

Received: 2006.03.24
Accepted: 2006.06.28
Published: 2006.07.24

PEDF – endogenny czynnik o silnym działaniu neuroprotektynym, neurotroficznym i antyangiogenym*

PEDF: an endogenous factor displaying potent neuroprotective, neurotrophic, and antiangiogenic activity

Katarzyna Marciniak, Agnieszka Butwicka, Jerzy Z. Nowak

Zakład Farmakologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Streszczenie

PEDF – czynnik pochodzący z nabłonka barwnikowego siatkówki (pigment epithelium derived factor) został odkryty w 1989 r. w hodowli komórek retinoblastoma Y-79, prowadzonej w środowisku z dodatkiem medium, w którym wcześniej hodowano komórki nabłonka barwnikowego siatkówki. Odkrycie to przyczyniło się do rozpoczęcia szeroko zakrojonych badań, których celem było poznanie właściwości tego intrygującego czynnika. Jego obecność wykazano nie tylko w tkankach oka, ale także w wielu innych narządach (wątroba, płuca, nerki), zarówno w okresie płodowym, jak i postnatalnym oraz w wielu strukturach ośrodkowego układu nerwowego. Synteza i sekrecja PEDF są bardziej nasilone w komórkach młodych i ulegają zmniejszeniu wraz z ich starzeniem. Nadal trwają poszukiwania receptora swoistego dla PEDF, przez który wywiera on swoje działania neurotroficzne, neuroprotektynne i antyangiogenne. PEDF jest endogennym regulatorem wielu procesów fizjologicznych i patologicznych. Stymuluje różnicowanie ludzkich komórek retinoblastoma do fenotypu neuronalnego, wzmacnia rozwój i przeżycie fotorceptorów siatkówki oraz neuronów ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego. Chroni również niedojrzałe neurony przed apoptozą. Jako jeden z najsilniejszych inhibitorów angiogenezy działa antagonistycznie na czynnik wzrostu śródbłonki naczyń (VEGF) i hamuje tworzenie nowych naczyń. PEDF lub jego aktywny fragment, mogą wkrótce zostać wykorzystane w celach terapeutycznych wielu chorób neurologicznych, okulistycznych i onkologicznych.

Słowa kluczowe:

PEDF • czynnik pochodzący z nabłonka barwnikowego • neuroprotekcja • działanie neurotroficzne • działanie antyangiogenne • potencjał terapeutyczny

Summary

PEDF (pigment epithelium-derived factor) was first purified in 1989 from the conditioned medium of human retinal pigment epithelial cells as a factor with potent differentiating activity in human retinoblastoma cells. This discovery triggered intensive research directed at elucidating the biological activity of this new factor. The presence of PEDF was confirmed in several structures of the eye and other organs (i.e. liver, lung, kidney) in both prenatal and postnatal life, and in almost all parts of the central nervous system. The synthesis and secretion of PEDF is more effective in young cells and decreases during their aging. Although many findings suggest a receptor nature of PEDF action, the receptor responsible for its neuroprotective, neurotrophic, and antiangiogenic effect still remains to be identified. PEDF is capable of regulating many phy-

* Praca finansowana przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi (grant 502-11-245; 503-123-1).

biological processes; for example, it stimulates the differentiation of human retinoblastoma cells to neurons and increases the growth and survival of photoreceptor cells of the retina and neurons of the central and peripheral nervous system. Furthermore, this factor also protects immature neuron cells from apoptosis. PEDF, probably the most potent endogenous inhibitor of angiogenesis, behaves as a functional antagonist of vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits neovascularization. Endowed with neuroprotective, neurotrophic, and antiangiogenic potential, PEDF itself, or its biologically active fragment, is currently considered an agent of great interest in the future therapy of an array of neurological, ophthalmological, and oncological disorders.

Key words: PEDF • pigment epithelium derived factor • neuroprotection • neurotrophic effect • antiangiogenic effect • therapeutic potential

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_60/9519.pdf

Word count: 3729

Tables: 2

Figures: 2

References: 72

Adres autora: prof. dr hab. n.med. Jerzy Z. Nowak, Zakład Farmakologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, ul. Żeligowskiego 7/9, 90-752 Łódź; e-mail: jznnowak@pharm.am.lodz.pl

Wykaz skrótów: **PEDF** – czynnik pochodzący z nabłonka barwnikowego siatkówki (pigment epithelium derived factor); **RPE** – nabłonek barwnikowy siatkówki (retina pigment epithelium); **VEGF** – czynnik wzrostu śródbłonka naczyń (vascular endothelial growth factor); **VEGFR1** – receptor czynnika wzrostu śródbłonka naczyń (vascular endothelial growth factor receptor 1); **AMD** – zwyrodnienie plamki związane z wiekiem (age-related macular degeneration).

ODKRYCIE PEDF

Czynnik pochodzący z nabłonka barwnikowego siatkówki (PEDF – pigment epithelium-derived factor) został po raz pierwszy zidentyfikowany w 1989 r. przez grupę G.J. Chadera i wsp. W hodowli komórek retinoblastoma Y-79, prowadzonej w środowisku z dodatkiem medium, w którym wcześniej hodowano komórki nabłonka barwnikowego siatkówki (RPE – retina pigment epithelium), zaobserwowano różnicowanie się tych komórek w kierunku neuronów. Wykazano także wzrost syntezy markerów charakterystycznych dla dojrzałych neuronów, takich jak enolaza swoista dla neuronów, czy białko neurofilamentowe o masie 200 kDa. Natomiast dodanie do tej hodowli samych komórek RPE nie wywierało żadnego istotnego efektu, co zasugerowało, iż to właśnie czynnik obecny w płynie powodował intensywne różnicowanie komórek Y-79 w komórki przypominające – zarówno pod względem strukturalnym, jak i biochemicznym – dojrzałe neurony. Czynnikiem tym okazało się białko o masie 50 kDa, nazwane później PEDF [56,61,62].

W toku dalszych badań wykazano, że struktura PEDF jest identyczna ze strukturą czynnika EPC-1 (early population doubling level cDNA-1), którego ekspresję badano w fibroblastach pochodzących z tkanki płucnej embrionów ludzkich (WI-38) i z ludzkiego endometrium [50].

Jednocześnie największą ekspresję EPC-1/PEDF zaobserwowano w komórkach młodych, a w miarę ich starzenia się ulegała ona obniżaniu. Taka zależność może mieć szczególne znaczenie w procesach, których aktywacja zależy od określonego okresu rozwoju embrionalnego lub od zaistnienia szczególnych warunków fizjologicznych lub patologicznych.

STRUKTURA GENU PEDF

Ludzki gen PEDF położony jest na krótkim ramieniu chromosomu 17 (17p13.3), ma nieciągłą strukturę i składa się z 8 eksonów i 7 intronów [4,23,64]. Położony jest też blisko genu rekoweryny (17p13.1), tj. białka uczestniczącego w procesie wzbudzania wzrokowego, oraz w pobliżu *locus retinitis pigmentosa* – *RP13*, a także genów m.in. medulloblastoma, dziedzicznego zwyrodnienia siatkówki, czy raka jajnika [23,24,25]. Przypuszcza się, że zaburzenia w strukturze regionu 17p13, obejmujące również gen PEDF, mogą prowokować wystąpienie wymienionych wyżej chorób.

Wśród ssaków uwagę zwraca silna konserwatywność sekwencji kodujących tego genu. Szczególnie dużą homologię do ludzkiego genu PEDF wykazują geny myszy i kury, które również są zbudowane z analogicznej liczby intronów i eksonów [54]. Gen tego czynnika został także zidentyfikowany u ptaków, ryb i płazów [4,63].

STRUKTURA I WYSTĘPOWANIE PEDF

PEDF jest białkiem o masie cząsteczkowej 46,3 kDa. Zawiera miejsca fosforylacji oraz glikozylacji łańcucha, przez co jego masa cząsteczkowa może wynosić około 50 kDa [56]. Ludzki czynnik jest zbudowany z 418 reszt aminokwasowych. Wykazano, że struktura PEDF u myszy i wołu jest bardzo zbliżona do tej stwierdzonej u ludzi. W strukturze cząsteczek czynnika wykrytych u tych ssaków, zidentyfikowano odpowiednio 417 i 416 aminokwasów, co odpowiada w 85-89% polipeptydowi ludzkiemu [51,54].

