

# Alfa-fetoprotein

## - historie a význam jeho objevu (2. část)

### Syntéza AFP

Gen odpovědný za syntézu AFP je členem „albuminoid gene superfamily“, kam patří geny pro AFP, sérový albumin, vitamin D-binding protein (Gc-globulin) a alfa-albumin (afamin). U člověka jsou tyto albuminoidní geny lokalizovány tandémově na chromosomu 4 v oblasti 4q11-q22 zahrnující u AFP 15 exonů a 14 intronů. Tato nadrodina je strukturálně charakterizována cysteinovými zbytky, které jsou poskládány do vrstev vytvářejících kličky, diktované disulfidovými můstky; tak vzniká tripletová doména s molekulovou strukturou ve tvaru písmene U. Homologie aminokyselinové sekvence AFP a albuminu svědčí pro hypotézu, že oba proteiny vznikly v evoluci jako důsledek duplikace společné tripartity ancestrálního genu.

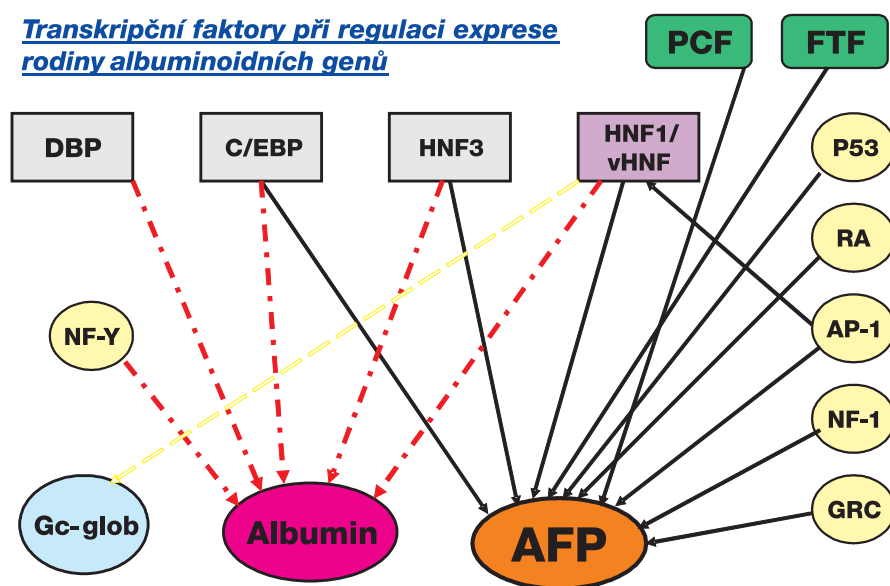
Syntéza polypeptidového řetězce AFP, která je v průběhu ontogeneze i za různých patologických stavů (stoupající a klesající produkce v prenatálním vývoji, náhlý pokles krátce po porodu, obnovená syntéza u určitých nádorových onemocnění nebo při regeneraci jaterního parenchymu) navozena stimulací „promotor-coupling elementu (PCE)“, jehož aktivitu spouští „fetoprotein transcription factor“. Na genové expresi nebo represi (silencing) se však ještě podílí další faktory: především faktor označovaný jako Nkx2.8, jehož aktivita je regulována vývojově, dále pak faktory HNF1 a HNF3, NF1, Zhx2, FOXA nebo receptor thyreoidních hormonů. Na základě experimentálních modelů se prokázalo, že exprese AFP-genů je regulována především ve fázi transkripce. Regulační oblast AFP-genu obsahuje tkáňově specifický promotor, tři nezávislé „enhancery“ a dále ales-

poň dva „silencery“. Regulace exprese specifického jaterního genu je komplexní a několikastupňový proces, který vyžaduje průběžné změny v aktivitě a koordinaci velkého počtu strukturálních, sekrečních a transportních proteinů a enzymů. Hepatocytový nukleární faktor (HNF) má při tom klíčovou úlohu. Až dosud bylo identifikováno několik rodin regulačních proteinů náležejících k HNF (HNF1 $\alpha$ , C/EBP, HNF3, HNF4 a HNF6). Proto-onkogeny, participující na procesech buněčné diferenciace a proliferace, jsou exprimovány v játrech vždy v určitém stádiu vývoje embrya. Po narození je jejich syntéza výrazně snížena, při regeneračních pochodech v játrech se exprese onkogenů, jako je *c-jun*, *c-fos*, a *c-myc*, významně zvyšuje. Stejně tomu je tak i v některých buněčných liniích hepatomu. Podle Lazareviche aktivace AFP-promotoru, kterou se

zahajuje syntéza AFP, se děje komplexem HNF/FTF transkripčních faktorů. Tento komplex kompetuje o vazebná místa na promotoru s faktorem GRC a NF-1. Aktivita promotoru je závislá na molárním poměru HNF1/NF-1 v jádře a mění se podle stádia vývoje hepatocytů. Spolupůsobí přítom řada dalších faktorů (obr. 1).

