

## RECEPTORY DLA HEMOGLOBINY. CZĘŚĆ I. BUDOWA I FUNKCJE

RECEPTORS FOR HEMOGLOBIN. PART I. STRUCTURE AND FUNCTIONS

Jolanta ZUWAŁA-JAGIEŁŁO

Katedra Biochemii Farmaceutycznej, Akademia Medyczna we Wrocławiu

*Streszczenie:* W artykule przedstawiono informacje dotyczące rozpoznawania przez komórki wolnej hemoglobiny – Hb i jej kompleksu z haptoglobiną – Hb-Hp, na podstawie badań cytowanych w literaturze ostatnich lat. Zaproponowano istnienie specyficznego receptora pośredniczącego w endocytozie kompleksu Hb-Hp w komórkach parenchymalnych wątroby, na podstawie badania wiązania, wychwytu i degradacji przez izolowane błony plazmatyczne i hepatocyty szczurze. Uważa się, że izolowane komórki parenchymalne wiążą wolną Hb i kompleks Hb-Hp, ale z niskim stopieniem wychwytu. Niedawno zidentyfikowano receptor uczestniczący w wychwycie kompleksów Hb-Hp, który jest identyczny z receptorem CD163, obecnym na powierzchni makrofagów tkankowych oraz na monocytach wyizolowanych z krwi. Rozpoznanie i endocytoza hemoglobiny i jej kompleksu z haptoglobiną przez receptor CD163/HbSR jest pierwszą fizjologiczną funkcją przypisaną białku HbSR w grupie B receptorów zmiatających. Natomiast molekularny mechanizm wychwytu wolnej hemoglobiny w cewce proksymalnej przebiega z udziałem endocytarnych receptorów megaliny i kubiliny. Artykuł ten przedstawia w sposób usystematyzowany wiedzę na temat struktury i funkcji receptora CD163/HbSR dla Hb i jej kompleksu z Hp na powierzchni monocytów/makrofagów oraz receptorów megaliny i kubiliny jako układu wychwytu hemoglobiny w cewkach proksymalnych nerek.

*Słowa kluczowe:* receptor dla hemoglobiny, monocyty/makrofagi, hepatocyty, megalina-kubilina, haptoglobina.

*Summary:* The information published during the last years, concerning the recognition of hemoglobin-haptoglobin complex by cells has been presented. It is generally accepted that the major function of Hb-Hp formation is the clearance of free hemoglobin through endocytosis of the complex by specific receptors on liver parenchymal cells. The internalised complex is then rapidly degraded. The function of the receptor specific for the hemoglobin in parenchymal cells not has been elucidated to date. Molecular mechanisms involved in the removal of hemoglobin-haptoglobin complex have been elusive, until the recent identification of the macrophage-restricted CD163 antigen as the specific hemoglobin scavenger receptor (HbSR). CD163/HbSR has been reported to be expressed by macrophages accumulating during the down regulation of inflammatory reactions and during the wound healing process. Moreover, the megalin-cubilin complex appears to be essential in the scavenging of hemoglobin, which would otherwise be excreted by the kidneys. The objective of this article is to review the most important publications dealing with structure, regulation and function of receptors for hemoglobin.

*Key words:* hemoglobin receptor, monocyte/macrophage, hepatocytes, megalin-cubilin, haptoglobin.

## WSTĘP

Hemoliza wewnątrznacyniowa krwinek czerwonych jest zjawiskiem fizjologicznym, jak również powikłaniem różnych zaburzeń, m.in. infekcyjnych, autoimmunologicznych, czy dziedzicznych. Hemoglobina (Hb) uwolniona z krwinek czerwonych ulega związaniu szybko i nierozzerwalnie przez haptoglobinę za pośrednictwem silnych wiązań niekowalencyjnych. Zaproponowano istnienie specyficznego receptora pośredniczącego w endocytozie kompleksu hemoglobiny z haptoglobiną (Hb-Hp) w komórkach parenchymalnych wątroby, na podstawie badania *in vivo* oraz badania wiązania i wychwytu przez izolowane błony plazmatyczne i hepatocyty szczurze (ryc. 1) [21]. Badania na izolowanych błonach hepatocytów wskazywały na wysoką ekspresję kompleksu Hb Hp (w formie nierozłożonej) w organellach związanych z mikrosomami. Dodatkowo dwie podjednostki 82 kDa kompleksu (z nierozłożonym hemem) we wczesnym stadium degradacji zidentyfikowano w kompartmentcie CURL (ang. *compartment of uncoupling receptor and ligand*), tj. przedziale odszczepienia receptorów od ligandów [31]. Izolowane komórki parenchymalne wiążą wolną Hb i kompleks Hb-Hp, ale wykazują niski stopień ich wychwytu; ten wynik niskiej internalizacji kompleksu Hb-Hp może być powodem istnienia jej specyficznego mechanizmu [20,21]. Ponadto nie jest jasne, czy wolna Hb może też być wychwytywana przez te komórki, chociaż względnie wysokie wartości Hb były włączane do hepatocytów [13,50].

Prawdopodobnie wiązanie Hb i/lub kompleksu Hb-Hp przez specyficzne receptory wątrobowe, nie tylko wpływa na los tych białek receptorowych, ale ma także znaczenie przy wewnątrzkomórkowym rozkładzie ich ligandów. Na poziomie komórki główną molekularną funkcją receptora dla hemoglobiny jest internalizacja i degradacja tej cząsteczki. Jednak na poziomie organizmu funkcja wątrobowego receptora dla Hb czy Hb-Hp nie została określona.

