

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

TOM 23 NR-2'96
(145–316)

2475
F. G. G.

Postępy Biologii Komórki

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki, Polskiej Sieci UNESCO oraz Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej wydawany z częściową pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych.

Redaguje Kolegium:

Szczepan BILIŃSKI (biologia rozwoju, embriologia, cytoszkielet, połączenia międzykomórkowe – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*),

Jerzy KAWIAK (immunologia, cytometria, hematologia, biologia nowotworów – *Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*),

Maciej KAWALEC (*Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*),

Wincenty KILARSKI (mięśnie, skurcz mięśniowy, ruchy komórek – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*),

Jan MICHEJDA (szlaki informacyjne, błony komórek, energetyka komórki – *Zakład Bioenergetyki UAM, 61-701 Poznań, ul. Fredry 10*),

Maria OLSZEWSKA (komórki roślinne, informacja genetyczna w komórkach roślinnych i zwierzęcych – *Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin Instytutu Fizjologii i Cytologii UŁ, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16*),

Maciej ZABEL (histologia ogólna, endokrynologia, histochemia (immunocytochemia, hybrydocytochemia), ultrastruktura komórek – *Zakład Histologii AM, 50-368 Wrocław, ul. Chałubińskiego 6a*)

Rada Redakcyjna:

Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca, Mieczysław CHORAŻY, Leszek CIECIURA, Antoni HORST, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŹNICKI,

Olgierd NARKIEWICZ, Aleksandra PRZEŁĘCKA, Aleksandra STOJAŁOWSKA,

Lech WOJTCZAK

Adres Redakcji: Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, tel. 340 344, fax 340470.

© Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej

Wszystkie prawa zastrzeżone. Zabrania się kopiowania części lub całości bez uprzedniego pisemnego zezwolenia Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

Ark. wyd. 12 Ark. druk. 10,75 Oddano do składu w marcu 1996 r. Podpisano do druku w maju 1996 r. Druk ukończono w maju 1996 r.

W tym zeszycie • Postępów Biologii Komórki •

- Aneksyny tworzą rodzinę cytoplazmatycznych białek wiążących się z anionowymi fosfolipidami w obecności mikromolowych stężeń Ca^{++} . W komórce aneksyny występują w formie rozpuszczalnej i związanej z błonami. Ich biologiczne funkcje są intensywnie badane w wielu laboratoriach (s. 151).
- Cytogenetyczne podtypy przewlekłej białaczki szpikowej (CML) omówiono w artykule na stronie 169 i 183. Przewlekła białaczka szpikowa z obecnym we wszystkich komórkach nowotworowych chromosomem Ph powstałym w wyniku translokacji t(9;22)(q34;q11) jest określana jako standardowa albo klasyczna. Od 10 do 25 procent przypadków CML stanowią odmienne jej postaci: Ph ujemna, z obecnością chromosomu Ph jedynie w części komórek nowotworowych oraz z chromosomem Ph powstałym w wyniku innej translokacji niż standardowa.
- Transformacja nowotworowa nabłonka jelita grubego jest uwarunkowana mutacjami o charakterze dziedzicznym i somatycznym. W komórkach są gromadzone mutacje genów przeciwnowotworowych aktywujących protoonkogeny i zaangażowanych w naprawę DNA. Mutacje prowadzą do zmiany funkcji produktów białkowych tych genów. Artykuł na stronie 279 warto porównać z informacjami artykułów PBK nr 20, 1993, s. 311 i nr 21 1994 s.243.
- Określenie udziału układu immunologicznego w zwalczaniu chorób nowotworowych jest ważnym problemem w onkologii. Swoiste oddziaływanie limfocytów T zależy od konfiguracji receptora limfocytów T (TCR). Limfocyty T naciekające nowotwór stanowią nieliczne klony komórek. Przyjmuje się to za dowód na selektywny udział limfocytów T w odpowiedzi na nowotwór (s. 197).
- W artykule na stronie 221 omówiono cztery główne klasy receptorów powierzchni komórek. Funkcje innego rodzaju receptora – receptora elastynowego omówiono na stronie 243. Receptor elastynowy bierze udział w powstawaniu włókien sprężystych oraz w procesach chemotaksji i migracji komórek zachodzących w prawidłowym rozwoju i w procesach patologicznych, takich jak: reakcje zapalne, miażdżyca, rozsiew komórek nowotworowych.
- Receptory jądrowe hormonu tarczycy, kwasów retinowych i witaminy D3 omówiono w artykule na stronie 261.
- Prawdopodobny udział zjawiska apoptozy i jego zaburzeń w patogenezie chorób układu nerwowego został omówiony na stronie 299. Autorzy nawiązują do wcześniejszych artykułów w PBK na temat apoptozy (PBK nr 21 1994 s. 303 i nr 22 1995 s. 247). Warto porównać informacje zawarte w tym artykule z informacjami o p53 w artykule na str. 279.



WSPOMNIENIE POŚMIERTNE
o Profesorze dr hab. n. med. dr h.c.
KAZIMIERZU STOJAŁOWSKIM
(01.10.1903–21.12.1995)

Profesor Kazimierz Stojalowski urodził się w Toruniu w 1903 r. w rodzinie robotniczej, jako najstarszy z czworga rodzeństwa. Uczęszczał kolejno: do Szkoły Podstawowej na Mokrem (1910–1914) i Szkoły Wydziałowej w Toruniu (1914–1917). Maturę uzyskał w Gimnazjum Męskim w Toruniu w 1922 r.

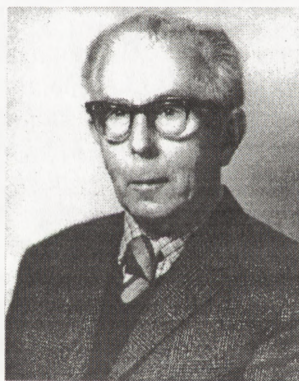
Studia lekarskie odbył w latach 1922–1928 na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Poznańskiego uzyskując dyplom doktora Wszech Nauk Lekarskich dnia 16.06.1928 r.

Po dwuletniej pracy w Sanatorium dla Płucno-Chorych w Kowanówku całe swoje życie związał z anatomią patologiczną. Za swego nauczyciela uważał Prof. Ludwika Skubiszewskiego.

W Zakładzie Anatomii Patologicznej w Poznaniu pracował na stanowisku adiunkta z przerwą od 1932 r. aż do 1947 r. Równolegle w latach 1933–1938 pracował jako wolontariusz na Oddziale Wewnętrznym w Szpitalu Elżbietanek w Poznaniu, uzyskując tytuł specjalisty chorób wewnętrznych. Został zweryfikowany w 1952 r. jako specjalista II^o. W 1935–1937 r. pracował w Pogotowiu Ratunkowym. W 1938 r. na własny koszt przebywał przez 3 miesiące we Francji i Niemczech zapoznając się z pracą anatomopatologiczną w Institut du Cancer i w Institut Pasteur w Paryżu, a także z ośrodkami anatomii patologicznej w Bordeaux, Tuluzie, Lyonie, Berlinie, Dreźnie, Monachium, Lipsku, Tybundze, Stuttgarcie i Frankfurcie nad Renem.

Brał udział w wojnie polsko-bolszewickiej w 1920 r. jako szeregowiec 18 Pułku Ułanów Pomorskich i w 1939 r. w obronie Warszawy jako lekarz batalionowy.

W czasie II Wojny Światowej wysiedlony do Gorlic pracował w Ubezpieczalni Społecznej, zorganizował i kierował Polskim Komitetem Opiekuńczym w powiatach Gorlice i Jasło.



Po wojnie po krótkiej pracy w Toruniu jako naczelnny lekarz Ubezpieczalni Społecznej powrócił do Poznania. Zorganizował ponownie Zakład Anatomii Patologicznej, aby już w kwietniu 1945 r. rozpocząć pracę dydaktyczną. W lipcu 1945 r. habilitował się na podstawie pracy "Morfologiczne badania porównawcze nad rolą układu mezenchymalnego, a w szczególności w zapaleniu hiperergicznym i goścocowym". Praca ta została nagrodzona w 1947 r. przez Polską Akademię Umiejętności. W latach 1945–1947 był delegatem docentów w Radzie Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Poznańskiego i Dyrektorem Studium Lekarsko-dentystycznego. W latach 1947–1948 jest adiunktem w Zakładzie Medycyny Sądowej. Przez cały powojenny okres pobytu w Poznaniu dodatkowo pracuje w redakcji "Nowiny Lekarskie" i sekretariacie Poznańskiego Towarzystwa Przyjaciół Nauk.

We wrześniu 1948 r. zostaje powołany do Szczecina jako kierownik Katedry Anatomii Patologicznej Pomorskiej Akademii Medycznej z równoczesnym mianowaniem na profesora nadzwyczajnego. Zakład Anatomii Patologicznej organizuje od podstaw, przekształcając go w nowoczesną placówkę naukowo-dydaktyczną i usługową, organizując ukierunkowane pracownie naukowo-dydaktyczne. Powstała placówka miała już w latach sześćdziesiątych charakter instytutu patologii z mikroskopią elektronową, onkologią, cyto- i histochemią, cytobiologią i cytometrią.

Tytuł profesora zwyczajnego Prof. K. Stojałowski otrzymał w 1957 r. Oprócz tego w latach 1948–1951 kieruje nieobsadzoną Katedrą Medycyny Sądowej, wykonując wszystkie związane z tym stanowiskiem obowiązki. W tym czasie prowadzi również wykłady z Patofizjologii. Kierownikiem Zakładu Anatomii Patologicznej pozostawał do 1974 r. Był doskonałym wykładowcą, wychowawcą i nauczycielem wielu pokoleń młodzieży akademickiej. Po latach powiedział o sobie "*...widocznie należą lub należałem do lekarzy dość bystrych, skoro niejedno cenne ziarno wiedzy, które uzupełniło moje wiadomości pochodzi od Was i wielu pokoleń moich uczniów*".

Umiejętność przekazywania wiedzy i humanistycznych wartości medycyny zawarł w podręczniku "Anatomia patologiczna w zarysie". Znalazło się tam miejsce dla historii anatomii patologicznej i wielu pouczających sentencji np. "*hic est locus, ubi mors gaudet securrere vitae*". Profesor K. Stojałowski zostawił liczne grono anatomicopatologów. Czterech patologów, samodzielnych pracowników naukowych, których osiągnięcia naukowe dobrze reprezentują stworzone przez Niego dzieło, a warsztat pracy naukowej nadal się rozwija i dominuje w kraju w wielu dziedzinach. Zostawił 16 doktorów medycyny, 15 specjalistów II^o w patomorfologii i trudną do ustalenia liczbę lekarzy, którzy pracowali w Zakładzie i dzięki pomocy Profesora uzyskali stopnie naukowe w innych zakładach i klinikach. Pięciu kolegów klinicyстів osiągnęło tytuły profesorskie rozpoczynając drogę naukową w Zakładzie Anatomii Patologicznej pod opieką Profesora Stojałowskiego.

Naukową szkołę Profesora Stojałowskiego charakteryzowała:

- 1) aktualność metodyczna,
- 2) integracja tematyki badawczej,
- 3) wytyczanie i konsekwentna realizacja kierunków pracy naukowej,
- 4) użyteczność kliniczna.

Te cechy widać wyraźnie w pracy Jego uczniów. Profesor napisał 152 publikacje naukowe. Ile prac napisali Jego uczniowie tego nie sposób ustalić. Zasadnicza problematyka naukowa dotyczyła układu łącznotkankowo-naczyniowego, chorób kolagenowych, co w naturalny sposób łączyło Go ze środowiskiem reumatologów.

Poza pracą związaną z kierowaniem katedrą Profesor pełnił szereg ważnych funkcji: m.in. od 1948–1973 r. konsultanta regionalnego na województwa: szczecińskie, koszalińskie i słupskie. Oryginalną metodą szkolenia i integracji diagnostycznej były, organizowane raz w tygodniu, konferencje kliniczno-anatomopatologiczne; odbyło się 730 takich konferencji.

Profesor w 1948 r. był współzałożycielem Szczecińskiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Lekarskiego i jego wieloletnim przewodniczącym. Szczeciński Oddział Polskiego Towarzystwa Patologów założył w 1954 r. i był jego przewodniczącym do 1974 r.

Był współzałożycielem w 1956 r. i wieloletnim prezesem Szczecińskiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Reumatologów. Z jego inspiracji doszło do otwarcia Oddziału Reumatologicznego w Szpitalu Wojewódzkim i Oddziału Klinicznego Chorób Reumatycznych PAM.

Profesor K. Stojałowski – entuzjasta rozwoju nauki na Pomorzu Zachodnim – był współzałożycielem Szczecińskiego Towarzystwa Naukowego, pełniąc funkcję Wiceprezesa i Prezesa aż do 1982 r. Z tej pozycji działał konsekwentnie na rzecz powstania Uniwersytetu Szczecińskiego i był zwolennikiem połączenia Pomorskiej Akademii Medycznej z Uniwersytetem, na wzór sprawdzonych przedwojennych wzorów organizacyjnych. Starania zakończyły się połowicznym sukcesem. Powstał Uniwersytet, do integracji nie doszło. Powstanie Uniwersytetu jest największą Jego spuścizną organizacyjną, jaką pozostawił Szczecinowi.

Profesor Stojałowski był członkiem redakcji wielu czasopism naukowych, wieloletnim członkiem Rady Naukowej przy Ministrze Zdrowia, Przewodniczącym Rady Naukowej Instytutu Reumatologicznego w Warszawie. Profesorowi przyznano honorowe członkostwo Polskiego Towarzystwa Lekarskiego, Polskiego Towarzystwa Reumatologicznego, Polskiego Towarzystwa Patologów, Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików, Szczecińskiego Towarzystwa Naukowego oraz Doktorat Honoris Causa Pomorskiej Akademii Medycznej. Zasługi Profesora Stojałowskiego były oceniane wysoko, nie tylko przez środowiska akademickie ale również przez władze szczecińskie i ogólnokrajowe. Świadczą dziś o tym liczne odznaczenia i nagrody uczelniane, regionalne, resortowe i państwowe:

- wpis do księgi zasłużonych Ziemi Szczecińskiej,
- Medal – Wielkiej Zasłudze Ziemia Szczecińska,
- Odznaka Gryfa Pomorskiego
- Złoty Krzyż Zasługi
- Krzyż Oficerski Orderu Odrodzenia Polski
- Order Sztandaru Pracy I klasy
- Zasłużony Nauczyciel RP.

Profesor K. Stojałowski przyniósł do Szczecina głęboką wiedzę lekarską i humanistyczną. Był Twórcą Szczecińskiej Szkoły Patologii. Cechowały go:

- niewiarygodna pracowitość
- doskonała organizacja pracy własnej i podległego zespołu
- wysokie wymagania w stosunku do siebie i do współpracowników
- realna ocena sytuacji
- nieustępliwość w dążeniu do celu
- odwaga cywilna
- życzliwość i sprawiedliwość.

Nad trumną Profesora Kazimierza Stojałowskiego obok wielu pożegnalnych słów powiedziano:

"Urodzony w Toruniu, wykształcony w Poznaniu, żył i pracował dla Szczecina. Był to hetman niezależny, po nim już drugiego takiego nie będzie. Kłaniał się prawdzie nigdy okolicznościom. Wiele spraw widział daleko dalej, cechowała Go roztropna troska o dobro wspólne. Poświęcić swój czas innym, to wielka ofiara i za to najbardziej dziś Panu, Profesorze Stojałowski dziękujemy".

Żegnamy Pana słowami Horacjusza: *extinctus amabitur idem*, co by można przetłumaczyć – zawsze będziesz kochany.

Prof. dr hab. med. W. Parafiniuk

ROLA ANEKSYN, BIAŁEK WIĄŻĄCYCH Ca^{2+} I FOSFOLIPIDY W KOMÓRCIE – OD FUZJI BŁON BIOLOGICZNYCH DO PRZEKAZYWANIA INFORMACJI*

**ROLE OF ANNEXINS, Ca^{2+} AND PHOSPHOLIPID-BINDING
PROTEINS, WITHIN THE CELL – FROM FUSION
OF BIOLOGICAL MEMBRANES TO SIGNAL TRANSDUCTION**

Joanna BANDOROWICZ-PIKUŁA

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego
PAN w Warszawie

Streszczenie: Aneksyny tworzą rodzinę cytoplazmatycznych białek wiążących się z anionowymi fosfolipidami w obecności mikromolowych stężeń Ca^{2+} . Masa cząsteczkowa większości aneksyn wynosi 28–40 kDa, z wyjątkiem aneksyn VII i XI (47–56 kDa) oraz VI (67–76 kDa). Wszystkie aneksyny charakteryzuje podobna budowa; ich cząsteczki składają się z rejonu rdzeniowego i domeny N-końcowej o różnej długości. W obrębie rejonu rdzeniowego zlokalizowane są miejsca wiązania Ca^{2+} i fosfolipidów. W komórce aneksyny występują w dwóch formach: rozpuszczalnej i związanej z błoną. Ich biologiczna funkcja nie jest dokładnie poznana i jest intensywnie badana w wielu laboratoriach. Postuluje się, że aneksyny biorą udział w przekazywaniu sygnałów i proliferacji komórki, regulacji transportu pęcherzykowego, w fuzji błon w procesach egzo- i endocytozy, w oddziaływaniu cytoszkieletu z błoną komórkową oraz w homeostazie wapnia. Aneksyny mogą również regulować proces krzepnięcia krwi, pośredniczyć w antyzapalnym działaniu glukokortykoidów, brać udział w syntezie DNA, tworzyć w błonie kanały wapniowe zależne od potencjału błonowego, a także działać jako enzymy.

Słowa kluczowe: aneksyny, rola w komórce, fosfolipidy anionowe, błony biologiczne, jony wapnia

Summary: Annexins belong to the superfamily of structurally related cellular proteins that bind to membrane anionic phospholipids in the presence of micromolar concentrations of Ca^{2+} . Molecular mass for most of annexins vary between 28–40 kDa, except for annexins VII and XI (47–56 kDa), and annexin VI (67–76 kDa). All members of the family possess a well defined, similar structure, which consists of a

*Praca dofinansowana przez KBN, projekt badawczy nr 6PO4A01408.

core and N-terminal domains. Within the core domain Ca^{2+} and phospholipid-binding sites are localized. In the cell annexins alternate between two major forms: cytosolic, and membrane-bound. Their biological function is still uncertain leaving an exciting challenge for investigators. However, it is postulated that these proteins may play a pivotal role in mediation of signal transduction and cell proliferation, in regulation of membrane traffic, and in initiation of membrane fusion in exocytosis and endocytosis, in cytoskeleton-membrane interactions, and in calcium homeostasis. They were also found to act as regulators of blood coagulation and as mediators of anti-inflammatory action of glucocorticoids, to play a role in DNA synthesis, to form a voltage-dependent Ca^{2+} channels in the membrane and, last but not least, to act as enzymes.

Key words: annexins, role within the cell, anionic phospholipids, biological membranes, calcium ions

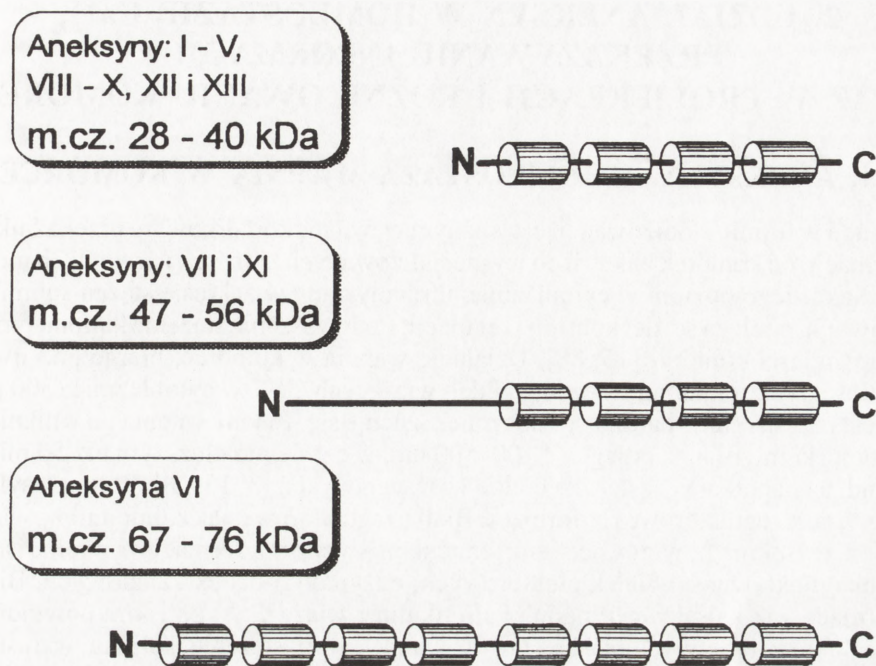
What are annexins for? Surely here is a challenge for the skilled protein engineer and molecular biologist to pin down the roles of annexins – proteins with obvious properties but with an unknown purpose.

Michael J. Geisow, 1991 [30]

1. WSTĘP – ANEKSYNY, BIAŁKA WIĄŻĄCE WAPŃ I FOSFOLIPIDY

Od momentu odkrycia aneksyn w 1977 r. opisano 13 przedstawicieli tej rodziny białek wiążących Ca^{2+} i fosfolipidy (oznacza się je kolejnymi cyframi rzymskimi). Określono pierwszorzędową strukturę aneksyn i poznano sekwencję DNA kodującego te białka. Kilka aneksyn skrytalizowano i na podstawie analizy krystalograficznej wyjaśniono trzeciorzędową strukturę aneksyn V i I [1, 42, 64, 68, 85]. Rozwój badań nad tą grupą białek doprowadził do ustalenia, że w ich cząsteczce występują miejsca wiązania Ca^{2+} , różniące się budową od domen o strukturze *EF-hand* w białkach S-100, takich jak: kalmodulina, parwalbumina lub troponina C [56, 95]. Wśród poznanych aneksyn dziesięć (I–VIII, XI i XIII) występuje w komórkach ssaków i innych kręgowców, dwie (IX i X) tylko w komórkach owadów (*Drosophila melanogaster*) i jedna (XII) jamochłonów (*Hydra vulgaris*) [6, 26, 50, 82].

Aneksyny są szeroko rozpowszechnione w organizmach ssaków, gdzie stanowią około 1% wszystkich białek w komórce (a w łożysku nawet 2% [69]). Wyizolowano je z fibroblastów, limfocytów, łożyska, rdzenia nadnerczy, mózgu, płuc, wątroby, śledziony, trzustki, nerek, soczewek, mięśni szkieletowych i sercowego oraz komórek śródbłonkowych jelita. Białka te występują w formie rozpuszczalnej, lokalizowane są jednak przede wszystkim na powierzchni błony komórkowej [87], a także mogą być związane z białkami cytoszkieletu [33]. Aneksynę IV wykryto w fibroblastach, w formie związanej z błonami siateczki śródplazmatycznej (ER), natomiast aneksyny II i VI z błoną komórkową [32]. W organie elektrycznym drętwy aneksyny związane są z błoną pęcherzyków synaptycznych, a w komórkach chromochłonnych – z błoną pęcherzyków wydzielniczych [6, 32]. Obecność aneksyn II, V i XI stwierdzono również w jądrze komórkowym [45, 54, 92], zaś w hepatocytach aneksyna VI może



Rys. 1. Schemat budowy cząsteczek aneksyn: w postaci walców przedstawiono powtarzające się domeny wiążące Ca^{2+} i fosfolipidy w cząsteczkach białek oraz pokazano różnice w długości regionu N-końcowego [56, 68, 82]

być również związana z wewnętrzną błoną mitochondrialną [66]. Ze względu na masę cząsteczkową aneksyny dzieli się na trzy grupy: białka o m. cz. 28–40 kDa (aneksyny I V, VIII–X i XII–XIII), 47–56 kDa (aneksyny VII i XI) i 67–76 kDa (aneksyna VI). Porównanie sekwencji aminokwasowych tych białek pozwoliło na ustalenie, że aneksyny zbudowane są z powtarzających się domen, złożonych z 70–72 reszt aminokwasowych. Każda z domen zawiera zachowaną ewolucyjnie sekwencję, tzw. *endonexin* lub *annexin fold*: K-G-h-G-T-D-E-x-x-L-I-p-I-L-A-p-R, gdzie h oznacza hydrofobowy, x, dowolny, zaś p, polarny aminokwas [31]. Sekwencja ta odpowiedzialna jest za wiązanie Ca^{2+} i cząsteczek fosfolipidów, przede wszystkim fosfatydyloseryny (PS) i kwasu fosfatydowego (PA). Cząsteczki aneksyn I V i VII–XIII składają się z czterech takich domen, natomiast aneksyna VI z ośmiu domen (rys. 1). Rejon N-końcowy cząsteczki ma zróżnicowaną długość i odpowiada prawdopodobnie za regulację aktywności biologicznej aneksyn [6, 16, 56, 57, 68].

2. UDZIAŁ ANEKSYN W HOMEOSTAZIE Ca^{2+} , PRZEKAZYWANIU INFORMACJI ORAZ W PROLIFERACJI I RÓŻNICOWANIU KOMÓREK

2.1. ANEKSYNY A HOMEOSTAZA WAPNIA W KOMÓRCIE

Wapń w formie zjonizowanej jest ważnym wewnątrzkomórkowym przekaźnikiem informacji, od komórek bakterii do wyspecjalizowanych komórek nerwowych mózgu człowieka. Jego poziom w cytoplazmie, utrzymywany w zakresie stężeń submikromolowych, podlega ścisłej kontroli i regulacji. Podwyższenie stężenia kationu prowadzi do śmierci komórki [15, 88]. Działanie wapnia w komórce, biorąc pod uwagę szybkość dyfuzji kationu i stężenie białek wiążących Ca^{2+} w cytoplazmie (300 μM) [3], jest przestrzennie bardzo ograniczone. Szacuje się, że jony wapnia po wnikięciu do komórki migrują na odległość 100–500 nm, w czasie nie dłuższym niż 50 mikrosekund, aż napotkają cząsteczkę białka wiążącego wapń [3, 15]. Białka te klasyfikowane są jako regulatorowe i buforujące. Białka regulatorowe, jak kalmodulina, wiążąc Ca^{2+} z wysokim powinowactwem, zmieniają swoją konformację i zdolne są do modulacji aktywności białek efektorowych: enzymów i białek kanałowych. Białka buforujące, jak kalsekwestryna lub kalretikulina, wiążą Ca^{2+} z niskim powinowactwem, ale z dużą wydajnością, np. w sytuacji gdy stężenie kationu wzrasta w cytoplazmie lub wewnątrz organelli [5, 39, 53]. Aneksyny stanowią przykład makrocząsteczek o właściwościach stawiających je pomiędzy białkami regulatorowymi a buforującymi. Powinowactwo do Ca^{2+} zbliża aneksyny do białek buforujących, zaś różnorodność funkcjonalna do białek regulatorowych [50, 68, 85].

Analiza właściwości aneksyn IV, V i VII pozwoliła na stwierdzenie, że po związaniu Ca^{2+} białka te tworzą w dwuwarstwie lipidowej kanały wapniowe zależne od potencjału błonowego (rys. 2) [65, 71, 72]. Kanały utworzone przez aneksynę VII nie są wrażliwe na Co^{2+} , Cd^{2+} , a także nifedypinę, związek blokujący aktywność typowych kanałów wapniowych. Selektywność wobec Ca^{2+} także nie jest pełną. Przez kanał utworzony np. przez aneksynę IV transportowane są również Ba^{2+} , Sr^{2+} , Cs^+ , Li^+ i Na^+ [72]. Dodać należy, że w cząsteczkach aneksyn brak jest rejonów homologicznych do znanych białek tworzących kanały [10, 14, 19]. Oprócz zdolności do tworzenia kanałów wapniowych, Díaz Muñoz i wsp. [21] zaobserwowali, że aneksyna VI modyfikuje aktywność kanałów uwalniających Ca^{2+} z błon siateczki sarkoplazmatycznej (SR). Modyfikacja polega na zwiększeniu prawdopodobieństwa i czasu otwarcia tych kanałów. Stosując metody immunocytochemiczne stwierdzono, że aneksyna VI występuje w formie związanej z błonami SR i błonami innych organelli biorących udział w regulacji poziomu Ca^{2+} w komórkach mięśniowych i niemięśniowych [37, 38]. Dodatkowo, Rainteau i wsp. [66] odkryli aneksynę VI związaną z wewnętrzną błoną mitochondriów wątroby, gdzie jest jedynym znanym białkiem wiążącym wapń. Mitochondria odznaczają się wysoką pojemnością w stosunku do Ca^{2+} , porównywalną z pojemnością cystem ER [52]. Przepuszcza się, że oligomery aneksyn mogłyby odgrywać rolę w tworzeniu kanałów wapniowych w błonie mito-

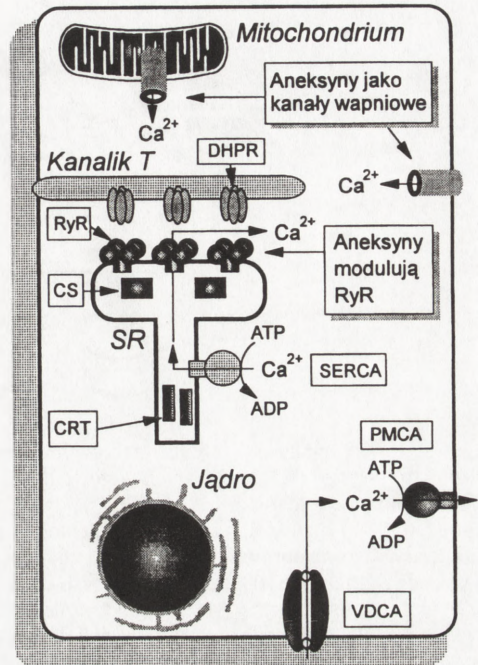
chondrialnej, a więc w transporcie Ca^{2+} pomiędzy przestrzenią perimitochondrialną a macierzą [66].

2.2. ANEKSYNY A PRZEKAZYWANIE INFORMACJI W KOMÓRCIE

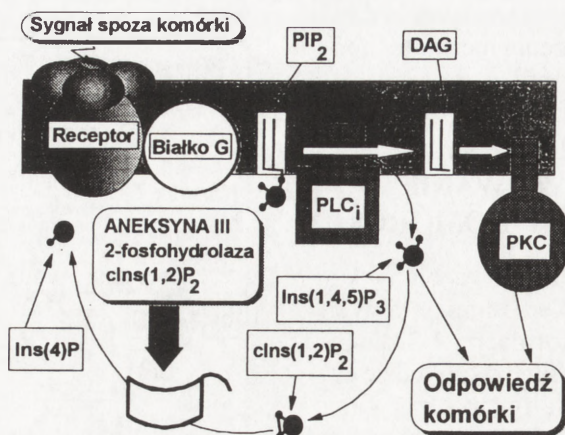
Fosfolipidy inozytowe błony komórkowej są prekursorami wtórnych przekaźników informacji: 1,2-diacylogliceroli, polifosfoinozytoli (także cyklicznych) i pochodnych kwasu arachidonowego, powstających w komórce po stymulacji przez hormony i neurotransmitery [7, 17, 63]. Enzymem, który reguluje wewnątrzkomórkowe stężenie cyklicznych fosforanów inozytoli, jest m. in. 2-fosfohydrolaza 1,2-cyklicznego fosforanu inozytoli (rys. 3). Ross i wsp. [74] wykazali, że sekwencja aminokwasowa enzymu jest identyczna z sekwencją aneksyny III, a jego aktywność jest stymulowana przez te same anionowe fosfolipidy, z którymi wiąże się aneksyna. Badacze ci sugerują, że także inne aneksyny mogłyby być enzymami biorącymi udział w regulacji stężenia cząsteczek przekaźnikowych w komórkach po ich aktywacji [74].

2.3. ANEKSYNY W JĄDRZE KOMÓRKOWYM

W komórkach normalnych i transformowanych trzustki i wątroby aneksyna II występuje w dwóch formach: jako heterotetramer związana jest z błoną komórkową, podczas gdy w cytoplazmie przeważa monomeryczna aneksyna II. W jądrze wraz z kinazą 3-fosfoglicerolu tworzy białkowy kompleks rozpoznający starter. Kompleks ten stymuluje aktywność polimerazy DNA α [49, 92]. Dodatkowo Sun i wsp. [84] wykazali, że aneksyna V w fibroblastach i komórkach nabłonkowych jest zlokalizowana w jąderku, miejscu syntezy rybosomalnego RNA, co mogłoby sugerować udział tego białka w organizowaniu się i transporcie rybosomów. Boyko i wsp. [8] stwierdzili, że aneksyna



Rys. 2. Aneksyny jako kanały wapniowe i ich udział w homeostazie wapnia w komórce mięśnia poprzecznie prążkowanego: ze względu na zdolność do tworzenia przez aneksyny kanałów wapniowych postuluje się, że mogłyby one pełnić rolę w uwalnianiu Ca^{2+} z mitochondriów i innych przedziałów komórkowych. Stwierdzono również, że aneksyny mogą modulować wpływ Ca^{2+} z system siateczki sarkoplazmatycznej (SR); CRT – kalretikulina, CS – kalsekwestryna, DHPR – receptor dihydropirydyny, PMCA – Ca^{2+} -ATPaza z błony komórkowej, RyR – receptor rianodynowy, SERCA – Ca^{2+} -ATPaza z błony SR, VDCA – kanał wapniowy zależny od potencjału błonowego (opracowano na podstawie prac [15, 19, 53, 64, 85, 88])



Rys. 3. Udział aneksyn w cyklu fosfatydoinozytoli i wytwarzaniu przekazników drugiego rzędu, polifosfoinozytoli i ich cyklicznych odpowiedników: w wyniku działania specyficznej w stosunku do fosfatydoinozytoli fosfolipazy C_i (PLC_i) powstają fosfatydoinozytolo-4-fosforan (PIP) i fosfatydoinozytolo-4,5-bisfosforan (PIP_2); wymienione związki ulegają przekształceniu do cyklicznych i niecyklicznych form polifosfoinozytoli, m. in. 1,2-cyklicznego fosforanu inozytoli; Ross i wsp. [74] wykazali, że aneksyna III (zaznaczona na rysunku pogrubioną strzałką) jest identyczna z 2-fosfohydrolazą 1,2-cyklicznego fosforanu inozytoli, która katalizuje reakcję rozszczepienia wiązania cyklicznego w cząsteczce wymienionego związku, w wyniku czego powstaje inozytolo-4-fosforan; DAG – diacyloglicerol, $Ins(1,4,5)P_3$ – inozytolo-1,4,5-trisfosforan, $cIns(1,2)P_2$ – 1,2-cykliczny fosforan inozytoli, $Ins(4)P$ – inozytolo-4-fosforan, PKC – białkowa kinaza C (opracowano na podstawie [7, 17, 22, 63, 86, 90, 91])

II wiąże się z kwasami nukleinowymi i mogłaby pełnić rolę w replikacji DNA i przekazywaniu sygnału mitogenicznego.

2. 4. ANEKSYNY JAKO PRZEKAŹNIKI SYGNAŁU MITOGENICZNEGO

Aneksyny biorą prawdopodobnie udział w regulacji wzrostu i transformacji komórek, działając jako wewnątrzkomórkowy pośrednik dla czynników wzrostu [6, 68]. Do wysunięcia takiego przypuszczenia skłoniły badaczy obserwacje, że aneksyny są substratami różnych kinaz białkowych. Aneksyna I jest np. jednym z głównych komórkowych substratów białkowej kinazy tyrozynowej receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGF), zaś aneksyna II białkowej kinazy tyrozynowej kodowanej przez onkogen retrowirusa mięsaka Rousa [6, 55, 61]. W proliferujących ludzkich fibroblastach poziom aneksyny I ulega podwyższeniu, a aneksyny V obniżeniu [78]. Wykazano również, że fosforylacja aneksyny I zwiększa jej powinowactwo do Ca^{2+} i wrażliwość na proteolizę [77]. Niektórzy autorzy sugerują, że w wyniku stymulacji komórek EGF i krótkotrwałego wzrostu stężenia Ca^{2+} aneksyna I wiąże się z błoną komórkową, gdzie ulega fosforylacji. Proteoliza aneksyny mogłaby być odpowiedzialna za inaktywację ufosforylowanego białka [77]. Fosforylację aneksyny I przez kinazę receptora EGF charakteryzuje *in vitro* bardzo wysokie powinowactwo enzymu

do substratu. Poziom fosforylacji białka w kulturze diploidalnych fibroblastów zmienia się od <1% w komórkach spoczynkowych do 25% w komórkach po stymulacji EGF. W ten sposób aneksyna I mogłaby być włączana w szlaki wewnątrzkomórkowe przekazywania sygnałów mitogenicznych [78].

2.5. ANEKSYNY I BIAŁKOWA KINAZA C (PKC)

Schlaepfer i wsp. [79] wykazali, że aneksyna V jest specyficznym inhibitorem PKC, w przypadku kiedy substratem kinazy jest aneksyna I. Jednocześnie aneksyna V nie wpływa na fosforylację aneksyny I przez kinazę tyrozynową receptora EGF. Przypuszcza się, że za hamowanie aktywności PKC odpowiada bezpośrednie oddziaływanie cząsteczek aneksyny i kinazy. Raynal i wsp. [67] stwierdzili jednak, że podwyższenie stężenia PS znosi hamujący efekt aneksyny V, co przemawiałoby za koncepcją regulacji pośredniej.

2.6. ANEKSYNY JAKO SUBSTRATY TRANSGLUTAMINAZY

Transglutaminaza jest enzymem katalizującym reakcję przeniesienia grupy acylowej z reszty kwasu glutaminowego na grupę (ϵ -aminową) lizyny, co prowadzi w konsekwencji do sieciowania białek w komórce. Enzym ten bierze udział w różnych procesach zależnych od stężenia Ca^{2+} , m.in. w endocytozie receptorowej i wydzielaniu hormonów, jak również w transformacji komórkowej i różnicowaniu. Niewiele dotąd wiadomo jest o endogennych substratach enzymu. Ando i wsp. [4] sugerowali, że w linii ludzkich naskórkowych komórek nowotworowych A431 substratem transglutaminazy jest aneksyna I. W wyniku pobudzenia komórek A431 EGF i wzrostu stężenia Ca^{2+} następuje translokacja aneksyny I do błony komórkowej, gdzie białko wiąże się z fosfolipidami. Następnie, w wyniku działania transglutaminazy N-końcowa domena białka ulega sieciowaniu i powstają dimery aneksyny [4]. Dimery aneksyny I zaobserwowano także w ludzkim łożysku i keratynocytach [62].