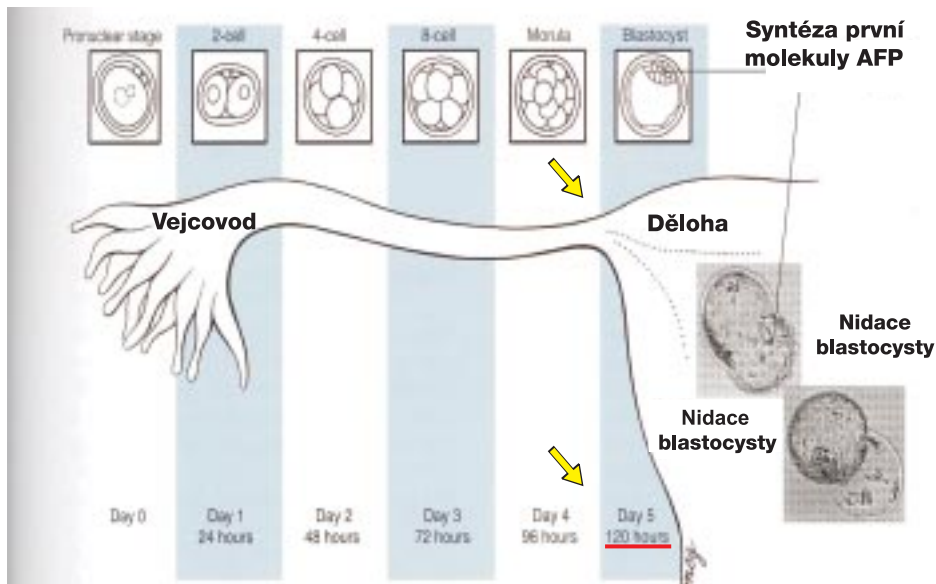
Místem syntézy AFP jsou játra (hepatoblasty), buňky žloutkového váčku (endodermal sinus) a pravděpodobně i buňky primitivního střeva, respektive viscerální endoderm, z něho odvozený endoderm žloutkového váčku, fetální hepatocyty a vyvíjející se primitivní střevní epitelium. Mezi produkcí albuminu a fetoproteinu existuje reciprokční vztah: zvýšená syntéza AFP je provázena sníženou syntézou albuminu. V průběhu ontogeneze myších embryí je možno prokázat imuno-

### Transkripční faktory při regulaci exprese rodiny albuminoidních genů



Lazarevich, N.L., 2000

Obr. 1: Transkripční faktory podílející se na expresi rodiny albuminoidních genů (AFP, albumin, Gc-globulin)



Obr. 2: Místa syntézy AFP v časném embryonálním období (průkaz myšičího AFP ve fázi implantace blastocysty)

histochemickou technikou AFP dříve než albumin, a to už uvnitř blastocysty, na vnitřní i vnější vrstvě primitivního endodermu. Z vnější vrstvy endodermu vzniká parietální endoderm, zatímco viscerální pochází z vnitřní vrstvy. *Lidský AFP je už exprimován 26. den po ovulaci* (průkaz pomocí mRNA-AFP) ve žlutkovém vaku, v endodermu zadního i středního střeva, v hepatálním divertiklu předního střeva. Embryonální játra vznikají v hepatální oblasti střevního endodermu, až když se tato oblast oddělí od dorzálního endodermu naléhajícího na notochord a ektoderm, které blokují expresi specifických jaterních genů. Expresie specifických jaterních genů, které navozují syntézu AFP a albuminu, se mohou objevit kdekoli v embryonálním střevě, pokud je vystaveno přímo kardiogennímu mesodermu. Aktivace se účastní **fibroblastový růstový faktor (FGF)**. Kromě toho je k tomu nutná přítomnost endotelových buněk vyvíjejícího se krevního řečiště. Mezi **32. až 52. dnem** je AFP exprimován v tubulech a v mezonefrickém duktu, přechodně pak (mezi 40. a 50. dnem) i v pankreatu (obr. 2).

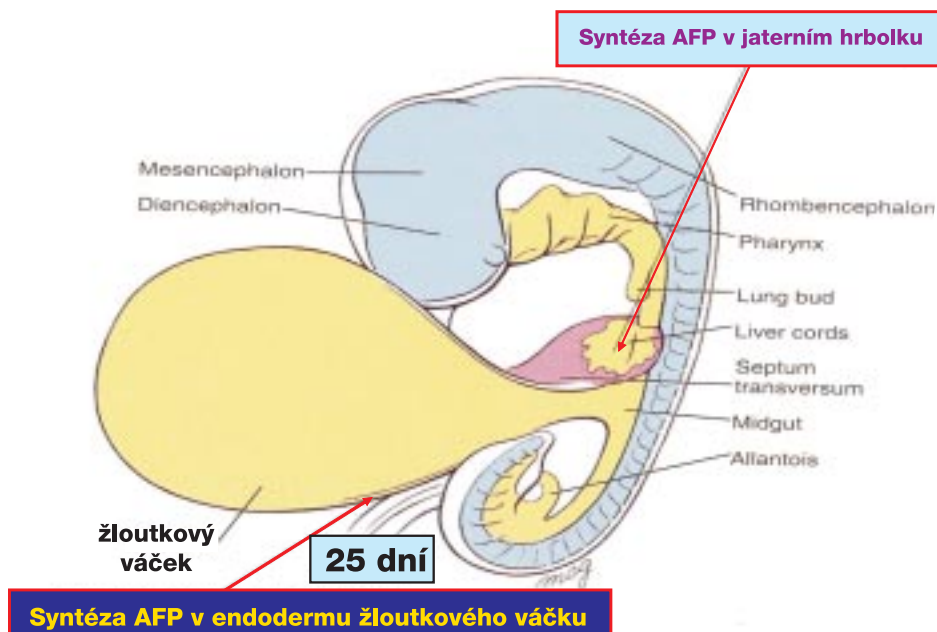
Není však exprimován v metanefrické ledvině, je ale též v této fázi exprimován v endodermu žlučových a žlučníku. AFP byl prokázán rovněž v tkáni fetálního mozku, ale jeho syntéza není v této tkáni pravděpodobná. Jeho přítomnost v nervové tkáni je zřejmě do 20. týdne nezbytná pro diferenciaci a vývoj neuronů; v třetím trimestru těhotenství už není prokazatelný. Uriel vysvětluje přítomnost AFP ve vyví-