Podczas ostrej hemolizy wewnątrznacyniowej następuje rozległe przechodzenie Hb przez kłębuszki nerkowe i odkładanie jej w cewkach nerkowych. Molekularny mechanizm wychwytu Hb w cewce proksymalnej przebiega, jak ustalono, z udziałem endocytarnych receptorów megaliny i kubiliny [22]. Uważa się, w warunkach fizjologicznych za resorpcję Hb w cewce nerkowej odpowiedzialna jest megalina, która tworzy jeden z mechanizmów odzyskiwania endogenego żelaza. Natomiast w przebiegu zaburzeń hemolitycznych, podczas których do nerek dostaje się nadmiar wolnej Hb, megalina w kompleksie z kubiliną może tworzyć wysokopojemnościowy układ resorpcji zwrotnej hemoglobiny chroniąc nerki przed jej działaniem cytotoksycznym [8,22].

Ostatnio zidentyfikowano receptor uczestniczący w wychwycie kompleksów Hb-Hp, który jest identyczny z receptorem CD163, obecnym na powierzchni makrofagów śledziony, łożyska i wątroby oraz na monocytach świeżo wyizolowanych z krwi [12]. Rozpoznanie i endocytoza Hb i/lub kompleksów Hp-Hb przez receptor CD163/HbSR jest fizjologiczną funkcją przypisaną białku CD163/HbSR w grupie B receptorów zmiatających.

Receptor występujący w błonie komórkowej hepatocytów rozpoznający hemoglobinę i/lub jej kompleks z haptoglobiną został wykryty na początku lat siedem-

dziesiątych. Przez ponad trzy dekady, jakie minęły od tego czasu, nie dokonał się znaczący postęp w naszej wiedzy na temat budowy cząsteczki receptora w komórkach parenchymalnych wątroby.

Zadaniem niniejszej publikacji jest przedstawienie w sposób usystematyzowany wiedzy na temat struktury i funkcji receptorów CD163/HbSR dla Hb i jej kompleksu z Hp na powierzchni układu monocytarno-makrofagowego oraz kompleksu receptorów megaliny i kubiliny jako układu wychwytu hemoglobiny w cewkach proksymalnych nerek.

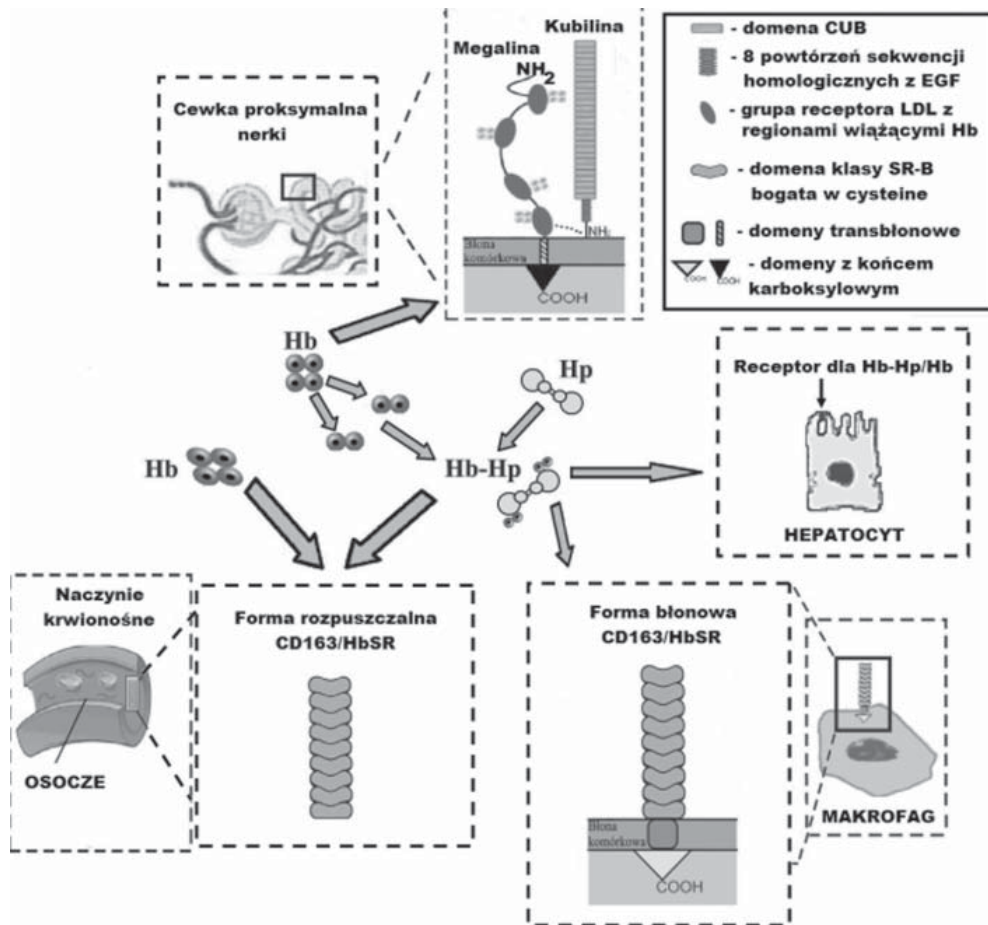
### **MAKROFAGOWY RECEPTOR CD163/HbSR DLA HEMOGLOBINY I JEJ KOMPLEKSU Z HAPTOGLOBINĄ**

Receptor zmiatający SR (ang. *scavenger receptor*) jest zaangażowany w endocytozę, fagocytozę martwych komórek, komórkową adhezję oraz w proces odkładania cholesterolu w ogniskach miażdżycowych [12,16]. Spośród co najmniej sześciu klas receptorów SR (od A–F) trzy klasy są najlepiej opisane: SR-A, SR-B i SR-C. Znane są trzy izoformy receptora SR-A: SR-AI, SR-AII i SR-AIII, które występują na powierzchni makrofagów wątroby, płuc, łożyska i blaszki miażdżycowej. Wszystkie trzy mają podobną strukturę złożoną z sześciu domen, przy czym różnice zaobserwowano w domenie C-końcowej, pozostałe pięć domen ma identyczną budowę [42]. W skład receptorów klasy B wchodzi receptory CD36 i SR-BI. CD36 jest receptorem fagocytującym i wiąże m.in. acetylowane i utlenione lipoproteiny o małej gęstości (LDL), fosfatydyloserynę i komórki apoptotyczne. SR-BI jest obecny na powierzchni wielu komórek, takich jak: monocyty krwi, makrofagi tkankowe, makrofagi w obszarze uszkodzenia miażdżycowego oraz na tkankach steroidogennych. Ligandami receptora SR-BI są natywne HDL (ang. *high density lipoprotein*), natywne i modyfikowane LDL, komórki apoptotyczne, późne produkty glikacji [49]. Receptor zmiatający SR-CI, opisany tylko u muszki owocowej *Drosophila*, wiąże acetylowane LDL i polianiony [42]. Bardziej szczegółowe informacje dotyczące samego receptora zmiatającego SR-BI przedstawiono w pracy przeglądowej [32].

