Luo Z., Zhou N., Hall J.W., Huang Z.: Attachment of C-terminus of SDF-1 enhances the biological activity of its N-terminal peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999; 264: 42–47
- [71] Martín-António B., Carmona M., Falantes J., Gil E., Baez A., Suarez M., Marín P., Espigado I., Urbano-Ispizua A.: Impact of constitutional polymorphisms in VCAM1 and CD44 on CD34<sup>+</sup> cell collection yield after administration of granulocyte colony-stimulating factor to healthy donors. *Haematologica*, 2011; 96: 102–109
- [72] Mbemba E., Gluckman J.C., Gattegno L.: Glycan and glycosaminoglycan binding properties of stromal cell-derived factor (SDF)-1 $\alpha$ . *Glycobiology*, 2000; 10: 21–29
- [73] Mirshahi F., Pourtau J., Li H., Muraine M., Trochon V., Legrand E., Vannier J., Soria J., Vasse M., Soria C.: SDF-1 activity on microvascular endothelial cells: consequences on angiogenesis in *in vitro* and *in vivo* models. *Thromb. Res.*, 2000; 99: 587–594
- [74] Miyata T., Tokunaga F., Yoneya T., Yoshikawa K., Iwanaga S., Niwa M., Takao T., Shimonishi Y.: Antimicrobial peptides, isolated from horseshoe crab hemocytes, tachyplesin II, and polyphemusins I and II: chemical structures and biological activity. *J. Biochem.*, 1989; 106: 663–668
- [75] Möhle R., Bautz F., Rafii S., Moore M.A., Brugger W., Kanz L.: The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. *Blood*, 1998; 91: 4523–4530
- [76] Möhle R., Schittenhelm M., Failenschmid C., Bautz F., Kratz-Albers K., Serve H., Brugger W., Kanz L.: Functional response of leukemic blasts to stromal cell-derived factor-1 correlates with preferential expression of the chemokine receptor CXCR4 in acute myelomonocytic and lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.*, 2000; 110: 563–572
- [77] Nagasawa T., Hirota S., Tachibana K., Takakura N., Nishikawa S., Kitamura Y., Yoshida N., Kikutani H., Kishimoto T.: Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*, 1996; 382: 635–638
- [78] Nanki T., Hayashida K., El-Gabalawy H.S., Suson S., Shi K., Girschick H.J., Yavuz S., Lipsky P.E.: Stromal cell-derived factor-1-CXC chemokine receptor 4 interactions play a central role in CD4<sup>+</sup> T cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium. *J. Immunol.*, 2000; 165: 6590–6598
- [79] Netelenbos T., Zuijderduijn S., Van Den Born J., Kessler F.L., Zweegman S., Huijgens P.C., Dräger A.M.: Proteoglycans guide SDF-1-induced migration of hematopoietic progenitor cells. *J. Leukoc. Biol.*, 2002; 72: 353–362
- [80] Paul S., Mancuso P., Rabascio C., Gobbi A., Capillo M., Pruneri G., Martinelli G., Fricker S., Bridger G., Bertolini F.: ASH Annual Meeting, Philadelphia, Pennsylvania, USA, 6–10 December 2002. Abstracts, no. 2276. *Blood*, 2002; 100: 579a
- [81] Peled A., Grabovsky V., Habler L., Sandbank J., Arenzana-Seisdedos F., Petit I., Ben-Hur H., Lapidot T., Alon R.: The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow. *J. Clin. Invest.*, 1999; 104: 1199–1211
- [82] Peng S.B., Peek V., Zhai Y., Paul D.C., Lou Q., Xia X., Eessalu T., Kohn W., Tang S.: Akt activation, but not extracellular signal-regulated kinase activation, is required for SDF-1 $\alpha$ /CXCR4-mediated migration of epitheloid carcinoma cells. *Mol. Cancer Res.*, 2005; 3: 227–236