3. ANEKSYNY W TRANSPORCIE PEŁCZERZYKOWYM I W FUZJI BŁON

3.1. ŁĄCZNIKI POMIĘDZY CYTOSZKIELETEM A BŁONĄ KOMÓRKOWĄ

Aneksyny *in vitro* wiążą się w sposób zależny od stężenia Ca^{2+} z F-aktyną, spektryną i odpowiednikami tego białka występującymi w komórkach nieerytrocytarnych i w mózgu, czyli fodryną i kalspektryną [68, 93]. Spektryna i aktyna są ważnymi elementami szkieletu podbłonowego w erytrocytach, gdzie pełnią rolę m.in. w regulacji ruchliwości i rozmieszczenia białek integralnych błony, są odpowiedzialne za właściwości mechaniczne błony erytrocytarnej oraz biorą udział w utrzymywaniu asymetrycznego rozmieszczenia fosfolipidów [81, 96]. Stan filamentów aktynowych

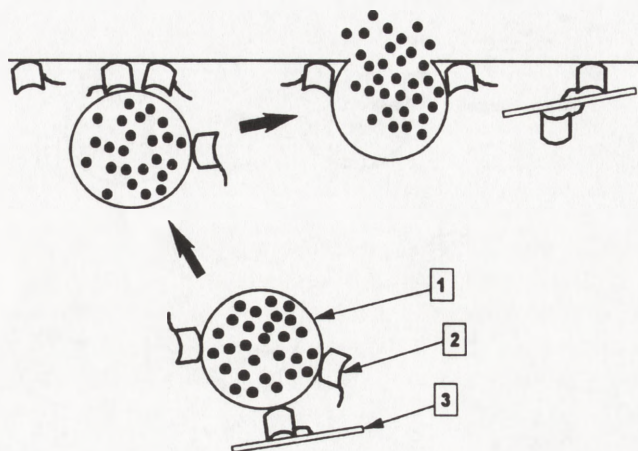
kontrolują białka wiążące aktyne, określające poziom polimeryzacji jej cząsteczek i oddziaływania pomiędzy filamentami a błoną komórkową. Większość tych białek jest wrażliwa na zmiany stężenia Ca^{2+} , które odgrywają również ważną rolę w regulacji ruchu komórki, sekrecji i adhezji. Wyniki doświadczeń Ikebuchi i Waismana [43] dowodzą, że heterotetramer aneksyny II ($\text{p}36_2/\text{p}11_2$) wiąże się z F-aktyną z wysokim powinowactwem i może regulować tworzenie wiązek filamentów aktynowych w obecności $5\text{--}10\ \mu\text{M}\ \text{Ca}^{2+}$. W cząsteczce aneksyny II stwierdzono obecność 9-aminokwasowej sekwencji podobnej do sekwencji miejsca wiążącego aktyne w cząsteczce miozyny [47]. Badania immunofluorescencyjne, potwierdzające podobne rozmieszczenie aneksyn i białek cytoszkieletu w różnych typach komórek, mogą przemawiać za koncepcją, że *in vivo* białka te oddziałują ze sobą [33, 41]. Lokalizacja aneksyn pod błoną komórkową dodatkowo sugeruje, że aneksyny mogłyby funkcjonować jako łączniki elementów cytoszkieletu z plazmalemą [32].

3.2. ANEKSYNY A EGZO- I ENDOCYTOZA

Podczas egzocytozy w wyspecjalizowanych komórkach błona pęcherzyków wydzielniczych zlewa się z błoną komórkową w drodze fuzji (rys. 4).

Proces ten jest indukowany przez wzrost stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie i dodatkowo modulowany przez różne czynniki wewnątrzkomórkowe [94]. Ze względu na zdolność aneksyn do oddziaływania z błoną komórkową w zależności od stężenia Ca^{2+} , wydaje się, że białka te mogłyby odgrywać rolę pośredników w egzocytozie [2, 11, 12, 16, 35,]. Stwierdzono, że wiele aneksyn wywołuje agregację i fuzję liposomów, jak również pęcherzyków wydzielniczych w komórkach chromochłonnych [2, 23, 60]. Jones i wsp. [46] wysunęli przypuszczenie, że aneksyna VI mogłaby powodować wypieranie jonów wapnia z przestrzeni pomiędzy błoną komórkową a ziarnami wydzielniczymi, co prowadziłoby do uwolnienia zawartości ziaren na zewnątrz komórki.

Badaniem immunocytochemicznym wykazano, że w komórkach chromochłonnych po stymulacji błona komórkowa i błona ziaren wydzielniczych połączone są strukturami zawierającymi aneksynę II [58, 80]. Po stymulacji komórek chromochłonnych acetylocholiną również zaobserwowano powstawanie podobnych połączeń, co sugeruje, że aneksyna II może brać udział w zakotwiczeniu pęcherzyków wydzielniczych na wstępnym etapie fuzji błon [58]. Sarafian i wsp. [76] stwierdzili dodatkowo, że tylko ufosforylowane białko wykazuje aktywność w procesie egzocytozy. Aby wyjaśnić mechanizm powstawania wspomnianych połączeń pomiędzy błonami, zastosowano przeciwciała monoklonalne przeciw aneksynie I – białku, które także wywołuje agregację pęcherzyków wydzielniczych. Stwierdzono, że w cząsteczce aneksyny I tylko pierwsza domena wiążąca Ca^{2+} odpowiedzialna jest za agregację błon [25, 40]. Aneksyny mogą również odgrywać istotną rolę w transporcie pęcherzykowym i fuzji błon w endocytozie (rys. 5). Endocytoza polega na internalizacji makrocząsteczek i często przebiega pod kontrolą receptorów błonowych. Jest to ciąg wydarzeń zapoczątkowany przez związanie ligandu z białkiem receptorowym i grupowanie tych białek. W trakcie grupowania receptorów, które zachodzi w wyspecjali-

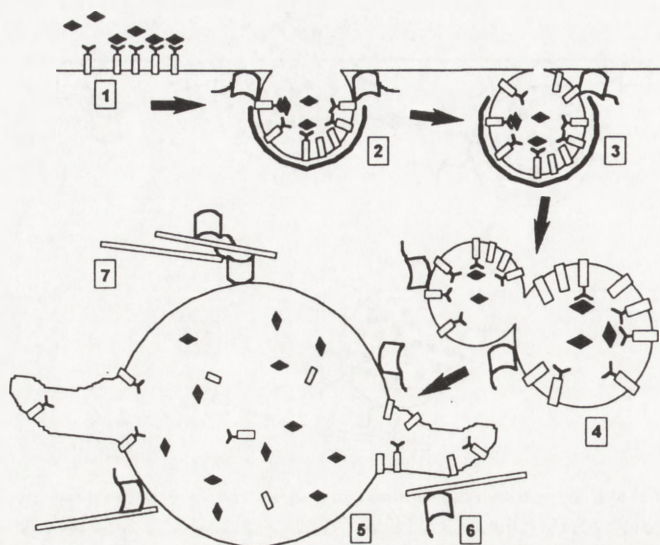


Rys. 4. Udział aneksyn w egzocytozie – aneksyny są szczególnie aktywne w tworzeniu połączeń pomiędzy pęcherzykami wydzielniczymi a błoną komórkową, a także w fuzji błon biologicznych [16, 58, 80]: 1 – pęcherzyk wydzielniczy, 2 – cząsteczki aneksyn, 3 – mikrofilamenty aktywne

zowanych wgłębieniach błony komórkowej, na cytoplazmatycznej stronie błony pod dołkami tymi organizuje się siatka klatrynowa. W wyniku tego procesu dołka rośnie. Powstają pęcherzyki opłaszczone klatryną. Po oderwaniu od błony tracą opłaszczenie i przekształcają we "wczesne" endosomy. Te zaś w wyniku wzajemnej fuzji, tworzą endosomy "dojrzałe" [12, 34, 35, 70]. Badacze zajmujący się endocytozą przypuszczają, że aneksyny są aktywne na dwóch etapach tego procesu: w czasie odpączkowania pęcherzyków od błony komórkowej i w fuzji endosomów [12, 35]. Lin i wsp. [51] wykazali, że aneksyna VI bierze udział w procesie odpączkowania, spełniając rolę nożyc odcinających pęcherzyk od plazmalemmy. Mechanizm procesu nie jest jednak jasny. Badacze sądzą, że polega on na specyficznym oddziaływaniu aneksyny z określonymi fosfolipidami. Być może powstawanie trimerów aneksyny VI na powierzchni błony mogłoby, na zasadzie mechanicznego zaciągania pętli, wywierać nacisk na błonę, która ulegałaby pęknięciu. W przeciwieństwie do opisanych obserwacji, Smythe i wsp. [83] nie stwierdzili w komórkach A431 z wprowadzonym genem aneksyny VI różnic w kinetyce procesu endocytozy i obiegu receptorów transferyny, w porównaniu z komórkami normalnymi, pozbawionymi aneksyny VI. Mimo tej sprzeczności faktem jest, że białko to zidentyfikowano we frakcji endosomów wyizolowanych z hepatocytów [44].

Coraz częściej publikowane są wyniki obserwacji świadczące o udziale heterodimeru aneksyny II w fuzji i w transporcie endosomów, np. w komórkach MDCK [36]. Wykazano, że po zwiększeniu przepuszczalności błony komórki tracą wiele czynników cytoplazmatycznych związanych z regulacją fuzji błon, m.in. aneksynę II. Inkubacja takich komórek z aneksyną II przywracała im zdolność do sekrecji i odwrotnie, zdolność tę komórki traciły w obecności przeciwciał przeciw aneksynie [24].

W cytoplazmie komórek ziarnistych (pneumocyty typu II) wyścielających pęche-



Rys. 5. Rola aneksyn w endocytozie – aneksyny uczestniczą prawdopodobnie w odpączkowywaniu i w agregacji pęcherzyków [36], i w fuzji "wczesnych" endosomów [12, 13, 24]: 1 – zgrupowanie białek receptorowych, 2 – dołek opłaszczony (ang. *coated pit*), 3 – pęcherzyk opłaszczony klatryną, 4 – "wczesne" endosomy, 5 – endosom, CURL (ang. *compartment of uncoupling receptor and ligand*), 6 – cząsteczki aneksyn, 7 – filamenty aktynowe

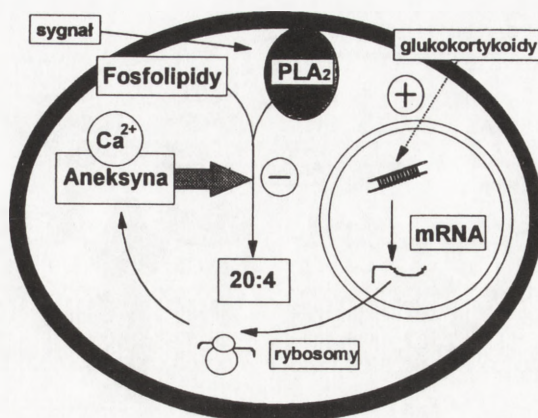
ryki płucne, obecne są wielopęcherzykowe ciała, w których magazynowane są związki powierzchniowo czynne. Większość tych związków to lipidy (80%), głównie dipalmitylofosfatydylocholina, a także białka (10%). Lipidy wydzielane na zewnątrz komórki, tworzą monowarstwę na granicy powietrze/woda, dzięki której napięcie powierzchniowe ulega obniżeniu, co zapobiega zapadaniu się pęcherzyków w czasie oddychania. Okazało się, że z cytoplazmy pneumocytów typu II można wyizolować białka wiążące fosfolipidy. Jednym z nich jest aneksyna I, która odgrywając rolę w fuzji pęcherzyków ułatwia tworzenie struktur magazynujących fosfolipidy [89].

4. ODDZIAŁYWANIE ANEKSYN Z ANIONOWYMI FOSFOLIPIDAMI

4.1. ANEKSYNY A REGULACJA PROCESÓW ZAPALNYCH

Prostaglandyny i leukotrieny, pochodne kwasu arachidonowego, których poziom wzrasta po aktywacji komórek, stymulują procesy zapalne w organizmie [68, 73].

Kwas arachidonowy uwalniany jest z cząsteczek fosfolipidów błonowych w reakcji hydrolizy katalizowanej przez fosfolipazy A_2 (PLA_2). Ponieważ stwierdzono, że *in vitro* aneksyny I–VI hamują aktywność enzymu [9, 55], wysunięto hipotezę, że *in vivo* mogłyby one odgrywać kluczową rolę w regulacji procesów zapalnych (rys. 6).

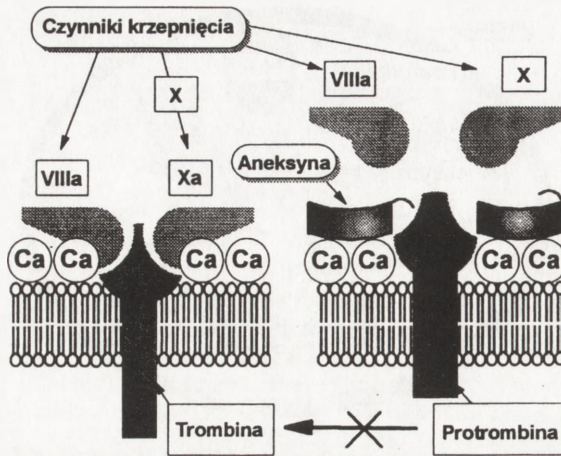


Rys. 6. Rola aneksyny w procesach zapalnych: hipotetyczny udział aneksyny w hamowaniu aktywności fosfolipazy A₂ (PLA₂) i wytwarzaniu wolnego kwasu arachidonowego (20:4), prekursora prostacyklin, prostaglandyn, tromboksanów i leukotrienów (szczegółowe wyjaśnienia w tekście, opracowano na podstawie prac [20, 55, 73])

Najlepiej udokumentowane obserwacje opublikowano w przypadku aneksyny I, która hamuje uwalnianie kwasów tłuszczowych z cząsteczek fosfolipidów błon neutrofilów, makrofażów i *E. coli* [18]. Proponowano różne mechanizmy hamowania aktywności fosfolipaz przez aneksyny, m.in. przez wiązanie aneksyny z cząsteczkami PLA₂ [48, 55]. Wielu badaczy uważa jednak, że hamowanie aktywności PLA₂ wynika z wyczerpania lub zablokowania substratu enzymu (anionowych fosfolipidów) [55]. Traktując błonę *E. coli* jako źródło substratu dla fosfolipazy wykazano, że istotnie aneksyna hamuje aktywność PLA₂ poprzez wiązanie z fosfolipidami. Dodatkowo stwierdzono, że aneksyny, jeśli inkubowano je z PS, nie hamowały aktywności fosfolipazy [55]. Jeszcze inny model inaktywacji enzymu przez aneksyny powstał przez analogię do działania mellityny. Peptyd ten wywołuje zmiany w strukturze błony komórkowej, w wyniku czego cząsteczki fosfolipidów stają się bardziej dostępne dla fosfolipazy. Być może aneksyny w taki sposób zmieniają strukturę błony komórkowej, że wręcz przeciwnie lipidy nie ulegają hydrolizie [59].

4.2. ANEKSYNY HAMUJĄ KRZEPNIĘCIE KRWI

Proces krzepnięcia krwi składa się z szeregu reakcji, w tym enzymatycznych zachodzących w osoczu, we współdziałaniu z czynnikami uwolnionymi z nabłonka wyściełającego naczynia, płytek krwi i erytrocytów. Jednym z końcowych etapów jest powstawanie enzymu proteolitycznego, trombiny, który katalizuje reakcję hydrolizy rozpuszczalnego białka osocza, fibrynogenu do fibryny. W wyniku polimeryzacji tego białka dochodzi do utworzenia skrzepu. Tworzenie trombiny jest uzależnione od obecności w błonie płytek krwi PS, wiązania z błoną czynników krzepnięcia krwi: Xa, VIIa, Va i II, a także obecności Ca²⁺ [98]. Stwierdzono, że aneksyny II–VI mogą działać jako czynniki antykrzepliwie (rys. 7). Wiążąc się z fosfolipidami, blokują



Rys. 7. Rola aneksyn w procesie krzepnięcia krwi: aneksyny, przez oddziaływanie z obdarzonymi ładunkiem ujemnym cząsteczkami fosfatydylseryny w błonie, mogłyby zapobiegać tworzeniu się kompleksu czynników krzepnięcia VIIa z X, hamować przekształcanie czynnika X w Xa, aktywację trombiny i w końcu przekształcanie fibrynogenu w fibrynę, fibryna bierze zaś udział w wytwarzaniu skrzepu [27, 73, 98]

oddziaływanie czynników krzepnięcia krwi z powierzchnią błony komórkowej płytek krwi, co hamuje przekształcanie protrombiny w trombinę [68, 73].

5. UWAGI KOŃCOWE

Jedno na pięćdziesiąt wśród ponad 5000 białek przeciętnej komórki ssaków stanowi aneksyna. Tylko niewiele innych białek, m.in. aktyna (10–20%) czy miozyna (0,3–35%), może pod tym względem równać się z aneksynami [17]. Fakt ten musi mieć swoje implikacje funkcjonalne. W przypadku aneksyn cechą tych białek stanowiącą o ich funkcjonalnej jedności jest zdolność do przechodzenia od formy rozpuszczalnej do formy związanej z błoną komórkową i błonami organelli wewnątrzkomórkowych, w wyniku zmiany stężenia Ca^{2+} . W stanie spoczynku stężenie Ca^{2+} w komórce wynosi 50–100 nM i może wzrosnąć po jej pobudzeniu do 1–10 μM [29]. Rodzi się zatem pytanie, czy jeśli po pobudzeniu komórki i wzroście stężenia Ca^{2+} , mimo wszystko większość miejsc wiążących w cząsteczce białka nie będzie zajęte przez Ca^{2+} [85] i aneksyny pozostaną w formie rozpuszczalnej, są one aktywne nadal biologicznie? W przypadku kalmoduliny wiązanie Ca^{2+} w warunkach fizjologicznych jest czynnikiem wyzwalającym jej aktywność biologiczną [29], ze względu na wysokie powinowactwo tego białka do kationu. W przypadku aneksyn cecha ta nie jest prawdopodobnie najważniejsza. Jeśli szukać porównań, to raczej do takich białek jak izoformy białkowej kinazy C czy fosfolipaza A_2 , które wiążą się z błonami w sposób zależny od stężenia Ca^{2+} , co pozwala na wyrażenie właściwej tym enzymom, specy-

ficznej funkcji [20]. Jaki jest mechanizm działania aneksyn i jakie funkcje pełnią w komórce, rozstrzygną dopiero przyszłe badania.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AITKEN A. Building an annexin structure and function. *Trends Cell Biol* 1993; **3**: 138.
- [2] ALI SM, GEISOW MJ, BURGOYNE RD. A role for calpactin in calcium-dependent exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Nature* 1989; **340**: 313–315.
- [3] ALLBRITTON NL, MEYER T, STRYER L. Range of messenger action of calcium ion and inositol 1,4,5-trisphosphate. *Science* 1992; **258**: 1812–1815.
- [4] ANDO Y, IMAMURA S, OWADA MK, KANNAGI R. Calcium-induced intracellular cross-linking of lipocortin I by tissue transglutaminase in A431 cells. Augmentation by membrane phospholipids. *J Biol Chem* 1991; **266**: 1101–1108.
- [5] BAIMBRIDGE KG, CELIO MR, ROGERS JH. Calcium binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci* 1992; **15**: 303–308.
- [6] BANDOROWICZ J, PIKUŁA S. Annexins – multifunctional, calcium-dependent, phospholipid-binding proteins. *Acta Biochim Polon* 1993; **40**: 281–293.
- [7] BERRIDGE MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 1993; **361**: 315–325.
- [8] BOYKO V, MUDRAK O, SVETLOVA M, NEGISHI Y, ARIGA H, TOMILIN N. A major cellular substrate for protein kinases, annexin II, is a DNA-binding protein. *FEBS Lett* 1994; **345**: 139–142.
- [9] BUHL W-J, GARCIA MT, ZIPFEL M, SCHIEBLER W, GEHRING U. A series of annexins from human placenta and their characterization by use of an endogenous phospholipase A₂. *Eur J Cell Biol* 1991; **56**: 381–390.
- [10] BURGER A, VOGES D, DEMANGE P, PEREZ CR, HUBER R, BERENDES R. Structural and electrophysiological analysis of annexin V mutants. Mutagenesis of human annexin V, an *in vitro* voltage-gated calcium channel, provides information about the structural features of the ion pathway, the voltage sensor and the ion selectivity filter. *J Mol Biol* 1994; **237**: 479–499.
- [11] BURGOYNE RD. Control of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1071**: 174–202.
- [12] BURGOYNE RD, CLAGUE MJ. Annexin in the endocytic pathway. *Trends Biochem Sci* 1994; **19**: 231–232.
- [13] BURGOYNE RD, GEISOW MJ. The annexin family of calcium-binding proteins. *Cell Calcium* 1989; **10**: 1–10.
- [14] CHEN JM, SHELDON A, PINCUS MR. Structure-function correlations of calcium binding and calcium channel activities based on 3-dimensional models of human annexins I, II, III, V and VII. *J Biomolec Struct Dynamics* 1993; **10**: 1067–1088.
- [15] CLAPHAM DE. Calcium signalling. *Cell* 1995; **80**: 259–268.
- [16] CREUTZ CE. The annexins and exocytosis. *Science* 1992; **258**: 924–931.
- [17] DARNELL J, LODISH H, BALTIMORE D. Molecular Cell Biology. Scientific American Books 1990: 1–1105.
- [18] DAVIDSON FF, DENNIS EA, POWELL M, GLENNEY JR, jr. Inhibition of phospholipase A₂ by lipocortins and calpactins. An effect of binding to substrate phospholipids. *J Biol Chem* 1987; **262**: 1698–1705.
- [19] DEMANGE P, VOGES D, BENZ J, LIEMANN S, GOTTIG P, BERENDES R, BURGER A, HUBER R. Annexin V: the key to understanding ion selectivity and voltage regulation? *Trends Biochem Sci* 1994; **19**: 272–276.

- [20] DENNIS EA. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. *J Biol Chem* 1994; **269**: 13057–13060.
- [21] DÍAZ-MUÑOZ M, HAMILTON SL, KAETZEL MA, HAZARIKA P, DEDMAN JR. Modulation of Ca²⁺-release channel activity from sarcoplasmic reticulum by annexin VI (67 kDa calcimedlin). *J Biol Chem* 1990; **265**: 15894–15899.
- [22] DIVECHE N, IRVINE RF. Phospholipid signaling. *Cell* 1995; **80**: 269–278.
- [23] DRUST DS, CREUTZ CE. Aggregation of chromaffin granules by calpactin at micromolar levels of calcium. *Nature* 1988; **331**: 88–91.
- [24] EMANS N, GOVEL J-P, WALTER C, GERKE V, KELLNER R, GRIFFITHS G, GRUENBERG J. Annexin II a major component of fusogenic endosomal vesicles. *J Cell Biol* 1993; **120**: 1357–1369.
- [25] ERNST JD, HOYE E, BLACKWOOD RA, MOK TL. Identification of a domain that mediates vesicle aggregation reveals functional diversity of annexin repeats. *J Biol Chem* 1991; **266**: 6670–6673.
- [26] FIEDLER K, LAFONT F, PARTON RG, SIMONS K. Annexin XIIIb: a novel epithelial specific annexin is implicated in vesicular traffic to the apical plasma membrane. *J Cell Biol* 1995; **128**: 1043–1053.
- [27] FIJAŁKOWSKA I, BABIŃSKA A, CIERNIEWSKICS. Rola białka C w układzie krzepnięcia i fibrynolizy. *Post Biochem* 1992; **38**: 178–182.
- [29] FINN BE, FORSÉN S. The evolving model of calmodulin structure, function and activation. *Structure* 1995; **3**: 7–11.
- [30] GEISOW MJ. Annexins - forms without function - but not without fun. *Trends Biotech* 1991; **9**: 180–181.
- [31] GEISOW MJ, FRITSCH U, HEXHAM JM, DASH B, JOHNSON T. A consensus amino-acid sequence repeat in Torpedo and mammalian Ca²⁺-dependent membrane-binding proteins. *Nature* 1986; **320**: 636–638.
- [32] GEISOW MJ, WALKER JH, BOUSTEAD C, TAYLOR W. Annexins – new family of Ca²⁺- regulated - phospholipid binding protein. *Biosci Rep* 1987; **7**: 289–298.
- [33] GOLDBERG M, FEINBERG J, LECOLLE S, KAETZEL MA, RAINTEAU D, LESSARD JL, DEDMAN JR, WEINMAN S. Co-distribution of annexin VI and actin in secretory ameloblasts and odontoblasts of rat incisor. *Cell Tissue Res* 1991; **263**: 81–89.
- [34] GOLDSTEIN JL, ANDERSON RGW, BROWN MS. Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature* 1979; **279**: 679–685.
- [35] GRUENBERG J, EMANS N. Annexins in membrane traffic. *Trends Cell Biol* 1993; **3**: 224–227.
- [36] HARDER T, GERKE V. The subcellular distribution of early endosomes is affected by the annexin II_{2p112} complex. *J Cell Biol* 1993; **123**: 1119–1132.
- [37] HAZARIKA P, KAETZEL MA, SHELDON A, KARIN NJ, FLEISCHER S, NELSON TE, DEDMAN JR. Annexin VI is associated with calcium-sequestering organelles. *J Cell Biochem* 1991; **46**: 78–85.
- [38] HAZARIKA P, SHELDON A, KAETZEL MA, DÍAZ-MUÑOZ M, HAMILTON SL, DEDMAN JR. Regulation of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-release channel requires intact annexin VI. *J Cell Biochem* 1991; **46**: 86–93.
- [39] HEIZMANN CW, HUNZIKER W. Intracellular calcium-binding proteins: more sites than insights. *Trends Biochem Sci* 1991; **16**: 98–103.
- [40] HOEKSTRA D, BUIST-ARKEMA R, KLAPPE K, REUTELINGSPERGER CPM. Interaction of annexins with membranes: the N-terminus as a governing parameter as revealed with a chimeric annexin. *Biochemistry* 1993; **32**: 14194–14202.
- [41] HOSOYA H, KOBAYASHI R, TSUKITA S, MATSUMURA F. Ca²⁺-regulated actin and phospholipid binding protein (68 kDa-protein) from bovine liver: Identification as a homologue for annexin VI and intracellular localization. *Cell Motil Cytoskel* 1992; **22**, 200–210.

- [42] HUBER R, BERENDES R, BURGER A, SCHNEIDER M, KARSHIKOV A, LUECKE H, RÖMISCH J, PÂQUES E-P. Crystal and molecular structure of human annexin V after refinement. Implications for structure, membrane binding and ion channel formation of the annexin family of proteins. *J Mol Biol* 1992; **223**: 683–704.
- [43] IKEBUSCHI NW, WAISMAN DM. Calcium-dependent regulation of actin filament bundling by lipocortin-85. *J Biol Chem* 1990; **265**: 3392–3400.
- [44] JÄCKLE S, BEISIEGEL U, RINNINGER F, BUCK F, GRIGOLEIT A, BLOCK A, GRÖGER I, GRETEN H, WINDLER E. Annexin VI, a marker protein of hepatocytic endosomes. *J Biol Chem* 1994; **269**: 1026–1032.
- [45] JINDAL HK, CHANEY WG, ANDERSON CHW, DAVIS RG, VISHWANATHA K. The protein-tyrosine kinase substrate, calpactin I heavy chain (p36), is part of the primer recognition protein complex that interact with polymerase α . *J Biol Chem* 1991; **266**: 5169–5176.
- [46] JONES PG, FITZPATRICK S, WAISMAN DM. Chromaffin granules release calcium on contact with annexin VI: implications for exocytosis. *Biochemistry* 1994; **33**: 8180–8187.
- [47] JONES PG, MOORE GJ, WAISMAN DM. A nonapeptide to the putative F-actin binding site of annexin-II tetramer inhibits its calcium-dependent activation of actin filament bundling. *J Biol Chem* 1992; **267**: 13993–13997.
- [48] KIM KM, KIM DK, PARK YM, KIM CK, NA DS. Annexin-I inhibits phospholipase A₂ by specific interaction, not by substrate depletion. *FEBS Lett* 1994; **343**: 251–255.
- [49] KUMBLE KD, IVERSEN PI, VISHWANATHA JK. The role primer recognition proteins in DNA replication: inhibition of cellular proliferation by antisense oligodeoxyribonucleotides. *J Cell Sci* 1992; **101**: 35–41.
- [50] LIEMANN S, LEWT-BENTLEY A. Annexins: a novel family of calcium- and membrane-binding proteins in search of a function. *Structure* 1995; **3**: 233–238.
- [51] LIN HC, SÜDHOF TC, ANDERSON RGW. Annexin VI is required for budding of clathrin-coated pits. *Cell* 1992; **70**: 283–291.
- [52] MARTÍNEZ-SERRANO A, SATRÚSTEGUI J. Regulation of cytosolic free calcium concentration by intrasynaptic mitochondria. *Mol Biol Cell* 1992; **3**: 235–248.
- [53] MILNER RE, FAMULSKI KS, MICHALAK M. Calcium binding proteins in the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum of muscle and nonmuscle cells. *Mol Cell Biochem* 1992; **112**: 1–13.
- [54] MIZUTANI A, WATANABE N, KITAO T, TOKUMITSU H, HIDAKA H. The long amino-terminal tail domain of annexin XI is necessary for its nuclear localization. *Arch Biochem Biophys* 1995; **318**: 157–165.
- [55] MORGAN RO, PILAR FERNÁNDEZ M. Annexins and signal transduction. [w] Bailey JM [red.] Prostaglandins, Leukotriens, Lipoxins, and PAF. Mechanism of Action, Molecular Biology, and Clinical Applications. GWUMC Department of Biochemistry Annual Spring Symposia 1991: 107–122.
- [56] MOSS SE [red.] The Annexins. London, Chapel Hill: Portland Press 1992: 1–173.
- [57] MOSS SE, EDWARDS HC, CRUMPTON MJ. Diversity in the annexin family. [w] Heizmann CW [red.] Novel Calcium-Binding Proteins. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest: Springer-Verlag 1991: 535–566.
- [58] NAKATA T, SOBUE K, HIROKAWA N. Conformational change and localization of calpactin I complex involved in exocytosis as revealed by quick-freeze, deep-etch electron microscopy and immunocytochemistry. *J Cell Biol* 1990; **110**: 13–25.
- [59] OHKI S, MARCUS E, SUKUMARAN DK, ARNOLD K. Interaction of mellitin with lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* 1994; **1194**: 223–232.
- [60] OSHRY L, MEERS P, MEALY T, TAUBER AI. Annexin-mediated membrane fusion of human neutrophil plasma membranes and phospholipid vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1066**: 239–244.

- [61] PEPINSKY RB, SINCLAIR LK. Epidermal growth factor-dependent phosphorylation of lipocortin. *Nature* 1986; **321**: 81–84.
- [62] PEPINSKY RB, SINCLAIR LK, CHOW EP, O'BRINE-GRECO B. A dimeric form of lipocortin-1 in human placenta. *Biochem J* 1989; **263**: 97–103.
- [63] PODDANA H, BARAŃSKA J. Udział polifosfoinozytoli w przetwarzaniu informacji w komórkach. *Post Biochem* 1991; **37**: 2–5.
- [64] POLLARD TD, ALMO S, QUIRK S, VINSON V, LATTMAN E. Structure of actin binding proteins: insights about function at atomic resolution. *Annu Rev Cell Biol* 1994; **10**: 207–249.
- [65] POLLARD HB, GUY HR, ARISPE N, FUENTE M, LEE G, ROJAS EM, POLLARD JR, SRIVASTAVA M, ZHANG-KECK Z-Y, MEREZHINSKAYA N, CAO HUY H, BURNS AL, ROJAS E. The expression of the 35- and 67-kDa calcimedins is dependent on thyroid hormone. *Biophys J* 1992; **62**: 15–18.
- [66] RAINTEAU DP, MANSUELLE P, ROCHAT H, WEINMAN S. Characterization and ultrastructural localization of annexin VI from mitochondria. *FEBS Lett* 1995; **360**: 80–84.
- [67] RAYNAL P, HULLIN F, RAGAB-THOMAS MF, FAUVEL J, CHAP H. Annexin 5 as a potential regulator of annexin 1 phosphorylation by protein kinase C. In vitro inhibition compared with quantitative data on annexin distribution in human endothelial cells. *Biochem J* 1993; **292**: 759–765.
- [68] RAYNAL P, POLLARD HB. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- an phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1994; **1197**: 63–93.
- [69] REGNOUF F, RENDON A, PRADEL LA. Biochemical characterization of annexins I and II isolated from pig nervous tissue. *J Neurochem* 1991; **56**: 1985–1996.
- [70] ROBINSON MS. The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 1994; **6**: 538–544.
- [71] ROJAS E, ARISPE N, HAIGLER HT, BURNS AL, POLLARD HB. Identification of annexins as calcium channels in biological membranes. *Bone Miner* 1992; **17**: 214–218.
- [72] ROJAS E, POLLARD HB, HAIGLER HT, PARRA C, BURNS AL. Calcium-activated endonexin II forms calcium channels across acidic phospholipid bilayer membranes. *J Biol Chem* 1990; **265**: 21207–21215.
- [73] RÖMISCH J, PÂQUES E-P. Annexins: calcium-binding proteins of multi-functional importance? *Med Microbiol Immunol* 1991; **180**: 109–126.
- [74] ROSS TS, TAIT JF, MAJERUS PW. Identity of inositol 1,2-cyclic phosphate 2-phosphohydrolase with lipocortin III. *Science* 1990; **248**: 605–607.
- [75] RUSSO-MARIE F. Lipocortins: an update. *Prostaglandins Leukotrienes Essent. Fatty Acids* 1991; **42**: 83–89.
- [76] SARAFIAN T, PRADEL L-A, HENRY J-P, AUNIS D, BADER M-F. The participation of annexin II (calpactin I) in calcium-evoked exocytosis requires protein kinase C. *J Cell Biol* 1991; **114**: 1135–1147.
- [77] SCHLAEPFER DD, HAIGLER HT. Characterization of Ca²⁺-dependent phospholipid binding and phosphorylation of lipocortin I. *J Biol Chem* 1987; **262**: 6931–6937.
- [78] SCHLAEPFER DD, HAIGLER HT. Expression of annexins as a function of cellular growth state. *J Cell Biol* 1990; **111**: 229–238.
- [79] SCHLAEPFER DD, JONES J, HAIGLER HT. Inhibition of protein kinase C by annexin V. *Biochemistry* 1992; **31**: 1886–1891.
- [80] SENDA T, OKABE T, MATSUDA M, FUJITA H. Quick-freeze, deep-etch visualization of exocytosis in anterior pituitary secretory cells: localization and possible roles of actin and annexin II. *Cell Tissue Res* 1994; **277**: 51–60.
- [81] SIKORSKI AF, DIAKOWSKI W, KUCZEK M. Szkielet błony erytrocytu. *Post Biol Kom* 1993; **20**: 93–110.

- [82] SMITH PD, MOSS SE. Structural evolution of the annexin supergene family. *Trends Genet* 1994; **10**: 241–245.
- [83] SMYTHE E, SMITH PD, JACOB SM, THEOBALD J, MOSS SE. Endocytosis occurs independently of annexin VI in human A431 cells. *J Cell Biol* 1994; **124**: 301–306.
- [84] SUN J, SALEM HH, BIRD P. Nucleolar and cytoplasmic localization of annexin V. *FEBS Lett* 1992; **314**: 425–429.
- [85] SWAIRJO MA, SEATON BA. Annexin structure and membrane interactions: a molecular perspective. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1994; **23**: 193–213.
- [86] SWEELEY ChC. Lipid and the modulation of cell function. [w] Hoekstra D [red.] *Current Topics in Membranes*. t 40. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press 1994: 357–360.
- [87] TAGOE CE, BOUSTEAD CM, HIGGINS SJ, WALKER JH. Characterization and immunolocalization of rat liver annexin VI. *Biochim Biophys Acta* 1994; **1192**: 272–280.
- [88] TRUMP BF, BEREZESKY IK. Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J* 1995; **9**: 219–228.
- [89] TSAO FHC, GAU CS, YU H, ZOGRAFI G. The surface properties of lung 36 kDa Ca²⁺-dependent phospholipid-binding protein. *Biochim Biophys Acta* 1993; **1166**: 39–47.
- [90] Van BLITTERSWIJK WJ, SCHAAP D, van der BEND RL. Generation and attenuation of lipid second messengers in intracellular signaling. [w] Hoekstra D [red.] *Current Topics in Membranes*, t 40. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press 1994: 413–438.
- [91] VANCE DE. Phospholipid metabolism and cell signalling in eucaryotes. [w] Vance DE, Vance J. [red.] *New Comprehensive Biochemistry*, t 20. Amsterdam, London, New York, Tokyo: Elsevier 1991: 205–240.
- [92] VISHWANATHA JK, JINDAL HK, DAVIS RG. Annexin VI-binding proteins in brain. Interaction of annexin VI with a membrane skeletal protein, calspectin (brain spectrin or fodrin). *J Cell Sci* 1992; **101**: 25–34.
- [93] WATANABE T, INUI M, CHEN BY, IGA M, SOBUE K. Annexin VI-binding proteins in brain. Interaction of annexin VI with a membrane skeletal protein, calspectin (brain spectrin or fodrin). *J Biol Chem* 1994; **269**: 17656–17662.
- [94] WATERS MG, GRIFF IC, ROTHMAN JE. Proteins involved in vesicular transport and membrane fusion. *Curr Opin Cell Biol* 1991; **3**: 615–620.
- [95] WILLIAMS RJP. Calcium and calmodulin. *Cell Calcium* 1992; **13**: 355–362.
- [96] ZACHOWSKI A. Evaluation of the annexins as potential mediators of membrane fusion in exocytosis. *Biochem J* 1993; **294**: 1–14.
- [97] ZAKS WJ, CREUTZ CE. Evaluation of the annexins as potential mediators of membrane fusion in exocytosis. *J Bioenerg Biomembr* 1990; **22**: 97–120.
- [98] ZUBAY G. *Biochemistry*. Dubuque, Iowa; Melbourne, Australia; Oxford, England: Wm C Brown Publishers 1993: 1–1024.

Otrzymano: 04.07. 1995 r.

Przyjęto: 12.12. 1995 r.

Adres autora: 02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3

CYTOGENETYKA PRZEWLEKŁEJ BIAŁACZKI SZPIKOWEJ. I. PRZEWLEKŁA BIAŁACZKA SZPIKOWA Ph-DODATNIA [Ph(+) CML]

CYTOGENETICS OF CHRONIC MYELOID LEUKEMIA I. Ph-POSITIVE CHRONIC MYELOID LEUKEMIA [Ph(+) CML]

Olga HAUS

Zakład Genetyki AM we Wrocławiu

Streszczenie. Chromosom Filadelfia (Ph), powstały w wyniku translokacji t(9;22)(q34;q11), jest pierwotną aberracją chromosomową w przewlekłej białaczce szpikowej. t(9;22)(q34;q11) powoduje fuzję zlokalizowanego na chromosomie 9 genu *abl* z genem *bcr* zlokalizowanym na 22. W zależności od punktów złamań w *bcr* gen *bcr/abl* ma różną długość, różne są jego transkrypty oraz produkty białkowe; p210 – występujący głównie w przewlekłej białaczce szpikowej oraz p190 – głównie w ostrych białaczkach Ph(+). *bcr/abl* zwiększa proliferację, hamuje apoptozę oraz stymuluje autokrynne wydzielanie czynników wzrostu przez komórki białaczkowe. t(9;22)(q34;q11) powstaje albo jako jedna z wielu translokacji w leukemogenezie i ulega następnie pozytywnej selekcji środowiskowej, albo nieprzypadkowo – jej powstaniu sprzyjałaby bliskość DNA chromosomów 9 i 22 w interfazie oraz homologia sekwencji DNA w pobliżu miejsc złamań *bcr* i *abl*. Lokalizację punktów złamań *bcr* próbuje się powiązać z lepszym lub gorszym rokowaniem w chorobie.