### **STRUKTURA RECEPTORA CD163/HbSR**

Błonowe białko CD163 o masie 130 kDa należy do rodziny receptorów zmiatających klasy B grupy I (SR-BI). Wykazuje on ekspresję głównie na makrofagach tkankowych i monocytach krwi krążącej oraz na limfocytach T i B [12]. Składa się z dużego, zewnątrzkomórkowego regionu z dziewięcioma domenami klasy B bogatymi w cysteinę (SRCR 1-9), segmentu transbłonowego i krótkiej cytoplazmatycznej części zawierającej C-końiec (ryc. 1) [12,29].

Domena SRCR jest pierwotną zewnątrzkomórkową domeną zawierającą około 100 reszt aminokwasowych. Warianty klasy A i B zawierają jedynie nieznaczące



RYCINA 1. Schematyczne ujęcie losów hemoglobiny i jej receptorów w organizmie ludzkim: w zaburzeniach hemolitycznych zaangażowanie receptora CD163/HbSR makrofagów oraz kompleksu receptorów megalina-kubilina może służyć jako wysokowydajny mechanizm wychwytyjący nadmiar hemoglobiny (szczegółowy opis w tekście)

FIGURE 1. Schematic representation of cell-surface receptors and cells implicated in hemoglobin (Hb) binding and uptake. The involvement of CD163/HbSR and the megalin-cubilin complex serves as a high-capacity mechanism for Hb uptake in hemolytic disorders (for more detail, see text)

różnice związane z rozmieszczeniem cystein [17,29,37]. Domena klasy A ma sześć stałych reszt cysteinowych. Domeny kodowane przez dwa egzony, zostały odnalezione w szerokim zakresie gatunków od Metazoa do ssaków. Domena klasy B ma osiem cystein, połączonych mostkami wg wzoru 1-4, 2-7, 3-8 i 5-6. Cysteiny w pozycji 1 i 4 są nieobecne w domenach klasy A. Domeny klasy B kodowane przez jeden egzon stwierdzono jedynie u kręgowców [29,37]. Domena SRCR wykazuje bliską homologię z wieloma białkami błonowymi, np. CD5, WC1 i M160/CD163b, które zawierają odpowiednio 3, 11 i 12 zewnątrzkomórkowych domen klasy B. Domena bogata w cysteinę ma strukturę, którą można opisać jako sześciokrętną

$\beta$ -harmonijkę z widełkami  $\alpha$ -helisy. Pętla tworząca  $\beta$ -splot piąty i szósty jest miejscem interakcji receptora z ligandem [18,29,48].

Istnieją trzy główne izoformy receptora CD163/HbSR różniące się długością części cytoplazmatycznej. Opisano kilka różnych mRNA CD163, wszystkie pochodzące z alternatywnego łączenia się pojedynczego genu *CD163* [29,39]. Trzy z nich kodują białka CD163 z różnymi C-końcowymi cytoplazmatycznymi częściami: wariant CD163 z krótką częścią końcową, wskazany jako pośredniczący w endocytozie Hp-Hb i dwie jeszcze nie do końca scharakteryzowane formy (wariant 1 i 2 z długą częścią końcową) [12]. Cytoplazmatyczne części końcowe tych trzech izoform CD163 mają wspólny, 42-aminokwasowy region bliższy błony, podczas gdy długość i kolejność skrajnego, C-końcowego regionu są określone dla każdego wariantu. Region bliższy błony zawiera potencjalny motyw internalizujący typu YXX $\phi$  (gdzie  $\phi$  stanowi przestrzenną resztę hydrofobową) i umieszczony jest w dół od segmentu transbłonowego [12]. Region 42 reszt aminokwasowych zawiera najistotniejsze sekwencje dla procesu internalizacji i fosforylacji przy udziale białkowej kinazy C i kinazy kreatynowej [38]. Dwie pozostałe izoformy błonowe zbudowane z 84 i 89 reszt aminokwasowych mają dodatkowe miejsca fosforylacji, które są prawdopodobnie zaangażowane w transdukcję sygnału podczas odpowiedzi przeciwzapalnej [12,29,38].

## EKSPRESJA I REGULACJA RECEPTORA CD163/HbSR

Receptor CD163/HbSR jest antygenem różnicowania układu monocytarno-makrofagowego. Makrofagi tkankowe mają wyższą ekspresję receptora CD163/HbSR w porównaniu z monocytami, co wskazuje, że wzrost ekspresji receptora jest częścią dojrzewania monocytów do postaci fagocytujących makrofagów [40]. Ekspresja CD163/HbSR ma także miejsce na białaczkowych komórkach blastycznych i komórkach dendrytycznych wywodzących się z monocytów MoDC (ang. *monocyte-derived dendritic cells*) [5,24].