W cząsteczce PEDF występują sekwencje aminokwasów, które są odpowiedzialne za pewne funkcje, wykazywane przez ten czynnik. Wyróżnione zostały: rejon swoisty dla gatunku (Asn21-Val38), rejon zawierający domenę aktywności neurotroficznej (Leu78-Lys121), miejsce N-glikozylacji (Asn283-Leu-Tyr) oraz rejon korespondujący z domeną „serpinową” (Leu382-do końca) [43].

PEDF ma strukturalną i sekwencyjną homologię z większością członków nadrodziny inhibitorów proteaz serynowych, określanej mianem „serpin” (serine protease inhibitors) [15,31,46,69]. Peptyd ten wykazuje 27% homologii aminokwasów z modelowym członkiem serpin – α 1-antytropsyną. Inne peptydy, będące przedstawicielami tej rodziny mają także zbliżoną do PEDF strukturę trzeciorzędową, np. inhibitor ludzkiej α 2-plazminy (26% homologii) i ludzka α 1-antychymotrypsyna (43% homologii). Taki stopień podobieństwa jest charakterystyczny również dla innych członków tej rodziny (np. inhibitor α 2-plazminy wykazuje 23–26% homologii w stosunku do innych inhibitorów proteaz serynowych) [53]. Większość członków nadrodziny serpin wykazuje właściwości hamujące wobec proteaz serynowych, tj. ludzkiej trypsyny, czy też chymotrypsyny [5,15,40]. Mimo homologicznej budowy PEDF nie ma potencjału antyproteazowego. W cząsteczce PEDF wykazano obecność charakterystycznej dla serpin reaktywnej pętli (RCL – reactive center loop) o giętkiej strukturze, dzięki której pośredniczy w procesach hamowania aktywności enzymów proteolitycznych [56]. Pętla ta zawiera 17 aminokwasów, z wysocę konserwatywną glicyną w pozycji 15. W przeciwieństwie jednak do pętli typowych przedstawicieli serpin, RCL w PEDF różni się strukturą aminokwa-

sów w rejonie odpowiedzialnym za właściwości hamujące, m.in. zawiera dodatkowe reszty proliny, co prawdopodobnie przeszkadza w interakcji z proteazami i wywieraniu działania hamującego ich aktywność [68].

PEDF został odkryty jako czynnik charakterystyczny dla nabłonka barwnikowego siatkówki (RPE) [49,61]. Jednak wiele tkanek ludzkich i zwierzęcych jest zdolnych do jego syntezy. U człowieka czynnik ten został wyizolowany z wątroby, płuc, serca, nerek zarówno w okresie płodowym, jak i postnatalnym. U dorosłych jego obecność obserwowano również w łożysku, jądrach i jajnikach, w przewodzie pokarmowym oraz w korze nadnerczy [16]. W ośrodkowym układzie nerwowym PEDF syntetyzowany jest z różną intensywnością. Najsilniej wyrażoną ekspresję tego peptydu obserwowano w szyszynce, płatach potylicznych, wzgórzu, podwzgórzu, hipokampie, ciele modzełowym oraz jądrze migdałowatym. Obecności PEDF nie stwierdzono jedynie w mózdzku i jądrze ogoniastym [63]. Ekspresję PEDF wykazywały także liczne struktury ludzkiego oka np.: ciało rzęskowe, rogówka, komórki warstwy wewnętrznej i zewnętrznej siatkówki [47,49,51]. Taka różnorodność w ekspresji genu dla tego peptydu, a także aktywacja komórek pod jego wpływem może świadczyć o możliwości działania zarówno miejscowego, jak i obwodowego tego peptydu.

Początkowo wczesną ekspresję PEDF wykryto w komórkach 17-tygodniowego ludzkiego płodu [65]. Wkrótce jednak wykazano obecność tego czynnika już w 7,4-tygodniowego płodu w komórkach RPE i komórkach fotoreceptorowych [36]. Badania przeprowadzone na myszach pozbawionych genu PEDF wykazały, że brak ten nie jest letalny dla gryzoni, jednak skutkuje poważnymi zaburzeniami w różnicowaniu komórek oraz w architektonice siatkówki u tych zwierząt [19]. Nadal jednak nie wyjaśniono, czy zmiany fenotypu są w tym przypadku związane z rzeczywistym brakiem PEDF, czy też niedobór ten wpływa na wydzielanie innych substancji, które wywołują wspomniane zaburzenia.

Wykazano natomiast zmniejszanie wydzielania PEDF w starzejących się komórkach. Zaobserwowano zmiany w stabilności PEDF-mRNA oraz zmniejszenie syntezy tego czynnika w pierwotnych hodowlach komórek RPE

bPEDF (1), hPEDF (2), mPEDF (3)			
1	MGALVLLVLTGALLGFGRCQ	N-AG-QEAGSLTPESTGAPVEEEDPFFKVPVNKLAAAVSNFG	60
2		CI HSS P SPP E PD D L	62
3		H SS VPS- SSE P E	61
1	YDLRYVRSGESPTANVLLSPLSVATLSALSLSLGAQRTESNIHRLYYDL--ISNPDIHGTY		120
2		SM T I V S	122
3		L SA G H V T S	121
1	KDLLASVTAPQKNLK-SASRIIF-ERKLRIKASFIPPLEKSYGTRPRILT-GNSRVLDQIEIN		179
2		E DT E V K S VA V P L	181
3		E E V S V P	180
1	NWVQAQMGKGVARSTREMPSEISIFLLGVAYFKGQWVTKFDSRKTSLEDYFLDEERTVKVPM		241
2		L K I D L H T Q H D R	243
3		I AL L	242
1	MSDPQAVLRYGLSDNLCKIAQLPLTGSTSIFFLPQKVTONLTIEESLTSEFIHDIIDREL		303
2		K I S M L M	305
3		K I M L M	304
1	KTVQAVLTIPKLSYEGELTKSVQELKLSLF-DAPDFSKITGK-PIKLTQVEHRVGFWEWN		383
2		S V F V L M ES V A	385
3		I V F V L M ES V AA	384
1	EDGAGTNSSPGVQPARLTFPLDYHLNQPFIFVLRDITDTGALLFIGKILDPRGT		416
2		TP L H P	418
3		E SSP L V L R SST	417

Ryc.1. Struktura pierwszorzędowa PEDF człowieka (hPEDF), krowy (bPEDF) i myszy (mPEDF). Łańcuchy tych polipeptydów są zbudowane odpowiednio z 418, 416 i 417 reszt aminokwasowych. Struktury peptydów człowieka (2) i myszy (3) różnią się od struktury PEDF wołu (1) wypunktowanymi aminokwasami; reszta jest identyczna. Liczby oznaczają ważniejsze, funkcjonalnie zdefiniowane miejsca: rejon swoisty dla gatunku: 21-38; rejon zawierający domenę aktywności neurotroficznej: 44-121; następnie zawężony do odcinka 78-121; miejsce N-glikozylacji: 283-285; rejon korespondujący z domeną „serpinową”: 382-do końca

Tabela 1. Występowanie PEDF w organizmie

Występowanie PEDF w strukturach oka	
ciało rzęskowe, rogówka, komórki warstwy wewnętrznej siatkówki, komórki warstwy zewnętrznej siatkówki	
Występowanie PEDF poza układem nerwowym	
Okres prenatalny	wątroba, płuca, nerki
Okres postnatalny	wątroba, płuca, nerki, łożysko, jądra, jajniki, przewód pokarmowy, kora nadnerczy
Występowanie PEDF w układzie nerwowym	
szyszynka, płaty potyliczne kory mózgu, wzgórze, podwzgórze, hipokamp, ciało modzelowate, jądro migdałowe	

w miarę ich starzenia się, bez komórek [30,65]. Nadal jednak nie jest pewne, czy ograniczenie syntezy PEDF jest skutkiem starzenia się komórek, czy być może stymuluje ten proces. Wymaga to dalszego wyjaśnienia, ze względu na możliwość udziału PEDF w wielu chorobach związanych z wiekiem, takich jak choćby zwyrodnienie plamki ocznej związane z wiekiem (AMD – age-related macular degeneration) [4].