Słowa kluczowe: przewlekła białaczka szpikowa, cytogenetyka, chromosom Ph, translokacja t(9;22), fuzja *bcr/abl*, leukemogeneza.

Summary. Philadelphia chromosome (Ph), resulting from a translocation t(9;22)(q34;q11), is a primary chromosome aberration in chronic myeloid leukemia. t(9;22)(q34;q11) causes a fusion of *abl* gene, localized on chromosome 9, with *bcr* gene, localized on 22. As a function of breakpoints localization on *bcr* – a fusion gene has different length, different transcripts and products; p210 – mainly in chronic myeloid leukemia and p190 – in Ph(+) acute leukemias. *bcr/abl* increases cell proliferation, induces autocrine secretion of growth factors and inhibits apoptosis of leukemic cells. In the course of leukemogenesis t(9;22) arises randomly, as one among multiple translocations, which is subsequently positively selected, or nonrandomly – its generation would be favoured by spatial relationship of chromosome 9 and 22 DNA in interphase and homology of DNA sequence close to *bcr* and *abl* breakpoints. *bcr* breakpoints localization is supposed to be related to disease prognosis.

Key words: chronic myeloid leukemia, cytogenetics, Ph chromosome, t(9;22) translocation, *bcr/abl* fusion, leukemogenesis.

Badania genetyczne w nowotworach układu krwiotwórczego zapoczątkowali w 1960 r. Nowell i Hungerford, stwierdzając w leukocytach chorego na przewlekłą białaczkę szpikową (CML – *chronic myeloid leukemia*) obecność małego metacentrycznego chromosomu powstałego w wyniku delecji części długich ramion chromosomu grupy G [63]. Od nazwy miasta, w którym został po raz pierwszy opisany, nazwano go chromosomem Filadelfia (Ph). W 1973 r. wykazano, że chromosom Ph powstaje w wyniku zrównoważonej translokacji wzajemnej między chromosomami 9 i 22: t(9;22)(q34;q11) [77] (rys. 1). Dzięki technikom prążkowym o wysokiej rozdzielczości uściślono lokalizację punktów złamań: 9q34.1 i 22q11.2 [67], zaś badania molekularne w pełni udowodniły, że translokacja między chromosomami 9 i 22 jest translokacją wzajemną, tzn. duży fragment ramion długich chromosomu 22 zostaje przeniesiony na długie ramiona 9 na wymianę z niewielkim ich fragmentem ledwie widocznym w badaniach cytogenetycznych [25].

1. CHROMOSOM Ph JAKO CYTOGENETYCZNY MARKER CML

Chromosom Ph, powszechnie uznawany za marker CML, jest w niej pierwotną aberracją chromosomową. Jego obecność w kariotypie komórek białaczkowych stwierdza się w większości przypadków od momentu rozpoznania [32]. Wyniki badań ofiar wybuchów atomowych w Hiroszimie i Nagasaki, u których rozwinęła się CML, oraz badań kinetyki cyklu komórkowego w CML wskazują, że Ph pojawia się w pojedynczych komórkach macierzystych szpiku średnio na 8 lat przed wystąpieniem pierwszych objawów choroby [33]. Po wybuchu atomowym Ph występował wśród wielu przypadkowych aberracji, z których tylko nieliczne pozwalały komórkom na przetrwanie i proliferację [2,33]. Bezpośredni związek napromieniowania z powstaniem Ph udowodniono *in vitro*, otrzymując w wyniku zadziaływania promieniami X na komórki HL-60 zmiany na poziomie molekularnym odpowiadające temu chromosomowi (fuzja genów *bcr/abl*) [36].

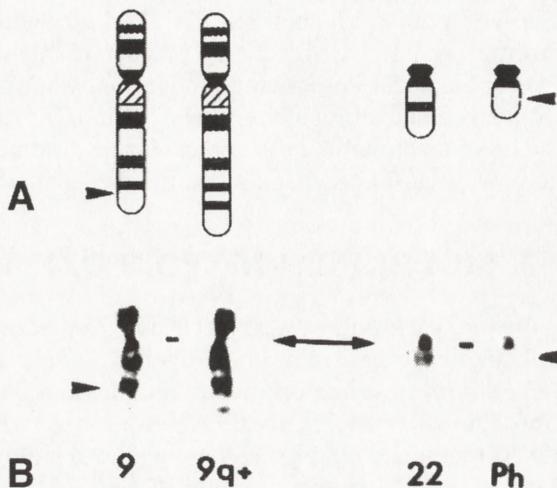
Jako wtórny nowotwór CML rozwija się rzadko, po 3 do 16 latach od rozpoczęcia chemio- lub radioterapii poprzedniego nowotworu [7,28,51]. Zawodowa ekspozycja na mutageny może również przyczynić się do rozwoju CML, nawet po krótkim czasie od początku ekspozycji [28]. Z reguły jednak nie udaje się udowodnić związku przyczynowo-skutkowego, gdyż CML, tak jak i wiele innych przewlekłych chorób nowotworowych, jest najczęściej wynikiem sumowania się działania wielu czynników ryzyka [9]. Rozwojowi CML mogą sprzyjać wrodzone aberracje chromosomów lub zaburzenia w strukturze heterochromatyny, będące źródłem niestabilności genetycznej [39,42]. Nie udowodniono dotąd zakaźnego podłoża CML, choć analiza niektórych przypadków go nie wyklucza [88].

Następstwem pojawienia się Ph w komórkach szpiku są ich fenotypowe zmiany: zaburzone dojrzewanie, zmniejszone przyleganie do macierzy szpikowej, zwiększona proliferacja oraz zmniejszone podleganie zaprogramowanej śmierci komórkowej, czyli apoptozie, powodujące ich przewagę nad komórkami prawidłowymi [5,11,38,79].

Według niektórych autorów Ph nie jest jednak pierwotną zmianą genetyczną w CML. Badania inaktywacji polimorficznych markerów sprzężonych z chromosomem X wskazują, że klonalny rozrost komórek istnieje już przed pojawieniem się Ph [70]. Translokacja t(9;22) byłaby więc tylko jednym z ogniw w wielostopniowym procesie leukemogenezy, zmianą wtórną do zmian fenotypu, u podłoża których leżą inne klonalne zmiany genetyczne [8,89]. Potwierdzeniem takiego poglądu mogą być pojedyncze opisane przypadki późnego pojawienia się Ph w przebiegu CML [46].

Obecność chromosomu Ph stwierdza się we wszystkich liniach komórkowych układu krwiotwórczego zaangażowanych w proces białaczkowy [73,81]. Do niedawna sądzono, że Ph nie występuje w szeregu limfocytów T, jednak ostatnio opisano udział tych limfocytów w procesie białaczkowym, zarówno w fazie przewlekłej CML jak i w przełomie limfoblastycznym [81,90]. Brak Ph w limfocytach T w większości przypadków CML może wynikać z obecności długo żyjących grasiczozależnych klonów, które powstały z prawidłowej komórki jeszcze przed zadziałaniem czynnika powodującego transformację nowotworową [62]. W przypadkach Ph(+) CML z zajęciem linii limfocytów T transformacja nowotworowa, połączona z nabyciem nowej cechy w postaci chromosomu Ph, musiała zajść w komórce, wspólnej dla linii granulocytowej, monocytowej, megakarioblastycznej, erytroblastycznej oraz linii limfocytów T i B, jeszcze przed ich odłączeniem się od wspólnej linii rozwojowej. Pogląd ten znajduje potwierdzenie w jednolitości zmian cytogenetycznych we wszystkich liniach komórkowych w CML przebiegającej z zaangażowaniem limfocytów T [81] oraz w doświadczalnie stwierdzonej multipotencjalności komórek Ph(+) [41].

Obecność chromosomu Ph stwierdza się również w CML typu dorosłych u dzieci, w źle rokującej ostrej białaczce limfoblastycznej u dzieci (3–5% przypadków) i u dorosłych (15–30% przypadków) w ostrej białaczce szpikowej, najczęściej typu M_1 , rzadziej M_2 lub M_4 oraz w pojedynczych przypadkach pierwotnej trombocytemii i



Rys.1. Translokacja t(9;22)(q34;q11): a) schemat, b) przykład (materiał własny); "głowy" strzałek wskazują punkty złamań chromosomów: 9q34 i 22q11

mielofibrozy [1,15,64,82]. W ostrej białaczce dwufenotypowej Ph jest jedną z najczęściej występujących aberracji [73]. Pod względem morfologicznym jest to taki sam chromosom jak w CML. Z tego powodu różnicowanie przełomu blastycznego CML i ostrej białaczki Ph-dodatniej może sprawiać spore trudności, zwłaszcza gdy obraz kliniczny i hematologiczny nie jest jednoznaczny. Z pomocą przychodzą wówczas badania molekularne, gdyż molekularnie chromosom Ph występujący w CML różni się w większości przypadków od Ph obecnego w ostrych białaczkach [31].

2. MOLEKULARNE PODŁOŻE TRANSLOKACJI t(9;22)

W prążkach odpowiadających punktom złamań chromosomów 9 i 22 w CML, zlokalizowane są dwa protoonkogeny: *c-abl* – w 9q34.1 i *c-sis* w obrębie 22q12.3-q13.1. *c-abl* jest komórkowym homologiem genu transformującego wirusa pre-B-limfocytowej mysiej białaczki Abelsona, *c-sis* – homologiem transformującego genu wirusa małego mięsaka. Jego prawidłową biologiczną rolą jest kodowanie łańcucha B płytkowego czynnika wzrostu (PDGF) [15,25,92].

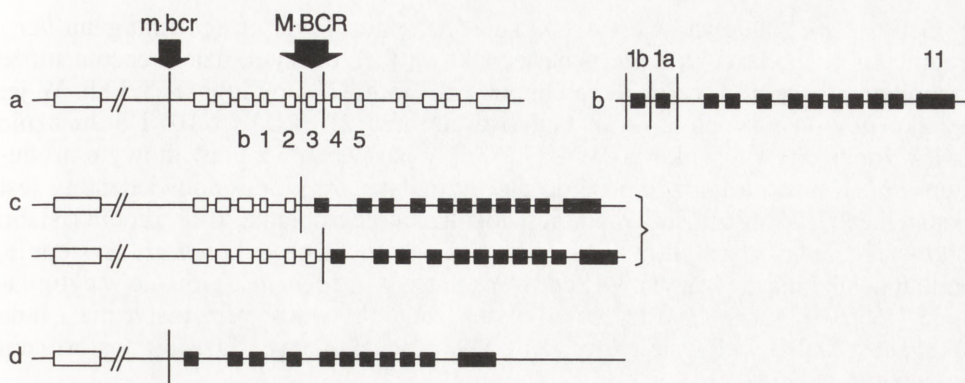
Stosując hybrydyzację *in situ* na chromosomach metafazalnych wykazano, że *c-abl* i *c-sis* są wzajemnie wymieniane w wyniku t(9;22). W trakcie tej translokacji *abl* podlega zmianom strukturalnym powodującym jego aktywację, zaś *sis* pozostaje strukturalnie niezmieniony i nie bierze udziału w patogenezie CML [25].

2.1. Gen *abl*

Protoonkogen *c-abl*, zachowany u wszystkich gatunków w trakcie ewolucji w prawie nie zmienionej formie, zbudowany jest z około 320 tys. par nukleotydów (kb). Na 5' końcu tego genu znajdują się dwa alternatywnie transkrybowane eksony 1a i 1b, oddzielone od siebie bardzo długim intronem liczącym 175 kb. Na 3' końcu *abl* zlokalizowano 10 eksonów: 2–11 [25]. W wyniku transkrypcji genu *abl*, w zależności od alternatywnego udziału w niej eksonu 1a albo 1b, powstaje m-RNA o długości 6 albo 7 kb. Produktem translacji protoonkogeny *abl* jest białko o wielkości 145 kDa i słabej aktywności kinazy tyrozynowej należące do zależnego od genu *ras* systemu kontroli proliferacji komórkowej [14]. Aktywność tego białka jest regulowana w cyklu komórkowym poprzez specyficzną interakcję z anty-onkogenem *rb* [17]. Złamania chromosomu 9, będące podłożem t(9;22) w CML, zachodzą w różnych punktach *abl*. Najczęściej grupują się w obrębie długiego intronu między eksonami 1a i 1b, rzadziej – między eksonami 1a i 2 lub w kierunku 5' od eksonu 1b [25,92] (rys. 2). Fuzja *abl* z *bcr* przerywa prawidłową drogę przewodzenia sygnałów zależną od *ras* i powoduje zaburzenie sygnału proliferacyjnego [14,66].

2.2. Gen *bcr*

W odróżnieniu od punktów złamań chromosomu 9, rozproszonych w obrębie ABL, lokalizacja złamań chromosomu 22 w CML jest ściśle ograniczona. Koncentrują się one w niewielkim obszarze o wielkości 5,8 kb, dawniej nazywanym *bcr*



Rys. 2. Schematyczny diagram genów: *bcr* (a), *abl* (b) oraz genu *bcr/abl*: w przewlekłej białaczce szpikowej – połączenie b2a2 lub b3a2 (c) i w ostrych białaczkach – połączenie b1a2 (d)

(*breakpoint cluster region*), obecnie – *M-bcr-1* (*major breakpoint cluster region*) [25]. Jest on zawarty w większej sekwencji o długości 90 kb, zbudowanej z 21 eksonów, zwanej genem BCR [29] albo *phl* [6] (rys. 2).

Eksony 12–15 genu *bcr* leżą w obszarze *M-bcr-1* i określane są jako jego eksony b1–b4. One właśnie biorą udział w t(9;22) w CML [29]. W pojedynczych przypadkach Ph(+) CML nie stwierdza się jednak typowej rearanżacji *bcr*, a punkt złamania chromosomu 22 leży najczęściej w kierunku 3' od *M-bcr-1* [61]. Alternatywnymi transkryptami genu *bcr* są, zależnie od transkrypcji różnego zestawu eksonów, mRNA o różnej długości: głównie 4,5 kb i 7,0 kb. Kodują one fosfoproteiny o aktywności kinaz treoninowych i serynowych. Najczęściej spotykany 4,5 kb mRNA koduje białko 160 kDa złożone z 1271 aminokwasów o aktywności GTP-azowej oraz kinazy serynowo-treoninowej [15,20,49]. Białko to tworzy z produktem białkowym chimerycznego genu *bcr/abl* – p210 – kompleksy, które prawdopodobnie odgrywają znaczącą rolę w podtrzymywaniu białaczkowego potencjału komórek CML [10,49].

2.3. Fuzja genów *bcr* i *abl* w przewlekłej białaczce szpikowej

Efektorem t(9;22) w CML jest fuzja genów *bcr* i *abl* [92]. Jeden hybrydowy gen – *bcr/abl* – lokalizuje się na chromosomie Ph w *locus bcr*, drugi – *abl/bcr* – na chromosomie 9q+ w *locus abl*. Złamania w *bcr* zachodzą w 70% przypadków między eksonem b2 i b3 regionu *M-bcr-1*, w 30% – między b3 i b4. W pierwszym przypadku w obręb genu *bcr/abl* wchodzi eksony b1 i b2, w drugim – eksony b1–b3 [25,29]. Pochodzący z *abl* ekson 1a (i 1b, jeśli jest obecny w *bcr/abl*) jest eliminowany podczas potranskrypcyjnego dojrzewania mRNA. Niezależnie od punktu złamania *abl* w obręb mRNA genu *bcr/abl* wchodzi więc tylko eksony a2–a11, tworząc połączenia typu b2a2 lub b3a2 [25] (rys. 2). mRNA obu typów może być równocześnie znajdowane w tych samych koloniach komórek CML [37]. We wczesnych komórkach progenitornych mających gen *bcr/abl* można natomiast nie stwierdzić ich obecności [4].

Gen *bcr/abl* zbudowany jest w taki sposób, że transkrypty fragmentu genu *bcr* i fragmentu pochodzącego z *abl* mają jednakową fazę odczytu, dzięki czemu może zachodzić proces translacji całego chimerycznego mRNA o długości 8,5 kb. W jej wyniku powstaje zupełnie nowe białko o ciężarze 210 kDa (p210) i o znacznie zwiększonej aktywności kinazy tyrozynowej w porównaniu z prawidłowym produktem *abl*. Kinaza ta ma zdolność do autostymulacji, za którą odpowiedzialny jest ekson 1 genu *bcr* [86]. Zmieniona jest lokalizacja tego białka: o ile produkt słabo aktywnego genu *abl* znajduje się w jądrze komórkowym, produkt *bcr/abl* występuje, podobnie jak kinaza tyrozynowa kodowana przez wirusowy *abl*, głównie w cytoplazmie [19]. Być może obie te cechy: zwiększona aktywność enzymatyczna i inna lokalizacja białka wpływają na rozwój CML w początkowych fazach transformacji nowotworowej [25].

Ekspresję genu hybrydowego *bcr/abl* reguluje prawdopodobnie onkogen *c-myc* zlokalizowany w 6q23. Zdziałanie oligonukleotydami antysensowymi dla *c-myc* na hodowle komórek CML powoduje znikanie komórek: *bcr/abl* (+) [71,72,86].

Fuzja *bcr* z *abl* pozwala komórkom białaczkowym na uniezależnienie się od zewnątrzkomórkowych czynników wzrostu poprzez uruchomienie autokrynnego mechanizmu ich wydzielania [85]. Gen *bcr/abl* może hamować apoptozę [5,87] oraz transformować zwierzęce komórki *in vitro* i *in vivo*, w czym pośredniczy prawdopodobnie gen *bcl-2* [53,78]. Transfekcja mysich komórek szpiku genem *bcr/abl* powoduje z reguły rozwój choroby podobnej do CML [16]. Jednak czasami obraz choroby przypomina nowotwory limfoidalne, co może świadczyć o wbudowaniu *bcr/abl* w obręb pierwotnej komórki pnia, wspólnej dla linii limfo- i mieloidalnej [24].

Ostatnio podkreśla się również rolę zlokalizowanego na chromosomie 9 hybrydowego genu *abl/bcr*, który uważano za gen nieaktywny. Stwierdzono, że jest on, tak jak i *bcr/abl*, aktywny w CML [54]. Przypuszczalnie oba geny – *bcr/abl* i *abl/bcr*, a nie tylko *bcr/abl* są zaangażowane w proces leukemogenezy [3].

Zdziałanie oligonukleotydami antysensowymi dla *bcr/abl*, które znajdują się już w fazie prób klinicznych, na komórki białaczkowe powoduje z reguły zahamowanie procesu białaczkowego [5,37,50,86]. Wycinanie swoistymi rybozymami transkryptu b3a2 *bcr/abl* powoduje zahamowanie proliferacji komórek CML [44].

2.4. Geneza translokacji t(9;22) i zjawisko imprintingu genowego

Translokacja t(9;22) jest specyficzna dla nowotworów hematologicznych; nie znaleziono jej dotąd w innych nowotworach mimo występujących w nich różnorodnych aberracji [79].

Geneza t(9;22) nie jest w pełni wyjaśniona. Na podstawie cytogenetycznej analizy polimorfizmu chromosomów 9 i 22 Haas i wsp. stwierdzili, że w tę translokację zaangażowane jest zjawisko imprintingu; chromosom 9q+ jest zawsze pochodzenia ojcowskiego, Ph – matczyne [27]. Hipotezę tę potwierdza fakt, że ekspresja prawidłowego *abl* zachodzi w całości androgenetycznej tkance zaśniadu groniastego i kosmówczaaka złośliwego, w których nie stwierdza się ekspresji *bcr* [30,65]. Natomiast na podstawie różnorodnych badań molekularnych wykazano, że ani ABL, ani *bcr* nie ulegają zjawisku imprintingu; w prawidłowych leukocytach zachodzi

ekspresja i ojcowskich, i matczyńskich alleli tych genów [55,56,74]. Wyniki innych badań molekularnych, prowadzonych na małej grupie pacjentów, były zbieżne z wynikami Haasa i wsp., choć wskazywały na ojcowskie, a nie matczyne pochodzenie zaangażowanego w translokację genu *bcr* [47,48]. Rozbieżności te mogą wynikać z znacznej częstości homologicznych rekombinacji somatycznych pomiędzy polimorficznymi regionami chromosomów 9 i 22 [47,55,56] oraz odmiennych kryteriów doboru pacjentów do badań cytogenetycznych i molekularnych [26]. Za ideą imprintingu przemawia fakt odmiennej metylacji prawidłowych alleli *bcr* i *abl* w porównaniu z hybrydowym genem *bcr/abl*, nie podważa jej natomiast zjawisko biallelicznej ekspresji genów *bcr* i *abl*, gdyż wiele napiętnowanych genów ma w jednych tkankach ekspresję bialleliczną, podczas gdy w innych – monoalleliczną [18,26].

Wystąpienie translokacji właśnie pomiędzy chromosomami 9 i 22 próbowano wytłumaczyć ich bliskim sąsiedztwem w obrębie płytki metafazalnej, a więc prawdopodobnie i w interfazie [91]. Rowley uważa, że translokacji t(9;22) sprzyjają dwa czynniki: bliskość pomiędzy 9 i 22 w jądrze interfazalnym oraz homologia regionów wymiany w tych chromosomach [77].

Obecnie najbardziej prawdopodobne wydają się dwie hipotezy:

1) Hipoteza tłumacząca wystąpienie t(9;22) w CML jako jednej z wielu różnorodnych przypadkowych mutacji powstałych wskutek zaburzeń mechanizmów naprawy DNA z następową pozytywną selekcją środowiskową zmian korzystnych. Komórki hematopoetyczne z t(9;22), jako mające największy potencjał "nowotworowy", przeżywałyby dając początek klonom komórkowym Ph-dodatnim, a komórki z innymi translokacjami ginęłyby w wyniku selekcji [22].

2) Hipoteza somatycznej rekombinacji pomiędzy chromosomami 9 i 22 w pierwotnych komórkach pnia, negująca przypadkowość pojawienia się t(9;22) w CML i chorobach pokrewnych [22,52]. Nieprzypadkowość tej rekombinacji może wynikać z podobieństwa genów *bcr* i *abl* pod względem funkcjonowania (np. ich produkty obecne są we wszystkich komórkach) i struktury (np. obydwie zawierają długie introny na 5' końcach) [25]. Dzięki wspólnym cechom sekwencji DNA geny te mogą stanowić "gorące punkty" (*hot-spots*), mogą więc być podatne na powtarzające się złamania i wzajemne wymiany [22]. Takimi "hot-spots" w obrębie *bcr* i *abl* mogą być sekwencje Alu, obserwowane po obu stronach w pobliżu miejsca złamania i połączenia *bcr* i *abl*. Inwersja Alu i nieprawidłowe sparowanie pętli utworzonych z takich odwróconych sekwencji mogłyby być odpowiedzialne za powstanie t(9;22) [13,22].

2.5. Chromosom Ph w ostrych białaczkach (AL)

Analizując problem identyczności chromosomu Ph w AL i w CML postawiono hipotezę, że ostre białaczki Ph(+) i ostra faza Ph(+) CML stanowią różne postaci tej samej choroby. W tym ujęciu ostre białaczki Ph(+) byłyby jedynie ostrą fazą CML nie rozpoznanej w fazie przewlekłej [12,75]. Pogląd ten znajdował potwierdzenie w przypadkach przełomu blastycznego, błędnie rozpoznanych jako AL. Jednakże przełomy blastyczne w CML mają w 75% charakter mieloblastyczny, natomiast chromosom Ph występuje z większą częstością w ostrej białaczce limfatycznej (ALL=*acute*

lymphoblastic leukemia) niż w ostrej białaczce szpikowej (AML=*acute myeloblastic leukemia*) [15]. Ponadto w AL Ph występuje często jedynie w pewnym odsetku komórek, natomiast w ostrej fazie Ph(+) CML z reguły wszystkie komórki są Ph-dodatnie. W remisji AL chromosom Ph znika, podczas gdy po skutecznej terapii przełomu blastycznego CML znikają inne, wtórne aberracje, natomiast Ph pozostaje [23].

Na poziomie badania cytogenetycznego chromosom Ph z CML nie różni się od Ph z AL. W obu przypadkach występują te same punkty złamań chromosomów 9 i 22 [25]. Na poziomie molekularnym mogą jednak występować różnice. W 50% przypadków ALL dorosłych złamania chromosomu 22 lokalizują się w obrębie M-*bcr-1* [43], w pozostałych 50% oraz w ok. 90% przypadków ALL u dzieci złamania występują poza M-*bcr-1*, w obrębie tzw. m-*bcr* (*minor breakpoint cluster region*) (rys. 2) [13,31]. Ta heterogenność molekularna odzwierciedla się również w heterogenności linii komórkowych w ALL [83]. W Ph(+) AML, która stanowi ok. 1% wszystkich przypadków AML, złamania lokalizują się w M-*bcr-1* albo w m-*bcr* [31].

W wyniku transkrypcji hybrydowego genu, w którym połączenie nastąpiło pomiędzy eksonem 1 *bcr* a eksonem 2 *abl* (b1a2), powstaje 7kb mRNA kodujący białko 190 kDa(p190). Oba białka p190 i, jak w CML, p210 są równolegle znajdowane w AL [41]. Opisano przypadek Ph(+) ALL, w którym *bcr/abl* nie zawierał eksonu a2 *abl* (fuzja b3a3 – białko 203 kD), co dowodzi, że obecność tego eksonu nie jest niezbędna do inicjacji procesu białaczkowego [35]. Nie znaleziono dotąd różnic między 8kb transkryptami *bcr/abl* ani między jego produktami białkowymi p210, pochodzącymi z AL i z CML [86]. Natomiast w pojedynczych przypadkach przełomu blastycznego CML opisywano występowanie charakterystycznego dla AL białka p190. Pojawienie się go w trakcie fazy przewlekłej CML mogłoby być zwiastunem ostrej fazy choroby [76].

p190 i p210 indukują podobne typy białaczek u zwierząt doświadczalnych, jednak w przypadku p190 choroba ma bardziej agresywny przebieg, co wskazuje, że typ białka BCR/ABL nie wpływa na rodzaj choroby, ale na siłę sygnału onkogenego [40]. Białka te wiążą się prawdopodobnie z różnymi komórkami pierwotnymi: p190 – z ukierunkowaną limfopoetycznie, p210 – z pluripotencjalną [15].

2.6. Rokownicze znaczenie lokalizacji złamań w obrębie M-BCR-1

W wielu badaniach próbowano powiązać określoną lokalizację punktów złamań w obrębie M-*bcr-1* z poszczególnymi cechami klinicznymi i hematologicznymi oraz z rokowaniem w CML [34,80]. W 1987 r. Schaefer-Rego i wsp. wykazali, że pacjenci w fazie przełomu blastycznego mają punkty złamań w pobliżu 3'końca M-*bcr-1* [80]. W późniejszych pracach stwierdzono krótszy czas trwania fazy przewlekłej i krótszy całkowity czas przeżycia w grupie pacjentów z punktami złamań w pobliżu 3'końca M-*bcr* (mRNA typu b3a2), w porównaniu z grupą ze złamaniami w pobliżu końca 5' (mRNA typu b2a2) oraz większe ryzyko nawrotu choroby po allogenicznym przeszczepie szpiku u tych pacjentów [45,58].

Wpływ lokalizacji punktów złamań na różnice w przebiegu klinicznym CML próbuje się tłumaczyć zmianami długości transkryptu oraz zmianami fazy jego odczytu zależnymi od charakteru odcinka genu *M-bcr-1* wchodzącego w skład chimery *bcr/abl* [60]. Mogłyby one wpłynąć na powstanie białka BCR/ABL o typowym ciężarze (210 kDa), lecz innych właściwościach fizykochemicznych i o zmienionym działaniu [6]. Określony typ białka musiałby być jednak obecny u danego pacjenta przez cały czas trwania choroby; nie stwierdzono bowiem dotychczas zmian lokalizacji punktów złamań przy przejściu fazy przewlekłej w fazę ostrą CML [6,58].

Wyniki badań innych ośrodków nie potwierdzają związku między lokalizacją złamań a przebiegiem CML [20,59,68,69,84]. Rozbieżności w wynikach mogą zależeć od fazy choroby, w której pacjenci zgłaszali się na badanie, stosowanego leczenia oraz różnic w charakterystyce grup pacjentów [6,57]. Rozstrzygnięcie problemu pozwoliłoby na wykorzystanie badań molekularnych w ustalaniu rokowania co do przebiegu i czasu trwania choroby.

LITERATURA

- [1]AURER I, BUTTURINI A, GALE RP. BCR-ABL rearrangements in children with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1991; **78**: 2407–2410.
- [2]AWA AA. Persistent chromosome aberrations in the somatic cells of A-bomb survivors, Hiroshima and Nagasaki. *J Radiat Res* 1991; **32**, suppl.: 265–274.
- [3]BARTRAM CR. Application of molecular genetics to diagnosis in leukemia. [w]Haematology Trends'93, [red.] Lechner. Gardner. [wyd.] Schattauer Stuttgart, New York 1993: 280–293.
- [4]BEDI A, ZEHNBAUER BA, COLLECTOR MI, BARBER JP, ZICHA MS, SHARKIS SJ, JONES RJ. BCR-ABL gene rearrangement and expression of primitive hematopoietic progenitors in chronic myeloid leukemia. *Blood* 1993; **81**: 2898–2902.
- [5]BEDI A, ZEHNBAUER BA, BARBER JP, SHARKIS SJ, JONES RJ. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1994; **83**: 2038–2044.
- [6]BIRNIE GD, MILLS KI, BENN P. Does the site of the breakpoint on chromosome 22 influence the duration of the chronic phase in chronic myeloid leukemia? *Leukemia* 1989; **8**: 545–547.
- [7]BOUABDALLAH K, MARIT G, REIFFERS J, BROUSTET A, BILHOU-NABERA C, WEN ZQ, BERNARD P. Hodgkin's disease and secondary Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1991; **55**: 277–278.
- [8]BRECHER G, ROSS D. Long-term prognosis and combined genomic hybridization. *Blood Cells* 1993; **19**: 684–686.
- [9]BROWNSON RC, NOWOTNY TE, PERRY MC. Cigarette smoking and leukemia. A meta-analysis. *Arch Int Med* 1993; **153**: 469–475.
- [10]CAMPBELL M, LU D, GUO JQ, ARLINGHAUS RB. Inhibition of phosphorylation of p160 BCR within p210 BCR-ABL complexes during early stages of phorbol ester-induced differentiation of K-562 cells. *Cell Growth Differ* 1993; **4**: 581–586.
- [11]CANNISTRA S. Chronic myelogenous leukemia as a model for genetic basis of cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 1990; **4**: 337–341.
- [12]CATOVSKY D. Ph¹ positive acute leukaemia and chronic granulocytic leukaemia: One or two diseases? *Br J Haematol* 1979; **42**: 493–498.

- [13]CHEN SJ, CHEN Z, FONT M-P, D'AURIOL L, LARSEN C-J, BERGER R. Structural alterations of the BCR and ABL genes in Ph 1 positive acute leukemia with rearrangements in the BCR gene first intron: further evidence implicating Alu sequences in the chromosome translocation. *Nucl Acid Res* 1989; **17**: 7631-7642.
- [14]CICCHETTI P, MAYER BJ, THIEL G, BALTIMORE D. Identification of a protein that binds to the SH3 region of Abl and is similar to Bcr and GAP-rho. *Science* 1992; **257**: 803-806.
- [15]CLINE MJ. The molecular basis of leukemia. *N Engl J Med* 1994; **330**: 328-336.
- [16]DALEY GQ, VANETTEN RA, BALTIMORE D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the p210^{bcr/abl} gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 1990; **247**: 824-830.
- [17]DANIEL R, CAI Y, WONG PMC, CHUNG S-W. Deregulation of c-abl mediated cell growth after retroviral transfer and expression of antisense sequences.. *Oncogene* 1995; **10**: 1607-1614.
- [18]DAVIES SM. Developmental regulation of genomic imprinting of the IGF 2 gene in human liver. *Cancer Res* 1994; **54**: 2560-2562.
- [19]DHUT S, CHAPLIN T, YOUNG BD. BCR-ABL and BCR protein: Biochemical characterization and localization. *Leukemia* 1990; **11**: 745-750.
- [20]DIEKMANN D, BRILL S, GARRETT MD, TOTTY N, HSUAN J, MONFRIES C, HALL C, LIM L, HALL A. BCR encodes a GTP-ase activating protein for p21^{rac}. *Nature* 1991; **351**: 675-684.
- [21]DIEKMANN L, BEELEN DW, QUABECK K, BECHER R, SCHULTE HOLTHAUSEN H, BUTZLER R, SCHAEFER UW, OPALKA B. Presence or re-appearance of BCR-ABL positive cells years after allogeneic bone marrow transplantation for chronic phase chronic myelogenous leukemia in patients in haematological remission. *Acta Haematol* 1994; **92**: 169-175.
- [22]DOBROVIC A, PETERS GB, FORD JH. Molecular analysis of the Philadelphia chromosome. *Chromosoma* 1991; **100**: 479-486.
- [23]DUB ID, CARTER RF, PINKERTON PH. Chromosome abnormalities in chronic myeloid leukaemia. *Tumor Biol* 1990; **11**: suppl. 1, 3-24.
- [24]ELEPHANTY AG, HARIHARAN IK, CORY S. bcr-abl, the hallmark of chronic myeloid leukemia in man, induces multiple haematopoietic neoplasms in mice. *EMBO J* 1990; **9**: 1069-1078.
- [25]GORSKA-FLIPOT J, NORMAN C, ADDY L, MINDEN M. Molecular pathology of chronic myelogenous leukemia. *Tumor Biol* 1990; **11**, suppl.1: 25-43.
- [26]HAAS OA. Are ABL or BCR imprinted? No definite answers, but more questions. *Leukemia* 1995; **4**: 740-743.
- [27]HAAS OA, ARGYRIOU-TIRITA A, LION T. Parental origin of chromosomes involved in the translocation t(9;22). *Nature* 1992; **359**: 414-416.
- [28]HAUS O. Kliniczne znaczenie badań cytogenetycznych w przebiegu przewlekłej białaczki szpikowej. Akademia Medyczna we Wrocławiu. Wrocław 1995.
- [29]HEISTERKAMP N, KNOPPEL E, GROFFEN J. The first BCR gene intron contains breakpoints in Philadelphia chromosome positive leukemia. *Nucl Acid Res* 1988; **16**: 10069-10081.
- [30]HOCHBERG A, GONIK B, GOSHEN R, DE GROOT N. A growing relationship between genomic imprinting and tumorigenesis. *Cancer Genet Cytogenet* 1994; **73**: 82-83.
- [31]HUNGER SP, CLEARY ML. PCR assessment of the efficacy of therapy in Philadelphia chromosome - positive leukemias [w] The Polymerase Chain Reaction. [red.] K.B. Mullis, F. Ferre, RA. Gibbs. Birkhauser, Boston 1994: 323-334.
- [32]HURET JL. Complex translocations, simple variant translocations and Ph-negative cases in chronic myelogenous leukaemia. *Hum Genet* 1990; **85**: 565-568.

- [33] ICHIMARU M, TOMONAGA M, AMENOMORI T, MATSUO T. Atomic bomb and leukemia. *J Radiat Res* 1991; **32**, suppl: 162–167.
- [34] INOKUCHI K, INOUE T, TOJO A, FUTAKI M, MIYAKE K, YAMADA T, TANABE Y, OHKI I, DAN K, OZAWA K, ASANO S, NOMURA T. A possible correlation between the type of bcr-abl hybrid messenger RNA and platelet count in Philadelphia-positive chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1991; **78**: 3125–3127.
- [35] INUKAI T, SUGITA K, SUZUKI T, IJIMA K, GOI K, TEZUKA T, KOJIKI S, HATAKEYAMA K, KAGAMI K, MORI T, OKAZAKI T, MIZUTANI S, NAKAZAWA S. A novel 203 kD aberrant BCR-ABL product in a girl with Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukaemia. *Brit J Haematol* 1993; **85**: 823–825.
- [36] ITO T, SEYAMA T, MIZUNO T, HAYASHI T, IWAMOTO KS, DOHI K, NAKAMURA N, AKIYAMA M. Induction of BCR-ABL fusion genes by *in vitro* irradiation. *Jpn J Cancer Res* 1993; **84**: 105–109.
- [37] KABISH A, PERENYIL, SEAY U, LOHMEYER J, PRALLE H. Unmodified phosphodiester antisense oligonucleotides to the BCR-ABL junction do not suppress Philadelphia-positive clonogenic cells. *Acta Haematol* 1994; **92**: 190–196.
- [38] KANTARJIAN HM, DEISSEROTH A, KURZROCK R, ESTROV Z, TALPAZ M. Chronic myelogenous leukemia: a concise update. *Blood* 1993; **3**: 691–703.
- [39] KAPAUN P, KABISCH H, HELD KR, WALTER TA, HEGEWISCH S, ZANDER AR. A typical chronic myelogenous leukemia in a patient with trisomy 8 mosaicism syndrome. *Ann Hematol* 1993; **66**: 57–58.
- [40] KELLIHER M, KNOTT A, MC LAUGHLIN J, WITTE ON, ROSENBERG N. Differences in oncogenic potency but not target cell specificity distinguish the two forms of BCR/ABL oncogene. *Mol Cell Biol* 1991; **11**: 1785–1792.
- [41] KITA K, SHIMIZU N, MIWA H, IKEDA T, NISHII K, MORITA N, UCHIDA T, SHIRAKAWA S, TSUTANI H, NASU K. A granulocytic population with rearranged immunogenotype in chronic myelocytic leukemia blast crisis and Philadelphia chromosome-positive acute leukemia with cross-lineage nature. *Leukemia* 1993; **7**: 251–257.
- [42] KRISTOFFERSSON U, BERNHEIM A, BERGER R, NILSSON B, HEIM S, MANDAHL N, MITELMAN F. Constitutional C-band polymorphism in lymphocytes from patients with chronic myeloid leukemia. *Hereditas* 1989; **110**: 145–148.
- [43] KURZROCK R, KANTARJIAN HM, SHTALRID M, GUTTERMAN JU, TALPAZ M. Philadelphia chromosome – negative chronic myelogenous leukemia without breakpoint cluster region rearrangement: A chronic myeloid leukemia with a distinct clinical course. *Blood* 1990; **75**: 445–452.
- [44] LANGE W, CANTIN EM, FINKE J, DOLKEN G. *In vitro* and *in vivo* effects of synthetic ribozymes targeted against BCR/ABL mRNA. *Leukemia* 1993; **7**: 1786–1794.
- [45] LEE M-S, KANTARJIAN M, DEISSEROTH A, FREIREICH E, TRUJILLO J, STASS S. Clinical investigation of bcr/abl splicing patterns by polymerase chain reaction (PCR) in Philadelphia chromosome (Ph⁺) positive chronic myelogenous leukemia (CML). *Blood* 1990; **76**: 294a.
- [46] LISKER R, CASAS L, MUTCHINICK O, LOPEZ-ARIZA B, LABARDINI J. Patient with chronic myelogenous leukemia and late-appearing Philadelphia chromosome. *Cancer Genet Cytogenet* 1982; **6**: 275–277.
- [47] LITZ CE. The parental origin of the Philadelphia chromosome: evidence of additional recurring recombinatorial events. *Leukemia* 1995; **9**: 744–745.
- [48] LITZ CE, COPENHAVER CM. Paternal origin of the rearranged major breakpoint cluster region in chronic myeloid leukemia. *Blood* 1994; **83**: 3445–3448.
- [49] LIU J, CAMPBELL M, GUO JQ, LU D, XIAN YM, ANDERSSON BS, ARLINGHAUS RB. BCR-ABL tyrosine kinase is autophosphorylated or transphosphorylates P160 BCR on tyrosine predominantly within the first BCR exon. *Oncogene* 1993; **8**: 101–109.

