

UDZIAŁ UKŁADU DOPEŁNIACZA W REGULACJI KRWIOTWORZENIA

THE ROLE OF COMPLEMENT SYSTEM IN HEMATOPOIESIS

Dorota SŁOWIK-ŻYŁKA, Iwona POZIOMKOWSKA-GĘSICKA,
Wioletta MIKOŁAJEK-BEDNER

Zakład Fizjologii, Katedra Fizjopatologii Pomorskiej Akademii Medycznej,
Szczecin

Streszczenie: W pracy przedstawiono dane doświadczalne wskazujące, że układ dopełniacza pełni ważną, niedocenianą do tej pory rolę w regulacji krwiotworzenia. Produkty aktywacji fragmentu C3 dopełniacza regulują bowiem odpowiedź wczesnych komórek hematopoetycznych na gradient SDF-1, który jest głównym czynnikiem chemotaktycznym komórek macierzystych. Układ dopełniacza aktywowany jest w szpiku kostnym zarówno podczas przygotowania mieloablacyjnego przed przeszczepieniem komórek krwiotwórczych, jak i podczas indukowanej farmakologicznie ich mobilizacji ze szpiku do krwi obwodowej. W związku z powyższym, pojawiają się nowe możliwości przyspieszenia wszczepienia komórek po transplantacji, jak i ich mobilizacji poprzez odpowiednią modulację aktywności niektórych składników dopełniacza.

Słowa kluczowe: stromalny czynnik wzrostu-1 (SDF-1), hematopoeza, receptor CXCR4, układ dopełniacza.

Summary: This review presents the experimental data indicating that complement system plays an important, however, up to now underestimated role in the regulation of hematopoiesis. The cleavage fragments of the third complement component (C3) regulate the response of early hematopoietic cells to an SDF-1 gradient, which is the main chemoattractant for stem cells. Complement system is activated in bone marrow both during myeloablative conditioning for hematopoietic transplantation as well as during pharmacological mobilization of stem cells. Therefore modulation of complement activation may lead to new strategies to accelerate engraftment of stem cells or to increase their mobilization into peripheral blood.

Key words: stromal derived factor-1 (SDF-1), hematopoiesis, CXCR4 receptor, complement system.

WSTĘP

Krwiotworzenie jest procesem zależnym od prawidłowej funkcji populacji krwiotwórczych komórek macierzystych (KKM), które wykazują zdolność do samoodnowy i różnicowania w różne linie komórek układu krwiotwórczego. Dzięki ich stałej

obecności w szpiku osób dorosłych proces krwiotworzenia toczy się przez całe życie. W życiu płodowym pierwsze, tzw. prymitywne KKM znajdują się w woreczku żółtkowym. Następnie zasiedlają obszar pomiędzy aortą brzuszną, gonadami i śródnerczem AMG – (ang. *aorta-gonad-mesonephros region*). Z tego regionu wyizolowano pierwsze tzw. definitywne, dojrzałe KKM [42]. Około 6. tygodnia życia płodowego człowieka KKM migrują do wątroby płodowej, która w drugim trymestrze ciąży jest głównym organem krwiotworzenia, a pod koniec drugiego trymestru opuszczają ją i kolonizują szpik kostny, ostateczne miejsce hematopoezy u dorosłych [91]. Procesy krwiotworzenia, zachodzące w szpiku wymagają udziału wielu chemokin, cytokin i czynników wzrostu wydzielanych parakrywnie przez komórki podścieliska (fibroblasty, komórki śródbłonna, makrofagi, osteoblasty), limfocyty T, jak i autokrywnie przez same komórki krwiotwórcze macierzyste i progenitorowe [24, 39]. Związki te wiążąc się ze specyficznymi receptorami regulują przemieszczanie się (migrację), przyleganie (adhezję), proliferację, dojrzewanie i apoptozę komórek krwiotwórczych [11, 66, 92]. Coraz więcej uwagi poświęca się chemokinom, czyli cytokinom mającym aktywność chemotaktyczną. Jedna chemokina wiąże się zwykle z więcej niż jednym receptorem i odwrotnie, jeden receptor może wiązać się z więcej niż jedną chemokina. Wrażliwość komórki na dany czynnik chemotaktyczny jest zależna od stopnia ekspresji jego receptora. Stromalny czynnik wzrostu-1 – SDF-1 (ang. *stromal derived factor-1*) jest chemokina, która odgrywa nadrzędną rolę w hematopoezie regulując przemieszczanie się KKM [14, 22, 32, 43, 66]. Wiąże się on z receptorami chemokinowym CXCR4 i CXCR7 (nazywanym również RDC1), które mają budowę białka o siedmiu domenach przezbłonowych i związane są z białkami regulatorowymi G [4, 71, 74]. W przeciwieństwie do receptora CXCR4, rola CXCR7 w krwiotworzeniu nie jest jednak znacząca.

OŚ CXCR4/SDF-1

SDF-1 jest chemokina z grupy CXC (CXCL12) wytwarzaną przez komórki podścieliska szpiku kostnego oraz komórki nabłonka różnych organów: trzustki, śledziony, jajników, jelita cienkiego, niewielką ilość obserwowano także w mózgu [2, 3, 14, 61]. Jest on białkiem monomerycznym, w którym 8 zasad N-końca tworzy miejsce wiązania z receptorem [13]. W porównaniu z mysią cytokina wykazuje 99% zgodności aminokwasowej [93]. Ludzki gen *SDF-1* ma inną lokalizację (chromosom 10q11.1) niż geny dla wielu innych chemokin (chromosom 4q) [70]. SDF-1 wiąże receptor CXCR4 i CXCR7, z których CXCR4 ma duże znaczenie dla regulacji krwiotworzenia [37, 38, 94]. Interakcja SDF-1/CXCR4 odgrywa ważną rolę już w życiu płodowym. Reguluje prawidłowym rozwojem neuronów, rozpoczyna rozwój serca, kontroluje angiogenezę, apoptozę [15, 37, 72, 94]. SDF-1 uwalniany z tworzących się podczas rozwoju embrionalnego nisz szpikowych przyciąga, z wątrobowych, płodowych ognisk hematopoetycznych KKM, komórki mające na swojej powierzchni swoisty receptor CXCR4 i reguluje zasiedlanie szpiku kostnego przez KKM [32, 52a]. SDF-1 jest jedynym jak dotąd poznanym, znaczącym chemoatraktantem dla KKM. Badania przeprowadzone na mysim modelu dowiodły, iż

delecja genu SDF-1 lub CXCR4 upośledza zasiedlanie nisz i jest letalna dla rozwijających się płodów mysich [43, 94]. U dorosłych pewna pula komórek macierzystych (w tym hematopoetycznych), fizjologicznie krąży we krwi obwodowej utrzymując równowagę z komórkami zasiedlającymi nisze szpikowe. W sytuacjach stresowych, takich jak: zawał serca, infekcje, uszkodzenie tkanek, liczba krążących komórek wzrasta [30, 31, 36, 64, 75]. KKM, krwiotwórcze komórki progenitorowe (KKP), limfocyty T czy neutrofile mają receptor CXCR4 na swojej powierzchni i podążają zgodnie z gradientem stężeń SDF-1. Masywne napromienianie lub chemioterapia mieloablacyjna przed przeszczepieniem krwiotwórczym prowadzą do uszkodzenia podścieliska szpiku kostnego i upośledzenia bariery krew-szpik kostny indukując tym samym uszkodzenie tkanki szpikowej. Uruchomienie procesów naprawczych w szpiku kostnym prowadzi do wzrostu stężenia SDF-1, co prowadzi do przyciągania przeszczepionych KKM i zasiedlenia przez nie szpiku kostnego. Oś SDF-1/CXCR4 jest więc swoistym „drogowskazem” dla migrujących i wszczepiających się KKM po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych [49]. SDF-1 jest jednak nie tylko czynnikiem chemotaktycznym, ale również indukuje sekrecję metaloproteinaz (MMP-2, MMP-9) ułatwiających pokonanie bariery śródbłonkowej krew-szpik, integryn i molekuł adhezyjnych (CD44) pośredniczących w przyleganiu KKM do naczyń szpikowych [27, 32].