RECEPTORY PEDF

Prawdopodobnie PEDF wywiera swoje działanie przez wiązanie z receptorami błonowymi. Dotychczas jednak, mimo szeroko zakrojonych badań, wciąż nie udało się odnaleźć i sklonować receptora swoistego dla tego peptydu. Wielokrotne próby odkrycia swoistego receptora PEDF prowadzone do dnia dzisiejszego przez wiele ośrodków badawczych nie przyniosły spodziewanych wyników. Udowodniono natomiast, iż PEDF łączy się ze swoistymi miejscami wiążącymi. Nadal jednak znana jest tylko podstawowa charakterystyka biochemiczna i farmakologiczna tych miejsc. Pojawia się w związku z tym pytanie, czy w ogóle istnieje swoisty receptor wiążący PEDF, czy też czynnik ten wykorzystuje receptory innych peptydów lub działa w sposób pozareceptorowy.

W badaniach prowadzonych przez Alberdi i wsp. [1] PEDF znakowany [¹²⁵I] łączył się z jedną z klas miejsc wiążących umiejscowionych na komórkach retinoblastoma i komórkach warstwy ziarnistej mózdzku. Podobne badania, prowadzone przez Aymerich i wsp. [3], dotyczyły miejsc wiążących w warstwach siatkówki. Wyniki uzyskane w obu modelach wskazują, że oddziaływanie PEDF na komórki retinoblastoma, komórki warstwy ziarnistej mózdzku oraz komórki siatkówki jest związane z obecnością swoistych receptorów tego peptydu, jednak nie zostały one bliżej scharakteryzowane. Sugeruje się, że za wiązanie z receptorem odpowiedzialny jest fragment 78-121 łańcucha aminokwasowego PEDF [71]. Wciąż również nie odkryto receptora zlokalizowanego na komórkach śródbłonna, przez który PEDF wywierałby swoje działanie antyangiogenne.

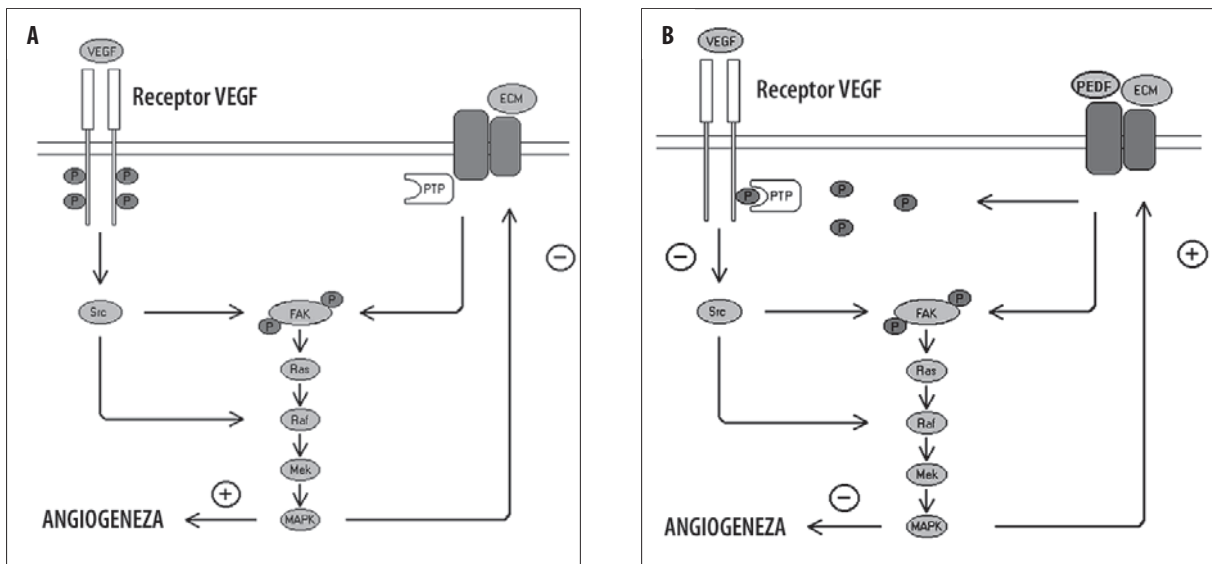
W 2003 roku po raz pierwszy pojawiła się hipoteza, że PEDF może hamować angiogenezę przez bezpośrednie zmniejszanie ekspresji genu VEGF (vascular endothelial growth factor) [72]. Najnowsze dane potwierdzają także bezpośredni wpływ PEDF na receptor czynnika wzrostu

śródbłonna naczyń, VEGFR-1 (vascular endothelial growth factor receptor 1). W badaniach prowadzonych w laboratorium Boultona i opublikowanych w 2006 roku [11] PEDF powodował zwiększanie aktywności kompleksu γ -sekreazy. Kompleks ten składa się z kilku podjednostek: APH-1, PEN-2, Nct i PS – ta ostatnia to presenilina, która stanowi główny fragment jednostki katalitycznej γ -sekreazy. Wzrost aktywności tego kompleksu jest związany z przemieszczeniem PS1 z przestrzeni okołojądrowej do błony cytoplazmatycznej, w której γ -sekreaza katalizuje reakcję hydrolizy VEGFR-1 z udziałem międzybłonowych domen białkowych, stanowiących fragment tego receptora i zawierających reszty walinowe. Odsłonięcie tych reszt następuje w chwili połączenia VEGF z receptorem. Odszczepienie wewnątrzkomórkowej domeny VEGFR-1 jest odpowiedzialne za zablokowanie proangiogenego wpływu VEGF. Z powyższych obserwacji wynika, że chociaż PEDF samodzielnie wpływa na zwiększenie aktywności γ -sekreazy, to proteoliza receptora zachodzi w błonie komórkowej tylko w obecności VEGF. Jeśli hydroliza VEGFR-1 jest niemożliwa do uzyskania, to wówczas PEDF nie hamuje proangiogenego działania naczyniowego czynnika wzrostu śródbłonna [11].

MECHANIZMY PRZEKAZYWANIA SYGNAŁU

Badania przeprowadzone przez Yabe'a i wsp. [71] wskazują na udział czynnika transkrypcyjnego NF- κ B w kaskadzie sygnalizacyjnej aktywowanej przez połączenie PEDF z receptorem. W wykonanym eksperymencie, celem wywołania apoptozy, komórki warstwy ziarnistej mózdzku (CGCs – cerebellar granular cells) poddano działaniu K⁺ w niewielkim stężeniu, a następnie PEDF. Zaobserwowano, że czynnik ten spowodował wzrost fosorylacji inhibitorów czynnika NF- κ B, zmniejszenie poziomu białek I κ B, aktywację NF- κ B, jądrową translokację p65 (RelA) oraz zwiększenie aktywności wiązania DNA przez NF- κ B, czego skutkiem było zapobieganie apoptozie tych komórek [71].

Inne badania sugerują udział liganda Fas – cytokiny należącej do nadrodziny czynnika martwicy nowotworów TNF (tumor necrosis factor) i jego receptora (Fas/CD95) w mechanizmie działania PEDF. Volpert i wsp. udowodnili, że przeciwciała anti-Fas, anti-FasL, oraz zastosowanie inhibitorów kaspaz, hamuje działanie PEDF, który w warunkach prawidłowych stymuluje apoptozę w hodowli komórek śródbłonna [66]. Zatem PEDF może zarówno



Ryc. 2. (A) Połączenie VEGF z receptorem wyzwała autofosforylację tego receptora i uruchamia szlak przemian prowadzący do aktywacji angiogenezy. (B) Połączenie PEDF z integrzynami drogą bezpośrednią lub pośrednio przez ECM (extracellular matrix) wywołuje zmianę konformacji cząsteczki integrzyn i oddysocjowanie fosfatazy, która przyłącza się następnie do receptora VEGF i prowadzi do jego defosforylacji. Ten mechanizm działania prowadzi do zatrzymania transdukcji sygnału i do zablokowania procesów aktywujących angiogenezę

zapobiegać apoptozie komórki przez aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, jak również doprowadzić do aktywacji zaprogramowanej śmierci komórki przez zwiększenie ekspresji liganda Fas.