jející se mozkové tkáni dodávkou polyneenasycených mastných kyselin transportovaných pomocí AFP. Nevyjasněná je syntéza AFP v tkáni placenty; u 14 dní starých hovězích embryí byl AFP detekován též v trofoblastu. Přítomnost AFP v ovidukální tekutině se vysvětluje nálezem ovidukální tekutiny-1 (HOV-1), glykoproteinu o  $M_r=54$  kDa a s obsahem sacharidů 8 %, produkovaným buňkami vejcovodu, a který vykazuje antigenní identitu s AFP; je považován za kmenovou (truncated) formu AFP. Syntéza (přítomnost) AFP (molekulových variant) a její vymizení v různých tkáních (buňkách) v průběhu vývoje plodu je podmíněna různorodou funkcí AFP v daném stádiu vyvíjejícího se embrya a fetu (obr. 3).

## Standardizace stanovení AFP (mezinárodní standard)

Pro praktické (klinické) i výzkumné potřeby bylo nutné kvantitativní stanovení AFP v biologických tekutinách standardizovat. Pro porovnání výsledků bylo třeba se alespoň dohodnout na jednotném mezinárodním standardu (etalonu), který by nejprve vyjadřoval srovnatelné hodnoty formou mezinárodních jednotek. WHO/AIRC připravila mezinárodní standard a určila, že obsahuje 100  $\mu$ U, jiný standard (British Standard) má hodnotu 98,5  $\mu$ U. V referenčním materiálu označeném jako WHO 72/225 jedna IU = 1,21 ng AFP. V seznamu IRMM (Belgie) je uváděn AFP-standard jako BCR-486. V roce 1998 byl uskutečněn ISOBM „workshop“, na němž několik pracovišť zkoumalo specifitu a afinitu 30 monoklonálních myšičích IgG-protilátek proti AFP a jejich způsobilost pro radioimunometrická měření a zjistilo, že některé se hodí pro tato měření, jiná ne (tab. 1).

*Poznámka:* Imunochemické metody (používající odlišnou metodiku, zejména s odlišnými vlastnostmi protilátek) mohou dávat diametrálně rozdílné výsledky u enormě zvýšených hodnot AFP. U kojence s nádorem v břiše a s naměřenou hodnotou 1.844 milionů kU/l v jedné laboratoři se výrazně lišila od naměřené hodnoty (452 kU/l) na jiném pracovišti. Vícenásobným nařazením séra byla prokázána správnost hodnoty vysoké (tzv. „hook“ efekt).



Obr. 3: Syntéza lidského AFP ve fázi časné organogeneze

Metody kvalitativní (detekce)	Použití	Citlivost	Autor (aplikace pro AFP)
Dvojitá imunodifuze ( <i>Ouchterlony</i> )	Průkaz v biologických tekutinách	2-5 mg/l	Masopust, J., 1966
Protisměrná imuno elektroforéza	Průkaz v biologických tekutinách	0,5 mg/l	
Imunoautoradiografie	Průkaz v tkáních (imunohistochemie)	0,1 - 0,05 mg/l	Abelev, G.I., 1971
Imunoflorescence histochemie	Průkaz v tkáních (imunohistochemie)		Engelgardt, N.V., et al., 1971
Hemaglutinace	Kvalitativní průkaz		Lehmann, F.G., 1974
Latex-aglutinace	Kvalitativní průkaz		Alpert, M.E., 1974
Imunoautoradiografie	Průkaz v tkáních		