Oś SDF-1/CXCR4 jest kluczowa dla utrzymania KKM w mikrośrodowisku szpiku kostnego, ich prawidłowej odnowy, różnicowania, dojrzewania i uwalniania do krwi obwodowej [38, 94]. Ingerencja farmakologiczna mająca zaburzyć jej funkcje powoduje mobilizację KKM do krwi obwodowej. Podanie np. czynnika wzrostowego granulocytów – G-CSF (ang. *granulocyte colony stimulating factor*) powoduje indukcję enzymów proteolitycznych w podścielisku szpiku kostnego. Uwolniona z granulocytów szpikowych katepsyna i elastaza degradują znajdujący się w podścielisku szpiku SDF-1 i odłączają N-terminalny koniec receptora CXCR4, który odpowiedzialny jest za przyłączenie SDF-1. Zaburzenie interakcji SDF-1/CXCR4 ułatwia wyjście KKM i KKP do krwi obwodowej [34, 50].

Obecność CXCR4 wykazano również na powierzchni niektórych komórek nowotworowych. CXCR4⁺ komórki nowotworowe mogą przerzutować do kości i szpiku kostnego oraz innych narządów, które wydzielają SDF-1 (węzły limfatyczne, płuca i wątroba) [56]. Ostatnio wykazano, że oś SDF-1/CXCR4 może być modulowana przez różne czynniki, wśród których ważną rolę odgrywają niektóre składowe układu dopełniacza [29, 54, 59, 60, 86].

DOPEŁNIACZ

Dopełniacz jest elementem wrodzonych, humoralnych mechanizmów obronnych, którego nazwa wiąże się z pierwotnie odkrytą rolą dopełniania przeciwciał w procesach „zabijania” mikroorganizmów. Jest zespołem składającym się z ponad 30 białek, stanowiących około 15% frakcji globulin. Glikoproteiny te zarówno krążą w

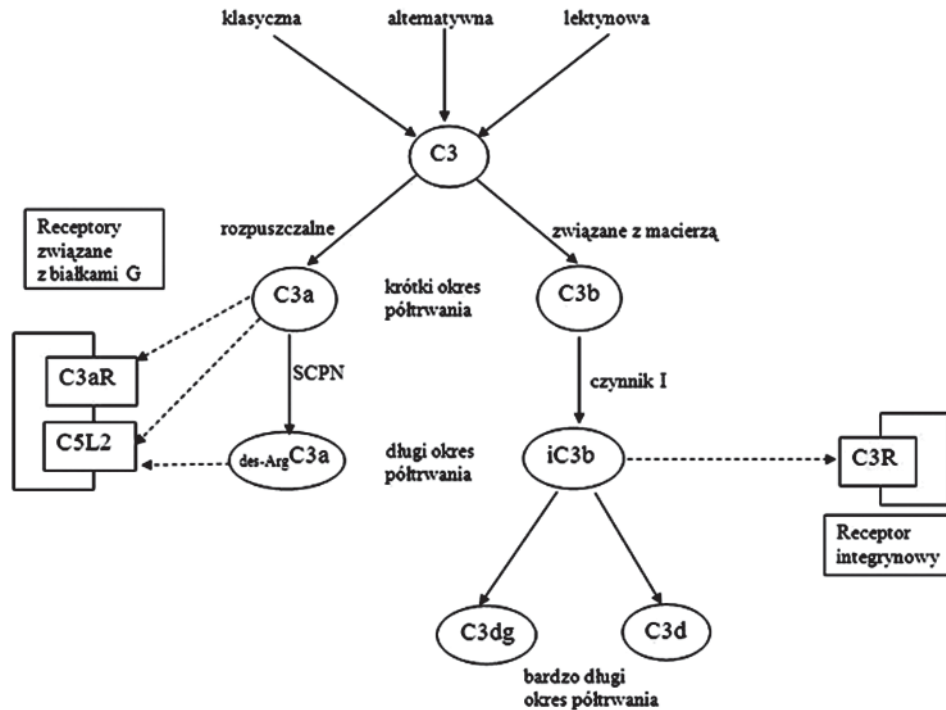
osoczu, jak i zlokalizowane są na powierzchni błon komórkowych. Układ dopełniacza odgrywa ważną rolę w procesach immunologicznych, reakcjach zapalnych i alergicznych. Uczestniczy w mechanizmach obrony przeciwko infekcjom bakteryjnym i wirusowym. Efekt jego działania przejawia się w postaci lizy, chemotaksji, opsonizacji, aktywacji leukocytów. Jest on przykładem ścisłych powiązań pomiędzy wrodzonymi i nabytymi mechanizmami odporności (dostarcza sygnałów pobudzających limfocyty B, potęguje pamięć immunologiczną) [8, 9, 29, 79, 80]. Dopełniacz ma również powiązanie z procesami niezapalnymi: różnicowaniem osteoklastów [65], proliferacją komórek mięśni gładkich naczyń [45]. Występuje w podścielisku szpiku kostnego. Składowe dopełniacza są syntetyzowane i wydzielane przez fibroblasty szpiku, jak również przez obecne tam makrofagi [59].

Proteolityczna aktywacja składowych tego układu prowadzi do powstania peptydów o prozapalnych właściwościach nazywanych anafilatoksynami. Zachodzi kaskadowo trzema drogami: klasyczną, zapoczątkowaną przyłączeniem się C1q do związanej z antygenem, zmienionej konformacyjnie immunoglobuliny, alternatywną, gdzie inicjującym enzymem jest konwertaza C3 aktywująca się spontanicznie w osoczu i prawdopodobnie z udziałem zewnątrzkomórkowych proteaz [47]. Szlak ten ma około 80% udziałów w procesie aktywacji. Poznano trójwymiarową strukturę kompleksu konwertazy i przeciwciała selektywnie hamujące produkty hydrolizy C3 i aktywację dopełniacza drogą alternatywną [26, 76]. Trzecia droga – lektynowa, inicjowana jest przez białko wiążące mannozę (ang. *mannose-binding lectin*). Niezależnie od czynnika aktywującego wszystkie drogi ogniskują na składowej C3, której stężenie w surowicy jest stosunkowo wysokie i wynosi około 1mg/ml!

W wyniku aktywacji składowa C3 staje się źródłem dwóch grup produktów (ryc. 1). Jedną stanowią peptydy rozpuszczalne (ang. *soluble fragments*) C3a (78 amniokwasów) i ^{desArg}C3a. Drugą, związane z komórkami lub macierzą pozakomórkową składowe C3b, iC3b, C3dg, C3d (ang. *solid phase, cell or extracellular matrix-bound fragments*). Jako pierwsze w wyniku aktywacji fragmentu C3 powstają C3a i C3b mające krótki okres półtrwania. Następnie składowa C3a pod wpływem osoczowej karboksypeptydazy N (SCPN) jest przekształcana do ^{desArg}C3a, a C3b do iC3b przez czynnik I. Zarówno ^{desArg}C3a, jak i iC3b mają długi okres półrozpadu. W następnym etapie iC3b po związaniu z substratem ulega proteolizie (czynnik 1, plazmina, elastaza leukocytów) do C3dg, C3d, mającymi również bardzo długi czas półtrwania [1, 54, 59, 62, 79, 80].

Rozszczepione fragmenty wiążą się ze specyficznymi receptorami: C3a z receptorami C3aR i C5L2, natomiast ^{desArg}C3a jedynie z C5L2 [7, 25, 53, 83]. Receptory te mają budowę receptorów o siedmiu domenach przezbłonowych związanych z białkami regulatorowymi typu G. Receptor C3aR zidentyfikowano na powierzchni ludzkich mastocytów, eozynofili, monocytów, aktywowanych limfocytów. Jest on związany z chemotaksją eozynofili, rekrutacją i degranulacją mastocytów [19, 23, 29, 82]. Jego ekspresję wykazano również na powierzchni ludzkich KKM i KKP oraz na mieloblastach, erytroblastach, megakarioblastach [59].

Receptor dla iC3b, zwany C3R ma z kolei budowę receptora integrynowego i jest $\alpha_M\beta_2$ -integryną (CD11b/CD18) znaną również pod nazwą Mac-1 [11, 12, 73].