Działanie antyangiogenne PEDF prawdopodobnie wiąże się z modulującym wpływem tego czynnika na szlaki Akt i MAPK, które w komórkach śródbłonna są aktywowane przez VEGF – naczyniowy czynnik wzrostu śródbłonna. PEDF nie wpływał znacząco na fosforylację nieaktywnego Akt, natomiast zdecydowanie blokował ten szlak, jeśli komórki wcześniej poddano działaniu VEGF [60]. Hamowanie angiogenezy przez aktywację szlaku MAPK jest związane z redukcją ekspresji kinazy 1 MAPK (MAPKK1) oraz ze zmniejszaniem fosforylacji ERK-1 indukowanej przez VEGF. Jednak działanie to jest dodatkowo zależne od wielu czynników zewnętrznych, jakim podlegają w danym momencie komórki śródbłonna naczyń [33].

POTENCJAŁ NEUROTROFICZNY I NEUROPROTEKCYJNY PEDF

Od chwili odkrycia wpływu PEDF na różnicowanie się komórek retinoblastoma w kierunku neuronów, czynnik ten stał się obiektem bardzo intensywnych badań. Okazało się, że pod jego wpływem komórki tego nowotworu, pochodzącego z multipotencjalnych retinoblastów i wykazującego dużą złośliwość, były przekształcane do postaci mniej agresywnej. Dało to podstawę do dalszych poszukiwań w kierunku właściwości neurotroficznych PEDF, jak również pozwoliło na postawienie hipotezy o wpływie przeciwnowotworowym tego czynnika.

Od odkrycia powstało wiele modeli doświadczalnych, uwzględniających także fizjologiczne miejsca występowania PEDF, których zadaniem stało się bliższe poznanie mechanizmów działania tego czynnika i określenie jego przydatności w terapii niektórych patologii układu nerwowego człowieka.

Modele komórek siatkówki

Ponieważ PEDF został odkryty w nabłonku barwnikowym siatkówki, początkowo skoncentrowano się na modelach, które przybliżyłyby wpływ tego czynnika na różnicowanie się komórek siatkówki. W badaniach prowadzonych przez Malchiodi-Albedi i wsp. [39] hodowle komórek RPE pochodzących od noworodków szczurzych poddawano działaniu PEDF. Zaobserwowano zmiany polegające na zwiększeniu obszarów cytoplazmatycznych tych komórek, stymulacji dojrzewania melaniny oraz przylegania komórek do siebie. Zatem, PEDF odgrywa ważną rolę w rozwoju nabłonka barwnikowego siatkówki.

W innym modelu dysmorfogenezę fotoreceptorów uzyskiwano przez usunięcie RPE z oczu kijanek żaby (*Xenopus laevis*) przed rozpoczęciem hodowli. Działanie to powodowało powstanie zaburzeń w strukturze zewnętrznych segmentów fotoreceptorów, nieprawidłowości w strukturze subkomórkowej oraz zmniejszenie ilości opsyny (białka fotoreceptorów, które stanowi 80–90% wszystkich białek w segmentach zewnętrznych pręcików). Natomiast dodanie PEDF do hodowli oczu *Xenopus* pozbawionych RPE zapobiegało wystąpieniu zmian strukturalnych w fotoreceptorach i przywracało poziom opsyny do wartości kontrolnych [34]. Wyniki uzyskane w tym doświadczeniu potwierdzają ważną rolę PEDF w rozwoju fotoreceptorów.

W podobnym modelu wykazano również troficzne działanie PEDF na komórki Müllera, czyli komórki gleju siatkówki, oraz pozbawienie tego czynnika jego korzystnego wpływu przez zastosowanie przeciwciał anti-PEDF [34]. Zaobserwowano również dojrzewanie komórek Müllera pod wpływem PEDF [35]. Badania te potwierdziły neurotroficzny wpływ PEDF nie tylko na komórki fotoreceptorowe siatkówki, ale również na występujące w siatkówce komórki glejowe.

W innym doświadczeniu prowadzonym *in vivo* na myszach – nosicielkach mutacji genów *rd1* i *rd5* odpowiedzialnych za tworzenie fotoreceptorów, stosowano PEDF doszkliskowo w pojedynczym wstrzyknięciu. Zastosowanie tego czynnika znacząco opóźniało postępowanie degeneracji fotoreceptorów, którą uzyskiwano przez zastosowanie ciągłego intensywnego światła. Wyniki te również stanowią potwierdzenie neuroprotektoryjnych właściwości PEDF [14,16].

W badaniach prowadzonych przez Ogata i wsp. [48] komórki siatkówki poddawano niedokrwieniu, które wywoływano przez zwiększenie ciśnienia wewnątrzgałkowego. Celem tego działania było wywołanie śmierci komórek wszystkich warstw siatkówki. Wykazano nie tylko ochronne działanie PEDF na komórki, które nie uległy uszkodzeniu pod wpływem wywołanego niedokrwienia, ale również pobudzanie ich dalszego przeżycia.

Kolejną grupę badań stanowił model cytotoksyczności wywołanej zastosowaniem H_2O_2 na neurony wyizolowane z siatekówek 0–2-dniowych szczurów. Zastosowanie PEDF chroniło te komórki przed prowadzącą do apoptozy cytotoksycznością, spowodowaną zastosowaniem nadtlenu wodoru, będącego donorem wolnych rodników [13,29].

Model toksyczności poglutaminianowej

PEDF chroni również różne komórki układu nerwowego poddane toksycznemu działaniu glutaminianu. Działanie to jest związane z uruchomieniem trzech mechanizmów. Poprzez aktywację receptorów NMDA glutaminian umożliwia z jednej strony wnikanie jonów wapniowych do wnętrza komórki, a z drugiej – umożliwia syntezę tlenu azotu. Trzeci mechanizm polega na nadmiernej aktywacji wymiennika sodowo-wapniowego i w rezultacie następuje napływ jonów sodowych do wnętrza komórki. Już nanomolowe stężenia PEDF zaburzają jeden lub więcej z tych procesów i prowadzą do zahamowania apoptozy. Badania te prowadzone były na hodowlach komórek ziarnistych mózdzku [58,59], neuronach hipokampa [18], motoneuronach rdzenia kręgowego [6,7], a także neuronach warstwy zwojowej siatkówki [58]. We wszystkich tych hodowlach PEDF zapobiegał toksycznemu działaniu glutaminianu, a nawet – jak w przypadku neuronów hipokampa – powodował znaczący wzrost neuronów [18].

Model komórek ziarnistych mózdzku

W badaniach prowadzonych przez Taniwakiego i wsp. [58] zaobserwowano, że obecność ludzkiego rekombinowanego PEDF (hrPEDF) w środowisku inkubacyjnym, w którym hodowano komórki ziarniste mózdzku (CGC) uzyskane od 5–8-dniowych szczurów, skutkowała zależnym od stężenia badanego czynnika zwiększeniem liczby żywych komórek. Był to dowód, że PEDF przedłuża żywotność neuronów ośrodkowego układu nerwowego (OUN).

Inny model, zaproponowany przez Chadera i wsp. [2] powstał w celu wykazania wpływu PEDF na proces naturalnej i indukowanej apoptozy. Hodowlę komórek CGC pobranych od 8-dniowych szczurów inkubowano z 25 mM chlorku potasu – czynnika, którego zadaniem jest inicjacja procesów zaprogramowanej śmierci komórki. Do tak przygotowanych komórek dodano dwa fragmenty PEDF,

z których jeden nie zawierał fragmentu „serpinowego”. Zaobserwowano, że zastosowanie PEDF przeciwdziałało apoptozie, zarówno naturalnej, jak i indukowanej. Wykazano także, że PEDF chroni niedojrzałe neurony mózdzku przed apoptozą, a dodatkowo dowiedziono, że działanie to nie zależy od aktywności typowej dla proteaz serynowych [2].