- [50] LUGER SM, RATAJCZAK MZ, STADTMAURER EA, MANGAN P, MAGEE D, SILBESTEIN I, EDELSTEIN M, NOWELL P, GEWIRTZ AM. Autografting for chronic myeloid leukemia (CML) with c-myc antisense oligonucleotide purged bone marrow: a preliminary report. *Blood* 1994; **84**: 151a.
- [51] MAJUMDAR G, HEARD SE, KABAROWSKI HS, AMIN S, PEARSON TC. Ph¹ positive chronic granulocytic leukaemia developing in a patient with primary proliferative polycythaemia: case report and literature review. *Leukemia Lymphoma* 1992; **6**: 423–425.
- [52] MATIOLI GT. On the topology of normal chromatids and on their translocations in myelogenous leukemia. *Med Hypotheses* 1990; **32**: 11–19.
- [53] MCWHIRTER JR, GALASSO DL, WANG JYJ. A coiled-coil oligomerization domain of bcr is essential for the transforming function of bcr-abl. *Mol Cell Biol* 1993; **12**: 7587–7595.
- [54] MELO JV, GORDON DE, GROSS NCP, GOLDMAN JM. The ABL-BCR fusion gene is expressed in chronic myeloid leukemia. *Blood* 1993; **81**: 158–165.
- [55] MELO JV, YAN X-H, DIAMOND J, GOLDMAN JM. Lack of imprinting of the ABL gene. *Nature Genet* 1994; **8**: 318–319.
- [56] MELO JV, YAN X-H, DIAMOND J, GOLDMAN JM. Balanced parental contribution to the ABL component of the BCR-ABL gene in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 1995; **9**: 734–739.
- [57] MILLS KI, BENN P, BIRNIE GD. Does the breakpoint within the major breakpoint cluster region (M-bcr) influence the duration of the chronic phase in chronic myeloid leukemia? An analytical comparison of current literature. *Blood* 1991; **78**: 1155–1161.
- [58] MILLS K, HYND S, BURNETT AK, MACKENZIE ED, BIRNIE GD. Further evidence that the site of the breakpoint in the major breakpoint cluster region (M-bcr) may be a prognostic factor. *Leukemia* 1989; **12**: 837–840.
- [59] MORRIS SW, DANIEL L, AHMAD CM, ALIAS A, LEOVITZ P. Relationship of bcr breakpoint to chronic phase duration, survival and blast crisis lineage in chronic myelogenous leukemia patients presenting in early chronic phase. *Blood* 1990; **75**: 2035–2042.
- [60] NAKAMURA K, MIYASHITA T, OZAKI M, IWAYA M, NAKAZAWA S, OKAMURA J, KAMADA N, TANAKA K, KOBAYASHI N, MIZUTANI S. Molecular studies of chronic myelogenous leukemia using the polymerase chain reaction. *Cancer* 1991; **68**: 2426–2430.
- [61] NEGRINI M, TALLARICO A, PAZZI J, CASTAGNOLI A, CUNEO A, CASTOLDI GL. A new chromosomal breakpoint in Ph positive bcr negative chronic myelogenous leukemia. Report of a case. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; **61**: 11–13.
- [62] NOWELL PC, FINAN JB, WEISS A. Karyotypic and clinical progression in chronic myelogenous leukemia after 30 years. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; **60**: 96–98.
- [63] NOWELL PC, HUNGERFORD DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960; **132**: 1487.
- [64] NOWELL PC, KANT JA, FINAN JB, CASSILETH PA, HANSON CA. Marrow fibrosis associated with a Philadelphia chromosome. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; **59**: 89–92.
- [65] PARK JS, NAMKOONG SE, LEE HY, KIM SJ, HONG KJ, KIM IS, KIM KU, SHIM BS. Expression and amplification of cellular oncogenes in human developing placenta and neoplastic trophoblastic tissue. *Asia Oceania J Obstet Gynecol* 1992; **18**: 57–64.
- [66] PAWSON T. Conviction by genetics. *Nature* 1992; **356**: 285–286.
- [67] PRAKASH O, YUNIS JJ. High resolution chromosomes of the t(9;22) positive leukemias. *Cancer Genet Cytogenet* 1984; **11**: 361–367.
- [68] PREJZNER W, ZAUCHA JM, HELLMANN A. Ocena korelacji miejsca pęknięcia w obrębie genu BCR z obrazem klinicznym chorych z przewlekłą białaczką szpikową. *Acta Haematol Pol* 1995; **26**, supl.1: 150, a.89.
- [69] PRICE CM, FOADI MD, MORGAN GJ, WIEDEMANN LM. Molecular analysis of a CML patient with a long duration of chronic phase before and after lymphoid blast crisis. *Leukemia* 1990; **6**: 455–457.

- [70] RASKIND WH, FIALKOW PJ. The use of cell markers in the study of human hematopoietic neoplasia. *Adv Cancer Res* 1987; **49**: 127–135.
- [71] RATAJCZAK MZ, HIJIYA N, CATANI L, DERIEL K, LUGER SM, MCGLAVE P, GEVIRTZ AM. Acute- and chronic-phase chronic myelogenous leukemia colony forming units are highly sensitive to the growth inhibitory effects of c-myb antisense oligonucleotides. *Blood* 1992; **79**: 1956–1961.
- [72] RATAJCZAK MZ, KANT JA, LUGER SM, HIJIYA N, ZHANG J, ZON G, GEWIRTZ AM. *In vivo* treatment of human leukemia in a scid mouse model with c-myb antisense oligodeoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 11823–11827.
- [73] REARDON DA, HANSON CA, ROTH MS. Lineage switch in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 1994; **73**: 1526–1532.
- [74] RIGGINS GJ, ZHANG F, WARREN ST. Lack of imprinting of BCR. *Nature Genet* 1994; **6**: 226.
- [75] ROMAN J, ANDRES P, JIMENEZ MA, TORRES A. Lymphoid blast crisis at the onset of chronic myelogenous leukaemia: molecular evidence. *Brit J Haemat* 1994; **87**: 624–626.
- [76] ROMERO P, BERAN M, SHTALRID M, ANDERSSON B, TALPAZ M, BLICK M. Alternative 5' end of the bcr-abl transcript in chronic myelogenous leukemia. *Oncogene* 1989; **4**: 93–98.
- [77] ROWLEY JD. Chromosome abnormalities in leukemia. *J Clin Oncol* 1988; **6**: 194–202.
- [78] SANCHEZ-GARCIA I, GRUTZ G. Tumorigenic activity of the BCR-ABL oncogenes is mediated by BCL-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **12**: 5287–5291.
- [79] SANDBERG AA. The Chromosomes in Human Cancer and Leukemia. 2nd ed. [wyd.] Elsevier, New York, 1990.
- [80] SCHAEFER-REGO K, DUDEK H, POPENOE D, ARLIN Z, MEARS JG, BANK A, LEIBOWITZ D. CML patients in blast crisis have break-points localized to a specific region of the BCR. *Blood* 1987; **2**: 448–455.
- [81] SCHUCH AC, SUTHERLAND DR, HORSEFALL W, MILLS GB, DUBE I, BAKER MA, SIMINOVITCH K, BAILEY D, KEATING A. Chronic myeloid leukemia arising in a progenitor common to T cells and myeloid cells. *Leukemia* 1990; **4**: 631–636.
- [82] SECKER-WALKER LM. Distribution of Philadelphia - positive acute lymphoblastic leukemia: Geographical heterogeneity or age related incidence? *Gene Chromosome Cancer* 1991; **3**: 1–7.
- [83] SECKER-WALKER LM, CRAIG JM. Prognostic implications of break-points and lineage heterogeneity in Philadelphia - positive acute lymphoblastic leukemia: a review. *Leukemia* 1993; **7**: 147–151.
- [84] SEFERYŃSKA J, BROJER E, SANKOWSKA M, MAJERSKI M, MAJ S. Badanie translokacji bcr/abl u chorych na przewlekłą białaczkę szpikową metodą reakcji łańcuchowej polimerazy. *Acta Haematol Pol* 1995; **26**, supl 1: 148, a.86.
- [85] SIRARD C, LANEUVILLE P, DICK JE. Expression of bcr-abl abrogates factor-dependent growth of hematopoietic MO7E cells by autocrine mechanism. *Blood* 1994; **83**: 1575–1585.
- [86] SKÓRSKI T. Postępy w biologii molekularnej białaczek – implikacje kliniczne. *Acta Haematol Pol* 1995; **26**, supl.1: 14–18.
- [87] SMETSERS TFC, SKÓRSKI T, VAN DER LOCHT LFT, WESSELS MMC, PENNINGHS AHM, DE WITTE T, CALABRETTA B, MENSINK EJM. Antisense BCR-ABL oligodeoxynucleotides induce apoptosis in the Philadelphia chromosome positive cell line BV 173. *Leukemia* 1994; **8**: 129–140.
- [88] SPIERS ASD, DRYSDALE HC, GALTON DAG, RICHARDS HGH. Four case pairs with chronic granulocytic leukemia. *J Amer Med Assoc* 1986; **256**: 1137–
- [89] STRIFE A, CLARKSON B. Biology of chronic myeloid leukemia: Is discordant maturation the primary defect? *Semin Hemat* 1988; **25**: 1–19.

- [90]SUN T, SUSIN M, KODURU P, COFFEY EL, DITTMAR K, WEISS R, GOH J, BRODY J. Extramedullary blast crisis in chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 1991; **68**: 3-7.
- [91]VERMA RS, THOMAS S, COLEMAN M, SILVER RT. Spatial relationship of chromosomes 9 and 22 at metaphase in patients with chronic myelogenous leukemia (CML). *Int J Cancer* 1988; **41**: 829-831.
- [92]WITTE ON. Role of BCR-ABL oncogene in human leukemia; Fifteenth Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture. *Cancer Res* 1993; **53**: 485-489.

Otrzymano: 09. 10. 1995 r.

Przyjęto: 12.12. 1995 r.

*Adres autora: Zakład Genetyki AM
50-368 Wrocław, ul. Marcinkowskiego 1*

**CYTOGENETYKA PRZEWLEKŁEJ BIAŁACZKI
SZPIKOWEJ. II. CYTOGENETYCZNE PODTYPY
PRZEWLEKŁEJ BIAŁACZKI SZPIKOWEJ (CML);
Ph-UJEMNA CML, MOZAIKOWATOŚĆ Ph,
WARIANTY TRANSLOKACYJNE Ph**

**CYTOGENETICS OF CHRONIC MYELOID LEUKEMIA
II. CYTOGENETIC SUBTYPES OF CHRONIC MYELOID
LEUKEMIA (CML); Ph-NEGATIVE CML, Ph MOSAICISM,
VARIANT Ph TRANSLOCATIONS**

Olga HAUS

Zakład Genetyki AM we Wrocławiu

Streszczenie. Do niestandardowych postaci przewlekłej białaczki szpikowej (CML) należą: CML Ph-ujemna, o karyotypie Ph(+)/Ph(-) oraz z wariantami translokacyjnymi Ph. Wśród przyczyn rozpoznawania CML jako Ph-ujemnej występują: "maskowanie" Ph przez kolejne translokacje z punktem złamania 22q11 i rearanżacje *bcr* bez fuzji *bcr/abl* [Ph(-)*bcr*(+)CML]. Brak rearanżacji *bcr* [Ph(-)*bcr*(-) CML] występuje w nietypowej CML, która różni się od klasycznej obrazem hematologicznym i klinicznym. Mozaikowość Ph(+)/Ph(-) przy rozpoznaniu odzwierciedla czas trwania choroby albo zależy od wtórnego zaburzenia proliferacyjnej pętli regulacyjnej. Warianty Ph powstają w wyniku złożonej translokacji obejmującej, oprócz 9 i 22, również inne chromosomy. Jej mechanizm jest albo wielostopniowy: po prostej translokacji t(9;22) wymienione fragmenty ulegają dalszym translokacjom, albo jednostopniowy; w wyniku zadziałania jednego czynnika sprawczego zachodzą jednoczesne złamania wielu chromosomów, a następnie błędne łączenie ich fragmentów z powodu homologii sekwencji DNA w pobliżu punktów złamania na różnych chromosomach.

Słowa kluczowe: cytogenetyka, Ph-ujemna przewlekła białaczka szpikowa, nietypowa przewlekła białaczka szpikowa, mozaikowość Ph, warianty translokacyjne Ph, leukemogeneza.

Summary. The forms of chronic myeloid leukemia (CML) different from classical Ph(+) CML are: Ph-negative CML, CML with mosaic Ph(+)/Ph(-) karyotype at diagnosis and CML with variant translocations. Among causes of diagnosis of CML as Ph-negative are: the presence of Ph "masked" by subsequently occurring translocations with 22q11 breakpoint and *bcr* rearrangements without BCR/ABL

fusion [Ph(-)*bcr*(+) CML]. The lack of *bcr* rearrangement [Ph(-)*bcr*(-)CML] is found in atypical CML, which differs from a classical one by hematological and clinical features. Ph(+)/Ph(-) mosaicism at diagnosis of CML may reflect the time from the beginning of the disease or may depend on secondary changes of proliferative regulatory feedback. Ph variants appear as a result of complex translocation involving 9,22, and other chromosomes. Its mechanism is either multistep: after a simple translocation t(9;22) exchanged fragments are involved in subsequent translocations, or one-step: there is only one factor which causes simultaneous breaks of many chromosomes. Broken fragments join incorrectly because of DNA sequence homology close to breakpoints on various chromosomes.

Key words: cytogenetics, Ph-negative chronic myeloid leukemia, atypical chronic myeloid leukemia, Ph mosaicism, variant Ph translocations, leukemogenesis.

Przewlekła białaczka szpikowa Ph-dodatnia z obecnym w 100% komórek chromosomem Ph, powstałym w wyniku standardowej translokacji t(9;22)(q34;q11), określana bywa jako standardowa lub klasyczna CML [5]. Około 10–25% przypadków CML stanowią odmienne jej postaci: Ph-ujemna CML, CML z obecnością chromosomu Ph jedynie w części komórek oraz CML, w której chromosom Ph powstał w wyniku translokacji innej niż standardowa [37,58].

1. Przewlekła białaczka szpikowa bez obecności chromosomu Filadelfia (Ph-ujemna CML)

W badaniach wcześniejszych w około 15% przypadków CML nie stwierdzano obecności chromosomu Ph. Uważano, że ta grupa cechuje się krótszym czasem przeżycia (14–17 miesięcy wobec 35–56 miesięcy) oraz cięższym przebiegiem klinicznym niż grupa Ph(+). Ph-ujemna CML [(Ph(-) CML] została uznana za odrębny podtyp CML, a brak Ph – za czynnik niekorzystny rokowniczo. W dalszym ciągu w badaniach wykonywanych na poziomie chromosomowym ta prawidłowość potwierdza się [25,36,38]. Kliniczna i morfologiczna weryfikacja przypadków opisanych wcześniej jako Ph(-) CML spowodowała u połowy pacjentów zmianę rozpoznania [66] najczęściej na przewlekłą białaczkę mielomonocytową (CMML) lub inne zespoły mielodysplastyczne, inne niż CML zespoły mieloproliferacyjne lub nietypową AML [9,13,19,66]. Do Ph-ujemnych postaci CML należy również młodzieńcza CML (JCML), która jednak ze względu na zupełnie odmienny obraz choroby i występowanie głównie u małych dzieci, była łatwa do odróżnienia [58]. Cytogenetyczna weryfikacja pozostałych przypadków Ph(-) CML wykazała, że przyczyną niewykrycia chromosomu Ph w niektórych z nich była niedoskonałość technik cytogenetycznych. Po wprowadzeniu technik o wysokiej rozdzielczości prążków w przypadkach tych rozpoznano standardowy albo "zamaskowany", powstały w wyniku złożonej translokacji chromosom Ph [8,67]. Badania molekularne pozostałych przypadków wykazały w 25–100% z nich obecność charakterystycznej dla Ph(+)CML fuzji genów *bcr/abl* lub typowej rearanżacji genu *bcr* [2,10,19]. Takie przypadki określa się jako Ph(-)*bcr/abl*(+) lub, lepiej, Ph(-)*bcr*(+), ponieważ zmiany strukturalne genu *bcr* są częściej rozpoznawane niż fuzja genów *bcr/abl* [12,13].

1.1. Patomechanizm Ph-ujemnej CML

Różnorodne są przyczyny prowadzące do rozpoznania CML jako Ph-ujemnej (tab.1). Ph(-)*bcr*(+) CML może powstać w wyniku podwójnej t(9;22), w której pierwszym etapem byłaby translokacja standardowa, z punktami złamań 9q34 i 22q11, a drugim – t(9;22) o innych punktach złamań, "maskująca" tę pierwszą [19,32,52]. Innym mechanizmem "maskowania" chromosomu Ph mogą być złożone translokacje zachodzące wielostopniowo, w których pierwszym etapem byłaby również translokacja t(9;22). Gen *bcr/abl* może pozostać na chromosomie 22 lub być przeniesiony na inny [10,32,53]. Niewidoczne na poziomie chromosomowym połączenie eksonu b2 lub b3 *M-bcr-1* z eksonem a2 *abl*, typowe dla Ph(+)*CML*, może również powstać w wyniku insercji fragmentu 3'*abl* w obręb *bcr* bez wymiany dłuższych odcinków chromosomów 9 i 22 [19,52,57]. Analiza obecności fuzji *bcr/abl* jedynie na poziomie mRNA może również się nie powieść; we wczesnych komórkach progenitorowych CML nie znajdowano *bcr/abl* mRNA mimo fuzji genów *bcr/abl* [4,11].

W niewielkiej liczbie przypadków Ph(-)*bcr*(+) CML nie stwierdzono fuzji *bcr/abl*. Przypuszcza się, że molekularnym podłożem CML w tych przypadkach jest interakcja genu *bcr* z innym, nie zidentyfikowanym dotąd genem [1,12,66].

Przypadki pozornie Ph-ujemnej, a *bcr*-dodatniej CML niewiele się różnią pod względem klinicznym i hematologicznym od "klasycznej" Ph(+)*CML* [45,66]. Dowodzi to, że fuzja *bcr/abl* albo tylko zmiany strukturalne genu *bcr* są momentem kluczowym w patogenezie CML – choroby o ściśle określonej charakterystyce w momencie diagnozy i o charakterystycznym przebiegu [12].

W części przypadków Ph(-)*CML* o przebiegu podobnym do Ph(+)*CML* nie stwierdza się typowej rearanżacji *bcr* [27,66]. Podłożem choroby mogą w nich być zmiany strukturalne tego genu o nietypowej lokalizacji – w obrębie albo poza *M-bcr-1* [10,46], przez co nie są obejmowane przez sondy DNA najczęściej stosowane do analizy *bcr* [12,66]. W innych przypadkach przyczyną niewykrycia rearanżacji *bcr* może być delecja zmienionego fragmentu, delecja całego *bcr/abl* (84, 129) albo brak ekspresji tego genu [4,11,27, 46]. Analogiczne do wszystkich wymienionych. zmiany mogą zachodzić nawet w CML Ph-dodatniej na poziomie chromosomowym [46,54].

1.2. Nietypowa CML

Pozostaje jeszcze sporo przypadków, w których w ogóle nie stwierdza się zmian w obrębie *bcr*. Co prawda, w niektórych badaniach wszyscy Ph-ujemni pacjenci wykazywali obecność rearanżacji *bcr*, wyniki takie mogły być jednak efektem nieprzypadkowego doboru grupy badanych lub błędnej, nie uwzględniającej zjawiska polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych, interpretacji wyników hybrydyzacji DNA, dokonanej przy użyciu tylko jednego enzymu restrykcyjnego [12,13,66]. W innych badaniach pacjenci Ph(-)*bcr*(-) stanowili 1–6% wszystkich przypadków CML [2,51]. Grupa ta charakteryzowała się typowym dla CML obrazem hematologicznym i klinicznym przy rozpoznaniu, lecz innym przebiegiem choroby oraz krótszym średnim czasem przeżycia [15,19,42].

TABELA 1. Przyczyny prowadzące do rozpoznania przewlekłej białaczki szpikowej jako Ph - ujemnej

Mechanizm	Referencje
Fuzja <i>bcr/abl</i>	
molekularnie Ph(+) CML	
a. zamaskowany chromosom Ph wynik podwójnej t(9;22) o różnych punktach złamania albo konwersji od standardowej do złożonej translokacji Ph	Bartram i Carbonnell 1985 [2] Inazawa i wsp. 1989 [32] Morris i wsp. 1990 [52] Morris i wsp. 1991 [53]
b. insercja 3' <i>abl</i> do <i>bcr</i>	Dewald i wsp. 1993 [10] Rassool i wsp. 1990 [57]
Zmiany strukturalne <i>bcr</i> bez widocznej fuzji <i>bcr/abl</i>	
a. w obrębie M- <i>bcr</i> -1	Bartram 1985 [1]
b. poza M- <i>bcr</i> -1	van der Plas i wsp. 1991 [66]
c. delecja, brak transkrypcji lub ekspresji zmienionego lfragmentu <i>bcr</i> lub chimerycznego genu <i>bcr</i>	Bedi i wsp. 1993 [4] Diekmann i wsp. 1994 [11] Hiroosawa i wsp. 1988 [27]
Późno pojawiający się chromosom Ph	
zniknięcie chromosomu Ph mozaicyzm Ph(+)/Ph(-) rozpoznany jako Ph(-) z powodu niedostatecznej liczby przebadanych komórek	Lisker i wsp. 1982 [44] Hagemeyer i wsp. 1979 [24] Chen i wsp. 1993 [8] Dewald i wsp. 1993 [10] Holena i wsp. 1993 [28]

Pacjenci Ph(-)*bcr*(-) są na ogół starsi niż Ph(+) [51]. Poza tą cechą Ph(-)*bcr*(-) CML nie różni się przy rozpoznaniu od Ph(+) CML [42]. W trakcie choroby stwierdza się natomiast duże różnice między tymi postaciami w badaniach laboratoryjnych [brak bazofilii, większa monocytoza, niższa liczba erytrocytów i megakariocytów, cechy mielodysplazji w Ph(-)*bcr*(-)CML] [5,9,35,38] i w obrazie klinicznym (większa tendencja do organomegalii, nacieków pozaszpikowych i osteomielifibrozy) [19,42]. W przebiegu choroby nie występuje klasyczny przełom blastyczny (odsetek mieloblastów i promielocytów wynosi 10–20%), nasilają się natomiast cechy mielodysplastyczne [5,42,47]. Wyparcie układu czerwonerwinkowego i płytkotwórczego oraz oporność na leczenie powodują, że średni czas przeżycia tych pacjentów (21 mies.) jest znacząco krótszy niż pacjentów z Ph(+) CML (39 mies.) [19,42,51].

Biorąc pod uwagę odrębną charakterystykę genetyczną, morfologiczną i kliniczną Ph(-)*bcr*(-) CML, wydzielono ją jako nietypową CML (at-CML) [5,19,21]. Znaczna mielodysplazja i monocytoza oraz częste w *bcr*(-) CML rearanżacje onkogenu *ras*, typowe dla przewlekłej białaczki mielomonocytovej – CMML, skłaniają niektórych autorów do zaliczenia at-CML do zespołów mielodysplastycznych, jako podtypu CMML [39,48]. Przypadki znajdowania analogicznych aberracji chromosomów w at-CML oraz w CMML świadczyć mogą również o bliskim "pokrewieństwie" tych dwóch jednostek chorobowych [69]. Jednak, mimo wielu podobieństw, różnią się one

zarówno pod względem parametrów hematologicznych, jak i obrazu klinicznego [21,48]. W 1994 r. na podstawie analizy wielowariantowej grupa Francusko-Amerykańsko-Brytyjska (FAB) określiła parametry hematologiczne wyraźnie odgraniczające te dwie jednostki od siebie, a także od klasycznej Ph(+)*bcr*(+) CML [5].

Ponieważ w chwili rozpoznania obraz at-CML jest taki sam jak klasycznej CML lecz w jej przebiegu nie występuje faza blastyczna, wysunięto hipotezę, że fuzja *bcr/abl* lub rearanzacja *bcr* niezbędne są jedynie do zainicjowania ostrej fazy choroby, zaś przewlekła, czyli podstawowy proces chorobowy, inicjowana jest przez różne alternatywne mechanizmy molekularne, angażujące geny *bcr* i *abl* albo zupełnie inne, nie poznane dotąd geny [15,33,42].

Nietypowa CML przebiega z reguły bez zmian w kariotypie. W około 10% przypadków w okresie zaostrzenia towarzyszą jej jednak aberracje chromosomów, z których część analogiczna jest do zmian występujących w Ph(+) CML [5]. Próba znalezienia powiązań między obrazem klinicznym i hematologicznym w at-CML a występowaniem określonych aberracji, np. t(8;9) – z punktem złamania 8p11 czy trisomią 14, nie powiodła się ze względu na zbyt małą liczbę dotychczas przeanalizowanych przypadków [35,47].

Wszystkie dotychczas znane fakty o biologii i klinice Ph(-) CML podkreślają konieczność wykonywania badań cytogenetycznych i molekularnych przy rozpoznaniu CML – zarówno w celach poznawczych, jak i klinicznych. Dotychczas brak pełnej analizy zjawisk leżących u podłoża Ph(-) CML, m.in. jej związków z ekspozycją na czynniki mutagenne w porównaniu z Ph(+) CML, choć w pojedynczych pracach wykazano, że narażenie na działanie mutagenów przed zachorowaniem na CML wiąże się z częstszym występowaniem Ph-ujemnej postaci choroby [25].

2. Mozaikowość Ph(+)/Ph(-)

W 15–54% przypadków CML chromosom Ph występuje jedynie w części komórek szpiku, czemu odpowiada z reguły proporcjonalnie niska ekspresja *bcr/abl* mRNA [43]. Zjawisko to może być odzwierciedleniem czasu, jaki upłynął od początku choroby, i stopniowego przejmowania dominacji przez klon Ph(+) [20]. U każdego pacjenta z Ph(+) CML istnieją najprawdopodobniej przetrwałe klony prawidłowych komórek Ph(-), które nie ujawniają się z powodu zahamowania ich rozwoju w wyniku działania regulacyjnej pętli ujemnego sprzężenia zwrotnego [16,49]. Komórki Ph(+), niepodatne na tę regulację, uzyskują proliferacyjną przewagę i tylko one dostępne są rutynowemu badaniu cytogenetycznemu w stadium metafazy [20]. Być może u pacjentów "mozaikowych" pętla regulacyjna działa mniej sprawnie i również komórki Ph(-) dochodzą w dużej ilości do stadium mitozy [16]. Jednak nawet w przypadkach rozpoznanych cytogenetycznie jako całkowicie Ph(+) można wykryć komórki Ph(-) w długoterminowych hodowlach szpiku prowadzonych w specjalnych warunkach [28] albo poprzez analizę dużej liczby (200–400) mitoz pochodzących z rutynowej hodowli [10,58].

W miarę progresji choroby u pacjentów wyjściowo Ph(+)/Ph(-) komórki Ph(-) stopniowo zanikają. Natomiast w przebiegu choroby mogą one ujawniać się zarówno u pacjentów wyjściowo Ph(+), jak i Ph(+)/Ph(-) po terapii np. busulfanem [6,62], interferonem, obniżającym potencjał proliferacyjny komórek *bcr/abl*(+) [68] lub po splenektomii czy napromienieniu śledziony [23,64]. Faza mozaikowatości po leczeniu trwa często tylko kilka miesięcy, potem ponownie komórki Ph(+) uzyskują proliferacyjną przewagę [40,55]. Obecne metody leczenia interferonem pozwalają w części przypadków na uzyskanie długotrwałej remisji cytogenetycznej połączonej z remisją hematologiczną i kliniczną. Najlepszą metodą kontroli remisji jest cytogenetyczna ocena odsetka komórek z chromosomem Ph – ściślej skorelowanego ze stanem klinicznym chorych niż ekspresja *bcr/abl*, gdyż badanie cytogenetyczne wykonywane jest na komórkach żywych i dzielących się, natomiast obecność *bcr/abl* mogą wykazywać również komórki martwe albo niezdolne do podziału [29,37,64,68].

Otwartym zagadnieniem jest rokownicze znaczenie wstępnej mozaikowatości Ph, przez niektórych autorów uważanej za czynnik korzystny rokowniczo [25,61], co wobec znajdowania komórek Ph(-) w długoterminowych hodowlach w każdym przypadku Ph(+) CML podawane jest w wątpliwość [28,49]. Istnieje wiele opisów długoletniego przeżycia pacjentów z mozaikowatością Ph. Część z nich dotyczy jednak przypadków, w których badanie cytogenetyczne wykonywano dopiero po kilkunastu latach trwania choroby, nie wiadomo więc, jaki był wyjściowy kariotyp białaczkowy tych chorych [6,61]. Opisy spontanicznej konwersji kariotypu w przebiegu choroby albo mozaikowatości występującej na tle hipoplazji pobusulfanowej również nie mogą być brane pod uwagę jako wyjściowy czynnik prognostyczny [61,62]. W analizie dużych grup pacjentów z CML nie stwierdza się z reguły związku między wyjściową mozaikowatością i wielkością odsetka komórek Ph(-) a długością czasu przeżycia [65], a więc problem rokowniczego znaczenia wyjściowej mozaikowatości wciąż jeszcze czeka na rozstrzygnięcie.

Pozostaje również nie rozwiązany problem charakteru komórek Ph(-). U pacjenta z długim czasem przeżycia ich prawidłowy charakter udowodniony zostaje *ex iuven-tibus*. Natomiast komórki Ph(-) u pacjentów w ostrej fazie CML mogą być komórkami białaczkowymi, w których transformacja nowotworowa wyindukowana została *de novo* przez inny mechanizm niż fuzja *bcr/abl* [46].

3. Chromosom Ph powstający w wyniku wariantów translokacyjnych

W 2–10% (średnio: 4,3%) przypadków CML chromosom Ph powstaje w wyniku translokacji innych od klasycznej t(9;22) [50,59]. Częstość występowania wariantów jest różna w różnych grupach etnicznych, socjo-ekonomicznych i środowiskowych [34]. Tradycyjnie rozróżniano dwa typy wariantów translokacyjnych: prosty i złożony. W prostych miałyby brać udział jedynie dwa chromosomy: 22 i chromosom inny niż 9 (90% przypadków) albo chromosom 9 i inny niż 22 (10%) [10,67]. W niektórych

przypadkach wariantów prostych oprócz wymienionej translokacji znajdowano również pozornie niezależnie występujące translokacje pomiędzy chromosomem 9 (albo 22) a innym chromosomem [10,59]. Natomiast w złożonych wariantach biorą udział co najmniej trzy chromosomy, włącznie z 9 i 22 [30,60]. Obecnie nie stosuje się już rozgraniczenia na warianty proste i złożone. Warianty proste są w istocie złożonymi, w których bierze zawsze udział zarówno prążek 9q34 jak i 22q11 [10,30,59,60]. We wszystkich wariantach powstają więc złamania w punktach 9q34 i 22q11, powodujące fuzję genów *bcr* i *abl*, przy czym w obręb genu chimerycznego, częściej niż w translokacji standardowej, wchodzi również ekson b3 regionu *M-bcr-1* [22,41,60]. Rearanżacja genów *bcr* i *abl* wydaje się podobna do rearanżacji w translokacji standardowej [14], niemniej jednak opinie na ten temat są podzielone [50]. Gen *bcr/abl* lokalizuje się w dowolnym miejscu genomu, najczęściej w obrębie chromosomu 22 i jest możliwy do wykrycia metodami biologii molekularnej niezależnie od stopnia złożoności translokacji [8,10,17].

W wariantach, w których chromosom 22 jest pozornie niezmienny, podejrzewa się zawsze istnienie "zamaskowanego" chromosomu Ph, czyli obecność zmian molekularnych bez widocznych zmian cytogenetycznych [10,67]. "Zamaskowany" Ph powstaje prawdopodobnie w procesie co najmniej dwustopniowym, którego ostatnim etapem jest translokacja na chromosom 22 fragmentu innego chromosomu, wielkością i ułożeniem prążków odpowiadającego utraconym odcinkom chromosomu 22 [13]. Pozorne niewciągnięcie chromosomu 9 w translokację wariantową może być wynikiem podobnego zjawiska albo utraty zmienionego i duplikacji niezmienionego, również pod względem molekularnym, chromosomu 9 [15,30].

W przypadkach pozornie niezależnych translokacji: 9 z innym niż 22 chromosomem oraz 22 – z innym niż 9, udowodniono istnienie translokacji złożonych, obejmujących wszystkie te chromosomy jednocześnie, oraz obecność fuzji *bcr/abl* [30]. Jednak gdy nie ma możliwości molekularnej weryfikacji takich zmian, opisywane są one nadal jako proste warianty translokacyjne [3].

W wariantach Ph stwierdzono udział wszystkich chromosomów z wyjątkiem Y. Najczęściej występuje w nich chromosom 17, szczególnie tam, gdzie chromosom 9 pozostaje cytogenetycznie niezmienny, najrzadziej zaś – chromosom X [3,10,17,59].

Rozkład punktów złamań w wariantach Ph nie jest przypadkowy. Ograniczają się one do kilkudziesięciu prążków chromosomowych, zaangażowanych z różną częstością w różnych populacjach. Statystycznie najczęściej występującymi punktami złamań ($p < 0,001$) są: 3p21, 3q21, 4q23, 5q13, 6p21, 9p24, 11q13, 12p13, 14q32, 17p13, 17q21, 17q25 [30,31,50,59]. Sugerowano brak korelacji między punktami złamań w wariantach Ph a lokalizacją onkogenów lub miejsc łamliwych [58]. Jednak wariantowe punkty złamań zlokalizowane są w 85% w obrębie jasnych prążków G, czyli w tych miejscach genomu, gdzie z reguły znajdują się miejsca łamliwe lub onkogeny. Ponadto takie miejsca jak 3p21, 6p21, 12p13 i 17p13 znane są jako loci anty-onkogenów lub jako punkty złamań w nowotworach z uprzednią ekspozycją na karcinogen [26,31,58,63].

3.1. Mechanizm powstawania wariantów translokacyjnych

Powstawanie wariantów Ph próbuje się wyjaśnić dwiema hipotezami. Według pierwszej z nich proces powstawania większości złożonych translokacji Ph jest co najmniej dwustopniowy: w pierwszym etapie powstaje standardowa translokacja t(9;22), w następnych dochodzi do wymiany uprzednio już przemieszczonych fragmentów między 9, 22 a innymi chromosomami. W tym etapie chromosom 9 uczestniczy częściej niż 22, prawdopodobnie z powodu niekompletnego upakowania DNA w pobliżu punktu złamania 9q34. Wystąpieniu drugiego etapu z zaangażowaniem nieprzypadkowych punktów złamań sprzyjać może homologia sekwencji DNA chromosomów innych niż 9 i 22 z sekwencjami flankującymi 3' *bcr* lub 5' *abl*, takimi jak sekwencje heptamer-nonamer czy sekwencje Alu [7,30].

Translokacje złożone byłyby więc wynikiem klonalnej ewolucji translokacji standardowej. Same też mogłyby podlegać dalszej ewolucji, tworząc coraz bardziej złożone translokacje, które cytogenetycznie mogłyby wyglądać na translokację standardową albo proste warianty translokacyjne. Dowodem na poparcie tej koncepcji są przypadki współlistnienia translokacji standardowych i złożonych oraz obserwacje wzrastania stopnia złożoności translokacji u danego pacjenta w miarę postępu choroby [18,58].

Druga hipoteza zakłada, że większość translokacji wariantowych powstaje w wyniku przypadkowego zadziałania pojedynczego czynnika sprawczego (np. promieniowania) powodującego jednoczesne złamanie kilku upakowanych blisko siebie chromosomów. Nieprzypadkowe byłyby punkty złamań tych chromosomów, obejmujące sekwencje homologiczne, np. Alu. Po zadziałaniu aparatu naprawczego mogłyby wskutek homologii punktów złamań nastąpić błędne łączenie fragmentów należących do różnych chromosomów [17,18]. Argumentem przemawiającym za tą hipotezą jest względna rzadkość występowania mozaiki typu standard/wariant oraz mniejsze prawdopodobieństwo wystąpienia po sobie kilku kolejnych zmian angażujących te same chromosomy, w porównaniu ze zmianą jednostopniową, nawet gdy dotyczy ona wielu chromosomów jednocześnie [17]. Znajdowanie w 100% komórek badanego pacjenta translokacji wariantowej wraz z jednolitymi dodatkowymi aberracjami strukturalnymi, nie mającymi związku z translokacją Ph świadczy, że wszystkie te zmiany zaszły w tym samym momencie prawdopodobnie w wyniku zadziałania tego samego czynnika sprawczego [59]. Jednak w dalszym ciągu zagadnienie jedno- albo wielostopniowego powstawania wariantów Ph pozostaje nierozstrzygnięte [50].

3.2. Znaczenie rokownicze wariantów translokacyjnych

Zasadniczy molekularny skutek wariantów translokacyjnych (fuzja *bcr/abl*) jest prawdopodobnie taki sam, jak standardowej translokacji t(9;22) [15,50]. Natomiast u pacjentów z wariantami Ph znamienne częściej stwierdza się przy rozpoznaniu obecność dodatkowych aberracji strukturalnych nie wpływających na rokowanie. Ich powstawaniu sprzyja prawdopodobnie mechanizm tworzenia wariantu Ph [59]. Dane kliniczne i hematologiczne nie różnią się znacząco pomiędzy grupą pacjentów z translokacją standardową i grupą z wariantami Ph [17,59]. Jedynie w pojedynczych

przypadkach warianty translokacyjne kojarzyły się z krótszym czasem przeżycia, szybszym występowaniem przełomu blastycznego, większym ryzykiem nawrotu czy niekorzystnymi zmianami hematologicznymi [56]. Obserwacje te, sugerujące związek między odmiennym od standardowego początkowym kariotypem a określonym przebiegiem choroby, mogłyby być dowodem na słuszność hipotezy jednostopniowego tworzenia wariantów Ph [17].