RYCINA 1 Schemat aktywacji dopełniacza. Układ dopełniacza może ulegać aktywacji drogą: klasyczną, alternatywną lub lektynową. Wszystkie drogi aktywacji zbiegają się na poziomie składowej C3. Aktywacja C3 prowadzi do powstania rozpuszczalnych produktów aktywacji C3 (C3a i des-Arg C3a) oraz składowych związanych z macierzą (iC3b, C3dg, C3d). Produkty rozpuszczalne zwane anafilatoksynami łączą się z receptorami mającymi budowę siedmiu domen przezłonowych związanych z białkami G (C3aR i C5L2), a składowa związana z macierzą iC3b łączy się z receptorem C3R, który jest integralny

Ulega on ekspresji na powierzchni granulocytów, monocytów/makrofagów, komórek NK oraz na powierzchni KKM i KKP [11, 63, 89]. Tak, więc zarówno KKM, jak i KKP mają receptory dla rozpuszczalnych i związanych z powierzchnią komórek, produktów aktywacji/rozpadu C3.

ROLA C3a I des-Arg C3a W KRWIOTWORZENIU

W celu wyjaśnienia roli składowych dopełniacza w krwiotworzeniu posłużono się modelem zwierzęcym. Mysie komórki Sca-1⁺ (wzbogacone w KKM i KKP) poddawano krótkiej ekspozycji na C3a lub des-Arg C3a , a następnie przeszczepiano letalnie napromieniowanym, syngenicznym, zgodnym tkankowo biorcom. Okazało się, iż komórki poddane wcześniejszej ekspozycji (ang. *priming*) na C3a, ale nie na des-Arg C3a , wszczepiają się szybciej, tworzą około 60% kolonii śledzionowych – CFU-S (ang. *colony forming units in spleen*) więcej w porównaniu z komórkami nieeksponowanymi na składowe aktywacji C3 dopełniacza, a we krwi obwodowej biorców po

przeszczepie KKM poddanych takiej ekspozycji wcześniej pojawiają się leukocyty i płytki krwi [59]. Wyniki tych doświadczeń wskazują więc, że ekspozycja KKM na C3a przyspiesza wszczepienie tych komórek po uprzedniej mieloablacji. Założono więc, że C3a uwrażliwia odpowiedź KKM na gradient SDF-1.

Wiadomo, że KKM pobrane z tzw. krwi obwodowej szybciej zasiedlają nisze szpikowe po zabiegu transplantacji niż komórki krwiotwórcze pobrane ze szpiku kostnego od dawców niemobilizowanych [10]. Ponieważ podczas zabiegu mobilizacji dochodzi do aktywacji układu dopełniacza, można założyć, że KKM znajdujące się w materiale przeszczepowym pochodzącym z krwi mobilizowanej są w wyniku uprzedniej ekspozycji na C3a uwrażliwione na gradient SDF-1 [52]. W dalszej części artykułu omówimy molekularne podstawy tego zjawiska.

Badania *in vitro* na ludzkich i mysich KKM i KKP nie wykazały natomiast, aby produkty rozpadu C3 wpływały bezpośrednio na ich proliferację. Czynniki te nie są również same w sobie chemoatraktantami tych komórek, ale w obecności C3a i ^{desArg}C3a zarówno KKM, jak i KKP lepiej odpowiadają chemotaktycznie do minimalnych, progowych dawek SDF-1 (10 ng/ml) [59, 60]. Ta zwiększona odpowiedź chemotaktyczna nie jest powodowana zwiększeniem ekspresji receptora CXCR4 na ich powierzchni. Składowe dopełniacza nie mają również wpływu na jego internalizację i ekspresję wewnątrzkomórkową. Stwierdzono natomiast, że zwiększają one zależną od SDF-1 aktywację wewnątrzkomórkowych kinaz (MAPK p42, PI-3K-AKT). Pojawiło się więc pytanie, w jaki sposób C3a może zwiększać zasiedlanie (ang. *homing*) szpiku kostnego przez KKM i zwiększać aktywność osi SDF-1/CXCR4.

Zasiedlanie szpiku kostnego obejmuje zasiedlanie nisz krwiotwórczych, poprzedzające proliferację i różnicowanie się KKM. Składa się z kilku etapów, które obejmują: 1) podążanie CXCR4⁺ KKM w kierunku gradientu SDF-1, 2) przyleganie do śródbłonna, 3) zależne od udziału metaloproteinaz przejście przez błonę podstawną oraz 4) ostateczne zasiedlenie niszy krwiotwórczych poprzedzające samoodnawianie i różnicowanie się KKM w ukierunkowane liniowo KKP [32, 51].

Wykazano, że w obecności C3a, lecz nie ^{desArg}C3a zwiększa się zależna od SDF-1 migracja CXCR4⁺ komórek w modelu doświadczalnym przez warstwę glikoprotein przypominającą składem błonę podstawną (Matrigel) [59]. Pokonanie tej bariery wymaga uwolnienia przez komórkę enzymów degradacyjnych i wykazano, że składowa C3a zwiększa sekrecję metaloproteinazy-9 (MMP-9) przez komórki KKM [59]. W przyleganiu komórek do śródbłonna naczyniowego i podścieliska szpiku kostnego pośredniczy integryna VLA-4 obecna na KKM i oddziałująca z receptorem VCAM-1, który występuje na komórkach śródbłonna [48]. Proces ten jest regulowany przez osi SDF-1/CXCR4. Wykazano, że C3a zwiększa zależne od SDF-1 przyleganie KKM do VCAM-1 [59].

W badaniach na innym modelu zwierzęcym wykorzystano z kolei myszy pozbawione składowej C3 dopełniacza (C3^{-/-}) [53]. U zwierząt nie obserwowano zaburzeń hematopoezy w warunkach bezstresowych. Jednakże po subletalnym napromienieniu zanotowano u nich opóźnioną odnowę płytek krwi i leukocytów. Wykazano następnie, że letalnie napromienione myszy bez składowej C3 dopełniacza wykazują znacznie opóźnioną odnowę parametrów krwi obwodowej po przeszczepieniu

KKM. Nadsącze uzyskane z napromieniowanego szpiku kostnego tych myszy charakteryzowały się mniejszą efektywnością chemoatrakcji KKM i KKP, w porównaniu z nadsącami uzyskanymi od myszy bez defektu ekspresji C3. Różnice te zmniejszało dodanie C3a do nadsącza uzyskanego z komórek szpiku myszy C3^{-/-}. Badania te są kolejnym dowodem na to, iż interakcja C3a-C3aR jest modulatorem osi SDF-1/CXCR4 ułatwiającym zasiedlanie nisz szpikowych. Ponieważ przed przeszczepem ekspozycja KKM na ^{desArg}C3a 1) nie przyspieszała ich wszczepienia *in vivo*, 2) nie zwiększała sekrecji metaloproteinaz oraz 3) nie zwiększała SDF-1 zależnej interakcji KKM z VCAM-1, należy przypuszczać, że główną rolę w tych zjawiskach odgrywa receptor C3aR, który pobudzany jest przez C3a. Ponieważ ^{desArg}C3a aktywuje wyłącznie receptor C5L2, należy założyć, że os ^{desArg}C3a-C5L2 nie odgrywa w tych procesach istotnej roli. Hipotezę tą potwierdziły wykonane ostatnio przeszczepy krwiotwórcze u myszy bez C3aR, mających receptor C5L2. Myszy takie wykazują znamieny defekt wszczepienia KKM, co przemawia za udziałem C3a w tym procesie [87].

ROLA iC3b W HEMATOPOEZIE

Jak wspomniano, fragment aktywacji składowej C3, jakim jest iC3b, ulega zdeponowaniu na powierzchni komórek podścieliska szpiku kostnego. Wiąże się on z receptorem C3R, który jest obecny na KKM, aczkolwiek KKP wykazują jego większą ekspresję [11, 12, 53]. Blokada C3R u myszy prowadzi do mobilizacji KKM i KKP do krwi obwodowej [78]. Komórki Sca-1⁺ od myszy pozbawionych CR3 wykazują defekt przylegania do podścieliska szpiku wzbogaconego w zdeponowaną na powierzchni komórek iC3b. Interakcja CR3-iC3b odpowiada zatem w pewnym stopniu za przyleganie i retencję KKM i KKP w szpiku kostnym. Można przyjąć, że os CR3-iC3b odgrywa znaczącą rolę w początkowych etapach wszczepiania się komórek, ułatwiając interakcje z innymi molekułami adhezyjnymi i cytokinami [53]. Jak wiadomo, dopiero prawidłowo zakotwiczona w niszy krwiotwórczej komórka jest zdolna do regeneracji hematopoety.