Model rdzeniowych neuronów ruchowych

Do wykazania właściwości neuroprotektoryjnych PEDF wykorzystano także komórki nerwowe rdzenia kręgowego. W jednym z doświadczeń Houenou i wsp. [32] wykonywali u noworodków myszy aksotomię neuronów ruchowych, co powodowało śmierć ponad połowy komórek poddanych temu zabiegowi i zanik pozostałych. Zastosowanie PEDF w tym modelu doświadczalnym doprowadziło nie tylko do zredukowania liczby zniszczonych całkowicie komórek, ale również zupełnie odwróciło proces atrofii neuronów, które przetrwały zabieg [32]. Uzyskane wyniki pozwalają nie tylko potwierdzić ochronny wpływ PEDF na komórki nerwowe, ale również pozwalają wysnuć hipotezę o podobnym wpływie wywieranym przez ten czynnik na uszkodzone neurony w innych obszarach ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego.

Model metabolicznej aktywności i proliferacji mikrogleju i astrocytów

Ostatnie badania wykazały neurotoksyczny wpływ mikrogleju, który pod wpływem cytokin (interferonu gamma, czy lipopolisacharydu) ulega nadmiernej aktywacji i w ten sposób może się przyczyniać do nasilania procesu zapalnego, który prawdopodobnie stanowi dodatkowy czynnik rozwoju chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, czy choroba Parkinsona [37,41]. W świetle tych doniesień celowym okazało się przeprowadzenie badań nad wpływem PEDF na mikroglej. W doświadczeniach prowadzonych przez Sugitę i wsp. [57] rekombinowany fragment ludzkiego PEDF dodawano do preparatu tkankowego uzyskiwanego z mózgu 2-dniowych szczurów. Zastosowanie tego czynnika wywoływało zmiany w morfologii zarówno mikrogleju, jak i astrocytów. Komórki z wrzecionowatych stawały się coraz mniejsze i bardziej okrągłe, a niektóre przyjmowały kształt ameboidalny. W doświadczeniu tym PEDF nasilał również proliferację mikrogleju oraz hamował proliferację tych komórek, wywołaną czynnikiem stymulującym komórki kolonii granulocytarno-makrofagowej (granulocyte macrophage colony-stimulating factor – GM-CSF) [57]. Wyniki te pokazują, że działanie PEDF w układzie nerwowym nie ogranicza się wyłącznie do komórek nerwowych, ale także odgrywa istotną rolę w regulacji funkcji i proliferacji komórek glejowych, dzięki czemu może się przyczyniać do zahamowania rozwoju chorób neurodegeneracyjnych.

Podsumowanie

Wszystkie prowadzone badania nad wpływem PEDF na komórki układu nerwowego nie tylko potwierdzają wywieranie przez ten czynnik działania neuroprotektoryjnego oraz neurotroficznego, ale również świadczą o ogromnym potencjale terapeutycznym, jaki niosą z sobą takie właściwości. Wykazano, że PEDF działa na wiele różnych komórek

od RPE, przez fotoreceptory, neurony siatkówki, neurony ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego oraz komórki gleju, a aktywność ta jest istotna zarówno w stanach fizjologicznych (dojrzwienie fotoreceptorów, utrzymywanie prawidłowej architektury siatkówki), jak i patologicznych (stwardnienie zanikowe boczne – ALS, zwyrodnienie plamki związane z wiekiem – AMD, zanik nerwu wzrokowego w przebiegu stwardnienia rozsianego – SM). Zahamowanie przez PEDF neurodegeneracji oraz apoptozy w tych procesach chorobowych stanowiłoby pierwszy krok w kierunku wprowadzania nowych terapii, a zatem poprawiłoby rokowanie pacjentom.

ROLA PEDF W REGULACJI ANGIOGENEZY

Działanie antyangiogenne PEDF w strukturach oka

Podobnie jak przypadkowo nastąpiło odkrycie czynnika pochodzącego z nabłonka barwnikowego siatkówki, tak nieoczekiwanie natrafiono na jego antyangiogenne właściwości. Pierwsze doniesienia dotyczące nowego aspektu działania PEDF zostały przedstawione przez Boucka i wsp. w 1999 roku i dotyczyły hamowania angiogenezy w tkankach oka [8,17]. Problem tworzenia nowych naczyń w strukturach oka jest niezwykle istotny dla całego procesu widzenia. W warunkach fizjologicznych w dojrzałym oku ssaków naczynia są w pełni uformowane i nie podlegają dalszemu rozwojowi. Jednocześnie ich lokalizacja zapewnia pełną przejrzystość struktur, takich jak rogówka czy ciało szkliste, przez które promień światła dociera do fotoreceptorów zlokalizowanych w siatkówce. Niestety, w szczególnych warunkach, np. podczas niedotlenienia, dochodzi do tworzenia nowych naczyń w tych strukturach. Zmiany te dotyczą zarówno noworodków (retinopatia wcześniacza) czy chorych na cukrzycę (retinopatia cukrzycowa), u których neowaskularyzacja wywodzi się z systemu naczyń śródkowych siatkówki, jak i pacjentów po 50 roku życia (AMD), u których dochodzi do proliferacji naczyń wywodzących się z systemu naczyniówkowego [9,45]. Konsekwencją tej angiogenezy w awaskularnych strukturach oka jest całkowita utrata wzroku. Dlatego antyangiogenne potencjał PEDF w oku obudził nadzieje klinicystów na opracowanie nowych metod terapii wymienionych wyżej stanów chorobowych.

Obecnie wiadomo, że proces angiogenezy jest związany z zachwianiem równowagi pomiędzy czynnikami pro- i antyangiogennymi [45]. Najważniejszym czynnikiem pobudzającym tworzenie nowych naczyń jest VEGF, natomiast PEDF jest jednym z czynników hamujących ten proces. W siatkówce oba czynniki pozostają we wzajemnej zależności [44,47]. Retrospektywne badania, dotyczące pacjentów z retinopatią cukrzycową, wskazują na istotne podwyższenie poziomu VEGF a obniżenie PEDF u badanych chorych, w porównaniu z grupami kontrolnymi – pacjentami diabetologicznymi niewykazującymi cech retinopatii [22,44]. Cai i wsp. [11] wykazali, że PEDF zastosowany w hodowli komórek śródbłonka mikrokapilarnego pochodzącego z siatkówki bydłowej (BRMECs – bovine retinal microvascular endothelial cells) nie wpływał w znaczący sposób na migrację i tworzenie przez te komórki kanalików pierwotnych naczyń. Jednak, jeśli dodanie PEDF było poprzedzone podaniem VEGF, wówczas czynnik ten w znaczący sposób redukował indukowaną przez VEGF proliferację i migrację komórek śródbłonka [11,38].

W innych badaniach skoncentrowano się nad wpływem PEDF na blokowanie angiogenezy w strukturach oka pozbawionych unaczynienia w warunkach fizjologicznych. PEDF okazał się niezbędny do utrzymania takiego stanu nie tylko ze względu na hamowanie odpowiedzi angiogennej wywołanej przez VEGF, czy FGF (fibroblast growth factor) [55], ale także na zapobieganie powstawaniu nieprawidłowego unaczynienia. Zaobserwowano również, że PEDF wpływa wybiórczo na nowo powstające naczynia, natomiast nie oddziałuje na już istniejące [70].

Dowson i wsp. wykazali, że podanie PEDF do rogówki szczura hamuje wywołaną wcześniej neowaskularyzację [17], a działanie to jest zdecydowanie silniejsze, niż innych czynników antyangiogennych, takich jak angiostatyna, czy trombospondyna [17,55]. PEDF jest także głównym inhibitorem angiogenezy, występującym fizjologicznie w cieple szklistym. Pozbawienie szklistki tego czynnika prowadzi do aktywacji procesu neowaskularyzacji [17,31]. Wyniki tych doświadczeń potwierdzają antyangiogenne działanie PEDF w awaskularnych strukturach oka.