Poziom ekspresji receptora CD163/HbSR w hodowli monocytów jest regulowany przez czynniki ostrej fazy. Mediatory przeciwzapalne jak glikokortykoidy i interleukina (IL)-10 (lecz nie IL-4 czy IL-3) indukują ekspresję zarówno mRNA CD163, jak również białka receptorowego na powierzchni makrofagów, podczas gdy prozapalne cytokiny czynnik martwicy nowotworów TNF- $\alpha$  (ang. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ) lipopolisacharyd i interferon- $\gamma$ , tłumią ekspresję CD163/HbSR [4,33]. Ponadto, plejotropowe cytokiny IL-6 i TGF- $\beta$  (ang. *transforming growth factor  $\beta$* ), znane z wywierania efektów pro- i przeciwzapalnych, odpowiednio wzmagają i tłumią ekspresję powierzchniowego CD163/HbSR [26]. Badania sekwencji regionu promotorowego genu receptora CD163/HbSR (zlokalizowanego na chromosomie 12p13) wskazały kilka przypuszczalnych miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych związanych z różnicowaniem szpikowym, jak również potencjalne miejsca wiązania receptora glikokortykoidowego [4,34].



## RECEPTOR CD163/HbSR JAKO RECEPTOR USUWAJĄCY HEMOGLOBINĘ

Izolacja czystego białka receptorowego metodą chromatografii powinowactwa kompleksów Hb-Hp z użyciem rozpuszczonych błon cytoplazmatycznych pochodzących z tkanek bogatych w makrofagi (wątroby, śledziony i łożyska), umożliwiła określenie fizjologicznej roli receptora CD163/HbSR. Z kolei udział receptora CD163/HbSR w endocytozie kompleksów Hb-Hp zbadano wprowadzając cDNA CD163 do komórek jajników chomików chińskich [17,23].

Haptoglobina i receptor CD163/HbSR tworzą wydajny mechanizm kierujący wolną hemoglobinę z osocza do makrofagów, które zaangażowane są również w fagocytozę nieprawidłowych retikulocytów i starzejących się erytrocytów (erytro-fagocytoza). W warunkach fizjologicznych ok. 10 hemoglobiny jest usuwane w kompleksie z haptoglobiną i ok. 90 hemoglobiny w procesie erytrofagocytozy. W przypadku znacznie przyspieszonej hemolizy wewnątrznaczyniowej, jaką obserwujemy w przebiegu różnych chorób infekcyjnych, autoimmunizacyjnych czy dziedzicznych, usuwanie nadmiaru wolnej hemoglobiny przez receptor CD163/HbSR [41] prawdopodobnie wzrasta nawet kilkakrotnie [11]. Hemoglobina w kompleksie z haptoglobiną typu Hp2-2 i Hp 2-1 wykazuje większe powinowactwo do unieruchomionego receptora CD163/HbSR niż kompleks Hb-Hp1-1. Jest to spowodowane prawdopodobnie nagromadzeniem kilku miejsc wiążących w kompleksie ligandu („zjawisko premii z wielowartościowości”) [17,23]. Podobnie jak w przypadku CD163/HbSR zarówno ekspresja białka Hp (wszystkie fenotypy), jak i oksygenazy hemowej [45] jednego z podstawowych enzymów metabolizmu hemu jest regulowana przez czynnik ostrej fazy IL-6. W czasie stanów zapalnych ten system może być równolegle indukowany, wspomagając tym samym zdolność usuwania wolnej hemoglobiny [33,46].

## RECEPTOR CD163/HbSR JAKO CZĄSTECZKA PEŁNIĄCA FUNKCJE IMMUNOREGULACYJNE

Kontrola ekspresji receptora CD163/HbSR przez czynniki ostrej fazy może sugerować immunoregulacyjne funkcje tej cząsteczki [12]. Reakcje krzyżowe monoklonalnych przeciwciał anti-CD163 z receptorem CD163/HbSR na powierzchni makrofagów indukują wewnątrzkomórkowy sygnał i wydzielanie mediatorów stanu zapalnego IL-6 i czynnika wzrostu kolonii granulocytów i makrofagów GM-CSF (ang. *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) [44]. Na szlaku tych przemian występuje fosforylacja cytoplazmatycznego fragmentu receptora CD163/HbSR, produkcja trifosforanu inozytoli i powolna mobilizacja wapnia. Uważa się, że reakcje krzyżowe przeciwciał z receptorem CD163/HbSR naśladują reakcję przyłączania ligandu do receptora, która prowadzi do usieciowania receptora [17,38]. Z tego powodu przyłączanie kompleksu Hb-Hp 2-2 prowadzi do usieciowania CD163/HbSR w większym stopniu niż przyłączanie Hb-Hp 1-1. Jeżeli to zróżnicowanie

usieciowania znajduje odbicie w wywoływanej reakcji, można nim wyjaśnić niektóre z opisanych fizjologicznych konsekwencji polimorfizmu haptoglobiny i przewagę poszczególnych wariantów Hp w różnych chorobach zakaźnych i stanach zapalnych [2,35].

### **FORMA ROZPUSZCZALNA RECEPTORA CD163/HbSR**

W wyniku badań przeprowadzonych *in vitro* na komórkach oraz wykrycia immunoaktywności receptora CD163/HbSR w osoczu, zaobserwowano obecność rozpuszczalnej formy tego receptora sCD163/HbSR, którego masa cząsteczkowa jest mniejsza niż formy błonowej [42]. Zewnątrzkomórkowy region, odcinany blisko segmentu transbłonowego formy błonowej CD163/HbSR (ryc. 1), cechuje wszystkie odmiany rozpuszczalnej formy receptora sCD163/HbSR, będące efektem rekombinacji domen zewnątrzkomórkowych (SRCR 1-9) [12,26].

Stężenie sCD163/HbSR ( $1-3 \text{ mg/dm}^3$ ) w osoczu odzwierciedla całkowitą pulę formy błonowej receptora CD163/HbSR, która może wzrastać podczas proliferacji komórek pochodzenia mielomonocytnego lub w wyniku zwiększonej ekspresji komórkowej CD163/HbSR przez indukcję czynnikami ostrej fazy [10,28].

Szersze informacje dotyczące formy rozpuszczalnej receptora CD163/HbSR zostały zamieszczone w części II cyklu pt.: „Receptory dla hemoglobiny: receptor zmiatający dla hemoglobiny jako składnik wrodzonej odpowiedzi immunologicznej na infekcję.”