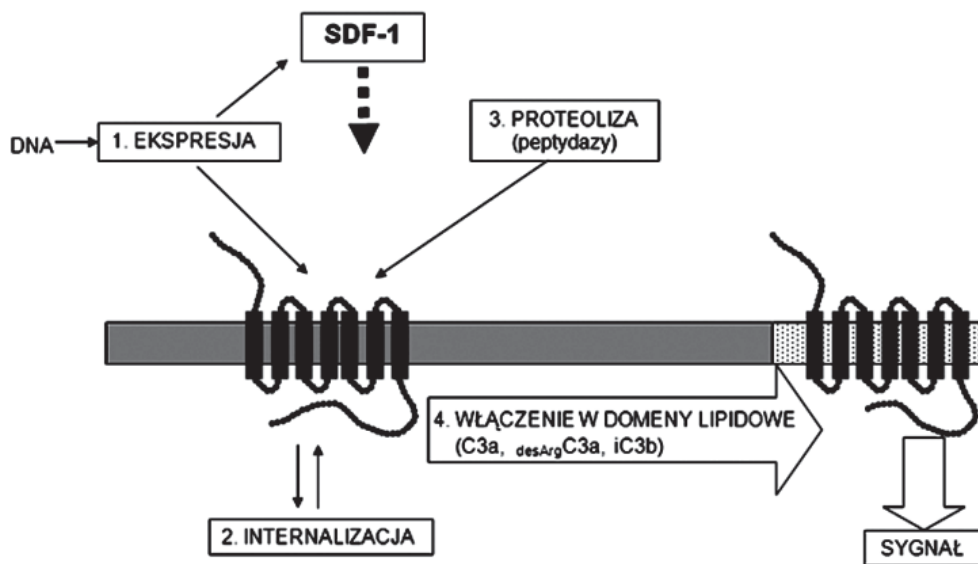
Aktywacja układu dopełniacza w obrębie szpiku prowadzi zatem z jednej strony do uwolnienia fragmentów C3 odpowiedzialnych za zwiększenie wrażliwości KKM i KKP na gradient SDF-1 (C3a), z drugiej zaś strony prowadzi do uwolnienia fragmentów C3 ułatwiających ich retencję (iC3b).

MOLEKULARNE MECHANIZMY UWRAŻLIWIAJĄCE RECEPTOR CXCR4 NA GRADIENT SDF-1

Jak wspomniano powyżej, receptor CXCR4 należy do grupy receptorów zbudowanych z siedmiu pętli przezbłonowych związanych z białkiem G. Po związaniu z SDF-1 podlega internalizacji i recyrkuluje pomiędzy endosomami i błoną komórkową [28, 49]. Jego ekspresja zmienia się pod wpływem hipoksji [67]. Jest wrażliwy

na proteolityczną degradację przez proteazy (np. elastazę, katepsynę), które obecne są w surowicy i podścielisku szpiku [34, 77]. Jego czynność jest regulowana przez białka RGS (ang. *regulators of G-protein signaling*) [5]. Receptor CXCR4 wykazuje najwyższą czynność, jeśli jest wbudowywany w domeny lipidowe, nazywane również tratwami lipidowymi (ang. *lipid rafts*). Domeny te stanowią obszary lipidowe błony komórkowej wzbogacone w sfingolipidy i cholesterol, które mogą przemieszczać się na powierzchni komórki [18, 84]. Charakteryzują się większym uporządkowaniem i opornością na niejonowe detergenty w porównaniu z pozostałymi obszarami błony komórkowej. Są także optymalnym miejscem dla interakcji pomiędzy różnymi białkami błonowymi i podbłonowymi [16]. Wbudowanie CXCR4 do domen lipidowych jest niezbędne dla jego prawidłowego funkcjonowania i regulacji aktywności receptora [16, 44, 57, 88]. Ma także kluczowe znaczenie dla jego interakcji z małymi GTPazami, w tym białkiem Rac-1.

Interakcja CXCR4 z Rac-1 w obrębie domen lipidowych pozwala na przestrzenne uporządkowanie sygnału dostarczanego do komórki przez SDF-1, który wpływa na jej optymalną migrację (stabilizacja wewnątrzkomórkowych mikrotubul) i przyleganie [16, 17, 18, 88, 90]. Zarówno C3a i ^{desArg}C3a zwiększają *in vitro* odpowiedź chemotaktyczną KKM na gradient SDF-1. Wykazano, że zubożenie błony komórkowej w cholesterol, które prowadzi do upośledzenia tworzenia domen lipidowych, niweluje uwrażliwienie odpowiedzi do SDF-1. Pozwala to sądzić, iż składowe dopełniacza oddziałując na powierzchni KKM i KKP ułatwiają wbudowanie CXCR4 w domeny lipidowe (ryc. 2). Zjawisko to potwierdzono analizą *Western blot* i mikroskopem



RYCINA 2. Różne poziomy regulacji osi SDF-1/CXCR4. Oś ta może być regulowana przez: 1) ekspresję SDF-1 i CXCR4 na poziomie białka, 2) tempo internalizacji receptora, 3) proteolizę i 4) włączenie w domeny lipidowe

konfokalnym [53]. Ponieważ tworzenie domen lipidowych przez C3a i $C3a_{desArg}$ obserwowano na mysich komórkach pozbawionych zarówno C3aR, jak i C5L2, uważa się, że ten specyficzny efekt działania obydwu anafilatoksyn na tworzenie traw lipidowych nie zależy od pobudzenia tych receptorów [20]. W zjawisku tym bierze udział jakiś inny, niepoznany jeszcze receptor układu dopełniacza, bądź inny receptor o budowie np. integrynowej. Postuluje się również, że SDF-1 może być wiązany przez C3a lub $C3a_{desArg}$. Takie agregaty mogą być bardziej aktywne biologicznie i mogą chronić SDF-1 przed degradacją przez enzymy proteolityczne [21].

ROLA UKŁADU DOPEŁNIACZA W MOBILIZACJI KKM

Mobilizacja KKM polega na ich uwolnieniu ze szpiku kostnego i przemieszczeniu do krążącej krwi obwodowej [33, 46]. Jak wspomniano powyżej, indukowana jest farmakologicznie np. za pomocą G-CSF [33, 46]. G-CSF zmienia mikrośrodowisko szpiku kostnego w obszar o dużej aktywności proteolitycznej. Niespecyficzne proteazy (katepsyna G, tryptaza, metaloproteiny) wydzielane przez neutrofile i komórki tuczne prowadzą do enzymatycznej degradacji SDF-1 oraz „odcinają” N-terminalny koniec receptora CXCR4. G-CSF także bezpośrednio hamuje ekspresję SDF-1 w szpiku kostnym zarówno na poziomie mRNA, jak i białka [34, 35, 69]. Prowadzi to do upośledzenia oddziaływania SDF-1/CXCR4 i wyjścia CXCR4⁺ KKM do krwi obwodowej.

Wykazano, że integralną częścią zmian molekularnych towarzyszących mobilizacji jest aktywacja układu dopełniacza [54, 55]. Uszkodzone przez enzymy proteolityczne komórki podścieliska szpiku kostnego ekspozycja bowiem determinantę antygenową (tzw. neoepitop), która jest rozpoznawana przez tzw. „naturalne” przeciwciała IgM krążące we krwi obwodowej. Związanie IgM z neoepitopem aktywuje dopełniacz klasyczną drogą. Aktywacja może zachodzić dodatkowo drogą alternatywną indukowaną przez uwalniane proteazy [53, 58]. Stwierdzono, że pacjenci z niedoborami immunologicznymi odpowiadają słabo na czynniki mobilizacyjne, np. G-CSF [68]. Podobnie myszy z niedoborami limfocytów B i immunoglobulin słabo mobilizują się po podaniu G-CSF [58]. Uważa się, że jednym z powodów upośledzonej mobilizacji w przypadku niedoboru immunoglobulin jest defekt klasycznej, zależnej od IgM drogi aktywacji dopełniacza.