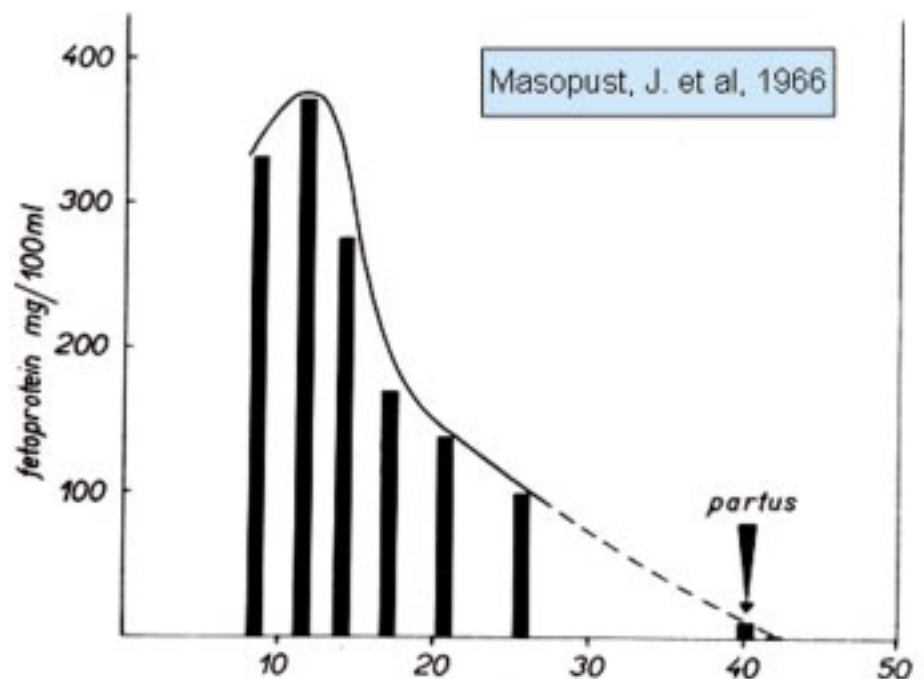
## Vývoj AFP v prenatálním a postnatálním období

Monitorování koncentrace AFP ukázalo, že jeho hladina v krevním séru prodělavá v průběhu ontogeneze charakteristický vývoj: U člověka je možno AFP prokázat v cirkulaci (imunoprecipitace na Ouchterlonyho plotně) před 8. týdnem nitroděložního života; maximální koncentrace (~4 g/l) dosahuje kolem 14. týdne, pak rychle klesá na hodnoty poloviční až třetinové (v 18. - 20. týdnu), poté následuje pomalejší pokles. Při porodu (pupečnicková

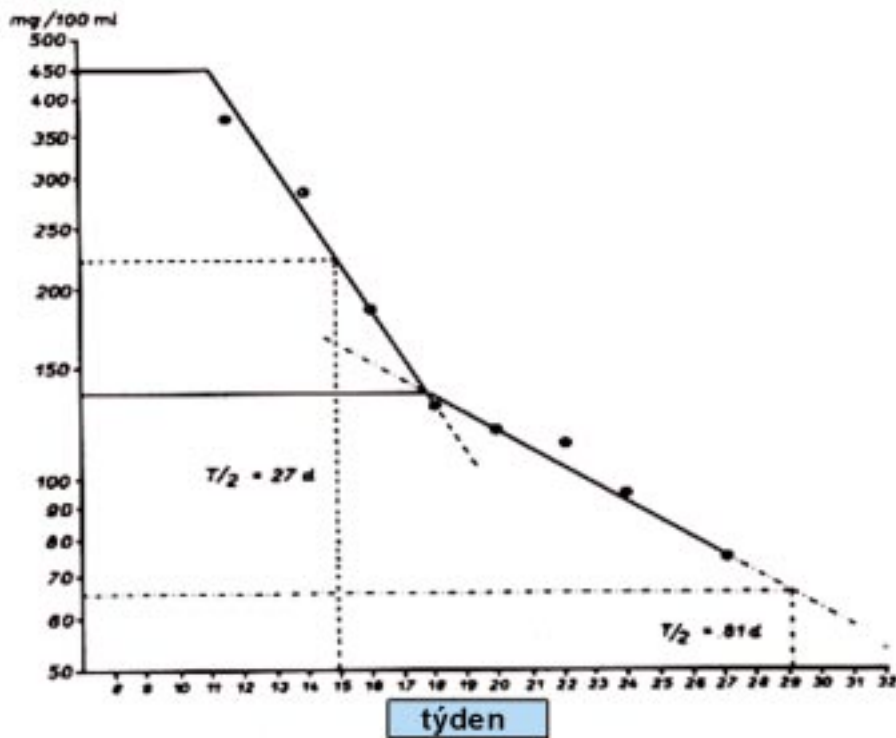
Metody kvantitativní (v biologických tekutinách)	Citlivost	Autor (použití pro AFP)
Radiální imunodifuze ( <i>Mancini</i> )	2,5 mg/l	Komerční soupravy
Elektroimmunomigrace	2 mg/l	Masopust, J., Tomášová, H., 1966
Elektroimunodifuze ( <i>Laurell</i> )	0,5 mg/l	
Radioimunoesej	25 µg/l	Ruoslahti, E. et Seppällä, M., 1972
RIEP	20 µg/l	Norgaard-Pedersen, B., 1973
ELISA		
"Flow injection" chemiluminiscence	0,5 µg/l	Lin, J., 2004
"Flow injection" amperometric enzyme-immunoassay	0,07 µg/l	Della Ciana, L., 1996
Immunochromatographic strip assay (semikvantitativní)		Chuang, L. et al., 2004
Flow-injection chemifluorescent immunoassay	2,7 µg/l	Fu, Z. et al., 2006
Multi-array immunoassay based on insert-plug model of piezoelectric immunosensor	20-640 µg/l	Zhang, B. et al., 2007
Tandem bioluminescent immunoassay (BLIA) using aequorin labeled Fab fragment and bionylated firefly luciferase	1,95-1000 µg/l	Ito, K. et al., 2007
Electrochemical immunoassay on a micro-fluidic device with sequential injection and flushing function	Detection limit: 0,1 ng	Nashida, N. et al., 2007
Ag/SiO <sub>2</sub> core-shell nanoparticle-based surface-enhanced Raman probes for sandwich-immunoassay	Detection limit 11,5 pg/l	Gong, J.L. et al., 2007