- [83] Ponomaryov T., Peled A., Petit I., Taichman R.S., Habler L., Sandbank J., Arenzana-Seisdedos F., Magerus A., Caruz A., Fujii N., Nagler A., Lahav M., Szyper-Kravitz M., Zipori D., Lapidot T.: Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *J. Clin. Invest.*, 2000; 106: 1331–1339
- [84] Ratajczak M.Z., Zuba-Surma E.K., Wysoczynski M., Wan W., Ratajczak J., Wojakowski W., Kucia M.: Hunt for pluripotent stem cell – regenerative medicine search for almighty cell. *J. Autoimmun.*, 2008; 30: 151–162
- [85] Rempel S.A., Dudas S., Ge S., Gutiérrez J.A.: Identification and localization of the cytokine SDF1 and its receptor, CXC chemokine receptor 4, to regions of necrosis and angiogenesis in human glioblastoma. *Clin. Cancer Res.*, 2000; 6: 102–111
- [86] Rombouts E.J., Pavic B., Löwenberg B., Ploemacher R.E.: Relation between CXCR-4 expression, Flt3 mutations, and unfavorable prognosis of adult acute myeloid leukemia. *Blood*, 2004; 104: 550–557
- [87] Roncalli J.G., Tongers J., Renault M.A., Losordo D.W.: Endothelial progenitor cells in regenerative medicine and cancer: a decade of research. *Trends Biotechnol.*, 2008; 26: 276–283
- [88] Rozenbaum W., Dormont D., Spire B., Vilmer E., Gentilini M., Griscelli C., Montagnier L., Barre-Sinoussi F., Chermann J.C.: Antimonotungstate (HPA 23) treatment of three patients with AIDS and one with prodrome. *Lancet*, 1985; 325: 450–451
- [89] Sachpatzidis A., Benton B.K., Manfredi J.P., Wang H., Hamilton A., Dohlman H.G., Lolis E.: Identification of allosteric peptide agonists of CXCR4. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 896–907
- [90] Schols D., Claes S., De Clercq E., Hendrix C., Bridger G., Calandra G., Henson G., Fransen S., Huang W., Whitcomb J.M., Petropoulos C.J., AMD-3100 HIV Study Group: AMD-3100, a CXCR4 antagonist, reduced HIV viral load and X4 virus levels in humans. 9<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Seattle, Washington, USA, 24–28 February 2002. Abstracts, pp. 53, no. 2
- [91] Schols D., Claes S., Hatse S., Princen K., Vermeire K., De Clercq E., Skerlj R., Bridger G., Calandra G.: Anti-HIV activity profile of AMD070, an orally bioavailable CXCR4 antagonist. *Antiviral Res.*, 2003; 57: A39. Abstracts of the 16<sup>th</sup> International Conference on Antiviral Research. Savannah, Georgia, USA, 27 April – 1 May 2003, A39, Abstract No. 2
- [92] Schols D., De Clercq E.: The simian immunodeficiency virus mnd(GB-1) strain uses CXCR4, not CCR5, as coreceptor for entry in human cells. *J. Gen. Virol.*, 1998; 79: 2203–2205
- [93] Schols D., Esté J.A., Henson G., De Clercq E.: Bicyclams, a class of potent anti-HIV agents, are targeted at the HIV coreceptor fusin/CXCR-4. *Antiviral Res.*, 1997; 35: 147–156
- [94] Schols D., Struyf S., Van Damme J., Esté J.A., Henson G., De Clercq E.: Inhibition of T-tropic HIV strains by selective antagonization of the chemokine receptor CXCR4. *J. Exp. Med.*, 1997; 186: 1383–1388
- [95] Schrader A.J., Lechner O., Templin M., Dittmar K.E., Machtens S., Mengel M., Probst-Kepper M., Franzke A., Wollensak T., Gatzlaff P., Atzpodien J., Buer J., Lauber J.: CXCR4/CXCL12 expression and signalling in kidney cancer. *Br. J. Cancer*, 2002; 86: 1250–1256