Dopełniacz pełni jednak równocześnie ważną rolę w utrzymaniu puli szpikowej KKM. Potwierdzają to wyniki mobilizacji u myszy z brakiem C3 lub C3aR [52]. Uważa się, że składowe C3a, $C3a_{desArg}$, „uwrażliwiają” odpowiedź komórek krwiotwórczych na gradient SDF-1 zwiększając retencję KKM w szpiku kostnym. Układ dopełniacza wydaje się być jednym z głównych czynników odpowiadających za utrzymanie równowagi pomiędzy retencją i uwalnianiem/mobilizacją KKM z mikrośrodowiska szpiku. Zgodnie z powyższym C3a jest negatywnym regulatorem wyjścia KKM w procesie mobilizacji. Aktywacja dopełniacza w podścielisku szpiku uwrażliwia więc komórkę na malejące stężenie SDF-1 stanowiąc „ostatnią linię obrony” przed niekontrolowanym opuszczeniem szpiku kostnego przez KKM.

Z drugiej strony, oś C3a-C3aR odgrywa znaczącą rolę w osiedlaniu się komórek po przeszczepieniu. Aktywacja dopełniacza w odpowiedzi na kondycjonowanie przed zabiegiem transplantacji ułatwia więc migrację przeszczepionych KKM do szpiku oraz ich wiązanie z komórkami podścieliska. Należy również podkreślić, że fragmenty dopełniacza oddziałują różnie na proces mobilizacji, zależnie od regionu aktywacji. C3 aktywowany wewnątrz-naczyniowo zwiększa np. odpowiedź receptora CXCR4 na gradient SDF-1 obecny we krwi i tym samym ułatwia ich mobilizację do krwi obwodowej [54].

UDZIAŁ DOPEŁNIACZA W MEGAKARIOPOEZIE

Ostatnio zgromadzono dowody, że układ dopełniacza może pełnić ważną rolę w megakariopoezie i produkcji płytek krwi [41, 85, 86]. Kluczowym czynnikiem regulującym megakariopoezę, proliferację i różnicowanie megakariocytów oraz produkcję płytek krwi pełni trombopoetyna (TPO). Okazało się jednak, że zwierzęta doświadczalne pozbawione tej cytokiny lub jej swoistego receptora c-mpl mają ciągle około 20% płytek krwi w krwi obwodowej i pewną liczbę megakariocytów w szpiku kostnym [6, 85]. Uważa się, że pewną rolę kompensacyjną mogą mieć cytokiny aktywujące receptory związane z receptorem gp130, takie jak: interleukina-11, interleukina-6, czynnik hamujący białaczkę – LIF (ang. *leukemia inhibitory factor*), czynnik neurotroficzny pochodzenia rzęskowego – CNTF (ang. *ciliary neurotrophic factor*), onkostatyny M [6, 15, 41, 85, 86]. Okazało się jednak, że żadna z wymienionych cytokin oddzielnie lub w kombinacji nie indukuje produkcji płytek przy braku TPO. Trombopoeza u myszy pozbawionych TPO i receptora c-mpl może być jednak przywrócona po podaniu SDF-1 i czynnika wzrostu fibroblastów-4 (FGF-4) [40]. SDF-1 reguluje bowiem prawidłową alokację megakariocytów, które mają receptor CXCR4 z nisz kostnych do nisz naczyniowych, gdzie megakariocyty dojrzewają i uwalniają do krwiobiegu płytki [40, 81, 85].

Biorąc pod uwagę fakt, że odpowiedź komórek CXCR4⁺ jest optymalna, gdy CXCR4 jest wbudowany w domeny lipidowe [81, 85, 86], przedstawiono koncepcję, że dopełniacz odgrywa ważną rolę w uwrażliwianiu odpowiedzi progenitorów megakariocytowych i megakariocytów na gradient SDF-1. Jak wykazano, myszy bez składowej C3 dopełniacza wykazują opóźnioną odnowę płytek krwi po subletalnym napromienieniu lub reaktywnej nadpłytkowości wywołanej nadmierną utratą krwi [85, 86]. Wykazano ponadto, że C3a i ^{desArg}C3a stymulują bezpośrednio w komórkach linii megakariocytowej fosforylację MAPKp42/44 (ang. *mitogen-activated protein kinase p42/44*) [40, 41, 85] i zwiększają wbudowywanie CXCR4 w domeny lipidowe. Zatem C3a poprzez ułatwienie migracji megakariocytów i zwiększenie ich przylegania do śródbłonna naczyniowego, jak i stymulację sekrecji metaloproteinazy-9 (MMP-9), które biorą udział w defragmentacji megakariocytów, reguluje powstawanie płytek krwi [85, 86].

Aktywacja składowych dopełniacza jest więc prawdopodobnie jedną z przyczyn nadpłytkowości towarzyszącej przewlekłym stanom zapalnym oraz niektórych przypadków

ostrej nadpłytkowości reaktywnej [86]. W stanach tych jak wiadomo dochodzi do aktywacji układu dopełniacza. Ponieważ wbudowanie CXCR4 do domen lipidowych jest zależne od cholesterolu, niektóre leki obniżające poziom cholesterolu, np. statyny, mogłyby być pomocne w leczeniu niektórych postaci nadpłytkowości [85].

PODSUMOWANIE

Badania ostatnich lat wskazują, że niektóre składowe aktywacji dopełniacza (C3a i ^{desArg}C3a) pełnią ważną rolę modyfikującą czynność osi SDF-1/CXCR4. Ponieważ dopełniacz ulega aktywacji w szpiku kostnym zarówno podczas przygotowania mieloablacyjnego do przeszczepienia krwiotwórczego, jak i mobilizacji farmakologicznej, składowe dopełniacza mogą pełnić ważną rolę zarówno we wszczepianiu, jak i uwalnianiu KKM ze szpiku. Stanowi to podstawę do nowych ingerencji farmakologicznych mających na celu np. przyspieszenie wszczepienia KKM poprzez krótką ich ekspozycję *ex vivo* do C3a lub zwiększenia mobilizacji KKM poprzez podanie np. antagonistów C3aR. Fragmenty aktywacji C3 modulując odpowiedź komórek do SDF-1 wpływają również na szereg innych procesów, takich jak np. produkcja płytek krwi. Dalszych badań wymaga ocena wpływu fragmentów C3 na modulację SDF-1-zależnych odpowiedzi immunologicznych, jak i ocena wpływu na powyższe procesy innych białek uwolnionych podczas aktywacji kaskady dopełniacza.

PODZIĘKOWANIA

Autorzy dziękują Panu Prof. Mariuszowi Ratajczakowi za krytyczne uwagi i wskazówki podczas przygotowywania niniejszej pracy.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ABDULAJEES A, GUNASEKARAN K, VOLANAKIS JE, NARAYANA SV, KOTWAL GJ, MURTHY HM. The structure of complement C3b provides insights into complement activation and regulation. *Nature* 2006; **444**(7116): 221–225.
- [2] ARA T, NAKAMURA Y, EGAWA T, SUGIYAMA T, ABE K, KISHIMOTO T, MATSUI Y, NAGASAWA T. Impaired colonization of the gonads by primordial germ cells in mice lacking a chemokine, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**(9): 5319–5323.
- [3] BAJETTO A, BONAVIAR, BARBERO S, PICCIOLI P, COSTAA, FLORIO T, SCHETTINI G. Glial and neuronal cells express functional chemokine receptor CXCR4 and its natural ligand stromal cell-derived factor 1. *J Neurochem* 1999; **73**(6): 2348–2357.
- [4] BALABANIAN K, LAGANE B, INFANTINO S, CHOW KY, HARRIAGUE J, MOEPPS B, ARENZANA-SEISDEDOS F, THELEN M, BACHELERIE F. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem* 2005; **280**(42): 35760–35766.
- [5] BERTHEBAUDM, RIVIEREC, JARRIER P, FOU DIA A, ZHANG Y, COMPAGNO D, GALY A, VAIN-CHENKER W, LOUACHE F. RGS16 is a negative regulator of SDF-1-CXCR4 signaling in megakaryocytes. *Blood* 2005; **106**(9): 2962–2968.
- [6] BUNTING S, WIDMER R, LIPARI T, RANGELL L, STEINMETZ H, CARVER-MOORE K, MOORE MW, KELLER GA, DE SAUVAGE FJ. Normal platelets and megakaryocytes are produced *in vivo* in the absence of thrombopoietin. *Blood* 1997; **90**(9): 3423–3429.