Tab. 1: Přehled metod pro důkaz a stanovení AFP

Byly vyvíjeny další metody stanovení AFP, citlivější a specifitější a umožňující jejich automatizaci. Mezi takové patří kupř. rychlá semikvantitativní imunochromatografická proužková metoda s vyhodnocením na optickém skeneru. Nedávno byla aplikována citlivá a specifická technika: *Flow-injection chemiluminescent immunoassay system based on a novel transparent immunoaffinity reactor* pro kvantitativní stanovení AFP, s koncentračním rozsahem 5-100 µg/l a detekčním limitem 2,7 µg/l (signal/noise ratio 3). Metoda je porovnatelná s radioimmunometrickým stanovením. Při mezilaboratorním srovnávání hodnot AFP naměřených v testovaných vzorcích se ukazuje, že stále existují rozdíly ve výsledcích. Koeficient variace při stanovení testovaných vzorků AFP mezi 12 laboratořemi kolísá od 12,56 do 117,87.



Obr. 4: Vývoj sérové koncentrace AFP v prenatálním období



Obr. 5: Křivka poklesu AFP v semilogaritmické stupnici

krev) hladina bývá mezi 20 - 200 mg/l (průměr 117 mg/l) (kvantitativní stanovení provedeno pomocí elektroimmunomigrace, citlivost: 2 mg (AFP/I) (obr. 4). (Pro kvantitativní stanovení AFP jsme ještě využívali dvojitou radiální imunodifuzi podle Manciniové a především tzv. „raketkovou“ imunoelektroforézu podle Laurella: antigen-antibody crossed electrophoresis.)

V semilogaritmické stupnici je prudší pokles po 14. týdnu charakterizován poločasem  $T/2 = 26$  dní, pozvolnější sklon má  $T/2 = 81$  dní. Po porodu ubývá AFP v cirkulaci ještě rychleji ( $T/2 = 4,05$  dne). Přepočteme-li koncentraci AFP v séru na 1 g tělesné váhy plodu, dostaneme hodnoty zvyšující se prudce s věkem fétu do 14. týdne, pak se drží přibližně na stejné hodnotě až asi do 28. týdne nitroděložního života (produkce je v rovnováze s degradací a se zředováním v narůstajícím cirkulujícím objemu plodu), (obr. 5).

Po porodu jsme našli rozdíl v prokazatelnosti AFP (detekce pomocí Ouchterlonyho techniky - senzitivita: 3-5 mg/l) mezi novorozenci donošenými a nedonošenými (porodní hmotnost: 1300 - 2200 g). Ubývání u nedonošených bylo pomalejší: U donošených novorozenců byl AFP touto technikou po 4. týdnu už ve všech případech neprokazatelný, u nedonošených byla patrná precipitační linie ještě u 10 %.

Velmi citlivými technikami jako je radioimunoesej byl nalezen AFP v řádově nižších koncentracích (kolem 10  $\mu\text{g/l}$ ) též

u zdravých dospělých jedinců. Otázkou zůstává, které buňky tuto reziduální syntézu AFP realizují - (všechny zralé hepatocyty v základním minimálním množství nebo jen ojedinělé hepatoblasty přetrvávají-

Věková skupina	AFP
Novorozenci (pupečník)	20 - 200 mg/l
2 měsíce	93,3 ± 32,1 $\mu\text{g/l}$
3-4 měsíce	27,9 ± 21,2 $\mu\text{g/l}$
5-7 měsíců	14,9 ± 11,3 $\mu\text{g/l}$
8-12 měsíců	13,1 ± 10,0 $\mu\text{g/l}$
(dospělí)	4 - 15 $\mu\text{g/l}$

Tab. 2: Hodnoty AFP v séru zdravých novorozenců (pupečník) a kojenců (ELISA)

Skupina	Median kIU/l ( $\mu\text{g/l}$ )	Průměr kIU/l ( $\mu\text{g/l}$ )	Geom. Průměr kIU/l ( $\mu\text{g/l}$ )	Interval (kvartilový) kIU/l ( $\mu\text{g/l}$ )	Interval (95-percentilový) kIU/l ( $\mu\text{g/l}$ )
Muži + ženy	2,60 (3,15)	3,23 (3,91)	2,67 (3,23)	1,73-4,00 (2,9-4,84)	0,81-8,81 (0,98-10,66)
Muži	2,70 (3,27)			1,90-4,05 (2,3-4,09)	
Ženy	2,50 (3,025)			1,60-4,00 (1,94-4,84)	
≥ 40 roků	2,00 (2,42)			0,50-11,50 (0,605-13,92)	
> 40 roků	3,10 (3,75)			0,90-18,40 (1,9-22,26)	

Tab. 3: Normální hodnoty (DELFLIA) u 264 krevních dárců uvádí Christiansen

Skupina	Median IU/ml ( $\mu\text{g/l}$ )	90% rozmezí IU/ml ( $\mu\text{g/l}$ )	Horní hranice (95% kvantil) IU/ml ( $\mu\text{g/l}$ )
Muži + ženy (n=382)	1,21 (1,46)	0,56 - 2,64 (0,68-3,19)	2,97 (3,6)
Ženy (n=119)	1,6 (1,94)	0,5 - 5,5 (0,61-6,66)	5 (6,05)

Tab. 4: Normální hodnoty testem IMMULITE

ci v játrech i po narození a produkující pro ně charakteristické vyšší množství). Abelev na základě experimentů, při kterých navozoval regeneraci jaterní tkáně u laboratorních myši a potkanů hepatotoxickými látkami, se přikláněl k druhé eventualitě.