Nieprzypadkowa w wariantach Ph lokalizacja punktów złamań w *loci* genów istotnych dla rozwoju procesu nowotworowego sugeruje możliwość większej złożoności obrazu molekularnego, jak i poważniejszych implikacji klinicznych w porównaniu z translokacją standardową [63]. Niektóre zmiany molekularne mogą wpływać korzystnie na przebieg choroby, inne – niekorzystnie, jeszcze inne mogą w ogóle nie mieć związku z rozwojem klonu białaczkowego. Sumarycznie daje to obraz braku różnic fenotypowych pomiędzy wariantami a standardową translokacją Ph [59]. Odrębna analiza wariantów przebiegających z zaangażowaniem różnych punktów złamań mogłaby jednak pozwolić na określenie fenotypu choroby i ustalenie prognozy dla każdego wariantu oddzielnie [30,50].

LITERATURA

- [1]BARTRAM CR. bcr rearrangement without juxtaposition of *c-abl* in chronic myelocytic leukemia. *J Exp Med* 1985; **162**: 2175–2179.
- [2]BARTRAM C, CARBONELL F. bcr rearrangement in Ph negative CML. *Cancer Genet Cytogenet* 1985; **21**: 183–184.
- [3]BECHER R, QIU JY, PARR A, WENDERHORST E, SCHMIDT CB. Seven variants including four new Philadelphia translocations. *Cancer Genet Cytogenet* 1990; **44**: 181–186.
- [4]BEDI A, ZEHNBAUER BA, COLLECTOR MI, BARBER JP, ZICHA MS, SHARKIS SJ, JONES RJ. BCR-ABL gene rearrangement and expression of primitive hematopoietic progenitors in chronic myeloid leukemia. *Blood* 1993; **81**: 2898–2902.
- [5]BENNETT JM, CATOVSKY D, DANIEL MT, FLANDRIN G, GALTON DAG, GRALNICK H, SULTAN C, COX C. The chronic myeloid leukaemias: guidelines for distinguishing chronic granulocytic, atypical chronic myeloid, and chronic myelomonocytic leukaemia. Proposals by the French - American - British Cooperative Leukaemia Group. *Brit J Haematol* 1994; **87**: 746–754.
- [6]BIRNIE GD, MAC KENZIE ED, GOYNS MH, POLLOCK A. Sequestration of Philadelphia chromosome – positive cells in the bone marrow of a chronic myeloid leukemia patient in very prolonged remission. *Leukemia* 1990; **6**: 452–454.
- [7]CHEN SJ, CHEN Z, FONT M-P, D'AURIOL L, LARSEN C-J, BERGER R. Structural alterations of the *bcr* and *abl* genes in Ph 1 positive acute leukemia with rearrangements in the *bcr* gene first intron: further evidence implicating Alu sequences in the chromosome translocation. *Nucl Acid Res* 1989; **17**: 7631–7642.
- [8]CHEN Z, MORGAN R, BERGER CS, PEARCE-BIRGE L, STONE JF, SANDBERG AA. Identification of masked and variant Ph (complex type) translocations in CML and classic Ph in AML and ALL by fluorescence *in situ* hybridization with the use of *bcr/abl* cosmid probes. *Cancer Genet Cytogenet* 1993; **70**: 103–107.
- [9]CRISAN D, MATTSON JC, AL-SAAD A. Chronic granulocytic leukemia: Reassessment of morphologic and cytogenetic characteristics in Ph¹ - positive and Ph¹ - negative cases. *Eur J Haematol* 1991; **16**: 77–84.

- [10]DEWALD GW, SCHAD CR, CHRISTENSEN ER, TIEDE AL, ZINSMEISTER AR, SPURBECK JL, THIBODEAU SN, JALAL SM. The application of fluorescent in situ hybridization to detect Mbcrl/abl fusion in variant Ph chromosomes in CML and ALL. *Cancer Genet Cytogenet* 1993; **71**: 7-14.
- [11]DIEKMANN L, BEELEN DW, QUABECK K, BECHER R, SCHULTE HOLTHAUSEN H, BUTZLER R, SCHAEFER UW, OPALKA B. Presence or reappearance of BCR-ABL - positive cells years after allogeneic bone marrow transplantation for chronic - phase chronic myelogenous leukemia in patients in hematological remission. *Acta Haematol* 1994; **92**: 169-175.
- [12]DOBROVIC A, MORLEY AA, SESHADRI R, JANUSZEWICZ EH. Molecular diagnosis of Philadelphia-negative CML using the polymerase chain reaction and DNA analysis: clinical features and course of M-bcr negative and M-bcr positive CML. *Leukemia* 1991; **5**: 187-190.
- [13]DOBROVIC A, PETERS GB, FORD JH. Molecular analysis of the Philadelphia chromosome. *Chromosoma* 1991; **100**: 479-486.
- [14]DUBE I, DIXON J, BECKETT T, GROSSMAN A, WEINSTEIN M, BENN P, MCKEITHAN T, NORMAN C, PINKERTON P. Location of breakpoints within the major breakpoint cluster region (bcr) in 33 patients with bcr rearrangement - positive chronic myeloid leukemia (CML) with complex or absent Philadelphia chromosomes. *Gene Chromosome Cancer* 1989; **1**: 106-111.
- [15]DUBÉID, CARTER RF, PINKERTON P. Chromosome abnormalities in chronic myeloid leukaemia. *Tumor Biol* 1990; **11**, suppl.1, 3-24.
- [16]DUBÉID, GUPTA CM, KALOUSEK DK, EAVES CJ, EAVES AC. Cytogenetic studies of early myeloid progenitor compartments in Ph¹ - positive chronic myeloid leukaemia (CML) I. Persistence of Ph¹ negative committed progenitors that are suppressed from differentiating *in vivo*. *Brit J Haematol* 1984; **56**: 633-644.
- [17]FITZGERALD PH. Complex Ph translocations in chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1991; **55**: 129-131.
- [18]FITZGERALD PH, MORRIS CM. Complex chromosomal translocations in the Philadelphia chromosome leukemias. Serial translocations or a concerted genomic rearrangement? *Cancer Genet Cytogenet* 1991; **57**: 143-151.
- [19]FITZGERALD PH, MORRIS CM. Ph-negative chronic myeloid leukemia: the nature of the breakpoint junctions and mechanism of *abl* transposition. *Leukemia Lymphoma* 1992; **6**: 277-287.
- [20]FRASSONI F, REPETTO M, PODESTA M, PIAGGIO G, RAFFO MR, SESSAREGO M, BACIGALUPO A, MARMONT AM. Competitive survival/proliferation of normal and Ph¹ -positive haemopoietic cells. *Brit J Haematol* 1986; **63**: 135-141.
- [21]GALTON DAG. Haematological differences between chronic granulocytic leukaemia, atypical chronic myeloid leukaemia and chronic myelomonocytic leukaemia. *Leukemia Lymphoma* 1992; **7**: 343-350.
- [22]GORSKA-FLIPOT J, NORMAN C, ADDY L, MINDEN M. Molecular pathology of chronic myelogenous leukemia. *Tumor Biol* 1990; **11**, suppl.1: 25-43.
- [23]GUILHOT F. The role of interferon in the treatment of chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Nouv Rev Fr Hematol* 1994; **36**, suppl.1: S39-S46.
- [24]HAGEMEIJER A, SMIT EME, LOWENBERG B, ABELS J. Chronic myeloid leukemia with permanent disappearance of the Ph¹ chromosome and development of new clonal subpopulations. *Blood* 1979; **53**: 1-14.
- [25]HAUS O. Kliniczne znaczenie badań cytogenetycznych w przebiegu przewlekłej białaczki szpikowej. Akademia Medyczna we Wrocławiu, Wrocław 1995.
- [26]HECHTF, RAMESH KH, LOCKWOOD DH. A guide to fragile sites on human chromosomes. *Cancer Genet Cytogenet* 1990; **44**: 37-45.

- [27]HIROSAWA S, AOKI N, MATSUSHIME H, SHIBUYA M. Undetectable bcr-abl rearrangements in some CML patients are due to a deletion mutation in the bcr gene. *Amer J Haematol* 1988; **28**: 33–36.
- [28]HOLENA O, JELINEK J, VANASEK J, STARY J, KOMRSKA V. Suppression of Philadelphia chromosome positive cell populations in long term cultures of bone marrow cells of patients with CML. XIIth Meeting of the International Society of Haematology (European and African Division). Vienna, Austria, August 28 - September 3, 1993, Book of Abstracts: p. 121, a. 479.
- [29]HUNGER SP, CLEARY ML. PCR assessment of the efficacy of therapy in Philadelphia chromosome - positive leukemias. [w] *The Polymerase Chain Reaction*. [red.] KB Mullis, F Ferre, RA Gibbs: Birkhauser, Boston 1994: 323–334.
- [30]HURET JL. Complex translocations, simple variant translocations and Ph-negative cases in chronic myelogenous leukaemia. *Hum Genet* 1990; **85**: 565–568.
- [31]HURET JL, TANZER J. Non-random aberrant breakpoints in chronic myelogenous leukaemia revisited. A call for a collaborative study. *Hum Genet* 1989; **83**: 208–210.
- [32]INAZAWA J, NISHIGAKI H, TAKAHIRA H, NICHIMURA J, HORIIKE S, TANIWAKI M, MISAWA S, ABE T. Rejoining between 9q+ and Philadelphia chromosomes results in normal-looking chromosomes 9 and 22 in Ph-negative chronic myelocytic leukemia. *Hum Genet* 1989; **83**: 115–118.
- [33]INUKAI T, SUGITA K, SUZUKI T, IJIMA K, GOI K, TEZUKA T, KOJIKI S, HATAKEYAMA K, KAGAMI K, MORI T, OKAZAKI T, MIZUTANI S, NAKAZAWA S. A novel 203 kD aberrant BCR-ABL product in a girl with Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukaemia. *Brit J Haematol* 1993; **85**: 823–825.
- [34]JOHANSSON B, MERTENS F, MITELMAN F. Geographic heterogeneity of neoplasia - associated chromosome aberrations. *Gene Chromosome Cancer* 1991; **3**: 1-7.
- [35]JOTTERAND BELLOMO M, MÜHLEMATTER D, WICHT M, DELACRETAZ F, SCHMIDT PM. t(8;9)(p11;q32) in atypical chronic myeloid leukaemia: A new cytogenetic - clinicopathologic association. *Brit J Haemat* 1992; **81**: 307–309.
- [36]KADAM PR, NANJANGUD GJ, ADVANI SH, NAIR C, BANAVALI S, GOPAL R, SAIKIA T. Chromosomal characteristics of chronic and blastic phase of chronic myeloid leukemia. A study of 100 patients in India. *Cancer Genet Cytogenet* 1991; **51**: 167–181.
- [37]KANTARJIAN HM, DEISSEROTH A, KURZROCK R, ESTROV Z, TALPAZ M. Chronic myelogenous leukemia: a concise update. *Blood* 1993; **3**: 691-703.
- [38]KANTARJIAN HM, KEATING MJ, WALTERS RS, MCCREDIE KB, SMITH TL, TALPAZ M, BERAN M, CORK A, TRUJILLO JM, FREIREICH EJ. Clinical and prognostic features of Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 1986; **58**: 2023–2030.
- [39]KANTARJIAN HM, KURZROCK R, TALPAZ M. Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukemia and chronic myelomonocytic leukemia. *Hematol/Oncol Clin North Amer* 1990; **4**: 389–404.
- [40]KAWAKUBO K, OHYASHIKI JH, OHYASHIKI K, TAUCHI T, OHTO T, TOYAMA K. Restoration of cytogenetically normal marrow cells after remission of lymphoblastic crisis in a case of Ph positive CML treated with alfa-interferon. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; **58**: 165–168.
- [41]KODURU P, GOH JC, ALLEN SL, KARP L, JASTI H, DE MARCO LC, LICHTMAN SM. Different patterns of chromosome and molecular breakage in classic Ph' chronic myelogenous leukemia (CML) and variant Ph' CML. *Hematol Pathol* 1991; **5**: 57–66.
- [42]KURZROCK R, KANTARJIAN HM, SHTALRID M, GUTTERMAN JU, TALPAZ M. Philadelphia chromosome - negative chronic myelogenous leukemia without breakpoint cluster region rearrangement: A chronic myeloid leukemia with a distinct clinical course. *Blood* 1990; **75**: 445–452.

- [43]LIN F, CHASE A, BUNGEY J, GOLDMAN JM, CROSS NCP. Correlation between the proportion of Philadelphia chromosome - positive metaphase cells and levels of BCR-ABL mRNA in chronic myeloid leukemia. *Gene Chromosome Cancer* 1995; **13**: 110-114.
- [44]LISKER R, CASAS L, MUTCHINICK O, LOPEZ-ARIZA B, LABARDINI J. Patient with chronic myelogenous leukemia and late-appearing Philadelphia chromosome. *Cancer Genet Cytogenet* 1982; **6**: 275-277.
- [45]MARTIAT P, MICHAUX JL, RODHAIN J. Philadelphia-negative (Ph⁻) chronic myeloid leukemia (CML): comparison with Ph⁺ CML and chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 1991; **78**: 205-211.
- [46]MELANI C, CANEPA L, SESSAREGO M, MIGLINO M, FERRARIS AM, GAETANI GF. Molecular analysis of the bcr rearrangement in a case of Ph-negative blastic crisis of Ph-positive chronic myelogenous leukemia. *Europ J Haematol* 1989; **42**: 32-37.
- [47]MERTENS F, JOHANSSON B, HEIMS S, KRISTOFFERSON U, MANDAHN N, TURESSON I, MALM C, OTHZEN A, BARTRAM CR, CATOVSKY D, MITELMAN F. Trisomy 14 in atypical chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 1990; **4**: 117-120.
- [48]MICHAUX JL, MARTIAT P. Chronic myelomonocytic leukemia (CMML): a myelodysplastic or myeloproliferative syndrome? *Leukemia Lymphoma* 1993; **9**: 35-41.
- [49]MISAWA M, MAEDA H, HARA H, YAMAMOTO Y, FURUYAMA J-I. Absence of bcr/abl gene in single hemopoietic progenitors in some patients with chronic myelogenous leukemia. *Stem Cells* 1993; **11**: 536-542.
- [50]MITELMAN F. The cytogenetic scenario of chronic myeloid leukemia. *Leukemia Lymphoma* 1993; **11**, suppl 1: 11-15.
- [51]MONTEFUSCO E, ALIMENA G, LO COCO F, DE CUIA MR, WANG Y-Z, ALOE SPIRITI MA, MANCINI F, CEDRONE M, MANCINI M, MANDELLI F. Ph-negative and bcr-negative atypical chronic myelogenous leukemia: biological features and clinical outcome. *Ann Hematol* 1992; **65**: 17-21.
- [52]MORRIS CM, HEISTERKAMP N, KENNEDY MA, FITZGERALD PH, GROFFEN J. Ph-negative chronic myeloid leukemia. Molecular analysis of ABL insertion into M-BCR on chromosome 22. *Blood* 1990; **9**: 1812-1818.
- [53]MORRIS C, KENNEDY M, HEISTERKAMP N, COLUMBANO-GREEN L, ROMERIL K, GROFFEN J, FITZGERALD P. A complex chromosome rearrangement forms the BCR-ABL fusion gene in leukemic cells with a normal karyotype. *Gene Chromosome Cancer* 1991; **3**: 263-271.
- [54]NEGRINI M, TALLARICO A, PAZZI J, CASTAGNOLI A, CUNEO A, CASTOLDI GL. A new chromosomal breakpoint in Ph positive bcr negative chronic myelogenous leukemia. Report of a case. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; **61**: 11-13.
- [55]OZER H, GEORGE S, PETTENATI M. Subcutaneous alfa-interferon in untreated chronic phase Philadelphia chromosome - positive chronic myeloid leukemia - No evidence for significant improvement in response duration or survival. *Blood* 1992; **89**, suppl. 1: 358a.
- [56]PRZEPIÓRKA D, THOMAS ED. Prognostic significance of cytogenetic abnormalities in patients with chronic myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplant* 1988; **3**: 113-119.
- [57]RASSOOL F, MARTIAT P, TAJ A, KLISAK J, GOLDMAN J. Interstitial insertion in varying amounts of ABL-containing genetic material into chromosome 22 in Ph-negative CML. *Leukemia* 1990; **4**: 273-277.
- [58]SANDBERG AA. The chromosomes in Human Cancer and Leukemia. 2nd ed. [wyd.] Elsevier, New York, 1990.
- [59]SESSAREGO M, FUGAZZA G, BRUZZONE R, PATRONE F. Variant Philadelphia chromosome translocations are frequently associated with additional structural abnormalities. *Cancer Genet Cytogenet* 1994; **73**: 57-59.

- [60]SESSAREGO M, MARTINELLI G, CHIAMENTI A, DEFFERRARI R, FUGAZZA G, BRUZZONE R, AJMAR F, PIGNATTI F. Molecular analysis of six variant Philadelphia chromosome translocations in chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1993; **67**: 50–54.
- [61]SINGER CRJ, MC DONALD GA, DOUGLAS AS. Twenty five years survival of chronic granulocytic leukemia with spontaneous karyotype conversion. *Brit J Haematol* 1984; **57**: 309–313.
- [62]SPOUL AM, MILLS KI, MCDONALD GA, BURNETT AK. Absence of bcr rearrangement and bcr/abl RNA in a patient with a 31-year survival of CML. *Leukemia* 1990; **6**: 450–451.
- [63]STOPERA SA, RAY M, RIORDAN D, CHRISTIEN, WICKSTROM D. Variant Philadelphia translocations in chronic myeloid leukemia: correlation with cancer breakpoints, fragile sites and oncogenes. *Cancer Lett* 1990; **55**: 249–253.
- [64]TALPAZ M, KANTARIJAN H, KURZROCK R, TRUJILLO JM, GUTERMAN JU. Interferon-alpha produces sustained cytogenetic responses in chronic myelogenous leukemia. *Ann Int Med* 1991; **114**: 532–538.
- [65]THOMPSON PW, WHITE AD. Cytogenetics [w] Leukemia 2nd ed. [red.] JA. Whittaker, [wyd.] Blackwell Scientific Publications, Oxford 1992, 182-202.
- [66]VAN DER PLAS DC, GROSVELD G, HAGEMEIJER A. Review of clinical, cytogenetic and molecular aspects of Ph-negative CML. *Cancer Genet Cytogenet* 1991; **52**: 143–156.
- [67]VERMA RS, DOSIK H. "Masked" Ph¹ chromosome in chronic myelogenous leukaemia. *Blut* 1985; **50**: 129–133.
- [68]WANDL UB, BUTZLER R, NIEDERLE N, KLOKE O, MENGELKOCH B, BECHER R, SEEBER S, OPALKA B. Bcr-abl-positive and -negative clonogenic cells in CML patients undergoing long-term interferon treatment. *Leukemia* 1994; **8**: 776–779.
- [69]WESSELS JW, FIBBE WE, VAN DER KEUR D, LANDEGENT JE, VAN DER PLAS DC, DEN OTTOLANDER GJ, ROOZENDAAL KJ, BEVERSTOCK GC. t(5;12)(q31;p12). A clinical entity with features of both myeloid leukemia and chronic myelomonocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1993; **65**: 7–11.

Otrzymano: 09.10.1995 r.

Przyjęto 12.12.1995 r.

Adres autora: Zakład Genetyki AM

50-368 Wrocław ul. Marcinkowskiego 1

ANALIZA RÓŻNORODNOŚCI RECEPTORÓW LIMFOCYTÓW T WIĄŻĄCYCH ANTYGEN W GUZACH LITYCH*

ANALYSIS OF THE T-CELL RECEPTOR REPERTUAR IN SOLID TUMORS

Dariusz KOWALCZYK

Zakład Genetyki Człowieka, Polska Akademia Nauk, Poznań

Streszczenie. Określenie roli układu immunologicznego w zwalczaniu chorób nowotworowych jest nadal poważnym problemem współczesnej immunologii. Swoistość limfocytów T jest zdefiniowana przez konfigurację receptora wiążącego antygen (TCR), z tego względu podjęto szereg prób w celu określenia różnorodności TCR limfocytów naciekających guzy nowotworowe (*Tumor Infiltrating Lymphocytes – TIL*), co pozwoliłoby na lepsze poznanie specyficzności odpowiedzi przeciwnowotworowej, jak również rozmiaru zróżnicowania antygenowego komórek nowotworowych. Analizą TCR komórek naciekających guzy nowotworowe wykazano selektywny udział limfocytów T w odpowiedzi na nowotwór, co sugeruje oligoklonalny charakter TIL. Koniecznym elementem warunkującym skuteczną odpowiedź wydaje się być równowaga cytokin w otaczającym mikrośrodowisku. W pracy przedstawiono także zarys metodyki analizy TCR w zmianach nowotworowych oraz podsumowano i zinterpretowano ostatnie osiągnięcia w tej dziedzinie.

Słowa kluczowe: receptor limfocytów T wiążący antygen (TCR), limfocyty naciekające guz (TIL), nowotwory

Summary. Defining the role of the host immune system in eliminating malignant cells is still a difficult challenge for immunologists. Since the specificity of tumor infiltrating lymphocytes (TIL) is defined by their T-cell receptor (TCR) configuration there have been undertaken many attempts to delineate the TCR repertoire within malignant lesions to gain a better insight into the extent of the antigenic diversity of malignant cells and specificity of the anti-neoplastic immune response. TCR analysis in TIL shows that response against cancer is relatively narrowed and oligoclonal indicating selective participation of the T cells. Furthermore, these findings suggest that effector functions are not caused by different TCR

*Artykuł opracowano w ramach realizacji programu badawczego KBN nr 4P05B 042 10.

but are influenced by the cytokine balance within the tumor microenvironment. Here it is outlined the basic methodology of TCR analysis in malignant lesions and summarised the most recent findings.

Key words: T-cell receptor (TCR), tumor infiltrating lymphocytes (TIL), cancer

Wykaz stosowanych skrótów: TCR (ang. *T-cell receptor*) – receptor limfocytów T wiążący antygen, TIL (ang. *tumor infiltrating lymphocytes*) – limfocyty naciekające guz, V (ang. *variable*) – część zmienna łańcucha TCR, D (ang. *diversity*) – część warunkująca różnorodność łańcucha TCR, J (ang. *joining*) – część łącząca łańcucha TCR, C (ang. *constant*) – część stała łańcucha TCR, PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy, TNF – czynnik martwicy nowotworów, INF – interferon, IL – interleukina

1. WSTĘP

Naciek leukocytny – przejaw odpowiedzi immunologicznej

Obecność nacieku leukocytnego w guzach nowotworowych, zarówno u ludzi jak i u zwierząt, została zauważona już przeszło sto lat temu przez Ehrlicha [19]. W 1922 roku MacCarty wysunął sugestię, że występowanie komórek limfoidalnych w guzach nowotworowych jest oznaką obrony organizmu [35]. Sugestia ta była poparta obserwacjami raka rdzeniastego piersi o względnie dobrym rokowaniu, który często odznacza się znacznym naciekiem limfocytarnym [41]. Jednakże Richardson wykazał, że guzy rdzeniaste mają lepszą prognozę nawet w tych przypadkach, gdy brak jest nacieku limfocytarnego lub jest on bardzo mały. Dobre rokowanie w tych przypadkach jest uwarunkowane osłabioną zdolnością do tworzenia podścieliska i obniżoną zdolnością tworzenia przerzutów [48]. Black i następnie Berg wysunęli tezę, że występowanie komórek leukocytnych w innych typach raka piersi ma związek z dłuższym przeżyciem i przedstawia element obrony organizmu [6,8]. Do podobnych sugestii prowadzą także obserwacje nowotworów, takich jak: czerniak złośliwy [14,16], choroba Hodgkina [34,50], rak żołądka [9], nasieniaki [17], rak kosmówki [20], glejaki [49], gdzie wielkość nacieku limfocytarnego wydaje się mieć znaczenie prognostyczne.

2. LIMFOCYTY T – GŁÓWNY CZYNNIK ODPOWIEDZI

Wczesne badania skupiały się na stwierdzeniu obecności lub braku limfocytów w guzie nowotworowym, w odniesieniu do długości przeżycia. Późniejsze obserwacje pozwoliły stwierdzić, które komórki układu immunologicznego są szczególnie zaangażowane w odpowiedzi przeciwnowotworowej.

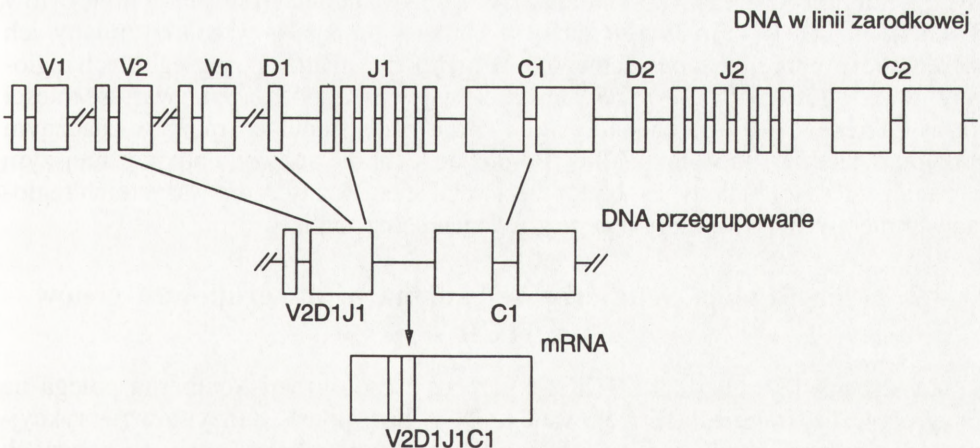
Badania wykorzystujące zdolność limfocytów T do tworzenia rozetek z erytrocytami baraniami wykazały, że limfocyty T są głównym składnikiem nacieku leukocytnego [21,22]. Zastosowanie swoistych przeciwciał monoklonalnych pozwoliło na dalszą charakterystykę powierzchniowego immunofenotypu limfocytów naciekających guz nowotworowy. Szereg wyników badań wykazuje, że naciek ten składa się głównie z limfocytów T, niewielkiej liczby limfocytów B oraz różnej ilości makrofa-

gów i komórek NK [3,7,26,27,30,63]. Powyższe obserwacje wydają się wskazywać, że limfocyty T stanowią główny element odpowiedzi organizmu na nowotwór.

3. GENY KODUJĄCE TCR – ŹRÓDŁO ZMIENNOŚCI I SWOISTOŚCI

Limfocyty T rozpoznają antygeny związane z cząsteczkami MHC obecnymi na powierzchni komórek prezentujących antygen [64]. Rozpoznanie to następuje przez limfocyty T, mające na swojej powierzchni specyficzny receptor wiążący antygen – TCR (ang. *T cell receptor*). Receptor ten jest heterodimerem składającym się z łańcuchów α i β lub γ i δ [13,15]. Najczęściej występującą formą obejmującą około 90% limfocytów krwi obwodowej jest receptor złożony z łańcuchów α i β , natomiast limfocyty z receptorem typu $\gamma\delta$ stanowią 1–10% [10,13,15]. Oba receptory połączone są z kompleksem CD3, który bierze udział w przekazywaniu sygnału przez błonę komórkową. Każdy łańcuch receptora składa się z części stałej zakotwiczonej w błonę komórkową oraz części zmiennej określającej jego swoistość. Zróżnicowanie części zmiennej łańcucha TCR i tym samym możliwość odpowiedzi na wiele różnorodnych antygenów warunkowana jest mozaikową budową genów kodujących TCR i przegrupowaniami segmentów genu TCR, polegającymi na zbliżaniu się i łączeniu poszczególnych sekwencji kodujących odpowiednie części łańcucha (rys. 1) [13].

Część zmienna TCR powstaje z segmentów genowych oznaczonych V, D, J oddalonych od siebie o kilkadziesiąt tysięcy par zasad, które w czasie różnicowania limfocytów T w grasicy ulegają zbliżeniu i połączeniu. W czasie somatycznej rearanżacji w wyniku nieprecyzyjnego łączenia się dodawane są lub usuwane nukleotydy w miejscach łączących segmenty V-J lub V-D-J, co prowadzi do powstania jeszcze większej zmienności. Geny części stałej TCR dołączane są do regionu zmiennego na etapie dojrzewania pierwotnego transkryptu mRNA [13]. Po związaniu antygeny



Rys. 1. Organizacja genów kodujących TCR (opis w tekście)

limfocyt T mający specyficzny receptor zostaje pobudzony, namnaża się, co prowadzi do powstania klonalnej populacji komórek mających dokładnie to samo przegrupowanie genów TCR [13].

Badania zjawisk autoimmunizacyjnych i odrzucania przeszczepów allogenicznych wykazały, że geny TCR komórek efektorowych używane są w stosunkowo wąskim zakresie prowadząc tym samym do powstania odpowiedzi ograniczonej do limfocytów o określonym przegrupowaniu genów dla TCR [5,12,39]. Nasuwa się pytanie, czy podobna odpowiedź występuje też w reakcji przeciw komórkom nowotworowym.

4. STRATEGIE ANALIZY RÓŻNORODNOŚCI TCR

Analiza różnorodności TCR może zostać dokonana metodami wykorzystującymi przeciwciała monoklonalne, transfer Southerna i typu *northern*, klonowanie komórek *in vitro* oraz PCR. Wszystkie metody mają swoje ograniczenia, które w pewnym stopniu mogą wpływać na końcowy rezultat przeprowadzonych badań.

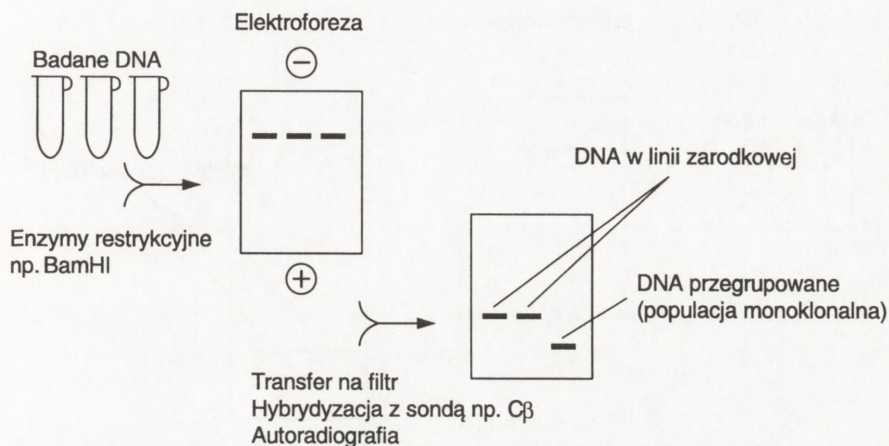
4.1. Cytometria przepływowa w badaniach różnorodności TCR

Zastosowanie przeciwciał monoklonalnych w połączeniu z cytometrią przepływową charakteryzuje się stosunkowo dużą czułością, prostotą wykonania i możliwością ilościowej oceny poszczególnych populacji komórek. Badanie polega na inkubacji zawiesiny komórek z przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciw częściom zmiennym TCR limfocytów T znakowanymi fluorochromami (np. fluoresceiną lub fikoerytryną) i analizie na cytometrze przepływowym, który umożliwia szybką i zautomatyzowaną ocenę immunofenotypu dużej liczby komórek.

Analiza różnorodności TCR różni się od typowej analizy immunofenotypu, opartej na ogół na znacznej różnicy ilościowej między poszczególnymi populacjami badanych komórek. Nie stanowi problemu oznaczenie wzajemnego stosunku limfocytów T CD4+ i CD8+, których jest dużo w badanej próbce, a wszelkie zmiany ich wzajemnej proporcji są łatwo uchwytnie. W przypadku analizy poszczególnych regionów V TCR limfocytów T, we krwi lub guzie najwyższa spodziewana wartość mieści się w zakresie 5–10%, a badanie zmian w tak małej populacji może w znacznym stopniu zależeć od sposobu analizy. Pomijając technikę analizy, najpoważniejszym ograniczeniem tej metody jest brak przeciwciał specyficznych dla wszystkich regionów zmiennych TCR, który uniemożliwia ich pełną analizę.

4.2. Hybrydyzacja Southerna w badaniach przegrupowań genów TCR

Zasada analizy repertuaru TCR za pomocą hybrydyzacji Southerna polega na enzymatycznej fragmentacji izolowanego DNA przy pomocy enzymów restrykcyjnych (najczęściej BamH I, Hind III, EcoR I), następnie elektroforezy otrzymanych fragmentów w żelu agarozowym, transferze na filtr nylonowy lub nitrocelulozowy,

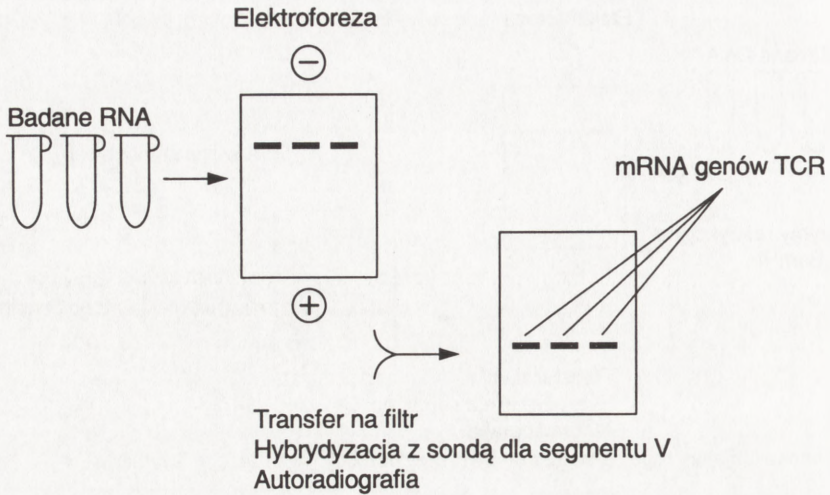


Rys. 2. Schemat analizy repertuaru genów TCR przy pomocy hybrydyzacji Southerna

hybrydyzacji z wyznakowaną radioaktywnym izotopem sondą specyficzną dla genów TCR (na ogół jest nim segment C β lub J γ) i autoradiografii (rys. 2). Efektem tych wszystkich zabiegów jest pojawienie się prążków na kliszy fotograficznej, których położenie uwarunkowane jest miejscem wiązania radioaktywnej sondy do fragmentu DNA o określonej wielkości. Rozkład fragmentów V, D, J i C w nieprzegrupowanym DNA jest stały – odpowiada konfiguracji linii zarodkowej i występuje we wszystkich komórkach somatycznych z wyjątkiem limfocytów T. Przegrupowania genów w czasie rozwoju limfocytów T prowadzą do zmiany wielkości fragmentów restrykcyjnych, czego efektem jest występowanie sygnałów hybrydyzacyjnych w innym miejscu niż w przypadku komórek linii zarodkowej. Możliwe jest przy tym odróżnienie populacji monoklonalnej limfocytów T, dającej pojedynczy sygnał na kliszy, od populacji oligoklonalnej dającej kilka, najczęściej 2–4 prążków oraz poliklonalnej, która uwidacznia się w tej metodzie w postaci rozciągniętej smugi [4].

4.3. Hybrydyzacja typu northern w badaniach ekspresji TCR

Northern blot jest techniką umożliwiającą analizę ekspresji genów na poziomie mRNA. Metoda ta generalnie przypomina hybrydyzację Southerna, polega na izolacji RNA, jego elektroforezie w żelu agarozowym, transferze na filtr i hybrydyzacji z odpowiednią sondą (rys. 3). Po autoradiografii widoczne są prążki wielkości 1,3–1,7 kb odpowiadające mRNA TCR. W przypadku analizy TCR stosuje się sondy specyficzne dla regionów V TCR, co pozwala na identyfikację poszczególnych klonów limfocytów T. Ograniczeniem metod opartych na hybrydyzacji jest ich niska rozdzielczość i stosunkowo mała czułość, co powoduje, że metody te mają znaczenie marginalne. Niemniej, mając na uwadze niebezpieczeństwo zafałszowania wyniku rozrostem klonów niereprezentatywnych [23], możliwe jest zastosowanie ich do analizy TCR limfocytów z hodowli *in vitro* [4,25,52].



Rys. 3. Schemat analizy repertuaru TCR przy pomocy hybrydyzacji typu *northern*

4.4. PCR w analizie przegrupowań i ekspresji genów TCR

Z uwagi na ograniczenia metod opartych na przeciwciałach monoklonalnych, hybryzację Southerna i hybryzację typu *northern*, obecnie najszerzej rozpowszechnioną metodą badania różnorodności receptora limfocytów T wiążącego antygen jest PCR. Metoda ta pozwala na bardzo dokładną charakterystykę TCR na poziomie DNA [32] lub powstałego z mRNA cDNA [42,43,45,62]. Jej główne zalety to ogromna czułość – w odpowiednich warunkach możliwe jest wykrycie jednej komórki z charakterystyczną sekwencją (będzie nią np. sekwencja TCR) pośród miliona innych [1], dostępność starterów oparta na znajomości genów kodujących TCR, a także możliwość analizy nieznanymi regionów V.

Gdy używa się cDNA jako matrycy w reakcji PCR, strategia postępowania oparta jest na specyficznych starterach dla genów części zmiennych V i stałej C. Gdy badanie przeprowadzane jest na poziomie genomowego DNA, zamiast starterów dla części stałej używa się zwykle starterów dla części łączącej J [32]. Możliwa jest również analiza sekwencji TCR bez wstępnego określenia końca 5' (regionu V) pozwalająca na badanie nieznanymi regionów V [36,55].