Działanie przeciwnowotworowe PEDF

Rozwój nowych naczyń jest także jednym z niezbędnych ogniw w łańcuchu przemian prowadzących do rozwoju i wzrostu nowotworu. Uzyskanie rozmiarów większych niż 2–3 mm, a w późniejszym okresie choroby uzyskanie zdolności tworzenia przerzutów jest ściśle uzależnione od procesu angiogenezy [9,20,21,26].

Badania prowadzone przez Hase'a i wsp. [28] dotyczyły wpływu PEDF na komórki ludzkiego raka trzustki wszczepione nagim myszom. Wprowadzenie wektora lentiwirusowego zawierającego PEDF doprowadziło do znaczącego zahamowania wzrostu guza nowotworowego, co było związane ze znacznym zmniejszeniem gęstości naczyń włosowatych w jego obszarze. Dane te sugerują również, że niedobór PEDF może się wiązać z nasileniem rozwoju nowotworu trzustki w wyniku nasilenia proliferacji komórek guza oraz aktywacją angiogenezy [28].

Blokowanie angiogenezy i zahamowanie wzrostu guza obserwowano także na modelu, w którym nagim myszom wszczepiono komórki linii HCC (human hepatocellular carcinoma) oraz LLC (Lewis lung carcinoma). W obu przypadkach myszom podano PEDF za pomocą wektora adenowirusowego i uzyskano zdecydowane zmniejszenie gęstości naczyń włosowatych otaczających guz [67].

W badaniach prowadzonych przez Lu i wsp. [27] wektor zawierający PEDF podawano myszom z niedoborem odporności, którym wcześniej wszczepiono komórki glejaka U251. Wynikiem wprowadzenia PEDF do tych komórek było opóźnienie progresji guza, zmniejszenie jego złośliwości oraz stymulacja apoptozy komórek glejaka [27].

Interesujące wyniki uzyskano na modelu raka piersi, w którym wykorzystano 9 linii komórkowych tego nowotworu. Ekspresja PEDF-mRNA oraz stężenie peptydu występowały tylko w 5 z nich i były znacząco mniejsze w porównaniu nie tylko z tkankami zdrowymi, ale także z wartościami oznaczanymi w komórkach innych nowotworów ludzkich [12].

Wyniki przytoczonych badań podkreślają ważną rolę, jaką PEDF odgrywa w procesach hamowania angiogenezy zarówno jako czynnik fizjologiczny, uczestniczący w poszczególnych etapach rozwoju zarodka, a także jako czynnik hamujący tworzenie patologicznych naczyń w chorobach oka i w nowotworach [43]. Chociaż nie do końca poznany został mechanizm oddziaływania PEDF na naczynia, do tychczas uzyskane dane sugerują możliwość wykorzystania tego czynnika lub jego aktywnych fragmentów w terapii wielu chorób, związanych z nadmiernym rozrostem naczyń, których rokowanie jest w chwili obecnej zdecydowanie niepomyślne. PEDF może także znaleźć zastosowanie jako czynnik prognostyczny do oceny tempa progresji niektórych nowotworów [12].

PERSPEKTYWY

PEDF – czynnik pochodzący z nabłonka barwnikowego siatkówki – ma krótką historię, ale intensywne i wielokierunkowe badania prowadzone w tym okresie ujawniły jego potencjał neurotroficzny, neuroprotektoryjny, a ostatnio również antyangiogeny. Te właściwości sprawiły, że PEDF dołączył do unikatowych endogennych czynników, które regulują wiele procesów zachodzących w organizmie, zarówno w warunkach fizjologicznych jak i patologicznych. Wyniki uzyskane z prowadzonych eksperymentów pozwalają sądzić, że PEDF ze swoim potencjałem neuroprotektoryjnym,

neurotroficznym i antyangiogenym znajdzie wkrótce zastosowanie w terapii przynajmniej niektórych chorób neurologicznych (np. z kręgu chorób neurodegeneracyjnych), okulistycznych (AMD, retinopatie), czy onkologicznych. Szczególne zainteresowanie towarzyszy możliwości wykorzystania PEDF w chorobach związanych z neowaskularyzacją w gałce ocznej. Pierwsze próby zastosowania wektorów adenowirusowych zawierających geny PEDF były prowadzone na modelu mysim. Po dogąłkowym podaniu badany czynnik hamował powstawanie nowych naczyń, dzięki czemu prowadził do zahamowania progresji choroby [42]. Podobne wyniki uzyskano na modelu oka świni, w którym wektory były podawane w iniekcji okołogałkowej [52]. Obecnie toczą się już badania kliniczne pierwszej fazy z zastosowaniem dogąłkowych iniekcji PEDF u ludzi z AMD. Wyniki otrzymane przez Campochiaro i wsp. [10] nie tylko potwierdziły antyangiogenne właściwości PEDF, który był dodatkowo pozbawiony działań niepożądanych niezależnie od zastosowanej dawki, ale wykazały także utrzymywanie się efektu terapeutycznego przez kilka miesięcy po wykonanej iniekcji.

Otrzymane wyniki nie tylko potwierdzają właściwości antyangiogenne PEDF, ale również stanowią niezbitą dowód możliwości jego terapeutycznego zastosowania u ludzi oraz wskazują kierunek dalszego rozwoju badań nad tym czynnikiem.

Tabela 2. Ważniejsze fakty z historii badań nad PEDF

Medium kondycjonowane komórkami nabłonka barwnikowego siatkówki (RPE) stymuluje ludzkie komórki retinoblastoma Y-79 do zmiany swojego fenotypu w kierunku neuronalnym	1989
Biochemiczna identyfikacja czynnika neurotroficznego wytwarzanego przez RPE – PEDF (pigment epithelium derived factor)	1991
Molekularna identyfikacja PEDF – struktura „serpinopodobna”, niewykazująca aktywności „serpinowej” (inhibitora proteazy serynowej)	1993
Potencjał neurotroficzny PEDF wobec neuronów ośrodkowych	1995
Potencjał neuroprotektoryjny PEDF	1997
Potencjał antyangiogeny PEDF	1999
Aktywność PEDF hamująca proces neowaskularyzacji pochodzenia siatkówkowego i choroidalnego	2001
Wykorzystanie PEDF jako czynnika antyangiogenego w schorzeniach okulistycznych przebiegających z neowaskularyzacją (np. retinopatia wcześniacza, cukrzycowa, AMD)	2002
Wykorzystanie PEDF jako środka terapeutycznego w chorobach zwyrodnieniowych rdzeniowych neuronów ruchowych	2002
Badania w kierunku wprowadzenia terapii genowej z zastosowaniem wektorów molekularnych kodujących PEDF	2003
I faza badań klinicznych na ludziach chorych na AMD, z zastosowaniem wektorów adenowirusowych zawierających gen PEDF w iniekcji doszkliskowej (dogąłkowej)	2006

PIŚMIENICTWO

- [1] Alberdi E., Aymerich M.S., Becerra S.P.: Binding of pigment epithelium-derived factor (PEDF) to retinoblastoma cells and cerebellar granule neurons. Evidence for a PEDF receptor. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 31605–31612
- [2] Araki T., Taniwaki T., Becerra S.P., Chader G.J., Schwarz J.P.: Pigment epithelium-derived factor (PEDF) differentially protects immature but not mature cerebellar granule cells against apoptotic cell death. *J. Neurosci. Res.*, 1998; 53: 7–15
- [3] Aymerich M.S., Alberdi E.M., Martinez A., Becerra S.P.: Evidence for pigment epithelium-derived factor receptors in the neural retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2001; 42: 3287–3293
- [4] Barnstable C., Tombran-Tink J.: Neuroprotective and antiangiogenic actions of PEDF in the eye: molecular targets and therapeutic potential. *Prog. Retin Eye Res.*, 2004; 23: 561–577