### **MEGALINA I KUBILINA – RECEPTORY BIORĄCE UDZIAŁ W ENDOCYTOZIE HEMOGLOBINY**

Megalina i kubilina różnią się pod względem budowy. Megalina jest dużą, pojedynczą i skręconą spiralnie glikoproteiną transbłonową. Natomiast kubilina jest glikoproteiną związaną zewnętrznie z błoną komórkową i wykazuje niewielką homologię z innymi receptorami pośredniczącymi w endocytozie. Jednakże zarówno megalina, jak i kubilina mogą wiązać różne ligandy i oddziaływać razem tworząc kompleks dwóch receptorów.

Megalina jest komórkowym receptorem powierzchniowym typu I o m. cz. 600 kDa. Receptor ma długą, zewnątrzkomórkową domenę N-końcową, pojedynczą domenę transbłonową i krótką C-końcową domenę wewnątrzkomórkową (ryc. 1). Ponadto N-koniec zawiera sekwencję złożoną z 25 reszt aminokwasowych, która stanowi prawdopodobnie peptydową sekwencję sygnałową (peptyd sygnałowy). Sekwencję DNA kodującą megalinę zidentyfikowano u szczura i u człowieka. Megalina należy do rodziny receptorów LDL i ma wiele cech wspólnych z innymi receptorami tej rodziny, tj. receptorem LDL, receptorem lipoprotein o bardzo niskiej gęstości (VLDL), białkiem zbliżonym do receptora LDL i receptorem apolipoproteiny E typ 2 (ApoER2). Domeny zewnątrzkomórkowe receptorów rodziny LDL charakteryzuje duże podobieństwo. Megalina zawiera 4 powtórzenia bogate w cysteinę,

homologiczne ze składnikiem dopełniacza C9, które stanowią miejsca wiązania ligandów. Są one oddzielone przez 17 powtórzeń bogatych w cysteinę, homologicznych z naskórkowym czynnikiem wzrostu EGF (ang. *epidermal growth factor*) oraz 8 powtórzeń ubogich w cysteinę. Cytoplazmatyczne sekwencje reszt aminokwasowych receptorów rodziny LDL cechuje małe podobieństwo. Wyjątek stanowi jedna lub więcej sekwencji NPXY, która stymuluje gromadzenie receptorów w opłaszczonych dołkach. Megalina zawiera dwie sekwencje NPXY i podobną sekwencję VENQNY, która prawdopodobnie uczestniczy w transdukcji sygnału [25]. Megalina jest receptorem biorącym udział w endocytozie takich ligandów, jak: apolipoproteina E, lipaza lipoproteinowa, laktoferyna, aprotynina i hemoglobina. Miejsce wiązania ligandu stanowi obszar między 1111–1210 resztą aminokwasową. Oprócz wiązania białek megalina wykazuje zdolność wiązania  $Ca^{2+}$  [7,30].

Kubilina jest zewnątrzkomórkową glikoproteiną błonową, o m. cz. 460 kDa. Sekwencje DNA kubiliny opisano u szczura, psa i u człowieka. Kubiliny szczura i człowieka są identyczne w 69%, podczas gdy kubilina psa wykazuje podobieństwo z kubiliną ludzką w 83% i z kubiliną szczura w 70%. Za N-końcem kubiliny zbudowanym ze 110 reszt aminokwasowych, znajduje się 8 powtórzeń sekwencji homologicznych z EGF oraz 27 domen CUB (podjednostki dopełniacza C1r/C1s), od których wywodzi się nazwa kubiliny (ang. *cubilin*) (ryc. 1). Kubilina nie ma odcinka transbłonowego i nie zawiera cząsteczki glikozylofosfatydyloinozytolu, który wiąże kowalencyjnie receptor z powierzchnią błony. Za zakotwiczenie kubiliny w błonie komórkowej i tworzenie jej trimerów odpowiada obszar N-końcowy białka o właściwościach amfipatycznych. Ponadto N-koniec kubiliny zawiera resztę cysteinową, stanowiącą prawdopodobnie miejsce przyłączenia kwasu palmitynowego. Główną część kubiliny stanowi 27 domen CUB, z których każda zbudowana jest z 110 reszt aminokwasowych. Domeny CUB mogą łączyć się w dimery, w których charakterystyczne struktury  $\beta$ -harmonijki przebiegają naprzeciwległe [22,27,47]. Kubilina ma zdolność wiązania różnych ligandów: hemoglobiny, kompleksu czynnik wewnętrzny – kobalamina (IF-B12), białka RAP, albuminy, łańcucha lekkiego immunoglobulin, transferyny, białka wiążącego witaminę D, apoliproteiny A, megaliny i wapnia. Kompleks IF-B12 i albumina przyłączają się do 113 reszty aminokwasowej na N-końcu kubiliny, który zawiera powtórzenia homologiczne z EGF oraz domeny CUB 6-8. Pomimo, że kompleks IF-B12 hamuje wiązanie albuminy do kubiliny, to miejsca wiązania dla obu tych białek nie są identyczne. Białko RAP wiąże się z domenami CUB 13-14. Natomiast sama megalina przyłącza się do N-końca kubiliny, zawierającego domeny CUB 1 i 2 [9,27].

Ekspresję megaliny i kubiliny wykazano w komórkach nabłonka jelita cienkiego, cewek proksymalnych nerek oraz w cytotrofoblastie łożyska [9]. W życiu płodowym obecność megaliny wykazano w komórkach trofoektodermi czterodniowych embrionów szczurzych [9]. Natomiast kubilina pojawia się w komórkach endodermi sześciodniowych embrionów i pozostaje tam razem z megaliną. Megalina została zlokalizowana w opłaszczonych dołkach komórek nabłonka nerwowego, który pokrywa jamę owodni, a następnie cewę nerwową. W trakcie rozwoju nerek megalina jest wyrażona w cewkach śródnercza i we wczesnych pęcherzykach nerkowych, podczas gdy kubilina



jest wykrywana najpierw w komórkach stanowiących wczesną fazę rozwoju cewek i kłębuszków nerkowych [7,9]. W późniejszym etapie ekspresja kubiliny zostaje ograniczona do komórek kłębuszków nerkowych i cewek proksymalnych, które stanowią główne miejsca jego ekspresji w dorosłej nerce. Razem megalina i kubilina występują w opłaszczonych dołkach, pęcherzykach endocytarnych oraz w lizosomach komórek cewek proksymalnych [7,9].