4.4.1. Wersja rodzinna reakcji PCR w badaniach TCR

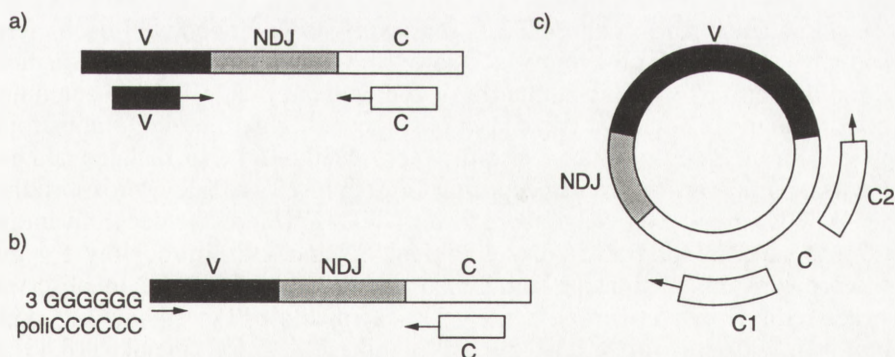
Najszerzej stosowaną techniką PCR dla charakterystyki TCR limfocytów obcych w guzie nowotworowym jest tzw. rodzinna reakcja PCR (ang. *family PCR*) wykorzystująca startery specyficzne dla znanych regionów V i regionu stałego C (rys. 4A). Półilościowa analiza poszczególnych segmentów V może zostać dokonana na podstawie oceny ilości zamplifikowanego produktu PCR [29]. Ocena ilościowa dokonuje się zwykle po hybryzacji produktu PCR z wyznakowaną sondą lub po dodaniu do mieszaniny reakcyjnej znakowanych izotopem starterów lub nukleoty-

dów. Po autoradiografii powstałe zaczerwienie może być analizowane densytometrycznie [24,28]. Możliwa jest także bezpośrednia ocena radioaktywności produktów PCR przy pomocy skannera lub licznika scyntylicyjnego [51,62]. W celu uzyskania pełniejszych danych i powtarzalności wyników stosowany jest tzw. wewnętrzny standard, do którego porównywane są uzyskane wyniki. Takim standardem jest najczęściej fragment łańcucha stałego (C) TCR, który amplifikowany jest z wszystkich limfocytów T i tym samym może być wartością referencyjną równą 100% [62].

Klonowanie produktów PCR pozwala nie tylko na późniejsze sekwencjonowanie i pełną charakterystykę TCR, ale licząc klonów o tej samej sekwencji można dokonać analizy ilościowej [36]. Ograniczeniem tej metody jest możliwość przeoczenia komórek mających nieznaną regiony V, które wykrywa się dzięki zastosowaniu tzw. zakotwiczonej lub odwrotnej reakcji PCR [36,55,60].

4.4.2. Odwrotna i zakotwiczona reakcja PCR w badaniach TCR

Odwrotna reakcja PCR (ang. *inverse PCR*) polega na cyrkulizacji cDNA i użyciu starterów dla części stałej TCR działających w odwrotnych kierunkach (rys. 4C). Zastosowanie tylko jednej pary starterów dla wspólnego regionu C, zamiast całego ich zestawu dla poszczególnych części zmiennych, pozwala na jednoczesną amplifikację wszystkich klonów w jednej próbce, w jednakowych warunkach. Zapewnienie identycznych warunków reakcji pozwala na późniejszą półilościową analizę różnorodności TCR. Niezwykle istotną cechą tej metody jest możliwość analizy klonów limfocytów T z nieznanymi regionami V, co czyni ją szczególnie użyteczną. Podobnej analizie można jedynie dokonać stosując tzw. zakotwiczoną reakcję PCR (ang. *single-sided* lub *anchored*), w którym korzysta się ze wspólnego startera poliC



Rys. 4. Metody analizy repertuaru TCR na podstawie reakcji PCR: A – rodzinna reakcja PCR: para starterów V i C amplifikuje cDNA wybranej grupy TCR; dla każdej grupy przeprowadza się osobną reakcję z oddzielnym, specyficznym starterem V; B – zakotwiczona reakcja PCR: primer poliC "zakotwicza" się po stronie 3' cDNA; dzięki specyficznemu starterowi dla segmentu stałego TCR, amplifikacji ulegają tylko geny kodujące TCR; C – odwrotna reakcja PCR: cDNA ulega najpierw cyrkulizacji, następnie przeprowadza się reakcję PCR ze starterami specyficznymi dla segmentu C działającymi w odwrotnych kierunkach; dalsza analiza w pkt. B i C odbywa się poprzez hybrydyzację produktu PCR z sondami specyficznymi dla poszczególnych segmentów V lub przez sekwencjonowanie po poprzednim sklonowaniu

zamiast zestawu dla wszystkich części zmiennych (rys. 4B). Analiza użycia części zmiennych V w obu przypadkach dokonywana jest przez hybrydyzację z oligonukleotydami lub przez sekwencjonowanie sklonowanych produktów PCR [36,60]. W celu uzyskania reprezentatywnego obrazu konieczne jest jednak sekwencjonowanie wielu klonów.

4.4.3. Reakcja PCR typu "runoff" w badaniach TCR

Konieczność przeprowadzenia analizy wielu klonów w znaczący sposób utrudnia badanie różnorodności TCR limfocytów. Wykorzystując aparaty do automatycznego sekwencjonowania możliwe jest ilościowe porównanie poszczególnych klonów komórkowych w sposób stosunkowo szybki, prosty i zautomatyzowany. Produkt PCR poddaje się dodatkowej reakcji z fluorescencyjnie wyznakowanymi starterami dla poszczególnych części łączących J w tzw. "runoff" PCR. Powstałe, wyznakowane produkty rozdziela się elektroforetycznie w aparacie do automatycznego sekwencjonowania, uzyskując w efekcie wykresy częstości poszczególnych klonów [24,47].

5. Oligoklonalna natura TIL

Gervois i wsp. [25] stosując hybrydyzację Southerna, przy pomocy sond dla TCR γ i β wykazał, że limfocyty naciekające guz po hodowli *in vitro* mają charakter klonalny. Nitta [42] stosując rodzinną reakcję PCR zaobserwował dominację TCR V α 7 wśród świeżych, niehodowanych TIL w czerniaku. Na podstawie półilościowego PCR Weidmann [62] stwierdził, że limfocyty obecne w guzie raka wątroby cechują się inną różnorodnością TCR β w porównaniu z krwią obwodową. Analiza sekwencji wykazała klonalny charakter populacji limfocytów mających TCR V β 3 i V β 1. Co więcej, porównując różnorodność TCR limfocytów krwi obwodowej osób cierpiących na raka wątroby z limfocytami osób zdrowych zauważono, że ekspansja niektórych klonów limfocytów T nie ogranicza się tylko do miejsca, w którym znajduje się nowotwór, ale może dotyczyć także krwi obwodowej. Sugeruje to ogólnoustrojową odpowiedź na antygeny związane z nowotworem. Mathouli i wsp. badając raki piersi nie wykazał ograniczenia użycia receptorów limfocytów T i różnicy w różnorodności genów TCR w limfocytach krwi obwodowej i TIL [37]. Jednak zdecydowana większość prac sugeruje lub potwierdza oligoklonalny charakter limfocytów T w guzie nowotworowym lub dominację komórek o danym typie TCR. Są to obserwacje dotyczące różnych nowotworów, takich jak: czerniak złośliwy [4,46,53,54,55,61], rak płuc [4], rak nerki [4,28,32,40,59], rak jajnika [28,45,59], glejaki [18,43], rak nadnerczy [65] oraz obserwacje dokonane na modelu mysim [31,33,56,60].

6. TCR a odpowiedź immunologiczna

Zastosowanie techniki PCR umożliwia analizę repertuaru TCR limfocytów naciekających guz nowotworowy. Wprawdzie dokładna interpretacja ilościowa jest trudna, większość danych wskazuje na oligoklonalny charakter limfocytów T w miejscu

nowotworzenia, wskazując na ich selektywną ekspansję. Podstawowym pytaniem jest, czy selektywne nagromadzenie limfocytów T jest wynikiem lokalnej aktywacji poprzez antygeny nowotworowe. Zmiany w obrębie tkanki, takie jak: zakażenie, stan zapalny, szybki wzrost czy martwica, mogą prowadzić do różnic antygenowych ze zdrową tkanką i wpływać na repertuar TCR [12,39]. Tym samym selektywna ekspansja nie jest wystarczającym dowodem na specyficzne rozpoznawanie komórek nowotworowych przez limfocyty T. Wprawdzie jednoczesna analiza klonalności i właściwości cytotoksycznych TIL wykazała, że badane limfocyty są cytotoksyczne wobec komórek autologicznych nowotworów [7], ale nie zawsze efekt ten był wywierany przez klon dominujący *in vivo* [45,59].

Obserwuje się także, że zróżnicowanie repertuaru TCR jest wysoce heterogenne. Różnice TCR pojawiają się nie tylko między pacjentami, ale także u tych samych chorych między guzem pierwotnym a powstałymi przerzutami [50,60].

Repertuar TCR limfocytów biorących udział w odpowiedzi na nowotwór może wynikać z zaangażowania wielu regionów V skierowanych przeciw pojedynczej determinancie antygenowej, ale także może być odzwierciedleniem ilości antygenów nowotworowych prezentowanych przez pojedynczą komórkę nowotworową. Ta ostatnia sugestia wydaje się być potwierdzona badaniami van den Eyde [58], który wykazał, że linia komórkowa czerniaka złośliwego prezentuje 6 różnych antygenów rozpoznawanych przez autologiczne CTL.

Ważnym czynnikiem determinującym różnorodność TCR w guzie jest restrykcja MHC. Dalsze badania powinny obejmować analizę TCR w szerokiej populacji pacjentów dobranych pod kątem HLA, aby szukać ewentualnych podobieństw w ekspresji TCR α lub β . Jak do tej pory nie wykazano, aby osoby mające zbliżony haplotyp wykazywały podobny wzór użycia TCR [18,51,54,55], co może odzwierciedlać różnorodność antygenów nowotworowych. Zbyt mała ilość tego typu doniesień uniemożliwia wyciągnięcie szerszych wniosków.

Scholler i wsp. [51] zaobserwował ilościowe, jak i jakościowe różnice TCR limfocytów pochodzących z guzów pierwotnych i przerzutów. Obserwowane różnice mogą być pośrednim dowodem na zmianę antygenowości komórek nowotworowych i w pewnym stopniu tłumaczyć przyczyny niepowodzeń terapii przy użyciu TIL.

Równie ciekawym problemem jest analiza funkcjonalna poszczególnych klonów limfocytów T obecnych w guzie nowotworowym. Kurt i wsp. [33] porównał limfocyty izolowane z guzów nowotworowych ulegających progresji z limfocytami izolowanymi z guzów z oznakami regresji. Badanie, które obejmowało analizę różnorodności TCR, aktywność cytotoksyczną i profil cytokinowy, wykazało, że w obu guzach występują limfocyty mające identyczne TCR oraz w obu przypadkach dominowały te same klony mające TCR V β 1 i V β 8. Limfocyty izolowane z nowotworu w trakcie progresji nie wykazywały aktywności cytotoksycznej i wykazywały zwiększoną ekspresję TGF- β w porównaniu z limfocytami z guza ulegającego regresji. Te ostatnie natomiast, posiadały aktywność cytotoksyczną oraz zwiększoną ekspresję IFN- γ , TNF- α i IL-10.

Wang i Taniguchi [60] wykazali, że dominujący klon może mieć negatywny wpływ na efektorowe limfocyty T w TIL, wzmacniając złośliwy charakter nowotworu i przyspieszając jego rozwój.

Obserwacje te sugerują, że funkcje efektorowe komórek nie zależą od typu receptora rozpoznającego antygen, co więcej sama obecność limfocytów T w guzie nie jest wystarczająca do odrzucenia nowotworu. Koniecznym elementem wydaje się być odpowiednia równowaga cytokin w mikrośrodkowisku nowotworowym, która może doprowadzić do powstania pożądaných funkcji efektorowych limfocytów. Ponadto z uwagi na funkcje regulatorowe, w tym funkcje supresorowe, jakie mogą pełnić limfocyty, dominujące klony nie muszą przyczyniać się do eliminacji nowotworu.

Wyniki badań różnorodności TCR limfocytów T naciekających guzy nowotworowe są kolejnymi danymi sugerującymi obecność specyficznęj reakcji immunologicznęj przeciw komórkom nowotworowym w warunkach *in vivo*. Lepsze poznanie biologii limfocytów odpowiadających na nowotworzenie może dostarczyć wielu cennych informacji dla skutecznej immunoterapii nowotworów oraz wyjaśnić przyczyny jej sukcesów, jak i niepowodzeń.

LITERATURA

- [1] AURIOL L, MacINTYRE E, GALIBERT F, SIGAUX F. *In vitro* Amplification of T cell gene rearrangements: a new tool for the assessment of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemias. *Leukemia* 1989; **3**: 155–158.
- [2] BABBITT B, ALLEN P, MATSUDA G, HABER E, UNANUE E. Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature* 1985; **317**: 359–361.
- [3] BEN-EZRA J, SHEIBANI K. Antigenic phenotype of the lymphocytic component of medullary carcinoma of the breast. *Cancer* 1987; **59**: 2037–2041.
- [4] BENNETT WT, PANDOLFI F, GROVE BH, HAWES GE, BOYLE LA, KRADIN RL, KURNICK JT. Dominant rearrangements among human tumor-infiltrating lymphocytes. Analysis of T-cells derived from 32 patients with melanoma, lung, and renal cell carcinoma. *Cancer*. 1992; **69**: 2379–2384.
- [5] BEN-NUN A, LIBLAU RS, COHEN L, LEHMANN D, TOURNIER-LASSERVE E, ROSENZWEIG A, JINGWU Z, RAUS JCM, ANDBACH MA. Restricted T-cell receptor V gene usage by myelin basic protein-specific T-cell clones in multiple sclerosis: predominant genes vary in individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 2466–2470.
- [6] BERG JW. Inflammation and prognosis in breast cancer. *Cancer* 1959; **12**: 714–721.
- [7] BHAN A K, DESMARAIS CL. Immunohistologic characterisation of major histocompatibility antigens and inflammatory cellular infiltrate in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1983; **71**: 507–516.
- [8] BLACK MM, OPLER SR, SPEER FD. Survival in breast cancer cases in relation to the structure of the primary tumour and regional lymph nodes. *Surg Gynec Obstet* 1955; **100**: 543–603.
- [9] BLACK MM, OPLER SR, SPEER FD. Structural representations of tumor-host relationships in gastric carcinoma. *Surg Gynecol Obstet* 1956; **102**: 599–603.
- [10] BORST J, VAN DOGEN JJM, BOLHUIS RLH, PETERS PJ, HAFLER DA, DE VRIES E, VAN DE GRIEND RJ. Distinct molecular forms of human T cell receptor detected on viable T cells by monoclonal antibody. *J Exp Med* 1988; **167**: 1625–1644.
- [11] BRENNER MB, McLEAN J, DIALYNAS DP, STROMINGER JL, SMITH JA, OWEN FL, SEIDMAN JG, IP S, ROSEN F, KRAGEL MS. Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature* 1986; **322**: 145–149.

- [12] CHATILA MK, PANDOLFI F, STAMENKOVIC IS, KURNICK JT. Clonal dominance among synovial tissue-infiltrating lymphocytes in arthritis. *Hum Immunol* 1990; **28**: 252–257
- [13] CHIEN Y, GASCOIGNE NRJ, KAVALER J, LEE NE, DAVIS MM. Somatic recombination in a murine T-cell receptor gene. *Nature* 1984; **309**: 322–326.
- [14] CLARK WHJ, ELDER DE, GUERY D. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 1989; **81**: 1893–1904.
- [15] DAVIS MM, BJORKMAN PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 1988; **334**: 395–402.
- [16] DAY C, LEW R, MIHM M. A multivariate analysis of prognostic factors for melanoma patients with lesions 3,65 mm in thickness. *Ann Surg* 1982; **195**: 44–49.
- [17] DIXONFJ, MOORERA. Testicular tumors: A clinico-pathological study. *Cancer* 1953; **6**: 427–454.
- [18] EBATOM, NITTA T, YAGITA H, SATO K, OKUMURA K. Skewed distribution of TCR V alpha 7-bearing T cells within tumor-infiltrating lymphocytes of HLA-A24(9)-positive patients with malignant glioma. *Immunol Lett* 1993; **39**: 53–64.
- [19] EHRLICH P. Über die spezifischen Granulationen des Blutes. *Arch Anat Physiol* 1879; **3**: 571–575.
- [20] ELSTON CW. Cellular reaction choriocarcinoma. *J Pathol* 1969; **97**: 261–268.
- [21] EREMIN O, COOMBS RRA, ASHBY J. Lymphocytes infiltrating human breast cancers lack K-cell activity and show low levels of NK activity. *Br J Cancer* 1981; **44**: 166–176.
- [22] EREMIN O, COOMBS RRA, PROSPERO TD, PLUMB D. T lymphocyte and B lymphocyte subpopulations infiltrating human mammary carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1982; **69**: 1–8.
- [23] FILGUEIRA L, ZUBER M, MERLO A, HARDER F, HEBERER M, SPAGNOLI GC. Effects of different culture protocols on the expression of discrete T-cell receptor variable regions in human tumour infiltrating lymphocytes. *Eur J Cancer* 1993; **29**: 1754–1760.
- [24] GAUDIN C, DIETRICH PY, ROBACHE S, GUILLARD M, ESCUDIER B, LACOMBE MJT, KUMAR A, TRIEBEL F, CAIGNARD A. *In vivo* local expansion of clonal T cell subpopulations in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 1995; **55**: 685–690.
- [25] GERVOIS N, HEUZE F, DIEZ E, JOTEREAU F. Selective expansion of a specific anti-tumor CD8+ cytotoxic T lymphocyte clone in the bulk culture of tumor-infiltrating lymphocytes from a melanoma patient: cytotoxic activity and T cell receptor gene rearrangements. *Eur J Immunol.* 1990; **20**: 825–831.
- [26] GIORNO R. Mononuclear cells in benign and malignant human breast tissue. *Arch Pathol Lab Med* 1983; **107**: 415–417.
- [27] GOTTLINGER HG, RIEBER P, GOKEL JM, LOHE KJ, REITH-MULLER G. Infiltrating mononuclear cells in human breast carcinoma: predominance of T4+ monocytic cells in stroma. *Int J Cancer* 1985; **35**: 199–205.
- [28] HALAPIE, YAMAMOTO Y, JUHLIN C, JEDDI-TEHRANI M, GRUNEWALD J, ANDERSSON R, HISING C, MASUCCI G, MELLSTEDT H, KIESSLING R. Restricted T cell receptor V-beta and J-beta usage in T cells from interleukin-2-cultured lymphocytes of ovarian and renal carcinomas. *Cancer Immunol Immunother* 1993; **36**: 191–197.
- [29] HALL BL, FINN O. PCR based analysis of the T cell receptor V multigene family: Experimental parameters affecting its validity. *Biotechniques* 1992; **13**: 248–257.
- [30] HORN Y HP, HORST HA. Lymphoreticular infiltrates in invasive ductal breast carcinoma: A histological and immunohistological study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1986; **409**: 275–286.
- [31] KARPATI RM, BANKS SM, MALISSEN B, ROSENBERG SA, SHEARD MA, WEBER JS, HODES RJ. Phenotypic characterization of murine tumor-infiltrating T lymphocytes. *J Immunol* 1991; **146**: 2043–2051.
- [32] KOWALCZYK D, SKORUPSKI W, DREW S, NOWAK J. Different pattern of T cell receptor delta gene rearrangement in tumour-infiltrating lymphocytes and peripheral blood in patients with solid tumours. *Cancer Immunol Immunother* 1994; **39**: 275–278.

- [33] KURT RA, PARK JA, PANELLI MC, SCHLUTER SF, MARCHALONIS JJ, CAROLUS B, AKPORIAYE ET. T lymphocytes infiltrating sites of tumor rejection and progression display identical V usage but different cytotoxic activities. *J Immunol* 1995; **154**: 3969–3974.
- [34] LUKES RJ, BUTLER JJ. The pathology and nomenclature of Hodgkin's disease. *Cancer Res* 1966; **26**: 1063–1081.
- [35] MACCARTY WG. Factors which influence longevity in cancer. *Ann Surg* 1922; **76**: 9–12.
- [36] MARGUERIEC, LUNARDIC, SOA. PCR based analysis of the TCR repertoire in human autoimmune diseases. *Immunol Today* 1992; **13**: 336–338
- [37] MATHOULIN MP, XERRI L, JACQUEMIER J, ADELAIDE J, PARC P, HASSOUN J. Unrestricted T-cell receptor V-region gene repertoire in tumor-infiltrating lymphocytes from human breast carcinomas. *Cancer* 1993; **72**: 506–510.
- [38] MELIOLI G, GUASTELLA M, SEMINO C, META M, PIETRA G, PONTE M, QUEIROLO P, SERTOLI MR, MARTINI L, REALI UM. Proliferative, phenotypic and functional and molecular characteristics of tumour-infiltrating lymphocytes obtained from unselected patients with malignant melanomas and expanded *in vitro* in the presence of recombinant interleukin-2. *Melanoma Res* 1994; **4**: 127–133.
- [39] MICELI MC, FINN OJ. T cell receptor-chain selection in human allograft rejection. *J Immunol* 1989; **142**: 81–86.
- [40] MITROPOULOS D, KOOI S, RODRIGUEZ-VILLANUEVA J, PLATSOUKAS CD. Characterization of fresh (uncultured) tumour-infiltrating lymphocytes (TIL) and TIL-derived T cell lines from patients with renal cell carcinoma. *Clin Exp Immunol* 1994; **97**: 321–327.
- [41] MOORE OS, FOOTE FW. The relatively favourable prognosis of medullary carcinoma of the breast. *Cancer* 1949; **2**: 635–642.
- [42] NITTA T, OKSENBERG JR, RAO NA, STEINMAN L. Predominant expression of T cell receptor V alpha 7 in tumor-infiltrating lymphocytes of uveal melanoma. *Science*. 1990; **249**: 672–674.
- [43] NITTA T, SATO K, OKUMURA K, STEINMAN L. An analysis of T-cell-receptor variable-region genes in tumor-infiltrating lymphocytes within malignant tumors. *Int J Cancer*. 1991; **49**: 545–550.
- [44] OLD LJ. Cancer immunology: the search for specificity. *Cancer Res* 1981; **41**: 361–375.
- [45] PEOPLES GE, DAVEY MP, GOEDEGEBUURE PS, SCHOOF DD, EBERLEIN TJ. T cell receptor V beta 2 and V beta 6 mediate tumor-specific cytotoxicity by tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian cancer. *J Immunol* 1993; **151**: 5472–5480
- [46] PLATSOUKAS CD. Human autologous tumor-specific T cells in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 1991; **10**: 151–176.
- [47] PUISIEUX I, EVEN J, PANNETIER C, JOTEREAU F, FAVROT M, KOURILSKY P. Oligoclonality of tumor-infiltrating lymphocytes from human melanomas. *J Immunol* 1994; **153**: 2807–2818.
- [48] RICHARDSON WW. Medullary carcinoma of the breast. *Br J Cancer* 1956; **10**: 415–423.
- [49] RIDLEY A, CAVANAGH JB. Lymphocytic infiltration in gliomas: Evidence of possible host resistance. *Brain* 1971; **94**: 117–124.
- [50] ROSENTHAL SR. Significance of tissue lymphocytes in the prognosis of lymphogranulomatosis. *Arch Pathol* 1936; **21**: 628–636.
- [51] SCHOLLER J, THOR-STRATEN P, BIRCK A, SIIM E, DAHLSTROM K, DRZEWIECKI KT, ZEUTHEN J. Analysis of T cell receptor alpha beta variability in lymphocytes infiltrating melanoma primary tumours and metastatic lesions. *Cancer Immunol Immunother*. 1994; **39**: 239–248.
- [52] SENSI M, CASTELLI C, ANICHINI A, GROSSBERGER D, MAZZOCCHI A, MORTARINI R, PARMIANI G. Two autologous melanoma-specific and MHC-restricted human T cell clones with identical intra-tumour reactivity do not share the same TCR V alpha and V beta gene families. *Melanoma Res* 1991; **1**: 261–271.
- [53] SENSI M, CASTELLI C, SALVI S, MAZZOCCHI A, MORTARINI R, NICOLINI G, ANICHINI A, PARMIANI G. Expansion of major histocompatibility complex-restricted antimelanoma cytotoxic T-cell lym-

- phocyte clones with identical T-cell receptor from tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunother* 1992; **12**: 207–211.
- [54] SENSI M, SALVI S, CASTELLI C, MACCALLI C, MAZZOCCHI A, MORTARINI R, NICOLINI G, HERLYN M, PARMIANI G, ANICHINI A. T cell receptor (TCR) structure of autologous melanoma-reactive cytotoxic T lymphocyte (CTL) clones: tumor-infiltrating lymphocytes overexpress in vivo the TCR beta chain sequence used by an HLA-A2-restricted and melanocyte-lineage-specific CTL clone. *J Exp Med* 1993; **178**: 1231–1246.
- [55] SHILYANSKY J, NISHIMURA MI, YANNELLI JR, KAWAKAMI Y, JACKNIN LS, CHARMLEY P, ROSENBERG SA. T-cell receptor usage by melanoma-specific clonal and highly oligoclonal tumor-infiltrating lymphocyte lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 2829–2833.
- [56] SUZUKI M, KOSEKI H, MIZUTANI Y, KURIBAYASHI K, KANNO M, TANIGUCHI M. Expansion of murine T cells bearing a unique T cell receptor beta-chain in Friend virus-induced tumor *in situ*. *J Immunol* 1992; **148**: 2968–2973.
- [57] TOWNSEND ARM, GOTCH FM, DAVEY J. Cytotoxic T cells recognize fragments of the influenza nucleoproteins. *Cell* 1985; **42**: 457–467.
- [58] VAN DEN EYNDE B, HAINAUT P, HERIN M, KNUTH A, LEMOINE C, WEYNANTS P, VAN DER BRUGGEN P, FAUCHET R, BOON T. Presence of human melanoma of multiple antigens recognized by autologous CTL. *Int J Cancer* 1989; **44**: 634–640.
- [59] WANG P, VEGH Z, VANKY F, KLEIN E. HLA-B5-restricted auto-tumor-specific cytotoxic T cells generated in mixed lymphocyte-tumor-cell culture. *Int J Cancer* 1992; **52**: 517–522.
- [60] WANG R, TANIGUCHI M. Limited T cell antigen receptor repertoire in tumor-infiltrating lymphocyte and inhibition of experimental lung metastasis of murine melanoma by anti-TCR antibody. *J Immunol* 1995; **154**: 1797–1803.
- [61] WEIDMANN E, ELDER EM, TRUCCO M, LOTZE MT, WHITESIDE TL. Usage of T-cell receptor V beta chain genes in fresh and cultured tumor-infiltrating lymphocytes from human melanoma. *Int J Cancer* 1993; **54**: 383–390.
- [62] WEIDMANN E, WHITESIDE TL, GIORDA R, HERBERMAN RB, TRUCCO M. The T-cell receptor V beta gene usage in tumor-infiltrating lymphocytes and blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1992; **52**: 5913–5920.
- [63] WHITWELL HL, HUGHES HPA, MOORE M, AHMED A. Expression of MHC antigens and leucocyte infiltration in benign and malignant human breast disease. *Br J Cancer* 1984; **49**: 161–172.
- [64] UNANUE ER, ALLEN PM. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science* 1987; **236**: 551–557.
- [65] YAMAMOTO Y, BACKLIN K, NAKAGOMI H, HALAPI E, JUHLIN C, BUCHT A, KIESSLING R. Cytotoxic activity and T cell receptor repertoire in tumor-infiltrating lymphocytes of adrenal cell carcinomas. *Cancer Immunol Immunother* 1993; **37**: 163–168.

Otrzymano: 12.12. 1995 r.

Przyjęto: 05. 03. 1996 r.

Adres autora: 60-479 Poznań, Strzeszyńska 32,

STRUKTURA PLEMNIKOWEGO DNA SSAKÓW

STRUCTURE OF MAMMALIAN SPERM DNA

Monika SZCZYGIEL, Maciej KURPISZ

Zespół Biologii Rozrodu, Zakład Genetyki Człowieka PAN, Poznań

Streszczenie. W pracy przedstawiono model struktury DNA występującego w plemnikach ssaków. Omówiono hipotetyczny mechanizm przemiany DNA o konformacji typu somatycznego w DNA charakterystyczny dla dojrzałych męskich komórek rozrodczych. Przedyskutowano wzajemną zależność struktury genomu plemnikowego i funkcji gamet. Zwrócono uwagę na niejasności związane z obecnością i rolą histonów w plemnikach.

Słowa kluczowe: struktura DNA, protaminy, chromatyna plemnikowa, macierz jądrowa, białka wiążące DNA

Summary. In this paper, a putative sperm DNA is described. Hypothetic mechanism of the "somatic" DNA transformation into the DNA characteristic for the mature male gametes is depicted. Interaction between the sperm genome structure and gametes function is discussed. Controversies related to the presence and the role of histones in spermatozoa have been indicated.

Key words: DNA-ultrastructure, protamines, sperm chromatin, nuclear matrix, DNA-binding proteins

1. WSTĘP

Od czasu odkrycia podwójnej helisy DNA przez Watsona i Cricka [32], wiedza dotycząca struktury nośnika informacji genetycznej i mechanizmu przekazu tej informacji stale się pogłębia. Intensywnie bada się charakterystyczne uorganizowanie chromatyny, a zwłaszcza specyficzne interakcje pomiędzy DNA a białkami strukturalnymi obecnymi w jądrze.

Ostatnio coraz więcej uwagi poświęca się strukturze IV-rzędowej, którą DNA przyjmuje w trakcie procesu upakowywania chromatyny. Dowiedziono, że uporządkowana struktura wyższego rzędu jest równie ważna dla funkcji DNA jak podwójna helisa. IV-rzędowa struktura DNA jest dowodem, że genom może w określonych warunkach podlegać procesom dalszej adaptacji i może przybierać różne formy organizacyjne. W zależności od cyklu życiowego komórki, DNA może być replikowany, transkrybowany, skondensowany w postaci chromosomów mitotycznych lub

zdekondensowany do poziomu chromatyny interfazowej. Odbiciem aktywnego i nieaktywnego stanu DNA jest upakowanie chromatyny w postaci hetero- i euchromatyny. Sposób upakowania jest zróżnicowany tkankowo – poszczególne fragmenty genomu przejawiają aktywność w określonych typach komórek. W przypadku komórek somatycznych podstawową funkcją genomu jest replikacja DNA i transkrypcja genów. W plemnikach procesy replikacji i transkrypcji nie zachodzą [23], ale konformacja DNA pozostaje bardzo specyficzna.

Mimo trwających od wielu lat intensywnych badań, sposób upakowania DNA w komórkach plemników nie został jednoznacznie określony. Wiadomo, że w plemnikach cały genom jest uorganizowany w nieaktywny, bardziej niż w przypadku chromosomów mitotycznych skondensowany stan. Ścisłe upakowanie dużej ilości materiału genetycznego w postaci jak najbardziej skondensowaną umożliwia funkcję, jaką plemniki odgrywają w procesie zapłodnienia, tj. transportują one (i ochraniają) kompletny zestaw informacji genetycznej, warunkujący całkowity rozwój osobniczy.

Ważną cechą odróżniającą genom komórek somatycznych od genomu plemnikowego jest superhelikalność, związana z rodzajem obecnych w jądrze białek stabilizujących DNA. Wiadomo, że DNA plemnikowy, w przeciwieństwie do DNA komórek somatycznych nie jest superhelikalnie skręcony lub skręcenie to występuje w niewielkim stopniu [18, 21, 30].

Specyficzną dla plemników konformację DNA trudno oceniać, nie przyjmując za układ odniesienia struktury genomu somatycznego. Plemniki wywodzą się z komórek gametogenicznych, w których występuje DNA typu somatycznego. W związku z tym konformacja, którą DNA plemnikowy przyjmuje, rozwija się ze stosunkowo dobrze poznanej struktury DNA somatycznego. Istnieje ścisły związek konformacji DNA typu somatycznego i konformacji DNA typu plemnikowego, wyrażający się zdolnością do dwukierunkowej przemiany obu typów strukturalnych DNA. W pierwszym przypadku – w trakcie spermiogenezy – obserwuje się zjawisko stopniowej kondensacji materiału genetycznego, co możliwe jest po gruntownej przebudowie kompleksów DNA-białko (zastąpienie histonów przez protaminy i konsekwencje tej przemiany). W drugim przypadku – po fuzji komórki jajowej z plemnikiem – ma miejsce proces odwrotny. Genom ulega stopniowej dekondukcji i DNA zostaje upakowany w sposób typowy dla komórek somatycznych. Zainteresowanie autorów niniejszej pracy skupia się na przemianie DNA typu somatycznego w DNA charakterystyczny dla dojrzałych męskich komórek rozrodczych oraz wzajemnej zależności struktury genomu plemnikowego i funkcji gamet.

2. STRUKTURA DNA PLEMNIKOWEGO

2.1. Podwójna helisa

Informacja genetyczna zapisana jest na 1-niciowym DNA linearnym kodem składającym się z 4 podstawowych elementów. Komplementarność drugiej nici DNA pozwala na powielenie zawartej w DNA informacji i powstanie idealnej kopii całego genomu podczas podziału komórki [32]. Na tym poziomie struktura DNA plemniko-

wego nie odbiega od struktury występującej w komórkach somatycznych (rys. 1A–E). W gametach męskich zaobserwowano jedynie wydłużenie telomerów oraz zwiększenie stopnia metylacji DNA.

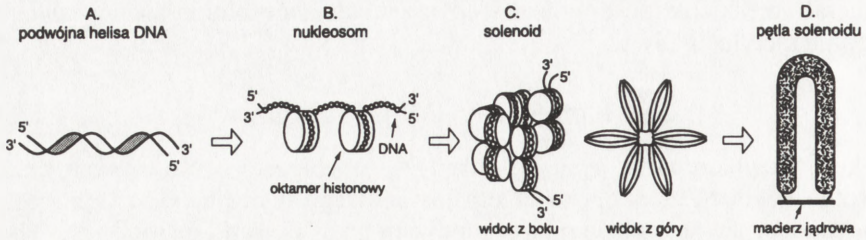
2.2. Kompleksy DNA-protaminy

W komórkach somatycznych, odcinki DNA o długości około 200 par zasad są dwukrotnie owinięte dookoła oktameru histonowego tworząc 10 nm nukleosomy, uwidaczniające się na obrazie mikroskopowym jako "paciorki na nici" (rys. 1B). W plemnikach odpowiednikiem nukleosomów są kompleksy DNA-protaminy (rys. 1F). Protaminy to małe białka o zdolności wiązania się z DNA, masie cząsteczkowej prawie o połowę mniejszej niż masa histonów i dwukrotnie wyższej zawartości zasadowych aminokwasów (50–70% aminokwasów w protaminach stanowi arginina), w porównaniu z białkami histonowymi [6]. Protaminy plemników ssaków mają długie, wyeksponowane na zewnątrz cząsteczki, reszty argininy i cysteiny. Wiążą się z DNA na całej jego długości, wzdłuż wąskiego rowka, w taki sposób, że dodatkowo naładowana reszta argininy neutralizuje ujemny ładunek szkieletu fosfodiesterowego DNA [2, 20]. Powoduje to, że polianionowy DNA ulega przekształceniu w neutralny polimer. Reszty cysteiny tworzą natomiast (u ssaków) wewnątrzcząsteczkowe mostki siarczkowe, zapewniając znaczny stopień stabilności nieaktywnej chromatyny plemnikowej [4]. Neutralne kompleksy DNA-protaminy wiążą się ze sobą siłami van der Waalsa. Stwierdzono, że kompleksy DNA-protaminy nie są skrócone superhelikalnie lub skrócenie to występuje w niewielkim stopniu [18, 21,30]. Funkcjonalne znaczenie tego faktu może być związane z brakiem aktywności plemnikowego DNA w procesach replikacji i transkrypcji. Podstawową funkcją protamin jest skondensowanie plemnikowego genomu do ściśle upakowanego, zabezpieczonego maksymalnie stanu. W przeciwieństwie do histonów protaminy nie wydają się skracać długości DNA [27]. Kompleksy DNA-protaminy są nierozpuszczalne w buforach o fizjologicznej sile jonowej i są odporne na trawienie enzymatyczne.

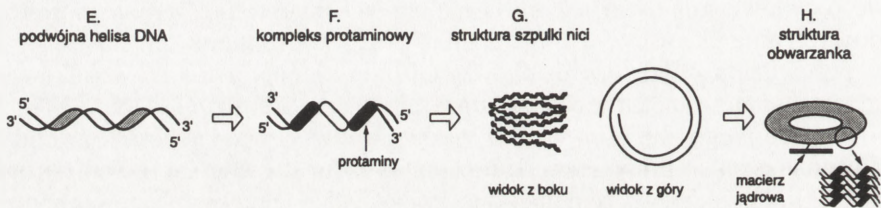
2.3. Struktura obwarzanka

Somatyczny DNA w postaci nukleosomów jest upakowany w włókno o średnicy około 30 nm. Najczęściej uznawanym modelem tego upakowania jest konfiguracja solenoidu. 6 nukleosomów owiniętych jeden obok drugiego tworzy skręt. Z kolejnych skrętów zbudowane jest włókno solenoidu (rys. 1C). Według modelu Warda [27, 28], kompleksy DNA-protaminy w plemnikach najprawdopodobniej są upakowane w postaci szerokich, koncentrycznych, nakładających się na siebie okręgów. Jest to forma zbliżona wyglądem do szpulki nici (rys. 1G). Zwinięte w postaci szpulki nici kompleksy DNA-protaminy ulegają silnej kondensacji, w wyniku której poszczególne okręgi zbliżają się do siebie i ostatecznie powstaje tzw. struktura obwarzanka (rys. 1H). Forma ta ma średnicę zewnętrzną równą ok. 65 nm, średnicę wewnętrzną – ok. 32,5 nm, wysokość – ok. 25 nm. Nie jest to jednak struktura idealnie cylindryczna, ponieważ okręgi DNA-protaminy kondensują niejednolicie. Obrazy mikroskopowe

SOMATYCZNY DNA



PLEMNIKOWY DNA



Rys. 1. Porównanie sposobów upakowania i konfiguracji DNA w komórkach somatycznych i w plemnikach: [A–D]: podwójna helisa DNA (A) jest dwukrotnie owinięta dookoła oktameru histonowego tworząc 10 nm nukleosom (B), który następnie jest upakowany w włókno o średnicy 30 nm i konfiguracji solenoidu (C); włókna solenoidu w postaci charakterystycznych pętli (domen) zostają związane w macierzy jądrowej (D); [E–H]: do podwójnej helisy DNA (E), na całej jej długości i wzdłuż jednego rowka, wiążą się protaminy, które całkowicie neutralizują ujemny ładunek szkieletu fosfodiesterowego DNA (F), kompleksy DNA-protaminy przyjmują formę spiralnych okręgów, mogących wiązać się ze sobą siłami van der Waalsa i przypominających z wyglądu szpulkę nici (G); następnie DNA związane z protaminami ulega silnej kondensacji, w wyniku której poszczególne okręgi zbliżają się do siebie i powstaje struktura obwarzanka (H), ulegająca następnie związaniu w postaci domeny w macierzy jądrowej

pozbawionych otoczki jądrowej plemników buhaja i myszy oraz częściowo zdekondensowanej chromatyny plemników myszy potwierdziły, że DNA nie jest uorganizowany w długie wiązki włókien (solenoid), ale w twory kuliste przypominające wyglądem koraliki [1]. Podobny obraz uzyskano w przeprowadzonych badaniach plemników szczura [17]. Dokładniejsze analizy pozwoliły na opisanie złożonego kompleksu DNA-protaminy jako 90 nm pierścienia zawierającego ok. 60 kb DNA [14].