- [96] Scotton C.J., Wilson J.L., Milliken D., Stamp G., Balkwill F.R.: Epithelial cancer cell migration: a role for chemokine receptors? *Cancer Res.*, 2001; 61: 4961–4965
- [97] Song R., Witvrouw M., Schols D., Robert A., Balzarini J., De Clercq E., Bernadou J., Meunier B.: Anti-HIV activities of anionic metalloporphyrins and related compounds. *Antiviral Chem. Chemother.*, 1997; 8: 85–97
- [98] Sutton A., Friand V., Brulé-Donneger S., Chaigneau T., Ziol M., Sainte-Catherine O., Poiré A., Saffar L., Kraemer M., Vassy J., Nahon P., Salzmann J.L., Gattegno L., Charnaux N.: Stromal cell-derived factor-1/chemokine (C-X-C motif) ligand 12 stimulates human hepatoma cell growth, migration, and invasion. *Mol. Cancer Res.*, 2007; 5: 21–33
- [99] Tamamura H., Omagari A., Hiramatsu K., Gotoh K., Kanamoto T., Xu Y., Kodama E., Matsuoka M., Hattori T., Yamamoto N., Nakashima H., Otake A., Fujii N.: Development of specific CXCR4 inhibitors possessing high selectivity indexes as well as complete stability in serum based on an anti-HIV peptide T140. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001; 11: 1897–1902
- [100] Tamamura H., Omagari A., Oishi S., Kanamoto T., Yamamoto N., Peiper S.C., Nakashima H., Otake A., Fujii N.: Pharmacophore identification of a specific CXCR4 inhibitor, T140, leads to development of effective anti-HIV agents with very high selectivity indexes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2000; 10: 2633–2637

- [101] Tamamura H., Xu Y., Hattori T., Zhang X., Arakaki R., Kanbara K., Omagari A., Otake A., Ibuka T., Yamamoto N., Nakashima H., Fujii N.: A low-molecular-weight inhibitor against the chemokine receptor CXCR4: a strong anti-HIV peptide T140. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998; 253: 877–882
- [102] Teng Y.H., Liu T.H., Tseng H.C., Chung T.T., Yeh C.M., Li Y.C., Ou Y.H., Lin L.Y., Tsai H.T., Yang S.F.: Contribution of genetic polymorphisms of stromal cell-derived factor-1 and its receptor, CXCR4, to the susceptibility and clinicopathologic development of oral cancer. *Head Neck*, 2009; 31: 1282–1287
- [103] Tudan C., Willick G.E., Chahal S., Arab L., Law P., Salari H., Merzouk A.: C-terminal cyclization of an SDF-1 small peptide analogue dramatically increases receptor affinity and activation of the CXCR4 receptor. *J. Med. Chem.*, 2002; 45: 2024–2031
- [104] Wegner S.A., Ehrenberg P.K., Chang G., Dayhoff D.E., Sleeker A.L., Michael N.L.: Genomic organization and functional characterization of the chemokine receptor CXCR4, a major entry co-receptor for human immunodeficiency virus type 1. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 4754–4760
- [105] Zhao F.L., Guo W.: Expression of stromal derived factor-1 (SDF-1) and chemokine receptor (CXCR4) in bone metastasis of renal carcinoma. *Mol. Biol. Rep.*, 2011; 38: 1039–1045
- [106] Zou Y.R., Kottmann A.H., Kuroda M., Taniuchi I., Littman D.R.: Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*, 1998; 393: 595–599
- [107] Zuba-Surma E.K., Kucia M., Ratajczak J., Ratajczak M.Z.: „Small stem cells” in adult tissues: very small embryonic-like stem cells stand up! *Cytometry A*, 2009; 75: 4–13

---

Autorki deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.