Pomocí techniky ELISA (*Enzymum Test AFP, Boehringer, Mannheim*) hodnoty AFP v séru u zdravých novorozenců a kojenců (62) ukazuje tabulka č. 2. (T. 3, 4)

Na rozdílné hodnoty AFP upozorňuje vyšetření 1335 mužů od věku 15 let u některých ze sedmi etnických skupin (Číňané, Indové, Malajci ze Singapuru, tři skupiny afrických černochů, běloši z Lyonu), kterou provedl Sizaret. Signifikantní rozdíl byl mezi Afričany a skupinou Singapur-Lyon. Prokázal též, že hodnoty se zvyšují s věkem. Ball našel u 270 dárců krve (Houston, USA) průměrnou hodnotu AFP  $3,04 \pm 1,9 \mu\text{g/l}$ . Přitom hodnoty u mužů byly významně vyšší ve srovnání s ženami. S věkem rovněž stoupaly.

## AFP v krevním séru těhotných žen (prenatální diagnostika)

AFP produkovaný plodem se dostává do amniotické tekutiny, proniká i placentární bariérou a dostává se tak do krevní cirkulace matky. Vyšetřování hladiny AFP v séru těhotných žen za fyziologických podmínek ukázalo, že stanovení koncentrace AFP pomáhá odhalit některé vývojové anomálie plodu (vrozené rozštěpy neuronální trubice; m. Down a další) a může být

také přínosem **pro diagnostiku patologického těhotenství** (kupř. *preeklampsie, intrauterinní retardace plodu, dysfunkce nebo nezralost placenty*). Výrazněji zvýšené hodnoty AFP mohou být prognosticky špatným znamením svědčícím pro komplikaci těhotenství jako je *ruptura* nebo *hematom* či *hemangiom pupečníku, non-imunní hydrops fetalis* a *polyhydramnion*. Zvyšující se hodnoty AFP v cirkulaci matky v průběhu těhotenství jsou způsobeny transplacentární a transamniotickou pasáží z fetu do matky. V prvních týdnech se do amniové tekutiny dostává AFP ze struktur žlutkového vaku, od druhého trimestru pak především z moči fetu. Frakce AFP vázající se silně na aglutinin z *Lens culinaris* (AFP-L3) je vyšší u těhotných s plodem postiženým trisomií 21. Nižší hodnoty AFP v plodové vodě u Downova syndromu ve srovnání se zdravým plodem jsou pravděpodobně způsobeny změnami v konformaci molekuly AFP navozené buď při vylučování AFP poškozenou ledvinou fetu (pyeloectasis) nebo při průchodu alterovanou placentární bariérou.

### Fylogeneze AFP (srovnání elektroforetických a imunologických vlastností různých savčích druhů)

AFP je normální složkou spektra plasmatických bílkovin v embryonálním a fetálním období všech savčích druhů (možná všech obratlovců?). Fetoproteiny různých savčích druhů se sice liší svojí elektroforetickou pohyblivostí, ale základní znaky této bílkoviny, tj. přítomnost v časně fázi ontogeneze a pouze stopová množství u dospělých jedinců, jsou stejné (obr. 6).

O tom, že jde o strukturálně (homologie polypeptidového řetězce) velmi podobný protein, svědčí imunologické testy (dvojitá imunodifuze podle Ouchterlonyho). Imunologickou parciální identitu jsme našli uvnitř jednotlivých řádů. *Carnivora*: pes - kočka, *Artiodactyla*: kráva - koza - ovce - prase; u některých jen vzdálenou - *Rodentia*: krysa - králík, - křeček; morče - křeček. Poněkud překvapivý byl nálezní imunologické příbuznosti (i když velmi malé) mezi druhy taxonomicky vzdálenými jako je člověk a skupina: pes, kočka nebo pes a prase či koza a skupina: krysa a křeček, dále křeček a skupina: pes, kočka,

koza, vepř, kůň. Tyto testy antigenní příbuznosti nasvědčují tomu, že v průběhu fylogeneze prodělávala molekula AFP strukturální změny, že však určité sekvence polypeptidového řetězce zůstaly homologní i se vzdálenějšími taxonomickými druhy (obr. 7). Rychlost vymizení (dokazatelnost pomocí Ouchterlonyho dvojité radiální imunodifuze) fetoproteinů z krevního séra po porodu u různých živočišných druhů odvisí od stupně zralosti porozeného plodu. Kupř. u morčete, které se rodí relativně zralé, je AFP již neprokazatelný 2. den, zatímco štěňata psa, po narození ještě značně nezralá, mají AFP v cir-

kulaci ještě 15. den. Také rychlost katabolismu AFP (tj. T/2) je nepřímo úměrná velikosti určitého živočišného druhu a rychlosti jeho metabolického obratu. Kupř. u kočky je rychlejší než u psa.