- [7] CAIN SA, MONK PN. The orphan receptor C5L2 has high affinity binding sites for complement fragments C5a and C5a des-Arg(74). *J Biol Chem* 2002; **277**(9): 7165–7169.
- [8] CARROLL MC, PRODEUS AP. Linkages of innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 1998; **10**(1): 36–40.
- [9] CARROLL MC. The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu Rev Immunol* 1998; **16**: 545–568.
- [10] CHAMPLIN RE, SCHMITZ N, HOROWITZ MM, CHAPUIS B, CHOPRA R, CORNELISSEN JJ, GALE RP, GOLDMAN JM, LOBERIZA FR JR, HERTENSTEIN B, KLEIN JP, MONTSERRAT E, ZHANG MJ, RINGDÉN O, TOMANY SC, ROWLINGS PA, VAN HOEF ME, GRATWOHL A. Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. IBMTR Histocompatibility and Stem Cell Sources Working Committee and the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Blood* 2000; **95**(12): 3702–3709.
- [11] COOMBE DR, WATT SM, PARISH CR. Mac-1 (CD11b/CD18) and CD45 mediate the adhesion of hematopoietic progenitor cells to stromal cell elements via recognition of stromal heparan sulfate. *Blood* 1994; **84**(3): 739–752.
- [12] CRAMER DE, ALLENDORF DJ, BARAN JT, HANSEN R, MARROQUIN J, LI B, RATAJCZAK J, RATAJCZAK MZ, YAN J. Beta-glucan enhances complement-mediated hematopoietic recovery after bone marrow injury. *Blood* 2006; **107**(2): 835–840.
- [13] CRUMP MP, GONG JH, LOETSCHER P, RAJARATHNAM K, AMARAA, ARENZANA-SEISDEDOS F, VIRELIZIER JL, BAGGIOLINI M, SYKES BD, 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**(23): 6996–7007.
- [14] DAR A, KOLLET O, LAPIDOT T. Mutual, reciprocal SDF-1/CXCR4 interactions between hematopoietic and bone marrow stromal cells regulate human stem cell migration and development in NOD/SCID chimeric mice. *Exp Hematol* 2006; **34**(8): 967–975.
- [15] GIERYNG A, BOGUNIA-KUBIK K. The role of the SDF-1-CXCR4 axis in hematopoiesis and the mobilization of hematopoietic stem cells to peripheral blood. *Post Hig Med Dosw* 2007; **61**: 369–383.
- [16] GÓMEZ-MOUTÓN C, LACALLE RA, MIRA E, JIMÉNEZ-BARANDA S, BARBER DF, CARRERA AC, MARTÍNEZ-AC, MANES S. Dynamic redistribution of raft domains as an organizing platform for signaling during cell chemotaxis. *J Cell Biol* 2004; **164**(5): 759–768.
- [17] GU Y, FILIPPI MD, CANCELAS JA, SIEFRING JE, WILLIAMS EP, JASTIAC, HARRIS CE, LEE AW, PRABHAKAR R, ATKINSON SJ, KWIATKOWSKI DJ, WILLIAMS DA. Hematopoietic cell regulation by Rac1 and Rac2 guanosine triphosphatases. *Science* 2003; **302**(5644): 445–449.
- [18] GUAN JL. Cell biology. Integrins, rafts, Rac, and Rho. *Science* 2004; **303**(5659): 773–774.
- [19] HARTMANN K, HENZ BM, KRÜGER-KRASAGAKES S, KÖHL J, BURGER R, GUHL S, HAASE I, LIPPERT U, ZUBERBIER T. C3a and C5a stimulate chemotaxis of human mast cells. *Blood* 1997; **89**(8): 2863–2870.
- [20] HONCZARENKO M, LU B, NICHOLSON-WELLER A, GERARD NP, SILBERSTEIN LE, GERARD C. C5L2 receptor is not involved in C3a/C3a-desArg-mediated enhancement of bone marrow hematopoietic cell migration to CXCL12. *Leukemia* 2005; **19**(9): 1682–1683.
- [21] HONCZARENKO M, RATAJCZAK MZ, NICHOLSON-WELLER A, SILBERSTEIN LE. Complement C3a enhances CXCL12 (SDF-1)-mediated chemotaxis of bone marrow hematopoietic cells independently of C3a receptor. *J Immunol* 2005; **175**(6): 3698–3706.
- [22] HORUK R. Chemokine receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001; **12**(4): 313–335.
- [23] JAGELS MA, DAFFERN PJ, HUGLI TE. C3a and C5a enhance granulocyte adhesion to endothelial and epithelial cell monolayers: epithelial and endothelial priming is required for C3a-induced eosinophil adhesion. *Immunopharmacology* 2000; **46**(3): 209–222.
- [24] JANOWSKA-WIECZOREK A, MAJKA M, RATAJCZAK J, RATAJCZAK MZ. Autocrine/paracrine mechanisms in human hematopoiesis. *Stem Cells* 2001; **19**(2): 99–107.
- [25] KALANT D, CAIN SA, MASLOWSKA M, SNIDERMAN AD, CIANFLONE K, MONK PN. The chemoattractant receptor-like protein C5L2 binds the C3a des-Arg77/acylation-stimulating protein. *J Biol Chem* 2003; **278**(13): 11123–11129.
- [26] KATSCHKE KJ JR, STAWICKI S, YIN J, STEFFEK M, XI H, STURGEON L, HASS PE, LOYET KM, DEFORGE L, WU Y, VAN LOOKEREN CAMPAGNE M, WIESMANN C. Structural and Functional Analysis of a C3b-specific Antibody That Selectively Inhibits the Alternative Pathway of Complement. *J Biol Chem* 2009; **284**(16): 10473–10479.

- [27] KOLLET O, SHIVTIEL S, CHEN YQ, SURIAWINATA J, THUNG SN, DABEVA MD, KAHN J, SPIEGEL A, DARA, SAMIRAS, GOICHBERG P, KALINKOVICHA, ARENZANA-SEISDEDOS F, NAGLER A, HARDAN I, REVEL M, SHAFRITZ DA, LAPIDOT T. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34⁺ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest* 2003; **112**(2): 160–169.
- [28] KOLLET O, SPIEGEL A, PELED A, PETIT I, BYK T, HERSHKOVIZ R, GUETTA E, BARKAI G, NAGLER A, LAPIDOT T. Rapid and efficient homing of human CD34(+)/CD38(-/low)/CXCR4(+) stem and progenitor cells to the bone marrow and spleen of NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Blood* 2001; **97**(10): 3283–3291.
- [29] KOPF M, ABEL B, GALLIMORE A, CARROLL M, BACHMANN MF. Complement component C3 promotes T-cell priming and lung migration to control acute influenza virus infection. *Nat Med* 2002; **8**(4): 373–378.
- [30] KUCIAM, DAWN B, HUNT G, GUO Y, WYSOCZYNSKI M, MAJKA M, RATAJCZAK J, REZZOUG F, ILDSTAD ST, BOLLI R, RATAJCZAK MZ. Cells expressing early cardiac markers reside in the bone marrow and are mobilized into the peripheral blood after myocardial infarction. *Circ Res* 2004; **95**(12): 1191–1199.
- [31] KUCIA M, RATAJCZAK J, RECAR, JANOWSKA-WIECZOREK A, RATAJCZAK MZ. Tissue-specific muscle, neural and liver stem/progenitor cells reside in the bone marrow, respond to an SDF-1 gradient and are mobilized into peripheral blood during stress and tissue injury. *Blood Cells Mol Dis* 2004; **32**(1): 52–57.
- [32] LAPIDOT T, DAR A, KOLLET O. How do stem cells find their way home? *Blood* 2005; **106**(6): 1901–1910.
- [33] LAPIDOT T, PETIT I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol* 2002; **30**(9): 973–981.
- [34] LÉVESQUE JP, HENDY J, TAKAMATSU Y, SIMMONS PJ, BENDALL LJ. Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by GCSF or cyclophosphamide. *J Clin Invest* 2003; **111**(2): 187–196.
- [35] LÉVESQUE JP, HENDY J, TAKAMATSU Y, WILLIAMS B, WINKLER IG, SIMMONS PJ. Mobilization by either cyclophosphamide or granulocyte colony-stimulating factor transforms the bone marrow into a highly proteolytic environment. *Exp Hematol* 2002; **30**(5): 440–449.
- [36] LONG MA, CORBEL SY, ROSSI FM. Circulating myogenic progenitors and muscle repair. *Semin Cell Dev Biol* 2005; **16**(4–5): 632–640.
- [37] MA Q, JONES D, BORGHESEANI PR, SEGAL RA, NAGASAWA T, KISHIMOTO T, BRONSON RT, SPRINGER TA. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**(16): 9448–9453.
- [38] MA Q, JONES D, SPRINGER TA. The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment. *Immunity* 1999; **10**(4): 463–471.
- [39] MAJKA M, JANOWSKA-WIECZOREK A, RATAJCZAK J, EHRENMAN K, PIETRZKOWSKI Z, KOWALSKA MA, GEWIRTZ AM, EMERSON SG, RATAJCZAK MZ. Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34(+) cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood* 2001; **97**(10): 3075–3085.
- [40] MAJKA M, JANOWSKA-WIECZOREK A, RATAJCZAK J, KOWALSKA MA, VILLAIRE G, PAN ZK, HONCZARENKO M, MARQUEZ LA, PONCZ M, RATAJCZAK MZ. Stromal-derived factor 1 and thrombopoietin regulate distinct aspects of human megakaryopoiesis. *Blood* 2000; **96**(13): 4142–4151.
- [41] MAJKA M, RATAJCZAK J, VILLAIRE G, KUBICZEK K, MARQUEZ LA, JANOWSKA-WIECZOREK A, RATAJCZAK MZ. Thrombopoietin, but not cytokines binding to gp130 protein-coupled receptors, activates MAPKp42/44, AKT, and STAT proteins in normal human CD34⁺ cells, megakaryocytes, and platelets. *Exp Hematol* 2002; **30**(7): 751–760.
- [42] MEDVINSKY A, DZIERZAK E. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 1996; **86**(6): 897–906.
- [43] NAGASAWA T, HIROTA S, TACHIBANA K, TAKAKURAN, NISHIKAWA S, KITAMURAY, 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**(6592): 635–638.
- [44] NGUYEN DH, TAUB D. CXCR4 function requires membrane cholesterol: implications for HIV infection. *J Immunol* 2002; **168**(8): 4121–4126.