Badania błon rąbka szczoteczki wykazały, że megalina i kubilina są zaangażowane w wychwyt hemoglobiny w cewce proksymalnej (ryc. 1), a wiązanie Hb do receptorów odbywa się w sposób zależny od wapnia [8,15]. W hodowli linii komórek BN-16 pochodzących z nabłonka pęcherzyka żółtkowego, w których ekspresja obu receptorów jest porównywalna z ekspresją ich w cewce proksymalnej *in vivo*, wykazano interakcje kompleksu megaliny i kubiliny z komórkowym wychwytem hemoglobiny [14]. Nerkowy wychwyt hemoglobiny zademonstrowano także powtarzając badania na różnych modelach hemoglobinurii. W warunkach fizjologicznych wychwyt hemoglobiny, za który odpowiedzialna jest megalina, prawdopodobnie jest jednym z mechanizmów odzyskiwania endogennego żelaza [8,13,14]. Wolna hemoglobina może być wykorzystana jako źródło żelaza przez bakterie chorobotwórcze wywołujące infekcje dolnych dróg moczowych (*Neisseria gonorrhoe* i *Gardnerella vaginalis*) [6,8,19,36]. Znaczne wycofanie hemoglobiny z przesączu moczu pierwotnego prawdopodobnie chroni dolne drogi moczowe przed wtargnięciem bakterii, ponieważ niedobór żelaza jest czynnikiem ograniczającym ich wzrost i patogenność [36]. W warunkach fizjologicznych obecność samej megaliny jest wystarczająca do usuwania niewielkiej ilości wolnej hemoglobiny. Rola kubiliny w tym procesie jest ograniczona przez jej niskie powinowactwo do hemoglobiny [14]. Uważa się, że w zaburzeniach hemolitycznych, kiedy stężenie wolnej hemoglobiny jest wysokie, udział kompleksu megalina-kubilina mógłby służyć jako wysoko wydajny mechanizm wychytujący nadmiar hemoglobiny.

Niezależnym czynnikiem progresji niewydolności nerek jest białkomocz. Wynikiem bezpośredniego działania toksycznego niektórych wchłoniętych białek, wskutek nasilonej endocytozy w komórkach nabłonka cewek nerkowych (generacja wolnych rodników, indukcja czynników zapalnych i mitogennych), jest uszkodzenie cewek nerkowych i rozwój niewydolności nerek [8]. W przypadku przeładowania albuminą dochodzi do zmniejszenia ekspresji megaliny, spadku aktywności błonowej kinazy białkowej B i fosforylacji białka Bad, co prowadzi do indukcji apoptozy w komórkach proksymalnych nerki [1]. Wykazano związek między procesami apoptozy a inwazją miofibroblastów zaangażowanych w rozwój bliznowacenia nerek [1]. Ogniwem wiążącym wydaje się TGF- $\beta$ , który może powodować aktywację procesów apoptozy wewnątrz komórek nabłonka cewek nerkowych, prowadzić do przyciągania śródmiąższowych fibroblastów i przekształcania ich w miofibroblasty.

Na podstawie badań mechanizmu resorpcji zwrotnej niektórych białek (albuminy i transferyny) można przez analogię sugerować rolę efektywnego wychwytu hemoglobiny w cewkach proksymalnych nerek w rozwoju nefropatii cewkowo-śródmiąższowych.

## PODSUMOWANIE

Odkrycie zaangażowania kompleksu receptorów megaliny i kubiliny, jako wysokopojemnościowego układu wychwyty hemoglobiny w cewkach proksymalnych nerek, może mieć znaczenie dla rozwoju nowych środków terapeutycznych, blokujących przechodzenie hemoglobiny do komórek cewek nerkowych i chroniących je przed cytotoksycznością hemoglobiny

Funkcja receptora zmiatającego dla hemoglobiny i/lub jej kompleksu z haptoglobina (CD163/HbSR) jako receptora prezentowanego wybiórczo na makrofagach może zostać wykorzystana w celu wprowadzania makrocząsteczek (np. DNA, leków), w postaci związanej z kompleksem Hb-Hp, do makrofagów. Precyzyjne wprowadzanie leków do makrofagów mogłoby być stosowane w chorobach zakaźnych, w których makrofagi są komórkami docelowymi dla drobnoustrojów, np. podczas wczesnej fazy infekcji HIV (ang. *human immunodeficiency virus* – ludzki wirus niedoboru odporności). Ostatnio doniesiono o wykorzystaniu receptorów CD163/HbSR jako wrót umożliwiających wprowadzenie do makrofagów hemoglobiny sprzężonej z ribawiryną i przeniesienie jej za pośrednictwem makrofagów w region uszkodzenia wątroby [3].

W końcu, indukowanie sygnału i właściwości immunoregulacyjne receptora CD163/HbSR stanowią także interesujący aspekt do wykorzystania w leczeniu przeciwzapalnym.