- [5] Becerra S.P., Sagasti A., Spinella P., Notario V.: Pigment epithelium-derived factor behaves like a noninhibitory serpin. Neurotrophic activity does not require the serpin reactive loop. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 25992–25999
- [6] Bilak M.M., Becerra S.P., Vincent A.M., Moss B.H., Aymerich M.S., Kuncel R.W.: Identification of neuroprotective molecular region of pigment epithelium-derived factor and its binding sites on motor neurons. *J. Neurosci.*, 2002; 22: 9378–9386
- [7] Bilak M.M., Corse A.M., Bilak S.R., Lehar M., Tombran-Tink J., Kuncel R.W.: Pigment epithelium-derived factor (PEDF) protects motor neurons from chronic glutamate-mediated neurodegeneration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1999; 58: 719–728
- [8] Bouck N.: PEDF: anti-angiogenic guardian of ocular function. *Trends Mol. Med.*, 2002; 8: 330–334
- [9] Campochiaro P.A.: Retinal and choroidal neovascularization. *J. Cell Physiol.*, 2000; 184: 301–310
- [10] Campochiaro P.A., Nguyen Q.D., Shah S.M., Klein M.L., Holz E., Frank R.N., Saperstein D.A., Gupta A., Stout J.T., Macko J., DiBartolomeo R., Wei L.L.: Adenoviral vector-delivered pigment epithelium-derived factor for neovascular age-related macular degeneration: results of a phase I clinical trial. *Hum. Gene Ther.*, 2006; 17: 167–176
- [11] Cai J., Jiang W.G., Grant M.B., Boulton M.: Pigment epithelium-derived factor inhibits angiogenesis via regulated intracellular proteolysis of VEGFR-1. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 3604–3613
- [12] Cai J., Parr C., Watkins G., Jiang W.G., Boulton M.: Decreased pigment epithelium-derived factor expression in human breast cancer progression. *Clin. Cancer Res.*, 2006; 12: 3510–3517
- [13] Cao W., Tombran-Tink J., Chen W., Mrazek D., Elias R., McGinnis J.F.: Pigment epithelium-derived factor protects cultured retinal neurons against hydrogen peroxide-induced cell death. *J. Neurosci. Res.*, 1999; 57: 789–800
- [14] Cao W., Tombran-Tink J., Elias R., Sezate S., Mrazek D., McGinnis J.F.: *In vivo* protection of photoreceptors from light damage by pigment epithelium-derived factor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2001; 42: 1646–1652
- [15] Carrell R.W., Pemberton P.A., Boswell D.R.: The serpins: evolution and adaptation in a family of protease inhibitors. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1987; 52: 527–535
- [16] Cayouette M., Smith S.B., Becerra S.P., Gravel C.: Pigment epithelium-derived factor delays the death of photoreceptors in mouse models of inherited retinal degenerations. *Neurobiol. Dis.*, 1999; 6: 523–532
- [17] Dawson D.W., Volpert O.V., Gillis P., Crawford S.E., Xu H., Benedict W., Bouck N.P.: Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science*, 1999; 285: 245–248
- [18] DeCoster M.A., Schabelman E., Tombran-Tink J., Bazan N.G.: Neuroprotection by pigment epithelium-derived factor against glutamate toxicity in developing primary hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.*, 1999; 56: 604–610
- [19] Doll J.A., Stellmach V.M., Bouck N.P., Bergh A.R., Lee C., Abramson L.P., Cornwell M.L., Pins M.R., Borenstajn J., Crawford S.E.: Pigment epithelium-derived factor regulates the vasculature and mass of the prostate and pancreas. *Nat. Med.*, 2003; 9: 774–780
- [20] Ferrara N.: Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin. Oncol.*, 2002; 29: 10–14
- [21] Folkman J.: Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin. Oncol.*, 2002; 29: 15–18
- [22] Funatsu H., Yamashita H., Nakamura S., Mimura T., Eguchi S., Noma H., Hori S.: Vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor are related to diabetic macular edema. *Ophthalmology*, 2006; 113: 294–301
- [23] Goliath R., Shugart Y.Y., Janssens P., Weissenbach J., Beighton P., Rameser R., Greenberg J.: Fine localization of the locus for autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 17p. *Amer. J. Hum. Genet.*, 1995; 57: 962–965
- [24] Goliath R., Tombran-Tink J., Rodriguez I.R., Chader G., Rameser R., Greenberg J.: The gene for PEDF, a retinal growth factor is a prime candidate for retinitis pigmentosa and is tightly linked to the RPI3 locus on chromosome 17p13.3. *Mol. Vis.*, 1996; 2: 5
- [25] Greenberg J., Goliath R., Beighton P., Rameser R.: A new locus for autosomal dominant retinitis pigmentosa on the short arm of chromosome 17. *Hum. Mol. Genet.*, 1994; 3: 915–918
- [26] Griffioen A.W., Molema G.: Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol. Rev.*, 2000; 52: 237–268
- [27] Guan M., Pang C.P., Yam H.F., Cheung K.F., Liu W.W., Lu Y.: Inhibition of glioma invasion by overexpression of pigment epithelium derived-factor. *Cancer Gene Ther.*, 2004; 11: 325–332
- [28] Hase R., Miyamoto M., Uechara H., Kadoya M., Ebihara Y., Murakami Y., Takahashi R., Mega S., Li L., Shichinohe T., Kawarada Y., Kondo S.: Pigment epithelium-derived factor gene therapy inhibits human pancreatic cancer in mice. *Clin. Cancer Res.*, 2005; 11: 8737–8744
- [29] Hivert B., Cerruti C., Camu W.: Hydrogen peroxide-induced motor neuron apoptosis is prevented by poly ADP ribosyl synthetase inhibitors. *Neuroreport*, 1998; 9: 1835–1838
- [30] Hjelmeland L.M., Cristofalo V.J., Funk W., Rakoczy E., Katz M.L.: Senescence of the retinal pigment epithelium. *Mol. Vis.*, 1999; 5: 33
- [31] Holekamp N.M., Bouck N., Volpert O.: Pigment epithelium-derived factor is deficient in the vitreous of patients with choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration. *Am. J. Ophthalmol.*, 2002; 134: 220–227
- [32] Houenou L.J., D'Costa A.P., Li L., Turgeon V.L., Enyadice C., Alberdi E., Becerra S.P.: Pigment epithelium-derived factor promotes the survival and differentiation of developing spinal motor neurons. *J. Comp. Neurol.*, 1999; 412: 506–514
- [33] Hutchings H., Maitre-Boube M., Tombran-Tink J., Plouet J.: Pigment epithelium-derived factor exerts opposite effects on endothelial cells of different phenotypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002; 294: 764–769
- [34] Jablonski M.M., Tombran-Tink J., Mrazek D.A., Iannaccone A.: Pigment epithelium-derived factor supports normal development of photoreceptor neurons and opsin expression after retinal pigment epithelium removal. *J. Neurosci.*, 2000; 20: 7149–7157
- [35] Jablonski M.M., Tombran-Tink J., Mrazek D.A., Iannaccone A.: Pigment epithelium-derived factor supports normal Müller cell development and glutamine synthetase expression after removal of the retinal pigment epithelium. *Glia*, 2001; 35: 14–25
- [36] Karakousis P.C., John S.K., Behling K.C., Surace E.M., Smith J.E., Hendrickson A., Tang W.X., Bennett J., Milam A.H.: Localization of pigment epithelium derived factor (PEDF) in developing and adult human ocular tissues. *Mol. Vis.*, 2001; 7: 154–163
- [37] Klegeris A., McGeer P.L.: Chymotrypsin-like proteases contribute to human monocytic THP-1 cell as well as human microglial neurotoxicity. *Glia*, 2005; 51: 56–64
- [38] Liu H., Ren J.G., Cooper W.L., Hawkins C.E., Cowan M.R., Tong P.Y.: Identification of the antivasopermeability effect of pigment epithelium-derived factor and its active site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 6605–6610
- [39] Malchiodi-Albedi F., Feher J., Caiazza S., Formisano G., Perilli R., Falchi M., Petrucci T.C., Scoria G., Tombran-Tink J.: PEDF (pigment epithelium-derived factor) promotes increase and maturation of pigment granules in pigment epithelial cells in neonatal albino rat retinal cultures. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 1998; 16: 423–432
- [40] Marshall C.J.: Evolutionary relationships among the serpins. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.*, 1986; 27: 1760–1764
- [41] McGeer P.L., McGeer E.G.: Inflammation and the degenerative diseases of aging. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2004; 1035: 104–116
- [42] Mori K., Gehlbach P., Yamamoto S., Duh E., Zack D.J., Li Q., Berns K.I., Raisler B.J., Hauswirth W.W., Campochiaro P.A.: AAV-mediated gene transfer of pigment epithelium-derived factor inhibits choroidal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2002; 43: 1994–2000
- [43] Nowak J.Z.: Czynniki pochodzący z nabłonka barwnikowego (PEDF)-potencjał neuroprotekcji, neurotroficzny i rola w regulacji angiogenezy. *Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN*, 2003; 20: 217–227
- [44] Nowak J.Z.: Wartość diagnostyczna poziomów VEGF i PEDF dla oceny procesu neowaskularyzacyjnego w chorobach oczu. *Okulistyka*, 2004; 2: 49–54
- [45] Nowak J.Z., Wiktorowska-Owczarek A.: Neowaskularyzacja w tkankach oka: mechanizmy i rola czynników pro- i antyangiogeny. *Klinika Oczna*, 2004; 106: 90–97
- [46] Ogata N., Nishikawa M., Nishimura T., Mitsuma Y., Matsumura M.: Unbalanced vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy. *Am. J. Ophthalmol.*, 2002; 134: 348–353
- [47] Ogata N., Nishikawa M., Nishimura T., Mitsuma Y., Matsumura M.: Inverse levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor in the vitreous of eyes with rheumatogenous retinal detachment and proliferative vitreoretinopathy. *Am. J. Ophthalmol.*, 2002; 133: 851–852