- [45] NICULESCU F, BADEA T, RUS H. Sublytic C5b-9 induces proliferation of human aortic smooth muscle cells: role of mitogen activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Atherosclerosis* 1999; **142**(1): 47–56.
- [46] PAPAYANNOPOULOU T. Current mechanistic scenarios in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Blood* 2004; **103**(5): 1580–1585.
- [47] PARK SY, SHIN YP, KIM CH, PARK HJ, SEONG YS, KIM BS, SEO SJ, LEE IH. Immune evasion of *Enterococcus faecalis* by an extracellular gelatinase that cleaves C3 and iC3b. *J Immunol* 2008; **181**(9): 6328–6336.
- [48] PELEDA, GRABOVSKY V, HABLER L, SANDBANK J, ARENZANA-SEISDEDOS F, PETIT I, BENHUR 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**(9): 1199–1211.
- [49] PELED A, PETIT I, KOLLET O, MAGID M, PONOMARYOV T, BYK T, NAGLER A, BEN-HUR H, MANY A, SHULTZ L, LIDER O, ALON R, ZIPORI D, LAPIDOT T. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* 1999; **283**(5403): 845–848.
- [50] PETIT I, SZYPER-KRAVITZ M, NAGLER A, LAHAV M, PELED A, HABLER L, PONOMARYOV T, TAICHMAN RS, ARENZANA-SEISDEDOS F, FUJII N, SANDBANK J, ZIPORI D, LAPIDOT T. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol* 2002; **3**(7): 687–694.
- [51] QUESENBERRY PJ, BECKER PS. Stem cell homing: rolling, crawling, and nesting. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**(26): 15155–15157.
- [52] RATAJCZAK J, RECA R, KUCIA M, MAJKA M, ALLENDORF DJ, BARAN JT, JANOWSKA-WIECZOREK A, WETSEL RA, ROSS GD, RATAJCZAK MZ. Mobilization studies in mice deficient in either C3 or C3a receptor (C3aR) reveal a novel role for complement in retention of hematopoietic stem/progenitor cells in bone marrow. *Blood* 2004; **103**(6): 2071–2078.
- [52a] RATAJCZAK J, KUCIA M. Komórki macierzyste – wywanie XXI wieku? *Post Biol Kom* 2005; **32** supl 23: 11–26.
- [53] RATAJCZAK MZ, RECA R, WYSOCZYNSKI M, KUCIA M, BARAN JT, ALLENDORF DJ, RATAJCZAK J, ROSS GD. Transplantation studies in C3-deficient animals reveal a novel role of the third complement component (C3) in engraftment of bone marrow cells. *Leukemia* 2004; **18**(9): 1482–1490.
- [54] RATAJCZAK MZ, RECA R, WYSOCZYNSKI M, YAN J, RATAJCZAK J. Modulation of the SDF-1-CXCR4 axis by the third complement component (C3)-implications for trafficking of CXCR4⁺ stem cells. *Exp Hematol* 2006; **34**(8): 986–995.
- [55] RATAJCZAK MZ, WYSOCZYNSKI M, RECA R, WAN W, ZUBA-SURMA EK, KUCIA M, RATAJCZAK J. A pivotal role of activation of complement cascade (CC) in mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells (HSPC). *Adv Exp Med Biol* 2008; **632**: 47–60.
- [56] RATAJCZAK MZ, ZUBA-SURMA E, KUCIA M, RECA R, WOJAKOWSKI W, RATAJCZAK J. The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia* 2006; **20**: 1915–1924.
- [57] RAULIN J. Human immunodeficiency virus and host cell lipids. Interesting pathways in research for a new HIV therapy. *Prog Lipid Res* 2002; **41**(1): 27–65.
- [58] RECA R, CRAMER D, YAN J, LAUGHLIN MJ, JANOWSKA-WIECZOREK A, RATAJCZAK J, RATAJCZAK MZ. A novel role of complement in mobilization: immunodeficient mice are poor granulocyte-colony stimulating factor mobilizers because they lack complement-activating immunoglobulins. *Stem Cells* 2007; **25**(12): 3093–3100.
- [59] RECA R, MASTELLOS D, MAJKA M, MARQUEZ L, RATAJCZAK J, FRANCHINI S, GLODEK A, HONCZARENKO M, SPRUCE LA, JANOWSKA-WIECZOREK A, LAMBRIS JD, RATAJCZAK MZ. Functional receptor for C3a anaphylatoxin is expressed by normal hematopoietic stem/progenitor cells, and C3a enhances their homing-related responses to SDF-1. *Blood* 2003; **101**(10): 3784–3793.
- [60] RECA R, WYSOCZYNSKI M, YAN J, LAMBRIS JD, RATAJCZAK MZ. The role of third complement component (C3) in homing of hematopoietic stem/progenitor cells into bone marrow. *Adv Exp Med Biol* 2006; **586**: 35–51.
- [61] REISS K, MENTLEIN R, SIEVERS J, HARTMANN D. Stromal cell-derived factor 1 is secreted by meningeal cells and acts as chemotactic factor on neuronal stem cells of the cerebellar external granular layer. *Neuroscience* 2002; **115**(1): 295–305.
- [62] ROSS GD, LAMBRIS JD, CAIN JA, NEWMAN SL. Generation of three different fragments of bound C3 with purified factor I or serum. I. Requirements for factor H vs CR1 cofactor activity. *J Immunol* 1982; **129**(5): 2051–2060.