2.4. Domeny

Zarówno włókna solenoidów komórek somatycznych, jak i struktury obwarzanka występujące w plemnikach są uorganizowane w postaci tzw. domen i pozostają związane z macierzą jądrową [24] w specyficznych miejscach (rys. 1D–H). Związanie to jest możliwe dzięki charakterystycznym sekwencjom DNA występującym na końcach pętli solenoidu i w odpowiadających im topologicznie określonych miejscach w obrębie struktury obwarzanka. U chomika, średnia wielkość domen w

plemnikach wynosi 47 kb, podczas gdy średnia wielkość domen w komórkach somatycznych – 77 kb [30]. Wielkość domen jest specyficzna gatunkowo. U tego samego gatunku stosunek wielkości domen w plemnikach do wielkości domen w komórkach somatycznych kształtuje się jak 1:2, przy czym owo zmniejszenie wielkości nie wydaje się być związane z haploidalnością genomu plemników. W czasie spermiogenezy liczba miejsc wiązania na macierzy jądrowej wzrasta wraz ze zmniejszeniem średniej wielkości domeny [9, 30]. Plemnikiowa macierz jądrowa ulega także pewnej kondensacji, przystosowując się do kondensującej chromatyny [28]. Domeny występują we wszystkich typach komórek eukariotycznych i na różnych etapach ich cyklu: w jądrach interfazowych [7, 26], w chromosomach mitotycznych [8, 31], w plemnikach [3, 16, 29, 30]. Są strukturami dynamicznymi zmieniającymi się wraz z funkcjonalnymi zmianami w jądrze, takimi jak: replikacja [26, 27], transkrypcja [22] lub długość replikonu [10, 15]. Stwierdzono specyficzność gatunkową wielkości domen i długości replikonów [5]. Wykazano, że w różnych typach komórek tego samego organizmu, na DNA związanym w domenach, znajdują się różne geny [12, 22]. Uważa się także za prawdopodobne, że specyficzne uorganizowanie DNA w macierzy jądrowej odgrywa znaczącą rolę w różnicowaniu komórki. Ponieważ sposób związania domen z macierzą ściśle koreluje z funkcją DNA, to znaczy, że organizacja tych domen może być najbardziej fundamentalnym aspektem struktury eukariotycznej chromatyny.

2.5. Chromosomy mitotyczne

Chromosomy mitotyczne to ostatni stopień kondensacji pętli solenoidowych DNA somatycznego. W jaki dokładnie sposób dochodzi do ich wykształcenia, pozostaje niejasne. Plemniki są komórkami, w których nie zachodzi mitoz. Nie wydaje się więc prawdopodobne, aby istniały w nich struktury odpowiadające chromosomom mitotycznym. Z drugiej jednak strony, plemniki są ostatnim produktem podziału mejotycznego, możliwe jest więc, że obecne są w nich ślady struktur właściwych komórkom, w których zachodzą procesy mitotyczne. Udowodniono, że w pełni skondensowana chromatyna plemnikiowa zachowuje pewną ilość specyficznych białek centromerowych, naturalnie występujących w komórkach somatycznych [13].

3. MECHANIZM PRZEMIANY

Plemniki różnicują się z komórek gametogenicznych nabłonka plemnikotwórczego, które mają strukturę DNA typu somatycznego. Jak to się dzieje, że w czasie procesu spermiogenezy złożona struktura DNA komórek somatycznych zostaje przekształcona w całkowicie inną formę? Aby przemiana taka mogła nastąpić, powinny zostać spełnione dwa warunki. Po pierwsze – należałoby przyjąć powszechnie uznany model struktury DNA występującego w komórkach somatycznych jako formę wyjściową. Po drugie – hierarchia struktury plemnikowego DNA musiałaby pokrywać się z hierarchią struktury DNA komórek somatycznych.

Na poziomie podwójnej helisy nie obserwuje się znaczących różnic w komórkach somatycznych i plemnikowych. Pierwszym etapem przemiany jest więc zastąpienie nukleosomalnych histonów przez protaminy. Ponieważ protaminy wiążą się z DNA linearnie, wzdłuż jego długości, najkorzystniejszym sposobem upakowania jest struktura kolistą. Na jeden obrót solenoidu w komórkach somatycznych przypada 13 superskrętów helisy DNA, po 2 na każdy z 6 nukleosomów i 1 na sam solenoid. W czasie przekształcania się struktury DNA typu somatycznego w plemnikowy możliwa jest następująca sytuacja: 11 z 12 nukleosomalnych superskrętów zostaje usuniętych drogą enzymatycznej działalności topoiizomerazy (obecność topoiizomeraz stwierdzono we wszystkich typach komórek pojawiających się w toku spermatogenezy z wyjątkiem dojrzałych plemników [19]). Po rozwinięciu DNA, histony zostają zastąpione protaminami. Po tym procesie, DNA 1 obrotu solenoidu przyjmuje formę 2 spiralnych okręgów kompleksu DNA-protaminy. Tak uorganizowane okręgi DNA łatwo mogą związać się ze sobą siłami van der Waalsa i powstaje struktura szpulki nici. Po procesie kondensacji, który jest procesem złożonym i wymagającym prawdopodobnie obecności wielu białek przejściowych, powstaje struktura obwarzanka [28].

Opisana przemiana struktury DNA typu somatycznego w DNA typu plemnikowego jest całkowicie zgodna z uznanym modelem konformacji cząsteczki DNA. Struktura obwarzanka pozwala na zachowanie hierarchii struktury DNA plemnikowego analogicznej do hierarchii DNA somatycznego, gdzie nukleosomowi odpowiada kompleks DNA-protaminy, solenoidowi – struktura obwarzanka (forma szpulki nici jest formą przejściową), a związanie DNA w postaci domen zostaje zachowane. Model wyjaśnia także podstawową właściwość plemników, jaką jest skondensowanie materiału genetycznego w nich zawartego około 6 razy bardziej niż w komórkach somatycznych [2, 20, 33] oraz przeniesienie ojcowskiego genomu do zygoty w zorganizowanej, skondensowanej, nieaktywnej formie zwiększającej szanse na to, że nie ulegnie on uszkodzeniu i zostanie doprowadzony do miejsca przeznaczenia w postaci nienaruszonej.

4. DALSZY PYTANIA

Jedną z niejasności towarzyszących badaniom genomu plemnikowego jest występowanie w nim białek histonowych. Podczas spermiogenezy DNA ulega kondensacji w związaną, transkrypcyjnie nieaktywną masę. Mechanizmy, które kierują kondensacją DNA, wydają się być zróżnicowane, ponieważ nie zawsze te same typy białek ulegają związaniu z chromatyną plemnikową. W plemnikach większości gatunków histony są zastępowane częściowo lub całkowicie przez protaminy. Są doniesienia, że te dwa typy białek podstawowych mogą wiązać się preferencyjnie do różnych sekwencji DNA [35]. Stwierdzono, że ludzkie plemniki zawierają około 15% histonów i 85% protamin [9], a więc występujący w nich DNA jest upakowany zarówno w kompleksy protaminowe, jak i histonowe.

Jaka jest rola histonów, które pozostają w genomie plemnikowym obok protamin?

Biologiczne znaczenie obecności kompleksów DNA-histony w plemnikach jest nieznane. Są doniesienia, że dwa typy białek podstawowych: histony i protaminy mogą wiązać się preferencyjnie do różnych sekwencji DNA [11]. Przeważająca większość DNA, kondensowana i stabilizowana przez protaminy, jest nieaktywna. Pozostała jego część jest połączona z histonami, w sposób pozwalający na zachowanie aktywności tego regionu. Tak uorganizowany DNA mógłby ulegać transkrypcji w końcowych etapach spermatogenezy bądź we wczesnych stadiach rozwoju embrionalnego. Możliwe jest, że kompleks histon-DNA, warunkujący aktywność danego regionu DNA, oddziałuje na miejsca inicjacji dekondensacji chromatyny. Istnieje także inna hipoteza mówiąca, że DNA szczytu pętli solenoidowych uorganizowanych w postaci domen w macierzy jądrowej pozostaje związany z histonami, co powoduje, że wewnątrz struktur obwarzanka jest wypełnione nukleosomami. DNA związany z macierzą jądrową i ukształtowany w postaci nukleosomów charakteryzuje się zwiększoną zdolnością do poddawania zginaniu [27].

5. PODSUMOWANIE

W niniejszej pracy przedstawiono model struktury DNA występującego w plemnikach. Dojrzałe męskie komórki rozrodcze charakteryzują się specyficznymi cechami, odróżniającymi je od innych komórek organizmu, takimi jak: haploidalność materiału genetycznego, jego maksymalne skondensowanie czy zdolność komórki do aktywnego ruchu.

Wszystkie te cechy są ściśle związane z rolą, jaką plemniki odgrywają w procesie zapłodnienia, co znajduje swe odbicie w strukturze DNA.

Przedstawiony model, opracowany szczegółowo przez Warda [27, 28, 29], wyjaśnia wzajemne korelacje pomiędzy strukturą DNA i funkcją plemników i stanowi pewien logiczny fragment w pełnym luk i kontrowersji obszarze wiedzy, jakim jest proces rozrodu.

LITERATURA

- [1] ALLEN MJ, POGANY G, SIEKHAUS WJ, BALHORN R. Atomic force microscopy studies of mammalian sperm chromatin. *J Cell Biol* 1990: **111**: 110 /abstract 613/.
- [2] BALHORN R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol* 1982: **93**: 298–305.
- [3] BARONE JG, de LARA J, CUMMINGS KB, WARD WS. DNA organization in human spermatozoa. *J Androl* 1994: **15**: 139–144.
- [4] BEDFORD JM, CALVIN HI. The occurrence and possible functional significance of -S-S crosslinks in sperm heads, with particular reference to eutherian mammals. *J Exp Zool* 1974: **188**: 137–155.

- [5] BUONGIORNO-NARDELLI M, MICHELI G, CARRI MT, MARRILLEY M. A relationship between replicon size and supercoiled loop domains in the eucaryotic genome. *Nature* 1982; **298**: 100–102.
- [6] COELINGH JP, ROZIEN TH, MONFOORT CH. Isolation and partial characterization of a basic protein from bovine sperm heads. *Biochem Biophys Acta* 1969; **188**: 353–356.
- [7] COOK PR, BRAZELL JA, JOST E. Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *J Cell Sci* 1976; **22**: 303–324.
- [8] EARNSHAW WC, LAEMMLI UK. Architecture of metaphase chromosomes and chromosomes scaffolds. *J Cell Biol* 1983; **96**: 84–93.
- [9] FAWCETT DW. A comparative view of sperm ultrastructure. *Biol Reprod* 1970; **2** /suppl.: 90–127.
- [10] FLICKINGER RA, GIVENS R, PINE S, SEPANIK P. Factors controlling the size of DNA loops in frog embryos and Friend erythroleukemia cells. *Cell Differ* 1986; **19**: 59–71.
- [11] GATEWOOD JM, COOK GR, BRADBURY EM, SCHMID CW. Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science* 1987; **236**: 962–964.
- [12] GETZENBERG RH, PIENTA KJ, WARD WS, COFFEY DS. Nuclear structure and three-dimensional organization of DNA. *J Cell Biochem* 1991; **46**: 1–11.
- [13] HAAF T, GRUNENBERG H, SCHMID M. Paired arrangement of nonhomologous centromeres during vertebrate spermiogenesis. *Exp Cell Res* 1990; **187**: 157–161.
- [14] HUD NV, ALLEN MJ, DOWNING KM, LEE J, BALHORN R. Identification of the elemental packing unit of the DNA in mammalian sperm cells by force microscopy. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **193**: 1347–1354.
- [15] HYODO M, FLICKINGER RA. Replicon growth rates during DNA replication in developing frog embryos. *Biophys Acta* 1973; **299**: 29–33.
- [16] KALANADZE AG, BUSHARA SA, VASSETZKY YS JR., RAZIN SV. Characterization of DNA pattern in the site of permanent attachment to the nuclear matrix in the vicinity of replication origin. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; **168**: 9–15.
- [17] KOEHLER JK, WURSCHMIDT U, LARSEN MP. Nuclear and chromatin structure in rat spermatozoa. *Gamet Res* 1983; **8**: 357–370.
- [18] de LARA J, WYDNER KL, HYLAND KM, WARD WS. Fluorescent *in situ* hybridization of the telomere repeat sequence in hamster sperm nuclear structures. *J Cell Biochem* 1991; **53**: 213–221.
- [19] MORSE-GAUDIO M, RISLEY MS. Topoisomerase expression during spermatogenesis. *J Cell Biochem* 1991; **115**: 50 /abstract 286/.
- [20] POGANY GC, COHETT M, WESTON S, BALHORN R. DNA and protein content of mouse sperm. *Exp Cell Res* 1981; **136**: 127–136.
- [21] RISLEY MS, EINHEBER S, BUMCROT DA. Changes in DNA topology during spermatogenesis. *Chromosoma* 1986; **94**: 217–227.
- [22] ROBINSON SI, NELKIN BD, VOGELSTEIN B. The ovaalbumin gene is associated with the nuclear matrix of chicken oviduct cells. *Cell* 1982; **28**: 99–106.
- [23] STEWART TA, BELLVE AR, LEDER P. Transcription and promoter usage of the *myc* gene in normal somatic and spermatogenic cells. *Science* 1984; **226**: 707–710.
- [24] SZYMCZYK P, KILIAŃSKA Z. Matriks jądrowa. II. Skład białkowy: Specyficzność białek matriks jądrowej. *Post Biol Kom* 1994; **21**: 133–164.
- [25] Van der VELDEN HMW, Van WILLIGEN G, WETZELS RHW, WANKA F. Attachment of origins of replication to the nuclear matrix and the chromosomal scaffold. *FEBS Lett* 1984; **171**: 13–16.
- [26] VOGELSTEIN B, PARDOLL DM, COFFEY DS. Supercoiled loops and eucaryotic DNA replication. *Cell* 1980; **22**: 79–85.
- [27] WARD WS. Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. *Biol Reprod* 1993; **48**: 1193–1201.

- [28] WARD WS, The structure of the sleeping genome: Implications of sperm DNA organization for somatic cells. *J Cell Biochem* 1994: **55**: 77–82.
- [29] WARD WS, COFFEY DS. Specific organization of genes in relation to the sperm nuclear matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 1990: **173**: 20–25.
- [30] WARD WS, PARTIN AW, COFFEY DS. DNA loop domains in mammalian spermatozoa. *Chromosoma* 1989: **98**: 153–159.
- [31] WARREN AC, COOK PR. Supercoiling of DNA and nuclear conformation during the cell cycle. *J Cell Sci* 1978: **30**: 211–226.
- [32] WATSON JD, CRICK FHC. Molecular structure of nucleic acids. *Nature* 1953: **171**: 737–738.
- [33] WYROBEK AJ, MEISTRICH ML, FURRER R, BRUCE WR. Physical characteristics of mouse sperm nuclei. *Biophys J* 1976: **16**: 811–825.

Otrzymano: 19.09.1995 r.

Przyjęto: 12.12.1995 r.

Adres autora: Zespół Biologii Rozrodu, Zakład Genetyki PAN
60-479 Poznań, ul. Strzeszyńska 32

RECEPTORY ADHEZYJNE

ADHESION RECEPTORS

Iwona ŻAK

Katedra i Zakład Biochemii i Chemii Śl. Akademii Medycznej

Streszczenie. W przeglądzie omówiono cztery główne klasy receptorów adhezyjnych powierzchni komórkowej: kadheryny, adhezyny, selektyny i integryny, eksponując główne ich własności biologiczne.

Słowa kluczowe: kadheryny, adhezyny, nadrodzina immunoglobulin, selektyny, integryny

Summary. Four major classes of cell surface adhesion receptors: cadherins, adhesins, selectins and integrins were discussed in the review, exposing their main biological properties.

Key words: cadherins, adhesins, the immunoglobulin superfamily, selectins, integrins

Wykaz stosowanych skrótów: **CCP** (*complement control protein*) – białka dopełniacza, **CD** (*cluster of differentiation*) – antygeny różnicowania leukocytów, **CLA** (*cutaneous lymphocyte-associated antigen*) – skórny antygen wiążący limfocyty, **CRD** (*carbohydrate recognition domain*) – domeny rozpoznające węglowodany, **ECM** (*extracellular matrix*) – substancja międzykomórkowa, **EGF** – epidermalny czynnik wzrostowy, **ELAM-1** (*endothelial-leukocyte adhesion molecule-1*) – cząsteczka adhezyjna leukocyta-endoetelialna-1 = selektyna-E, **GM-CSF** (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) – czynnik wzrostowy stymulujący wzrost kolonii granulocyto-makrofagowych, **GMP-140** (*granule membrane protein-140*) – białko błonowe ziarnistości-140, **HEV** (*high endothelial venule*) – żyłki o wysokim śródbłonku (naczyni pozawłośniczkowych), **Homing receptor** (*lymphnode homing receptor*) – receptor naprowadzający do węzłów chłonnych = selektyna-L, **ICAM-1; -2; -3** (*intercellular adhesion molecule-1, -2, -3*) – międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna-1; -2; -3, **Ig -podobne** – immunoglobulinopodobne, **IL** – interleukina, **LAM-1** (*lectin-like adhesion molecule-1*) – lektynopodobna cząsteczka adhezyjna, **LECAM-1 = LEC.CAM-1** (*lectin-like cell adhesion molecule-1*) – lektynopodobna cząsteczka adhezji komórkowej-1 = selektyna L, **Le(x)** – antygen x układu grupowego Lewis, **LFA-1** (*leukocyte function-associated antigen-1*) – integryna $\alpha_1\beta_2$: CD11a/CD1, **Mac-1** – integryna $\alpha_M\beta_2$: CD11b/CD18, **NCAM** (*neural cell adhesion molecules*) – cząsteczka adhezyjna komórek nerwowych, **PADGEM** (*platelet alpha-granule membrane protein*) – białka błonowe ziarnistości alfa płytek, **PAF** (*platelet activating factor*) – naczyniowy czynnik aktywujący płytki, **PECAM-1** (*platelet/endothelial cell adhesion molecule-1*) – cząsteczka adhezyjna komórek endotelialnych i płytek, **PMN** (*polymorphonuclear leukocytes*) – leukocyty o różnokształtnych jądrach komórkowych, **RGD** – Arg-

Gly-Asp, **SH2 domeny** (*src homology domain*) – domena homologiczna do obecnej w białku *src*, **sjalo-Le(a)** – węglowodanowa determinanta antygenowa układu grupowego Lewis: (NeuAc α 2.3Gal β 1.3(Fuc α 1.4)GlcNAc), **sjalo-Le(x)** – węglowodanowa determinanta antygenowa układu grupowego Lewis: (NeuAc α 2.3Gal β 1.4(Fuc α 1.3)GlcNAc β 1.3), **SPARC** (*secreted protein acidic and rich in cysteine*) – osteonektyna, **SSEA-1** (*stage specific embryonic antigen 1*) – specyficzny antygen embryonalny-1, **TGF- β** – transformujący czynnik wzrostowy- β , **TNF** (*tumor necrosis factor*) – czynnik martwicy nowotworu, **VCAM-1** (*vascular cell adhesion molecule-1*) – cząsteczka adhezyjna komórek naczyniowych-1, **VLA-4** (*very late antigen-4*) – bardzo późny antygen-4, integryna $\alpha_4\beta_1$: CD49d/CD29.

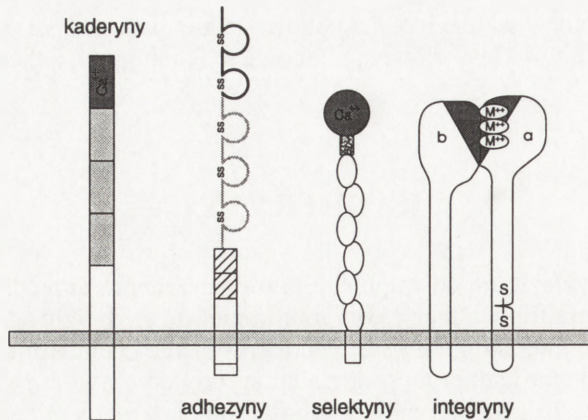
WSTĘP

Receptory adhezyjne są integralnymi glikoproteinami błonowymi, które pośredniczą w interakcjach typu białko-białko, choć interakcje typu białko-węglowodan mogą mieć również miejsce, ale tylko za pośrednictwem selektyn. Mają znaczenie w agregacji komórkowej, przyleganiu komórek do pozakomórkowej substancji (ECM) i w migracji komórek po ECM. Realizując swe własności adhezyjne mogą mieć wpływ na aktywność biologiczną komórek, niezależnie czy adhezja komórka-komórka jest fizjologicznie sporadyczna, czy raczej ciągła. Jednocześnie zdolne są do specyficznego rozpoznawania komórek, przeprowadzenia ich segregacji oraz kontroli morfologii komórkowej. Komórki ujawniają na powierzchniach błon wiele różnych receptorów adhezyjnych, których zestaw jest odmienny w zależności od typu komórki, etapu rozwoju oraz stanu funkcjonalnego dojrzałej komórki. Zmiana "repertuaru" receptorowego może wynikać zarówno z pobudzenia ich syntezy *de novo*, uwalniania z rezerwarów komórkowych bądź odwracalnego "przełączania" form konformacyjnie nieaktywnych w receptory aktywne. Pełny zestaw receptorowy danej komórki może decydować o jej biologicznym zachowaniu oraz determinuje różnice między odmiennymi typami komórek. Przymuszczenie współdziałanie między wszystkimi receptorami adhezyjnymi obecnymi w zestawie komórkowym sprawia, że jedne komórki mogą ciągle pozostawać w danym miejscu utrzymując adhezję komórka-komórka, podczas gdy inne uwalniają się z przylegania międzykomórkowego, przemieszczają się, a po dotarciu do właściwych im miejsc przeznaczenia ponownie ujawniają zdolności do międzykomórkowej agregacji. Genetycznie kontrolowane ujawnianie różnorodnych błonowych zestawów receptorów adhezyjnych może determinować zachowanie indywidualnych komórek w zespołach tkankowych, niezależnie czy ma to miejsce podczas rozwoju, czy w dojrzałym organizmie. Kontrolowana ekspresja różnych zestawów receptorów adhezyjnych ma znaczenie w wielu fizjologicznych procesach, również pozarozwojowych, np. w hemostazie, recyrkulacji leukocytów lub gojeniu ran. Natomiast nieoczekiwana zmiana repertuaru, zarówno pod względem ilościowym jak również jakościowym, powierzchniowych receptorów adhezyjnych często bywa podłożem patologii w takich stanach, jak: inwazja i przerzuty nowotworowe, remodelowanie tkanek, zakrzepica, chroniczne zapalenie i inne.

Błonowe receptory adhezyjne klasyfikuje się na podstawie własności strukturalno-funkcjonalnych w 4 klasy główne, mianowicie: kadheryny, adhezyny, selektywne i integriny (rys. 1).

KADHERYNY

Kadheryny są zależnymi od wapnia, błonowymi receptorami adhezyjnymi, które pośredniczą w homofilnej adhezji komórka-komórka, czyli w przyleganiu komórek za pośrednictwem interakcji ich kadheryn tego samego typu. Komórki, które ujawniają jedynie odmienne kadheryny, oddzielają się od siebie i tworzą odrębne skupienia [28, 30, 38, 39, 75, 76]. Kadheryny występują w połączeniach międzykomórkowych większości homotypowych zespołów komórek. Narządowe rozmieszczenie kadheryn wykazuje specyficzność tkankową. Dotychczas poznano wiele kadheryn. Wśród nich przynajmniej trzy można uznać za klasyczne, mianowicie kadheryny-E, -N i -P, gdyż są powszechne i najlepiej zbadane. Kadheryna-E, zwana inaczej uwomoruliną, jest charakterystycznym receptorem adhezyjnym komórek nabłonkowych, który odpowiedzialny jest za utrzymanie spójności różnych nabłonków [53, 54, 67]. Podobna kadheryna-E pośredniczy adhezji komórek w nerwach obwodowych, której obecność jest wymagana do prawidłowej mielinizacji [22]. Neutralna kadheryna-N charakterystyczna jest dla komórek nerwowych, lecz w tkance nerwowej obecnych jest wiele innych kadheryn [74] i podobne receptory mogą występować na powierzchni błon odmiennych komórek [66]. Kadheryna-P obecna jest w łożysku [44], kadheryna-R w siatkówce [35] natomiast kadheryna-VE, choć jest specyficzna dla komórek nabłonkowych wszystkich typów naczyń krwionośnych [41], to jednak mogą towarzyszyć jej inne kadheryny [48]. Wszystkie kadheryny mają podobną strukturę, z N-końcowym długim rejonem znajdującym się poza komórką, krótkim rejonem kotwiczącym w błonie i C-końcem w cytoplazmie. Niektóre tylko, np. kadheryna-T, zakotwiczone są w błonie za pośrednictwem glikofosfatydyloinozytolu [64]. Cytoplazmatyczny C-końcowy rejon łańcucha polipeptydowego większości kadheryn charakteryzuje się wysoką konserwatywnością sekwencji. Rejon ten odpowiedzialny jest za oddziaływanie z białkami łączącymi go z cytoszkieletem oraz za stabilizację całego kompleksu łączącego [55]. Białkami łącznikowymi są cytoplazmatyczne kateniny: $-\alpha$, $-\beta$ i plakoglobina oraz białka zasocjowane z połączeniem (*junction-associated proteins*), np. winkulina. Wymienione białka współuczestniczą w kotwiczeniu kadheryn w aktywie korowej cytoszkieletu [38, 42, 78]. Pozakomórkowy fragment polipeptydu kadheryn można podzielić na 5 regionów oznaczonych jako EC1 do EC5 [30]. Spośród nich wysoką wzajemną homologię wykazują cztery regiony, mianowicie EC1 do EC4 i zawierają sekwencje wiążące jony Ca^{++} . W najbardziej dystalnym regionie (EC1) znajdują się główne determinanty warunkujące specyficzność wiązania [59]. Region EC5, wykazujący najniższą homologię z pozostałymi, wyróżniany jest jako prebłonowa domena (rys. 1)[3].



Rys. 1. Główne klasy błonowych receptorów adhezyjnych [33]; miejsca odpowiedzialne za wiązanie ligandów we wszystkich receptorach zaznaczono jako zaciemnione terminalne obszary; w adhezynach dwa zakreślone obszary przedstawiają moduły fibronektynopodobne; w selektynach rejon zakropkowany odpowiada modułowi EG-F-podobnemu (szczegółowe objaśnienia w tekście)

Kadheryny są receptorami adhezyjnymi pojawiającymi się najwcześniej podczas rozwoju embrionalnego [75, 76]. Najwcześniej pojawia się kadheryna-E, gdyż na etapie moruli i odpowiada za utrzymanie spójności komórek, adhezji komórka-komórka, która ostatecznie prowadzi do polaryzacji komórek wczesnej blastocysty. Natomiast kadheryna-N po raz pierwszy pojawia się podczas gastrulacji jedynie na powierzchni komórek ektodermy neuralnej, które staną się zawiązkiem przyszłej cewki nerwowej [16]. Różnicowa ekspresja kadheryn -E i -N przyczynia się do segregacji komórek ektodermalnych, czego dalszym następstwem jest oddzielenie cewki nerwowej od ektodermy pokrywowej. Komórki, które utraciły ze swej powierzchni kadheryny, uwalniają się z zespołu komórkowego i mogą migrować [33]. W procesach migracji istotną rolę spełniają jednak inne receptory adhezyjne, mianowicie niektóre integryny (patrz dalej), które m.in. pośredniczą w adhezji komórka-ECM [34]. Podczas embriogenezy, uwalnianie komórek mezodermalnych z warstwy ektodermalnej jest przypuszczalnie konsekwencją skorelowanego wytłumiania ekspresji powierzchniowych kadheryn z jednoczesnym pobudzeniem ekspresji funkcjonalnych receptorów integrynowych, zdolnych do przeprowadzenia migracji komórek na substancji pozakomórkowej bogatej w białka adhezyjne, takie jak np. fibronektyna. Podobne zjawisko może mieć miejsce podczas inwazji nowotworowej, skoro wykazano wyraźny związek przyczynowy pomiędzy utratą kadheryn a nabywaniem inwazyjnego fenotypu przez komórki guza [2, 25, 60]. Inwazja i przerzuty są zjawiskami złożonymi obejmującymi nie tylko utratę pierwotnej adhezji, lecz także wymagają nabycia przez uwolnioną komórkę nowych cech, szczególnie w zakresie repertuaru błonowych receptorów adhezyjnych, których ekspresja przyzwoli na ponowną adhezję komórek złośliwych w nowym mikrośrodkowisku "obcego" ECM i komórek heterologicznych.

ADHEZYNY

Błonowe receptory adhezyjne nadrodziny immunoglobulin nazywane są adhezynami (rys. 1) [68, 69]. Jako pierwszy wykryto błonowy receptor adhezyjny komórek nerwowych – NCAM [9]. Podobne receptory są powszechne nie tylko w mózgu [83], ale również w komórkach systemu immunologicznego [46, 68] i wielu innych komórkach nabłonkowych i śródbłonkowych [33]. Pełnią rolę w rozpoznawaniu i adhezji [52] oraz transdukcji do komórki sygnału biologicznego [20]. Współuczestniczą w interakcjach komórka-komórka, które mają znaczenie podczas takich zjawisk, jak np. recyrkulacja limfocytów, diapedeza, odpowiedź immunologiczna i zapalenie. Należą do nich takie adhezyny, jak: ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102), ICAM-3, VCAM-1 i PECAM-1 (CD31).

Wiele adhezyn pełni funkcje przeciwwstawnych-receptorów (*counterreceptor*) dla receptorów integrynowych, dlatego ich działanie jest heterofilne. Inne, szczególnie pochodzące z tkanki nerwowej i systemu immunologicznego, działają również w sposób homofilny. Mogą pośredniczyć między komórkami tego samego typu w agregacji homotypowej oraz między komórkami odmiennego typu w agregacji heterotypowej [33]. Są receptorami, których powinowactwo do swych ligandów integrynowych nie wymaga dodatkowej regulacji, poza możliwym zwiększeniem ich ilości na powierzchni błon zaktywowanych komórek, w wyniku syntezy *de novo*.

Wszystkie adhezyny utworzone są z pojedynczego łańcucha glikoproteinowego, który jest integralnym białkiem błonowym (rys. 1). Niektóre (np. ICAM-1) występują również w formach rozpuszczalnych. Charakteryzują się dużą homologią regionów pozakomórkowych, natomiast znacznie niższą rejonów przezbłonowych i cytoplazmatycznych. Rejony pozakomórkowe adhezyn mają strukturę białek mozaikowych [85], którą tworzy zmienna liczba modułów Ig-podobnych i fibronektynopodobnych typu III. Członków nadrodziny immunoglobulin można klasyfikować na podstawie liczby powtórzeń modułów Ig-podobnych i w wielu przypadkach na podstawie obecności dwóch modułów fibronektynopodobnych. Przykładowo, NCAM zawiera cztery moduły Ig-podobne [80], ICAM-1 [70] i ICAM-3 [12, 23] – po pięć modułów Ig-podobnych, nieco więcej PECAM-1, mianowicie 6 [56], VCAM-1 6 lub 7 [10], natomiast ICAM-2 jedynie 2 [71]. Struktura przestrzenna modułów Ig-podobnych [85] jest doskonałym molekularnym rusztowaniem, na którym mogą być prezentowane niezależne warianty aminokwasowych sekwencji rozpoznania adhezyjnego [82]. Te krótkie sekwencje aminokwasowe tworzą płamki funkcjonalne bezpośrednio uczestniczące w rozpoznawaniu biologicznym i w interakcjach [80]. Miejsca wiążące ligand zlokalizowane są zwykle w 2 dystalnych modułach immunoglobulinowych oraz na trzecim module IG ICAM-1 jest miejsce wiążące Mac-1. Własności wiążące nie są zależne od dwuwartościowych kationów. Obecnie nie są dostatecznie poznane funkcje modułów fibronektynopodobnych oraz tandemu modułów Ig-podobnych. Można przypuszczać, że zwielokrotnienie liczby modułów dostarcza dodatkowych miejsc dla wiązania również innych ligandów, tak jak ma to miejsce w ICAM-1 [17].

Adhezyny różnią się bardziej między sobą rejonami cytoplazmatycznymi swych makrocząsteczek. Strukturalne różnice między wewnątrzkomórkowymi rejonami

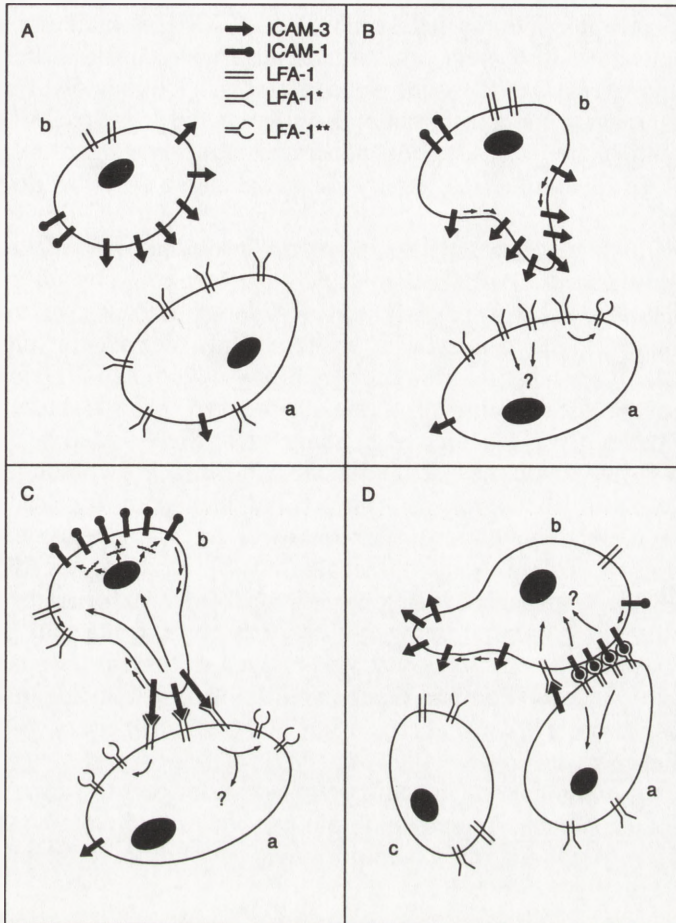
różnych adhezyn leżą u podstaw ich odmienności w rozmieszczeniu komórkowym i tkankowym, różnej zdolności do oddziaływania z cytoszkieletem i przekazywania sygnałów biologicznych. Tego typu różnice mają miejsce między ICAM-1 i ICAM-3 [12]. Różnorakie strukturalne modyfikacje w obrębie rejonów cytoplazmatycznych mogą modulować powinowactwo indywidualnych adhezyn do wiązania liganda oraz sygnalizację międzykomórkową [56, 68]. Ostatnio wykazano [14], że delekcja określonego fragmentu rejonu cytoplazmatycznego może zmienić specyficzność wiązania liganda przez PECAM-1 z heterofilnego na homofilne, pozostaje wyjaśnić, na ile zjawisko to może być powszechne wśród adhezyn.

Trzy homologiczne adhezyny, jakimi są ICAM-1, ICAM-2 i ICAM-3, mają wspólnego liganda, mianowicie główną leukocytarną integrynę LFA-1 = $\alpha_L\beta_2$ [12, 23, 71]. ICAM-1 jest przeciwstawnym-receptorem również dla drugiego liganda receptorowego, mianowicie integryny Mac-1 = $\alpha_M\beta_2$, dla którego miejsce wiążące znajduje się na trzecim module Ig-podobnym od N-końca tej adhezyny [17]. ICAM-1 jest również receptorem dla większości rinowirusów ludzkich powodujących przeziębienie [70]. Omawiane adhezyny różnią się rozmieszczeniem komórkowym i tkankowym oraz mechanizmem kontrolującym ich ekspresję.

ICAM-1 występuje w znikomych ilościach na spoczynkowych komórkach. Ilość ICAM-1 rośnie po stymulacji komórek cytokinami, osiągając maksymalny poziom w ciągu 16–24 godz. Wysoka aktywność ICAM-1 na powierzchni stymulowanych komórek jest wynikiem wzmożonej syntezy *de novo*. Różnorodne stymulowane i aktywne komórki, np. śródbłonkowe, nabłonkowe, fibroblasty, makrofagi i limfocyty, posiadają ICAM-1 na powierzchni błon [17, 69]. Adhezyna ta pełni rolę w odpowiedzi immunologicznej i w zapaleniu, m.in. uczestniczy w homotypowej agregacji limfocytów (rys. 2).

ICAM-2 nie jest białkiem indukowanym, lecz konstytutywnie ujawnianym na powierzchni komórek śródbłonkowych i różnych hematopoetycznych z wyjątkiem neutrofilii. Ilość ICAM-2 na błonach komórkowych nie zmienia się po stymulacji komórek mediatorami zapalenia [58]. Adhezyna ta pełni rolę w niestymulowanych procesach spoczynkowych, wczesnym zapaleniu, m.in. współuczestnicząc w adhezji leukocytów do komórek śródbłonkowych wymaganej dla diapedezy leukocytarnej (tzn. przechodzenie leukocytów przez ścianę naczyniową do przestrzeni pozakomórkowej) (rys. 3).

ICAM-3 jest jedyną z homologicznych adhezyn, która nie występuje na komórkach śródbłonkowych. Wysoka jej ekspresja ogranicza się do spoczynkowych komórek linii leukocytarnej. W znacznych ilościach występuje na spoczynkowych limfocytach, monocytach, neutrofilach oraz komórkach organów limfoidalnych [13, 15]. Del Pozo i wsp. [15] dowodzą, że adhezyna ICAM-3 zdolna jest do przeprowadzenia homotypowej agregacji limfocytów dwoma różnymi drogami, mianowicie: zależnej od interakcji typu LFA-1/ICAM-1 oraz zależnej od interakcji typu LFA-1/ICAM-3 (rys. 2). Adhezyna ta pełni rolę współstymulatora spoczynkowych limfocytów T, co może mieć szczególnie ważne znaczenie podczas początkowej fazy odpowiedzi immunologicznej (rys. 2).