- [48] Ogata N., Wang L., Jo N., Tombran-Tink J., Takahashi K., Mrazek D., Matsumura M.: Pigment epithelium derived factor as a neuroprotective agent against ischemic retinal injury. *Curr. Eye Res.*, 2001; 22: 245–252
- [49] Ortego J., Escribano J., Becerra S.P., Coca-Prados M.: Gene expression of the neurotrophic pigment epithelium-derived factor in the human ciliary epithelium. Synthesis and secretion into the aqueous humor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1996; 37: 2759–2767
- [50] Palmieri D., Watson J.M., Rinehart C.A.: Age-related expression of PEDF/EPC-1 in human endometrial stromal fibroblasts: implications for interactive senescence. *Exp. Cell. Res.*, 1999; 247: 142–147
- [51] Perez-Mediavilla L.A., Chew C., Campochiaro P.A., Nickells R.W., Notario V., Zack D.J., Becerra S.P.: Sequence and expression analysis of bovine pigment epithelium-derived factor. *Biochem. Biophys. Act.*, 1998; 1398: 203–214
- [52] Saishin Y., Silva R.L., Saishin Y., Kachi S., Aslam S., Gong Y.Y., Lai H., Carrion M., Harris B., Hamilton M., Wei L., Campochiaro P.A.: Periocular gene transfer of pigment epithelium-derived factor inhibits choroidal neovascularization in a human-sized eye. *Hum. Gene Ther.*, 2005; 16: 473–478
- [53] Silverman G.A., Bird P.I., Carrell R.W., Church F.C., Coughlin P.B., Gettins P.G., Irving J.A., Lomas D.A., Luke C.J., Moyer R.W., Pemberton P.A., Remolad-O'Donnell E., Salvesen G.S., Travis J., Whiststock J.C.: The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 33293–33296
- [54] Singh V.K., Chader G.J., Rodriguez I.R.: Structural and comparative analysis of the mouse gene for pigment epithelium-derived factor (PEDF). *Mol. Vis.*, 1998; 4: 7
- [55] Sondell M., Lundborg G., Kanje M.: Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J. Neurosci.*, 1999; 19: 5731–5740
- [56] Steele F.R., Chader G.J., Johnson L.V., Tombran-Tink J.: Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993; 90: 1526–1530
- [57] Sugita Y., Becerra S.P., Chader G.J., Schwartz J.P.: Pigment epithelium-derived factor (PEDF) has direct effects on the metabolism and proliferation of microglia and indirect effects on astrocytes. *J. Neurosci. Res.*, 1997; 49: 710–718
- [58] Taniwaki T., Becerra S.P., Chader G.J., Schwartz J.P.: Pigment epithelium-derived factor is survival factor for cerebellar granule cells in culture. *J. Neurochem.*, 1995; 64: 2509–2517
- [59] Taniwaki T., Hirashima N., Becerra S.P., Chader G.J., Etcheberrigaray R., Schwartz J.P.: Pigment epithelium-derived factor protects cultured cerebellar granule cells against glutamate-induced neurotoxicity. *J. Neurochem.*, 1997; 68: 26–32
- [60] Tombran-Tink J.: The neuroprotective and angiogenesis inhibitory serpin, PEDF: new insights in phylogeny, function and signaling. *Front. Biosci.*, 2005; 10: 2131–2149
- [61] Tombran-Tink J., Chader G.J., Johnson L.V.: PEDF: a pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity. *Exp. Eye Res.*, 1991; 53: 411–414
- [62] Tombran-Tink J., Johnson L.V.: Neuronal differentiation of retinoblastoma cells induced by medium conditioned by human RPE cells. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.*, 1989; 30: 1700–1707
- [63] Tombran-Tink J., Mazuruk K., Rodriguez I.R., Chung D., Linker T., Englander E., Chader G.J.: Organization, evolutionary conservation, expression and unusual Alu density of the human gene for pigment epithelium-derived factor, a unique neurotrophic serpin. *Mol. Vis.*, 1996; 2: 11
- [64] Tombran-Tink J., Pawar H., Swaroop A., Rodriguez I., Chader G.J.: Localization of the gene for pigment epithelium-derived factor (PEDF) to chromosome 17p13.1 and expression in cultured human retinoblastoma cells. *Genomics*, 1994; 19: 266–272
- [65] Tombran-Tink J., Shivaram S.M., Chader G.J., Johnson L.V., Bok D.: Expression, secretion, and age-related downregulation of pigment epithelium-derived factor, a serpin with neurotrophic activity. *J. Neurosci.*, 1995; 15: 4992–5003
- [66] Volpert O.V., Zaichuk T., Zhou W., Reiher F., Ferguson T.A., Stuart P.M., Amin M., Bouck N.P.: Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor. *Nat. Med.*, 2002; 8: 349–357
- [67] Wang L., Schmitz V., Perez-Mediavilla A., Izal I., Prieto J., Qian C.: Suppression of angiogenesis and tumor growth by adenoviral-mediated gene transfer of pigment epithelium derived factor. *Mol. Ther.*, 2003; 8: 72–79
- [68] Whiststock J.C., Pike R.N., Jin L., Skinner R., Pei X.Y., Carrell R.W., Lesk A.M.: Conformational changes in serpins: II. Mechanism of activation of antithrombin by heparindaggar. *J. Mol. Biol.*, 2000; 301: 1287–1305
- [69] Whiststock J.C., Skinner R., Lesk A.M.: An atlas of serpin confirmations. *Trends Biochem. Sci.*, 1998; 23: 63–67
- [70] Wick A., Wick W., Waltenberger J., Weller M., Dichgans J., Schultz J.B.: Neuroprotection by hypoxic preconditioning requires sequential activation of vascular endothelial growth factor receptor and Akt. *J. Neurosci.*, 2002; 22, 6401–6407
- [71] Yabe T., Wilson D., Schwartz J.P.: NFkB activation is required for the neuroprotective effects of pigment epithelium-derived factor (PEDF) on cerebellar granule neurons. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 43313–43319
- [72] Yamagishi S., Amano S., Inagaki Y., Okamoto T., Takeuchi M., Inoue H.: Pigment epithelium-derived factor inhibits leptin-induced angiogenesis by suppressing vascular endothelial growth factor gene expression through anti-oxidative properties. *Microvasc. Res.*, 2003; 65: 186–190