## LITERATURA

- [1] ABBATE M, ZOJA C, REMUZZI G. How does proteinuria cause progressive renal damage? *J Am Soc Nephrol* 2006; **17**: 2974–2984.
- [2] ASLEH R, MARSH S, SHILKRUT M, BINAH O, GUETTA J, LEJBKOWICZ F, ENAV B, SHEHADEH N, KANTER Y, LACHE O, COHEN O, LEVY NS, LEVY AP. Genetically determined heterogeneity in haemoglobin scavenging and susceptibility to diabetic cardiovascular disease. *Circ Res* 1999; **92**: 1193–200.
- [3] BROOKES S, BIESSELS P, NG NF, WOODS C, BELL DN, ADAMSON G. Synthesis and characterization of a hemoglobin-ribavirin conjugate for targeted drug delivery. *Bioconjug Chem* 2006; **17**: 530–537.
- [4] BUECHLER C, RITTER M, ORSÓ E, LANGMANN T, KLUCKEN J, SCHMITZ G. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J Leukoc Biol* 2000; **67**: 97–103.
- [5] CHAMORRO S, REVILLA C, GÓMEZ N, ALVAREZ B, ALONSO F, EZQUERRA A, DOMÍNGUEZ J. *In vitro* differentiation of porcine blood CD163- and CD163+ monocytes into functional dendritic cells. *Immunobiology* 2004; **209**: 57–65.
- [6] CHEN CJ, SPARLING PF, LEWIS LA, DYER DW, ELKINS C. Identification and purification of a hemoglobin-binding outer membrane protein from *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* 1996; **64**: 5008–5014.
- [7] CHRISTENSEN EI, BIRN H. Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; **280**: F562–573.
- [8] CHRISTENSEN EI, GBUREK J. Protein reabsorption in renal proximal tubule-function and dysfunction in kidney pathophysiology. *Pediatr Nephrol* 2004; **19**: 714–721.
- [9] CHRISTENSEN EI, NIELSEN R. Role of megalin and cubilin in renal physiology and pathophysiology. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2007; **158**: 1–22.
- [10] DAVIS BH, ZAREV PV. Human monocyte CD163 expression inversely correlates with soluble CD163 plasma levels. *Cytometry B Clin Cytom* 2005; **63**: 16–22.
- [11] DEISS A. Destruction of erythrocytes. W: Lee RG, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM. (red.) *Wintrobe's Clinical Hematology*. Baltimore: Williams and Wilkins 1999: 267–299.

- [12] FABRIEK BO, DIJKSTRA CD, VAN DEN BERG TK. The macrophage scavenger receptor CD163. *Immunobiology* 2005; **210**: 153–160.
- [13] FAGOONEE S, GBUREK J, HIRSCH E, MARRO S, MOESTRUP SK, LAURBERG JM, CHRISTENSEN EI, SILENGO L, ALTRUDA F, TOLOSANO E. Plasma protein haptoglobin modulates renal iron loading. *Am J Pathol* 2005; **166**: 973–983.
- [14] GBUREK J, VERRONST PJ, WILLNOW TE, FYFE JC, NOWACKI W, JACOBSEN C, MOESTRUP SK, CHRISTENSEN EI. Megalin and cubilin are endocytic receptors involved in renal clearance of hemoglobin. *J Am Soc Nephrol* 2002; **13**: 423–430.
- [15] GBUREK J, ZABEL M, OSADA J. Immunohistochemical localization of haemoglobin binding sites in the distal tubule of the rat kidney. *Histochem J* 1998; **30**: 621–624.
- [16] GORDON S. Homeostasis: a scavenger receptor for haemoglobin. *Curr Biol* 2001; **11**: R399–401.
- [17] GRAVERSEN JH, MADSEN M, MOESTRUP SK. CD163: a signal receptor scavenging haptoglobin-hemoglobin complexes from plasma. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; **34**: 309–314.
- [18] HOHENESTER E, SASAKI T, TIMPL R. Crystal structure of a scavenger receptor cysteine-rich domain sheds light on an ancient superfamily. *Nat Struct Biol* 1999; **6**: 228–232.
- [19] JAROSIK GP. Identification of a *Gardnerella vaginalis* hemoglobin-binding protein. *Curr Microbiol* 2001; **42**: 49–52.
- [20] KINO K, MIZUMOTO K, WATANABE J, TSUNOO H. Immunohistochemical studies on hemoglobin-haptoglobin and hemoglobin catabolism sites. *J Histochem Cytochem* 1987; **35**: 381–386.
- [21] KINO K, TSUNOO H, HIGA Y, TAKAMI M, NAKAJIMA H. Kinetic aspects of hemoglobin-haptoglobin-receptor interaction in rat liver plasma membranes, isolated liver cells, and liver cells in primary culture. *J Biol Chem* 1982; **257**: 4828–4833.
- [22] KOZYRAKI R, GOFFLOT F. Multiligand endocytosis and congenital defects: roles of cubilin, megalin and amnionless. *Curr Pharm Des* 2007; **13**: 3038–3046.
- [23] KRISTIANSEN M, GRAVERSEN JH, JACOBSEN C, SONNE O, HOFFMAN HJ, LAW SK, MOESTRUP SK. Identification of the hemoglobin scavenger receptor. *Nature* 2001; **409**: 198–201.
- [24] MANIECKI MB, MOLLER HJ, MOESTRUP SK, MOLLER BK. CD163 positive subsets of blood dendritic cells: the scavenging macrophage receptors CD163 and CD91 are coexpressed on human dendritic cells and monocytes. *Immunobiology* 2006; **211**: 407–417.
- [25] MAY P, HERZ J, BOCK HH. Molecular mechanisms of lipoprotein receptor signalling. *Cell Mol Life Sci* 2005; **62**: 2325–2338.
- [26] MOESTRUP SK, MOLLER HJ. CD163: a regulated haemoglobin scavenger receptor with a role in the anti-inflammatory response. *Ann Med* 2004; **36**: 347–354.
- [27] MOESTRUP SK, VERRONST PJ. Megalin- and cubilin-mediated endocytosis of protein-bound vitamins, lipids, and hormones in polarized epithelia. *Annu Rev Nutr* 2001; **21**: 407–428.
- [28] MOLLER HJ, PETERSLUND NA, GRAVERSEN JH, MOESTRUP SK. Identification of the hemoglobin scavenger receptor/CD163 as a natural soluble protein in plasma. *Blood* 2002; **99**: 378–380.
- [29] NIELSEN MJ, MADSEN M, MOLLER HJ, MOESTRUP SK. The macrophage scavenger receptor CD163: endocytic properties of cytoplasmic tail variants. *J Leukocyte Biol* 2006; **79**: 837–845.
- [30] ORLANDO RA, EXNER M, CZEKAY RP, YAMAZAKI H, SAITO A, ULLRICH R, KERJASCHKI D, FARQUHAR MG. Identification of the second cluster of ligand-binding repeats in megalin as a site for receptor-ligand interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 2368–2373.
- [31] OSHIRO S, YAJIMA Y, KAWAMURA K, KUBOTA M, YOKOFUJITA J, NISHIBE Y, TAKAHAMA M, NAKAJIMA H. Catabolism of hemoglobin-haptoglobin complex in microsome subfractions. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1992; **40**: 1847–1851.
- [32] PANCER Z. Scavenger receptor BI: a scavenger receptor with a mission to transport high density lipoprotein lipids. *Curr Opin Lipidol* 2004; **15**: 287–295.
- [33] PHILIPPIDIS P, MASON JC, EVANS BJ, NADRA I, TAYLOR KM, HASKARD DO, LANDIS RC. Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: anti-inflammatory monocyte-macrophage responses *in vitro*, in resolving skin blisters *in vivo*, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circ Res* 2004; **94**: 119–126.
- [34] POLFLIET MM, FABRIEK BO, DANIËLS WP, DIJKSTRA CD, VAN DEN BERG TK. The rat macrophage scavenger receptor CD163: expression, regulation and role in inflammatory mediator production. *Immunobiology* 2006; **211**: 419–425.
- [35] QUAYE IK. Haptoglobin, inflammation and disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008; **102**: 735–742.
- [36] RATLEDGE C. Iron metabolism and infection. *Food Nutr Bull* 2007; **28**: S515–523.