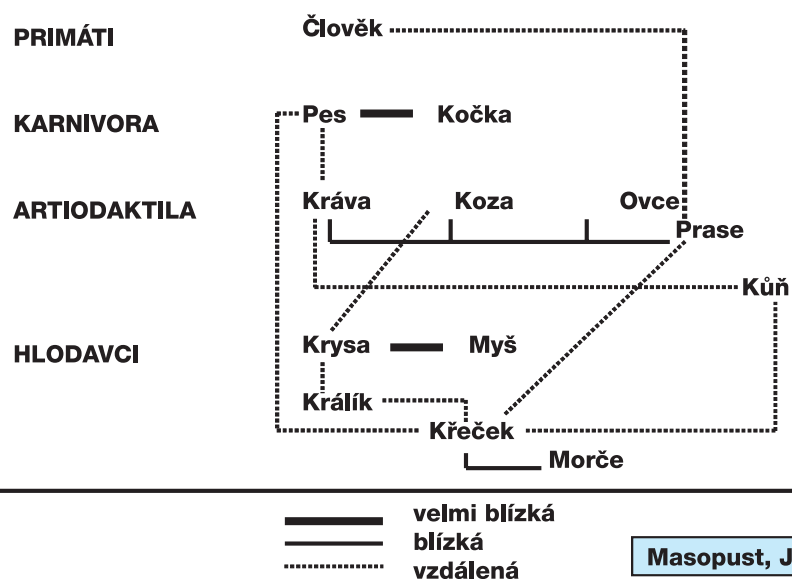
### Biologická funkce a biologický účinek AFP (a jeho fragmentů)

Ukazuje se, že AFP není užitečný jen jako marker určitých stavů fyziologických (kupř. regenerace jaterních buněk) nebo patologických (nádorová onemocnění, abnormality vývoje plodu), ale že působí

FETUS of	GELLOGEL					STARCH-GEL				POLYACRYLAMIDE GEL				IMMUNO-ELECTROPHORESIS					
	A	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\beta_1$	$\beta_2$	A	post	Fa	Trf	A	post	Crp	Trf	A	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\beta_1$	$\beta_2$	
MAN	■					■				■				■					
DOG				■				■					■						
CAT				■				■					■						
PIG				■				■					■						
COW				■				■					■						
GOAT				■				■					■						
SHEEP				■				■					■						
GUIN PIG					■				■										■
HAMSTER				■				■					■						
RABBIT				■				■					■						■
RAT				■				■					■						

Obr. 6: Fetoproteiny u různých živočišných druhů (elektroforetická pohyblivost)

### Imunologická příbuznost AFP mezi některými druhy



Masopust, J., 1972

Obr. 7: Schéma imunologické příbuznosti (odlišnosti) mezi jednotlivými živočišnými druhy

i jako **signální molekula**, která zastává důležité a různorodé biologické funkce ovlivňující vývoj buněk i celého organismu v embryonálním a fetálním období.

Do cílové buňky se dostává *specifickým receptorovým systémem (AFP/AFPFR) a endocytózou (clathrin-coated pits)*.

**AFP-receptor** je heterotrimerní glykosylovaný protein (65 kDa, 130 kDa a 185 kDa) o  $M_r = 250-300$  kDa. Je lokalizován hlavně na embryonálních buňkách; byl však také prokázán i na monocytech, T-lymfocytech, dokonce i na některých buňkách nádorových (kupř. na buňkách karcinomu mléčné žlázy). AFP přenáší do buněk endocytózou kupř. vyšší mastné kyseliny, které potřebují vyvíjející se a rostoucí embryonální buňky. Komplex se dostává takto do mikrotubulárních elementů a dále do transretikulární části Golgiho aparátu, kde se mastné kyseliny naváží na specifický vazebný protein (fatty acid binding-protein) a jsou dále inkorporovány do buněčných fosfolipidů.

(a) *Funkce podobné albuminu*: Při tvořících se zárodečích cévního systému v rozvíjejícím se embryu, kdy ještě nefungují primitivní játra, buňky žloutkového vaku secernují AFP, který plní *onkoticko-osmotickou funkci* (jako zásobní zdroj aminokyselin pro isoosmotickou regulaci intersticiálního prostoru a jako hlavní komponenta onkotického tlaku v cirkulaci) a dále *vazebnou (transferovou) funkci* pro různé substance ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ , mastné kyseliny, steroidy, retinoidy, flavonoidy, barviva, bilirubin, hematin, fytoestrogeny, dioxiny, různé organické látky) a také *blokovací funkci* (díky vysoké afinitě) vůči přebytku mateřského estradiolu-17 $\beta$ , který by mohl mít nepříznivý účinek na embryo nechráněné placentární bariérou. Nunez uvažuje, že různé biologické funkce AFP spočívají v různých mechanismech:

(1) Vazebnou afinitou na různé ligandy (víceenasycené mastné kyseliny, estrogeny, fytoestrogeny) ovlivňuje koncentraci volných forem těchto ligandů a moduluje tak negativně nebo pozitivně jejich aktivitu.

(2) Různé konformace (holoformy) molekuly AFP odvisí od povahy a koncentrace navázaných ligandů; to pak může ovlivnit vazbu AFP na specifický receptor a pozměnit tak jeho biologický účinek (internalizaci, dráhu signální transdukce).