- [63] ROSS GD. Role of the lectin domain of Mac-1/CR3 (CD11b/CD18) in regulating intercellular adhesion. *Immunol Res* 2002; **25**(3): 219–227.
- [64] SANDRI M, ADAMS V, GIELEN S, LINKE A, LENK K, KRÄNKEL N, LENZ D, ERBS S, SCHEINERT D, MOHR FW, SCHULER G, HAMBRECHT R. Effects of exercise and ischemia on mobilization and functional activation of blood-derived progenitor cells in patients with ischemic syndromes: results of 3 randomized studies. *Circulation* 2005; **111**(25): 3391–3399.
- [65] SATO T, ABE E, JIN CH, HONG MH, KATAGIRI T, KINOSHITA T, AMIZUKA N, OZAWA H, SUDA T. The biological roles of the third component of complement in osteoclast formation. *Endocrinology* 1993; **133**(1): 397–404.
- [66] SCHIER AF. Chemokine signaling: rules of attraction. *Curr Biol* 2003; **13**(5): R192–194.
- [67] SCHIOPPA T, URANCHIMEG B, SACCANIA, BISWAS SK, DONIA, RAPISARDA A, BERNASCONI S, SACCANI S, NEBULONI M, VAGO L, MANTOVANI A, MELILLO G, SICA A. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. *J Exp Med* 2003 Nov 3; **198**(9): 1391–402.
- [68] SEKHSARIA S, FLEISHER TA, VOWELLS S, BROWN M, MILLER J, GORDON I, BLAESE RM, DUNBAR CE, LEITMAN S, MALECH HL. Granulocyte colony-stimulating factor recruitment of CD34⁺ progenitors to peripheral blood: impaired mobilization in chronic granulomatous disease and adenosine deaminase-deficient severe combined immunodeficiency disease patients. *Blood* 1996; **88**(3): 1104–1112.
- [69] SEMERAD CL, CHRISTOPHER MJ, LIU F, SHORT B, SIMMONS PJ, WINKLER I, LEVESQUE JP, CHAPPEL J, ROSS FP, LINK DC. G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow. *Blood* 2005; **106**(9): 3020–3027.
- [70] SHIROZU M, NAKANO T, INAZAWA J, TASHIRO K, TADA H, SHINOHARA T, HONJO T. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* 1995; **28**(3): 495–500.
- [71] SIERRA F, BIBEN C, MARTÍNEZ-MUÑOZ L, MELLADO M, RANSOHOFF RM, LI M, WOEHL B, LEUNG H, GROOM J, BATTEN M, HARVEY RP, MARTÍNEZ-A C, MACKAY CR, MACKAY F. Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**(37): 14759–14764.
- [72] TACHIBANA K, HIROTA S, IIZASA H, YOSHIDA H, KAWABATA K, KATAOKA Y, KITAMURA Y, MATSUSHIMA K, YOSHIDA N, NISHIKAWA S, KISHIMOTO T, NAGASAWA T. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 1998; **393**(6685): 591–594.
- [73] TEIXIDÓ J, HEMLER ME, GREENBERGER JS, ANKLESARIA P. Role of beta 1 and beta 2 integrins in the adhesion of human CD34^{hi} stem cells to bone marrow stroma. *J Clin Invest* 1992; **90**(2): 358–367.
- [74] THELEN M, THELEN S. CXCR7, CXCR4 and CXCL12: an eccentric trio? *J Neuroimmunol* 2008; **198**(1–2): 9–13.
- [75] TÖGEL F, ISAAC J, HU Z, WEISS K, WESTENFELDER C. Renal SDF-1 signals mobilization and homing of CXCR4-positive cells to the kidney after ischemic injury. *Kidney Int* 2005; **67**(5): 1772–1784.
- [76] TORREIRA E, TORTAJADAA, MONTES T, RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA S, LLORCA O. 3D structure of the C3bB complex provides insights into the activation and regulation of the complement alternative pathway convertase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**(3): 882–887.
- [77] VALENZUELA-FERNÁNDEZ A, PLANCHENAULT T, BALEUX F, STAROPOLI I, LE-BARILLEC K, LEDUC D, DELAUNAY T, LAZARINI F, VIRELIZIER JL, CHIGNARD M, PIDARD D, ARENZANA-SEISDEDOS F. Leukocyte elastase negatively regulates Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCR4 binding and functions by amino-terminal processing of SDF-1 and CXCR4. *J Biol Chem* 2002; **277**(18): 15677–15689.
- [78] VELDERS GA, PRUIJT JF, VERZAAL P, VAN OS R, VAN KOOYK Y, FIGDOR CG, DE KRUIJF EJ, WILLEMZE R, FIBBE WE. Enhancement of G-CSF-induced stem cell mobilization by antibodies against the beta 2 integrins LFA-1 and Mac-1. *Blood* 2002; **100**(1): 327–333.
- [79] WALPORT MJ. COMPLEMENT. First of two parts. *N Engl J Med* 2001; **344**(14): 1058–1066.
- [80] WALPORT MJ. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med* 2001; **344**(15): 1140–1144.
- [81] WANG JF, LIU ZY, GROOPMAN JE. The alpha-chemokine receptor CXCR4 is expressed on the megakaryocytic lineage from progenitor to platelets and modulates migration and adhesion. *Blood* 1998; **92**(3): 756–764.

- [82] WERFEL T, KIRCHHOFF K, WITTMANN M, BEGEMANN G, KAPP A, HEIDENREICH F, GÖTZE O, ZWIRNER J. Activated human T lymphocytes express a functional C3a receptor. *J Immunol* 2000; **165**(11): 6599–6605.
- [83] WILKEN HC, GÖTZE O, WERFEL T, ZWIRNER J. C3a(desArg) does not bind to and signal through the human C3a receptor. *Immunol Lett* 1999; **67**(2): 141–145.
- [84] WOJEWÓDZKA U, GAJKOWSKA B, JURKIEWICZ J, GNIADOCKI R. Mikrodomeny (rafty) lipidowe w błonach komórkowych: struktura, fizjologia, i znaczenie w procesach patologicznych. *Post Biol Kom* 2005; **32**: 293–309.
- [85] WYSOCZYNSKI M, KUCIA M, RATAJCZAK J, RATAJCZAK M Z. Cleavage fragments of the third complement component (C3) enhance stromal derived factor-1 (SDF-1)-mediated platelet production during reactive postbleeding thrombocytosis. *Leukemia* 2007; **21**: 973–982.
- [86] WYSOCZYNSKI M, RATAJCZAK J, RECA R, KUCIA M, RATAJCZAK MZ. The third complement component as modulator of platelet production. *Adv Exp Med Biol* 2007; **598**: 226–239.
- [87] WYSOCZYNSKI M, RECA R, LEE H, WU W, RATAJCZAK J, RATAJCZAK MZ. Defective engraftment of C3aR^{-/-} hematopoietic stem cells reveals a novel role of the C3a-C3aR axis in bone marrow homing. *Leukemia* 2009 (in press).
- [88] WYSOCZYNSKI M, RECA R, RATAJCZAK J, KUCIA M, SHIRVAIKAR N, HONCZARENKO M, MILLS M, WANZECK J, JANOWSKA-WIECZOREK A, RATAJCZAK MZ. Incorporation of CXCR4 into membrane lipid rafts primes homing-related responses of hematopoietic stem/progenitor cells to an SDF-1 gradient. *Blood* 2005; **105**(1): 40–48.
- [89] XIA Y, BORLAND G, HUANG J, MIZUKAMI IF, PETTY HR, TODD RF 3RD, ROSS GD. Function of the lectin domain of Mac-1/complement receptor type 3 (CD11b/CD18) in regulating neutrophil adhesion. *J Immunol* 2002; **169**(11): 6417–6426.
- [90] YANG FC, ATKINSON SJ, GU Y, BORNEO JB, ROBERTS AW, ZHENG Y, PENNINGTON J, WILLIAMS DA. Rac and Cdc42 GTPases control hematopoietic stem cell shape, adhesion, migration, and mobilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**(10): 5614–5618.
- [91] YODER MC. Embryonic hematopoiesis in mice and humans. *Acta Paediatr Suppl* 2002; **91**(438): 5–8.
- [92] YOUN BS, MANTEL C, BROXMEYER HE. Chemokines, chemokine receptors and hematopoiesis. *Immunol Rev* 2000; **177**: 150–174.
- [93] ZLOTNIK A, MORALES J, HEDRICK JA. Recent advances in chemokines and chemokine receptors. *Crit Rev Immunol* 1999; **19**(1): 1–47.
- [94] ZOU YR, KOTTMANN AH, KURODA M, TANIUCHI I, LITTMAN DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 1998; **393**(6685): 595–599.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 06.04. 2009 r.

Przyjęto: 03.05. 2009 r.

Dr Dorota Słowik-Żyłka

Zakład Fizjologii PAM

Al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin

e-mail: dorota@pam.szczecin.pl