- [37] RESNICK D, PEARSON A, KRIEGER M. The SRCR superfamily: a family reminiscent of the Ig superfamily. *Trends Biochem Sci* 1994; **19**: 5–8.
- [38] RITTER M, BUECHLER C, KAPINSKY M, SCHMITZ G. Interaction of CD163 with the regulatory subunit of casein kinase II (CKII) and dependence of CD163 signaling on CKII and protein kinase C. *Eur J Immunol* 2001; **31**: 999–1009.
- [39] RITTER M, BUECHLER C, LANGMANN T, SCHMITZ G. Genomic organization and chromosomal localization of the human CD163 (M130) gene: a member of the scavenger receptor cysteine-rich superfamily. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **260**: 466–474.
- [40] SANCHEZ C, DOMENECH N, VAZQUEZ J, ALONSO F, EZQUERRA A, DOMINGUEZA. The porcine 2A10 antigen is homologous to human CD163 and related to macrophage differentiation. *J Immunol* 1999; **162**: 5230–5237.
- [41] SCHAER DJ, SCHAER CA, BUEHLER PW, BOYKINS RA, SCHOEDON G, ALAYASHAI, SCHAFFNER A. CD163 is the macrophage scavenger receptor for native and chemically modified hemoglobins in the absence of haptoglobin. *Blood* 2006; **107**: 373–380.
- [42] TIWARI RL, SINGH V, BARTH WAL MK. Macrophages: an elusive yet emerging therapeutic target of atherosclerosis. *Med Res Rev* 2008; **28**: 483–544.
- [43] SULAHIAN TH, HINTZ KA, WARDWELL K, GUYRE PM Development of an ELISA to measure soluble CD163 in biological fluids. *J Immunol Methods* 2001; **252**: 25–31.
- [44] VAN DEN HEUVEL MM, TENSEN CP, VAN AS JH, VAN DEN BERG TK, FLUITSMA DM, DIJKSTRA CD, DOPPE EA, DROSTE A, VAN GAALLEN FA, SORG C, HOGGER P, BEELEN RH. Regulation of CD 163 on human macrophages: cross-linking of CD163 induces signaling and activation. *J Leukoc Biol* 1999; **66**: 858–866.
- [45] WAGENER FA, VAN BEURDEN HE, VON DEN HOFF JW, ADEMA GJ, FIGDOR CG. The heme-heme oxygenase system: a molecular switch in wound healing. *Blood* 2003; **102**: 521–528.
- [46] YAMAZAKI H, OHTA K, TSUKIJI H, TOMA T, HASHIDA Y, ISHIZAKI A, SAITO T, ARAI S, KOIZUMI S, YACHIE A. Corticosteroid enhances heme oxygenase-1 production by circulating monocytes by up-regulating hemoglobin scavenger receptor and amplifying the receptor-mediated uptake of hemoglobin-haptoglobin complex. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **358**: 506–512.
- [47] YAMMANI RR, SEETHARAM S, SEETHARAM B. Identification and characterization of two distinct ligand binding regions of cubilin. *J Biol Chem* 2001; **276**: 44777–44784.
- [48] ZUWAŁA-JAGIEŁŁO J. Haemoglobin scavenger receptor: function in relation to disease. *Acta Biochim Pol* 2006; **53**: 257–268.
- [49] ZUWAŁA-JAGIEŁŁO J. Rola kaweoli śródbłonna w endocytozie późnych produktów glikacji. *Post Biochem* 2004; **50**: 272–281.
- [50] ZUWAŁA-JAGIEŁŁO J, OSADA J. Internalization study using EDTA-prepared hepatocytes for receptor-mediated endocytosis of haemoglobin-haptoglobin complex. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; **30**: 923–931.

*Redaktor prowadzący – Maciej Zabel*

*Otrzymano: 01.04. 2009 r.*

*Przyjęto: 01.06. 2009 r.*

*Katedra Biochemii Farmaceutycznej, AM*

*50-139 Wrocław ul. Szewska 38/39*

*e-mail: jolanta@biochfarm.am.wroc.pl*