(3) Kromě mechanismů uvedených sub 1 a 2, může AFP působit jako signální

molekula s účinkem růstového faktoru a ovlivnit tak proliferaci nebo diferenciaci buňky. Purifikovaný lidský AFP inhibuje v experimentu (buňky granulózy prasete) produkci estradiolu stimulovanou synergickým účinkem transformujícího růstového faktoru  $\alpha$  ( $\text{TGF}\alpha$ ) a „insulin-like“ růstového faktoru -1 ( $\text{IGF-1}$ ), a to v závislosti na množství. Usuzuje se z toho, že AFP by mohl potlačovat diferenciační aktivitu (steroidogenezi) podporující proliferaci buněk granulózy.

*Molekula AFP má dvě volné SH-skupiny na rozdíl od albuminu*. Volná skupina albuminu řadí tento protein mezi antioxidanty, které eliminují škodlivý účinek nadbytku reaktivních forem kyslíku a dusíku. AFP s dvěma SH-skupinami by mohl být v tomto smyslu ještě účinnější a *chránit tak vývoj embrya v nejrannějších stádiích vůči škodlivinám přicházejícím z cirkulace matky*. Také AFP-peptidy vzniklé změnou konformace terciární struktury molekuly AFP jako reakce na stresové a šokové podmínky navozené vysokými hodnotami estrogenů nebo insulinu mohou zmírnit jejich event. fetotoxický (teratogenní) účinek.

(b) *Ovlivnění imunokompetentních buněk (imunosupresivní efekt)*: AFP vykazuje *vazebnou kapacitu pro membránové receptory fetálních imunokompetentních buněk*, což může kupř. způsobit zablokování rozpoznání „cizorodých“ antigenů, podpořit supresorové buňky a později (po vytvoření placenty) podílet se na transportu mateřského IgG z cirkulace matky do cirkulace plodu. V pokusech při *in vitro* kultivaci linie *hepatomových Bel 7402 buněk* s ko-kulturou linie lymfomových buněk (*Jurkat cells*) bylo prokázáno, že přidání purifikovaného *AFP* (20 mg/l) *může podpořit jejich přežívání* (antiapoptózní efekt navozený blokováním signální dráhy kaspas a ovlivněním interakce *Fas/Fasl* mezi nádorovými buňkami a protinádorovými T-lymfocyty) a umožnit tak jejich únik imunologickému dohledu hostitelských T-buněk. Byly identifikovány peptidové epitopy (určité sekvence) molekuly AFP, které jsou rozpoznávány lidskými T-buňkami v kontextu MHC třídy I, a to membránovými histokompatibilními antigeny HLA-A\*0201.

Jde o skupinu tří nových sekvencí **hAFP(137-145)**, **hAFP(158-166)**, **hAFP(325-334)** a dříve rozpoznanou

**hAFP(542-550)**. Každý epitop má dvě zakončující sekvence (anchor residues) pro T2-buňky. Tyto čtyři peptidy byly též nalezeny na membránách HLA-A\*0201 buněčných linií lidského hepatocelulárního karcinomu; jsou průkazně imunogenní a autoři je považují za možné cílové molekuly pro imunoterapii HCC. Prokazuje to experiment s AFP-epitopem (PLA-AFP218-226), aplikovaným v podobě mikrokuliček a fagocytovaným dendritickými buňkami, což navodilo cytotoxicitu T2-buněk, které zničily nádorové buňky linie HepG2.

(c) *Růst-regulující aktivita (pro embryonální i nádorové buňky)*: Tato aktivita je kriticky odvislá od koncentrace AFP; při nízkých koncentracích nejsou ovlivněny normální ani nádorové buňky, naopak koncentrace AFP vyšší než 2,0 - 3,0  $\mu\text{M}$  navozují signifikantní supresi nádorových buněk (indukcí cytostázy, cytotoxicity a apoptózy). Na základě experimentálních dat se někteří autoři domnívají, že indukce apoptózy nádorových buněk aplikací AFP se neděje prostřednictvím signalizace *Fas/Fasl* nebo *TNFR/TNF*, ale *aktivací efektorové „caspase-3-like“ proteasy*.

(d) *Účinek s vlastnostmi homeodomenového faktoru*, který usměrňuje a kontroluje charakter a rozmístění buněk v tvořících se tkáních a orgánech v průběhu ontogeneze. Tento účinek nastupuje zřejmě už v nejčasnějších fázích vývoje embrya (implantace blastocysty). Aminokyselinové sekvence určitých peptidových fragmentů molekuly AFP vykazují identitu nebo vysokou similaritu s fragmenty homeodomenových faktorů (jako *Pou Pax, Wnt, notch atd.*)

(e) *Vliv na fertilizaci žen*: Nedostatek AFP navozuje androgenizaci (syndrom polycystických ovarií).

*Poznámka*: Biologická úloha AFP je objasňována identifikací funkčních míst (úseků) resp. peptidových fragmentů jeho molekuly, tj. srovnáním primární struktury s jinými biologicky aktivními proteiny patřícími do téže nadrodiny (albuminoid gene superfamily) (*strukturálně funkční mapa AFP*) nebo i jiných proteinů s obdobnou aminokyselinovou sekvencí v některých peptidových fragmentech.

(Literatura u autora: jaromasopust@seznam.cz)