Rys. 2. Rola ICAM-3 w aktywacji spoczynkowych limfocytów T podczas wczesnego etapu odpowiedzi immunologicznej [wg 15 za zgodą autora i wydawcy]: A – komórki prezentujące antygen lub komórki limfoidalne T i B tuż po aktywującej stymulacji (a) mają na błonach uaktywnione formy integrzyn LFA-1*; spoczynkowe limfocyty T (b) mają LFA-1 w nieaktywnej konformacji oraz ICAM-3 w ilościach znacznie przekraczających poziom ICAM-1; B – zjawisko rozpoznawania ICAM-3 przez LFA-1* sprzyja naprowadzaniu komórek (a) w sąsiedztwo komórek (b); oddziaływaniu komórek (a i b) towarzyszy redystrybucja ICAM-3 i zmiana morfologii spoczynkowych limfocytów T (b) przez wytworzenie przodującego lobopodium (*heading uropod*) bogatego w ICAM-3; na błonie sąsiedniej komórki (a) następuje redystrybucja LFA-1* polegająca na skupianiu (*clustering*) integrzyn w obszarze naprzeciwko lobopodium; C – interakcje typu ICAM-3/LFA-1* między spoczynkowym limfocytom T (b) i aktywną komórką (a) pobudzają syntezę *de novo* ICAM-1 w komórkach (b); natomiast na obu komórkach (a i b), stymulują zmiany w strukturze przestrzennej integrzyn do konformacji o pełnej aktywności biologicznej LFA-1** i dużej "chciwości" (*avidity*) na interakcję z ICAM-1; ICAM-3 jest współstymulatorem aktywacji limfocytów T; D – zwiększająca się ilość ICAM-1 na błonach komórek (b) sprawia, że są przejmowane przez "chciwe" (na interakcję z ICAM-1), w pełni aktywne formy integrzyn LFA-1**; przyczynia się to do stabilizacji wiązania komórka-komórka w drodze oddziaływań typu ICAM-1/LFA-1**; natomiast uwolnione z interakcji cząsteczki ICAM-3 przemieszczają się wzdłuż błony, gromadzą na powierzchni przodującego lobopodium zachowując zdolność wiązania nowych komórek (c) przez oddziaływania typu ICAM-3/LFA-1*

Naczyniowe receptory adhezyjne, mianowicie VCAM-1 są białkami indukowanymi, dlatego pojawiają się w zmiennych ilościach na powierzchni komórek śródbłonkowych. Wykazują selektywność wobec jednojądrzastych leukocytów. Endotelium, po stymulacji cytokinami zapalenia lub endotoksyną, ujawnia duże ilości VCAM-1, które mogą być utrzymywane przez 24 godz. po zaprzestaniu stymulacji [69]. Heterogenność VCAM-1 może wynikać z alternatywnego składowania eksonów do mRNA [10]. Dwie formy VCAM-1 różniące się ilością powtórzeń modułów Ig-podobnych mogą mieć odmienną lokalizację narządową. Komórki śródbłonkowe ludzkiej żyły pępowinowej stymulowane IL-1 ujawniają VCAM-1 głównie w postaci cząsteczek z 7 modułami Ig-podobnymi, podczas gdy jedynie śladowe ilości cząsteczek z 6 modułami Ig-podobnymi [10]. Adhezyna ta występuje również na innych komórkach, mianowicie makrofagach i komórkach nabłonkowych kanalików nerkowych. VCAM-1 jest przeciwnym-receptorem dla integryn grupy β_1 , które obecne są na limfocytach T pamięci immunologicznej, mianowicie VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$) [21]. Interakcje typu VLA-4/VCAM-1 mają znaczenie w wiązaniu limfocytów, monocytów i eozynofili, lecz nie neutrofilii do zaktywowanych ludzkich komórek śródbłonkowych, umożliwiając im pokonanie bariery śródbłonkowej. Interakcje tego typu mogą mieć szczególne znaczenie w chronicznym zapaleniu [46]. Królicze VCAM jest bardzo podobne do ludzkiego i również występuje w dwóch różnych formach. U królików z eksperymentalną hipercholesterolemiczną arteriosklerozą wykazano, że VCAM są ujawniane na powierzchni komórek śródbłonkowych w bliskim sąsiedztwie rejonów ściany aorty zawierających komórki piankowe i które objęte są zmianami wczesnymi [11]. Przypuszczalnie VCAM ma znaczenie podczas aterogenezy, gdyż umożliwia monocytom diapedezę.

PECAM-1 występuje na powierzchni płytek krwi, leukocytów oraz w międzykomórkowych połączeniach komórek śródbłonkowych. Adhezyna ta wraz z VE-kaderynami tworzy połączenia międzykomórkowe endotelium oraz pośredniczy w transmigracji [56, 69].

SELEKTYNY

Selektyny wyróżniają się spośród innych błonowych receptorów adhezyjnych własnościami lektynopodobnymi [4, 18]. Molekularną podstawą tych własności jest zdolność białka do rozpoznawania i oddziaływania z jednostkami węglowodanowymi znajdującymi się na innych glikokonjugatach, Selektywne wiązanie oligosacharydów przez domeny CRD jest szczególnie ważne w takich procesach biologicznych, jak: adhezja komórka-komórka, neutralizacja patogenów oraz klirens glikoprotein [19]. Oligosacharydy glikoprotein i glikolipidów są ligandami dla lektyn ssaków. Olbrzymia różnorodność oligosacharydów glikoprotein jest uwarunkowana genetycznie przez kontrolowaną ekspresję specyficznych glikozylotransferaz uczestniczących w ich syntezie, która jest swoista dla każdego typu komórek [86]. Oligosacharydy glikoprotein nadają specyficzne piętno powierzchniom komórek. Są rodzajem szyfru

biologicznego, który jest odmienny u różnych typów komórek, zmiennie kodowany podczas rozwoju i stanu funkcjonalnego komórki zróżnicowanej [86]. Charakter strukturalny oligosacharydów glikoprotein błonowych oraz względne zmiany ich ilości mogą odzwierciedlać patofizjologiczny stan komórki lub tkanki odpowiedzialnej za ich syntezę [86]. Oligosacharydy glikoprotein są nie tylko biernymi markerami czy ligandami, ale również nośnikami informacji w procesach rozpoznania biologicznego z pośrednictwem receptorów lektynowych, gdyż same mogą być elementami składowymi receptorów zdolnych do sygnalizacji międzykomórkowej. Funkcjonalnie zmienny profil oligosacharydów powierzchni komórki sprawia, że interakcje z niektórymi lektynami mogą być promowane, a z innymi wstrzymywane [86]. Oczywisty jest zatem fakt, że w rozważaniach nad mechanizmami kontrolującymi proces adhezji za pośrednictwem selektyn należy uwzględnić regulację na poziomie ekspresji ich oligosacharydowych ligandów.

Przedstawicielami rodziny selektyn są trzy grupy cząsteczek adhezyjnych, mianowicie: selektyny-P (CD62P) (płytkopochodne), selektyny-L (CD62L) (leukocytopochodne) i selektyny-E (CD62E) (endotelialne): symbol literowy przy nazwie wskazuje na pierwotną lokalizację, w której zostały wykryte. Wcześniej selektyny opisywano różnymi skrótami, mianowicie: selektyny-P GMP-140 lub PADGEM, selektyny-E ELAM-1 natomiast selektyny-L LEC. CAM-1, LECAM-1, LAM-1, homing receptor, antygeny limfocytarne: Mel-14, Leu-8, TQ1 i DREG56 [5].

Selektyny są błonowymi białkami mozaikowymi [85] z C-końcowym fragmentem w cytoplazmie, krótkim rejonem kotwiczącym w błonie i długim N-końcowym pozakomórkowym rejonem, który utworzony jest z trzech rodzajów modułów polipeptydowych (rys. 1). N-terminalnie ulokowany jest zawsze wapniozależny moduł CRD, podobny do zwierzęcej lektyny typu C, za nim znajduje się moduł podobny do EGF, po czym zmienna liczba modułów CCP. Tych ostatnich modułów w selektynie-P jest dziewięć, w selektynie-E 6 i w selektynie-L tylko 2 [4,68, 84]. Obecność w selektynach dodatkowych modułów poza lektynopodobnymi może dostarczać miejsc dla przypuszczalnych interakcji typu białko-białko. Natomiast glikoproteinowa i mozaikowa budowa sprawiają, że pojedyncza selektyna może uczestniczyć jednocześnie w dwóch różnych typach interakcji białko-oligosacharyd. Mianowicie, jednej, w której uczestniczy domena lektynopodobna, oraz w drugiej tego typu interakcji, do której jednak przekazuje swe jednostki oligosacharydowe zdolne do interakcji z domeną lektynopodobną innej cząsteczki. Zatem selektyny z powierzchni jednych komórek mogą dostarczać oligosacharydowych ligandów dla selektyn znajdujących się na innych komórkach. Tego typu interakcje wykazano między selektyną-L a selektynami: -P i E, mianowicie selektyna-L neutrofilii dostarcza oligosacharydowego liganda dla domeny CRD endotelialnej selektyny-E lub -P [63]. Natomiast nie zostało dotychczas udokumentowane, czy domena CRD selektyny-L jednocześnie może wiązać oligosacharydy selektyn-P i -E lub innych ligandów.

Selektyny-L są stale obecne na powierzchni różnych leukocytów oraz ich formach prekursorowych, mianowicie na wszystkich limfocytach, granulocytach, monocytach i innych komórkach szpiku kostnego. Po stymulacji tych komórek cytokinami, np. GM-CSF lub TNF, następuje szybkie "gubienie" selektyn-L z powierzchni większości

komórek z wyjątkiem limfocytów [29, 46]. Stracie selektyn-L towarzyszy pojawianie się aktywnych form integryn grupy β_2 na powierzchni komórek stymulowanych. Selektyny-L mogą uczestniczyć w nakierowywaniu limfocytów do właściwych im miejsc diapedezy podczas recyrkulacji między krwią a limfą. Na powierzchni komórek wyspecjalizowanego śródbłonka HEV naczyń pozawłośniczkowych w obwodowych węzłach chłonnych zidentyfikowano siarczanowaną glikoproteinę, która "dźwiga" oligosacharydowy ligand dla domeny lektynowej selektyn-L [43]. Glikoproteina ta jest cząsteczką mucynopodobną, która zawiera dwie domeny bogate w serynę i/lub treoninę. Ta siarczanowana glikoproteina dostarczając oligosacharydowych ligandów selektynom-L może pośredniczyć w specyficznej rekrutacji limfocytów do obwodowych węzłów chłonnych. Wykazano również, że limfocytarne selektyny-L rozpoznają i wiążą oligosacharydowe determinanty sjałozylowanego antygeny Lewis(x) (Le(x)) [24, 63], które wcześniej opisano jako ligandy dla selektyn-E [66, 68]. Przepuszczalnie, specyficzność interakcji komórka-komórka, w których pośredniczą selektyny-L, może być współtworzona również przez inne własności strukturalne, zarówno węglowodanowych ligandów jak i ich białkowych nośników. Selektyny-L mogą pośredniczyć w nieciągłych interakcjach komórka-komórka mających miejsce podczas toczenia się (*rolling*) leukocytów po endotelium małych żyłek większości tkanek objętych procesem zapalnym [47].

Selektyny-E są błonowymi receptorami specyficznymi tylko dla komórek endotelialnych stymulowanych cytokinami zapalenia (np. IL-1, TNF- α) lub bakteryjnym lipopolisacharydem. Natomiast selektyny-E nie są ujawniane na powierzchni spoczynkowych komórek śródbłonkowych, leukocytów oraz innych komórek niehemopoetycznych. Przejściowe pojawianie się selektyn-E na powierzchni stymulowanych komórek osiąga maksymalną aktywność w 6 godz. po stymulacji, natomiast po 24 godz. komórki śródbłonkowe nie ujawniają już selektyn-E, nawet w obecności stymulatora. Pojawienie się selektyn-E na powierzchni błon wymaga stymulowanej *de novo* ich syntezy oraz śródkomórkowego transportu do powierzchni komórki [4, 6]. TGF- β i IL-4 zdolne są wstrzymać ujawnianie selektyn-E na ludzkich komórkach śródbłonkowych [26].

W surowicy zdrowych osobników wykazano obecność rozpuszczalnej, wolnej formy selektyny-E, która jest biologicznie aktywna [57]. Ponadto, występowanie rozpuszczalnych selektyn-E potwierdzono w warunkach *in vitro* hodowli komórek endotelialnych śródbłonkowych stymulowanych IL-1. Gubione selektyny z powierzchni błon komórek stymulowanych, choć mają nieco mniejszą cząsteczkę od natywnej, zawierają niezmienny C-końcowy region cytoplazmatyczny w porównaniu z natywną cząsteczką [57]. Natomiast komórki śródbłonkowe stymulowane cytokiną TNF internalizują w sposób konstytutywny powierzchniowe selektyny-E, co przyczynia się do obniżania ekspresji aktywności błonowej i pobudzenia klirensu ligandów selektyn-E z krążenia [79].

Endogennymi ligandami selektyn-E mogą być zarówno błonowe glikoproteiny [45], jak i glikolipidy, które "dźwigają" reszty kwasów sjałowych i poli-N-acetylo-laktozoaminoglikany, z co najmniej jedną resztą fukozylowanej- $\alpha 1$. 3-N-acetyloglukozoaminy [77]. Genetycznie uwarunkowana ekspresja specyficznej

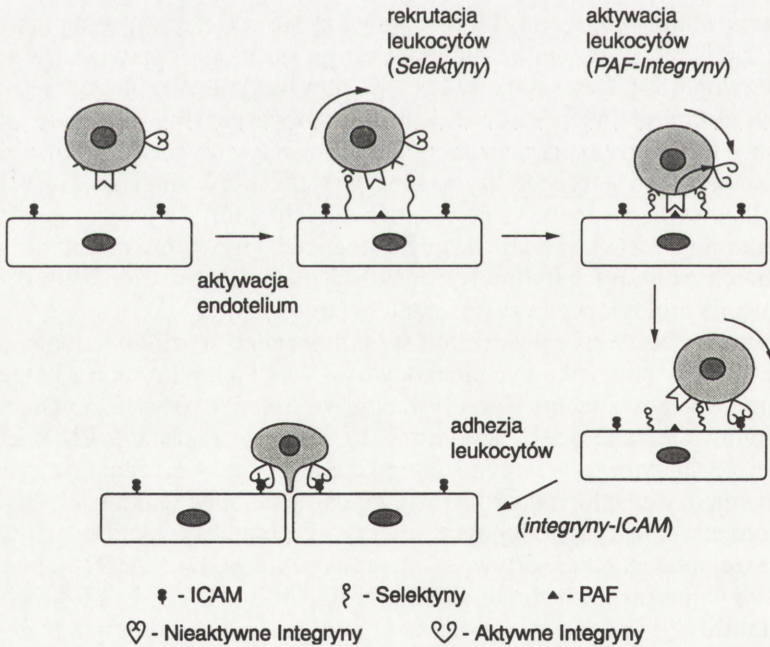
α 1.3-fukozylotransferazy w określonych komórkach determinuje syntezę węglowodanowych determinant na ligandach dla selektyn-E [51]. Selektyny-E rozpoznają ligandy zawierające determinanty antygenowe sjalo-Le(x) [2, 61], które są granulocyto-specyficznymi antygenami dźwiganymi przez mucynową leukosjalinę, N-glikany innych glikoprotein oraz glikolipidy błon granulocytów [86]. Jednak zdolność do rozpoznawania determinant antygenowych sjalo-Le(x) nie ogranicza się tylko do neutrofilii. Endotelialne selektyny-E mogą wiązać, w miejscach chronicznego zapalenia, również specyficzną subpopulację limfocytów, która nie ujawnia wyraźnej aktywności sjalo-Le(x). W tego typu lektynozależnych interakcjach endotelium-limfocyt pośredniczy nowy antygen CLA. Struktury węglowodanowe CLA zawierają determinanty antygenowe sjalo-Le(a) obok sjalo-L(x), choć te ostatnie nie są "manifestowane" na powierzchni limfocytów [2]. W warunkach fizjologicznych determinanta antygenowa sjalo-Le(a), raczej nie jest obecna na neutrofilach i limfocytach, może pojawiać się w stanach patologicznych, np. w dużych ilościach obecna jest na komórkach i w surowicy osobników z nowotworami żołądkowo-jelitowymi, trzustkowymi i gruczołów piersiowych [2, 86]. Wysoki poziom rozpuszczalnych ligandów sjalo-Le(a) może blokować lektynozależne interakcje leukocytów z endotelialną selektyną-E przyczyniając się do patologicznego obniżenia odpowiedzi immunologicznej.

Terminalne determinanty antygenowe sjalo-Le(x) powszechnie występują w różnych białkach [86]. Są wczesnymi markerami embrionalnymi, SSEA-1 (z ang. *stage specific embryonic antigen 1*), które pojawiają się na etapie preimplantacyjnym, następnie zanikają, po czym ze zmienną ekspresją mogą pojawiać się na innych etapach rozwoju [86]. Determinanty Le(x) są powszechnie obecne również w rozpuszczalnych glikoproteinach surowiczych (np. α -kwaśnej glikoproteinie, ceruloplazminie i in.), które wykazują jednak bardzo słabą aktywność antygenową Le(x). Do pełnej ekspresji tego antygeny wymagana jest obecność długiego łańcucha laktozoaminoglikanowego (nieobecnego w tych białkach), który "wyeksponuje" terminalne determinanty Le(x). Sądzi się, że obecność tego typu dodatkowych cech strukturalnych w oligosacharydowych ligandach ma istotne znaczenie w mechanizmie rozpoznawania biologicznego za pośrednictwem selektyn.

Selektyny-E obecne na powierzchni stymulowanego śródbłonka mogą pośredniczyć w aktywacji spoczynkowych leukocytów PMN i ich rekrutacji z krążenia [49]. Pojawienie się na powierzchni stymulowanego śródbłonka specyficznych przynęt dla PMN, mianowicie selektyn-E, wystarczy do wstępnej rekrutacji PMN z krążenia połączonej ze słabymi, nieciągłymi interakcjami podczas toczenia po śródbłonku. Interakcje między węglowodanowymi ligandami na spoczynkowych leukocytach PMN a domenami lektynopodobnymi selektyn-E pobudzają leukocyty, które ujawniają na swej powierzchni aktywne integryny α _M β ₂ CD11b/CD18. Integryny te pośredniczą w interakcjach z endotelialnymi ICAM-1 przyczyniając się do wzmocnienia i stabilizacji przylegania PMN do stymulowanego śródbłonka (rys. 3). Pojawienie się selektyn-E jest czasami jedynym i wystarczającym warunkiem stymulacji spoczynkowych leukocytów PMN i ujawnienia ich aktywnych integryn, które umożliwią nie tylko przyleganie, ale i pokonanie bariery śródbłonkowej [49]. Podobne

zdolności aktywacji integrynowych receptorów adhezyjnych $\alpha_M\beta_2$ dzielają różnorodne chemoatraktanty pośredniczące w zjawisku chemotaksji. Selektyny-E mogą pełnić funkcje chemoatraktantów zakotwiczonych w błonach zdolnych do sygnalizacji międzykomórkowej, ważnej w mechanizmie diapedyzy leukocytów PMN [49].

Selektyny-P są białkami błon wewnątrzkomórkowych ziarnistości alfa płytek [72] oraz ciałek Weibela-Palade komórek endotelialnych [7]. Po stymulacji komórek różnymi czynnikami, np. trombiną lub histaminą, selektyny-P są translokowane na powierzchnię błon plazmatycznych. Maksymalna ekspresja powierzchniowych selektyn-P następuje w ciągu 5–15 min, natomiast po 90 min od stymulacji wraca do poziomu wyjściowego sprzed stymulacji [73]. Powierzchniowe selektyny-P, podobnie do -E, mogą być internalizowane do wnętrza komórki i być może wykorzystywane są ponownie podczas stymulowanej redystrybucji receptorów [69]. Rozpuszczalne formy selektyn-P są obecne w osoczu zdrowych osobników [37]. Badania *in vitro* dowiodły, że rozpuszczalne selektyny-P hamują zależną od integryn (grupy β_2) adhezję neutrofilii stymulowanych TNF- α do spoczynkowego śródbłonna. Selektyny te, nie hamują natomiast adhezji spoczynkowych neutrofilii do śródbłonna zaktywowanego cytokiną TNF [27]. Selektyny-P, podobnie do selektyn-E i -L rozpoznają sjalozylowane laktozaminoglikanowe determinanty antygenowe sjalo-Le(a) i sjalo-Le(x) na różnych komórkach linii mieloblastycznej i niemieloblastycznej [24]. Selektyna-P wykazuje jednak wyższe powinowactwo wobec determinanty antygenowej



Rys. 3. Udział błonowych selektyn stymulowanych komórek śródbłonna w aktywacji i rekrutacji spoczynkowych leukocytów PMN z krążenia dla diapedyzy podczas wczesnej reakcji zapalnej (objaśnienia w tekście) [wg 33 za zgodą autora i wydawcy]

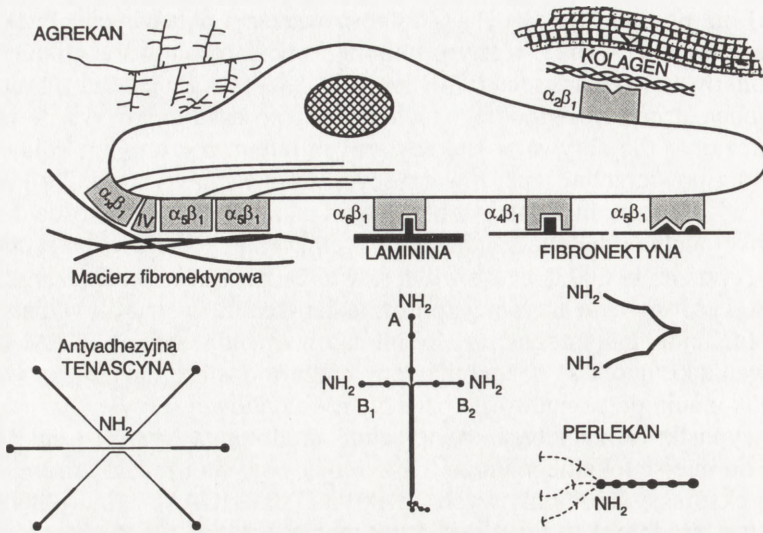
sjalo-Le(a) niż do sjalo-Le(x) [31]. Zdolność wiązania aktywnych płytek do tych determinant jest hamowana w różnym stopniu przez siarczanowane glikany.

Śródbłonkowa ekspresja selektyn-P może być wystarczająca dla rekrutacji spoczynkowych neutrofilów z krwioobiegu i ich toczenia po śródbłonku (rys. 3), jednak nie jest wystarczająca dla aktywacji leukocytarnych integrzyn grupy β_2 . Pojawieniu się selektyn-P na powierzchni musi towarzyszyć współekspresja czynnika PAF, który wchodząc w bezpośredni kontakt z błonowym receptorem na neutrofilach współindukuje funkcjonalną odpowiedź adhezyjną tych komórek [50]. Justakrywny sposób aktywacji (poprzez kontakt) neutrofilów sprawia, że następuje przełączenie integrzyn $\alpha_L\beta_2$ (LFA-1) z form o nieaktywnej konformacji przestrzennej na aktywną LFA-1**, zdolną do funkcjonalnej integracji z śródbłonkowymi adhezynami ICAM-2 (rys. 3). Oddziaływania komórek za pośrednictwem integrzyn dostarczają adhezji wystarczającej do pokonania przez neutrofile bariery śródbłonkowej. Przylegające leukocyty wysyłają wypustki do zagłębień powierzchni śródbłonka (rys. 3) i dalej realizują diapedezę do miejsc lokalnego urazu. Utrzymujący się stan zapalny może wzmacniać opóźnioną ekspresję śródbłonkowych selektyn-E oraz ICAM-1, które podtrzymują aktywny stan śródbłonka i przedłużają rekrutację, adhezję i diapedezę leukocytów (jak przedstawiono wyżej), dzięki kooperatywnemu współdziałaniu receptorów w kaskadzie adhezyjnej.

INTEGRYNY

Integryny są głównymi receptorami adhezyjnymi pośredniczącymi w oddziaływaniach komórek ze składnikami substancji międzykomórkowej (rys. 4). Integryny przytwierdzają komórki do wyspecjalizowanej formy ECM, jaką są błony podstawne [33, 34, 36]. Pozakomórkowe białka adhezyjne o budowie mozaikowej [85, 87, 88], np. fibronektyna, laminina, perlekan, agrekan, kolageny, wszystkie mogą być ligandami dla integrzyn z różnych podrodzin, z wyjątkiem β_2 (rys. 4). Glikoproteiny ECM, poza swą funkcją mechaniczno-strukturalną, mogą realizować funkcje komórkowe za pośrednictwem integrzyn. Ważnymi zadaniami komórkowymi białek ECM są między innymi: współdziałanie w przyczepianiu komórek (*cell attachment*) do błony podstawnej, w przyleganiu międzykomórkowym, w modulacji migracji i proliferacji komórek [33, 36, 85]. Czasami funkcje komórkowe białek ECM mogą być lokalnie modulowane przez pojawienie się białek antyadhezyjnych, np. SPARC (z ang. *secreted protein acidic and rich in cysteine*, inaczej osteonektyna) lub trombospondyny czy też tenascyny [65]. Ta ostatnia może być cząsteczką zarówno adhezyjną, jak i antyadhezyjną. Białka tego typu albo mogą być konkurencyjnymi ligandami dla integrzyn, albo też oddziałując z własnymi receptorami mogą zmieniać funkcje adhezyjne receptorów integrzynowych na tej samej komórce.

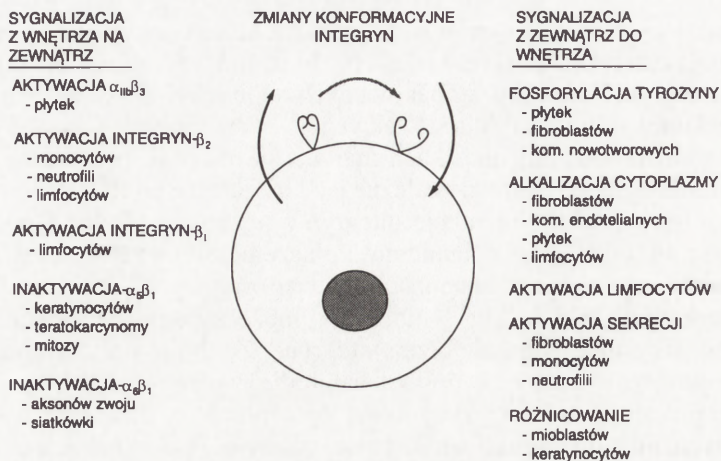
Integryny współuczestniczą powszechnie w adhezji typu komórka-komórka, co przedstawiono wcześniej prezentując receptory dla adhezyn oraz omawiając rolę selektyn-E w aktywacji leukocytarnych integrzyn. Integryny występują przypuszczalnie we wszystkich komórkach, lecz poszczególne typy komórek różnią się między sobą zestawem integrzynowym.



Rys. 4. Integrynowe pośrednictwo oddziaływań komórek z glikoproteinami substancji międzykomórkowej [82, zmodyfikowane]: komórki wykorzystują receptory integrynowe do interakcji ze specyficznymi sekwencjami aminokwasowymi rozpoznania adhezyjnego obecnymi na ligandach; poszczególne glikoproteiny ECM zwykle zawierają różnorodne takie sekwencje na odmiennych modułach, które mogą być rozpoznawane przez różne integryny, jak to przedstawiono dla fibronektyny; "rozpostarty" kształt wielopodjednostkowych, mozaikowych ligandów doskonale jest dopasowany do ich własności, mianowicie prezentacji wielu sekwencji rozpoznania adhezyjnego oraz realizacji wielokrotnych oddziaływań typu białko-białko z integrynami (choć nie tylko); interakcji glikoprotein z integrynami mogą towarzyszyć zmiany w organizacji elementów cytoszkieletu, np. wewnątrzkomórkowe składanie pęczków mikrofilamentów (cienkie linie w cytoplazmie); oddziaływania integryn z glikoproteinowymi ligandami ECM mają znaczenie w licznych procesach biologicznych, szczególnie w kontroli adhezji, migracji oraz morfologii komórki

Integryny są heterodimerami- $\alpha\beta$ mającymi charakterystyczny kształt utworzony przez globularną "głowę" wspartą na dwóch "szypułkach" przechodzących przez dwuwarstwę lipidową błon (rys. 1) [34, 62]. Rejony C-końcowe obu podjednostek znajdują się w cytoplazmie, natomiast N-końcowe poza komórką. Dotychczas poznano 14 odmiennych podjednostek- α i 8 podjednostek- β , które mogą teoretycznie utworzyć ponad 100 heterodimerów, jednak dotychczas opisano 21 integryn. Integryny klasyfikuje się w grupy na podstawie rodzaju podjednostki β , np. β_1 , β_2 , β_3 [34]. Niektóre podjednostki- α mają N-koniec cząsteczki dłuższy o dodatkową domenę-I, która wykazuje homologię do domen wiążących kolagen, domen czynnika von Willebranda i domen białek dopełniacza. Obecność dodatkowej domeny jest charakterystyczna przede wszystkim dla tych podjednostek- α , które wchodzi w interakcje z podjednostkami- β_2 i - β_1 . Większość podjednostek- α ma rejony pozakomórkowe składające się z dwóch fragmentów polipeptydowych połączonych wiązaniem disiarczkowym (rys. 1). Wynika to z postranslacyjnej modyfikacji polipeptydu- α . Podjednostki- β w swych pozakomórkowych szypułkach mają konserwatywne powtórzenia

bogate w reszty cysteinowe (*cystine-rich repeats*), które tworząc disiarczkowe wiązania utrwalają czterokrotne skręty polipeptydu charakterystyczne dla tego regionu wszystkich integrzyn. Natomiast w upakowanych rejonach N-końcowych obu podjednostek globularnej głowy znajdują się sekwencje tworzące pętle wiążące jony Ca^{++} . W rejonach tych, na obu podjednostkach znajdują się również specyficzne sekwencje rozpoznania adhezyjnego, zarówno zależne jak i niezależne od RGD, które odpowiedzialne są za bezpośrednie interakcje integrzyn z ligandami. Żadna z podjednostek indywidualnie nie oddziałuje z ligandem. Połączenie obu podjednostek integrzynowych w heterodimer wymaga obecności dwuwartościowych kationów. Rodzaj oddziałującego kationu, Ca^{++} , Mg^{++} lub Mn^{++} może modulować powinowactwo i specyficzność wiązania ligandów przez integrzynę. Zdolność do wiązania ligandów mają tylko integrzyny będące w postaci heterodimerycznej i tylko te o aktywnej konformacji przestrzennej. Integrzyny mogą występować w dwóch różnych stanach funkcjonalnych, mianowicie aktywnym i nieaktywnym. Funkcjonalnemu "przełączeniu" z jednej formy na drugą towarzyszy zmiana konformacji przestrzennej integrzyny (rys. 5) [34]. Na powierzchni niestymulowanych komórek integrzyny są nieczynne. W ciągu kilku minut po stymulacji komórek, np. agonistami lub innymi czynnikami, integrzyny zmieniają swą konformację przestrzenną i zdolne są przyłączyć ligand. Stan aktywności biologicznej integrzyn jest odwracalny. Ponadto, specyficzne ligandy oddziałując z integrzyną mogą również spowodować wiązanie, choć moc wiązania liganda znacznie wzrasta przy współstymulującym działaniu na komórkę innych czynników [34]. Wiązanie liganda z heterodimeryczną integrzyną może zatem zachodzić fazowo. Początkowo luźno związany z receptorem ligand tworzy z czasem stabilny kompleks integrzyna-ligand. Często, pojedyncze integrzyny mogą wiązać różne ligandy, tak jak i pojedynczy ligand może być rozpoznawany przez wiele różnych integrzyn [33, 34]. Nieznany jest mechanizm uczynniania integrzyn pod wpływem wewnątrzkomórkowych sygnałów. Wykazano, że ludzkie leukocyty PMN mogą stymulować własności wiążące swych integrzyn $\alpha_M\beta_2$ (CD11b/CD18) przez przemiatającą indukcję syntezy lipidowego czynnika modulującego integrzynę-1 (IMF-1, z ang. *integrin modulating factor-1*). IMF-1 działa jak allosteryczny aktywator leukocytarnych integrzyn [32]. Integrzyny nie mają aktywności kinaz tyrozynowych oraz brak jest jednoznacznych dowodów, że swoiście tworzą kompleksy z niereceptorowymi, cytoplazmatycznymi kinazami. Jednocześnie jednak zaobserwowano powiązanie między zmianami w fosforylacji niektórych integrzyn a ich aktywnością biologiczną. Przypuszcza się, że rejony cytoplazmatyczne obu podjednostek mogą pośredniczyć w regulacji aktywności biologicznej integrzyn. Być może, rejony cytoplazmatyczne niektórych integrzyn asocjują z białkami cytoplazmatycznymi m.in. zawierającymi domeny SH2 [81], które pośredniczą w wewnątrzkomórkowych kontaktach z systemem cytoszkieletem. Rejony cytoplazmatyczne wszystkich podjednostek- β , z wyjątkiem β_4 , są bardzo podobne, natomiast rejony cytoplazmatyczne podjednostek- α przedstawiają niską homologię. Cytoplazmatyczne rejony podjednostek- α mogą być odpowiedzialne za różnicowanie oddziaływań z elementami cytoszkieletu komórki oraz za odmienne rozmieszczenie integrzyn w obrębie powierzchni błony komórkowej. Obecność rejonów cytoplazmatycznych i przezbłonowych nie jest wymagana podczas

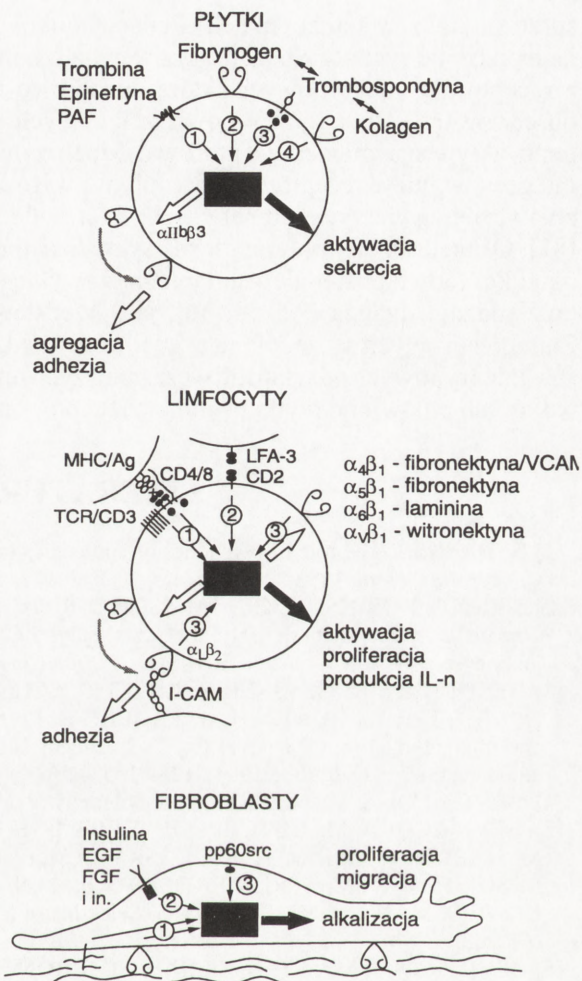


Rys. 5. Biologiczna sygnalizacja przez receptory integrynowe [wg 34 za zgodą autora i wydawcy]: integryny występują w co najmniej dwóch przeciwstawnych konformacjach przestrzennych, mianowicie: nieaktywnej (symbol zamknięty) i aktywnej (symbol otwarty); jedynie ten ostatni stan integryny gwarantuje wiązanie większości swoistych ligandów; zmiany konformacyjne integryn umożliwiają wysyłanie sygnalizacji z wnętrza na zewnątrz komórki oraz odbieranie sygnałów z zewnątrz komórki i transdukcji ich do śródkomórkowej sygnalizacji

tworzenia form heterodimerycznych i do ujawnienia aktywnej konformacji przestrzennej. Formy "kadłubowe" receptorów integrynowych, które pozbawione są rejonów przezłonowych i cytoplazmatycznych, tworzą heterodimery $\alpha\beta$ i ujawniają ciągłą aktywność biologiczną bez możliwości przełączenia do stanu nieaktywnego [34]. Podobnie, różne zmiany modyfikacyjne w rejonie cytoplazmatycznym podjednostek α wraz z jego delecją, mogą również prowadzić do ujawnienia ciągłej aktywności przez integrynę bez możliwości przełączenia do stanu nieaktywnego. Stało się to podstawą przypuszczenia, że rejon cytoplazmatyczny podjednostek α mogą kontrolować głównie nieaktywny stan integryn.

Integryny są elementami sygnalizacji międzykomórkowej [33, 35]. Sygnalizacja za pośrednictwem integryn może mieć dwie formy. Mianowicie jedna, sygnalizacji wychodzącej z wnętrza komórki na zewnątrz (*INSIDE to OUT*) wynikającej z regulacji powinowactwa receptora integrynowego poprzez zmiany jego konformacji przestrzennej (rys. 5). Druga forma to sygnalizacja do wnętrza komórki informacji napływających z zewnątrz (*OUTSIDE to IN*) (rys. 5). Integryny po przyłączeniu liganda wysyłają wewnątrzkomórkową sygnalizację, która zmienia fosforylację białek komórkowych, wewnątrzkomórkowe stężenie jonów Ca^{++} , cytoplazmatyczne pH, przemianę inozytolową i ostatecznie czynności komórki w zakresie adhezji lub agregacji, sekrecji i proliferacji (rys. 5, 6). Obserwowane zmiany we wnętrzu komórki mogą czasami być podobne do tych, które indukowane są przez czynniki wzrostowe lub onkogeny. Zmiany aktywności receptorów integrynowych obserwowane są głównie w komórkach stymulowanych różnymi czynnikami, które jednocześnie oddziałują z innymi receptorami błonowymi m.in. zawierającymi kinazy tyrozynowe,

Rys. 6. Wytwarzanie i odbieranie sygnałów przez integryny w trzech różnych przykładowych komórkach [wg 34 za zgodą autora i wydawcy]: czarna cienka strzałką zaznaczono nadawanie sygnałów przez integryny lub inne receptory do śródkomórkowego systemu wtórnych informatorów (czarny prostokąt); strzałką o czarnych konturach zaznaczono aktywację specyficznych integryn wzmagających adhezję komórek; dużą strzałką czarną zaznaczono inne odpowiedzi komórki, np. sekrecja, proliferacja, zmiana morfologii; **płytki**: integryna $\alpha_{IIb}\beta_3$ wiąże fibrynogen, a integryna $\alpha_2\beta_1$ wiąże kolagen, oba ligandy mogą zachowywać się jak agoniści w transdukcji sygnałów do systemu wtórnych informatorów (strzałki 2 i 4); sygnały te zbiegają się z śródkomórkową sygnalizacją napływającą z innych receptorów (strzałki 1 i 3), które współdziałają z integrynami; ponadto oba ligandy mogą oddziaływać z trombospondyną, której receptor GPIV/CD36 ma białkową kinazę tyrozynową zasocjowaną z domeną cytoplazmatyczną (czarne kropki); skupianie (*clustering*) powierzchniowych receptorów jest konieczne dla fosforylacji tyrozyn, przyspoczalnie ułatwia interakcje kinaz z substratami; sugeruje się, że konsekwencją wszystkich sygnałów jest aktywacja tyrozyn kinaz $\alpha_{IIb}\beta_3$ prowadząca do mocnej adhezji komórek; **limfocyty**: poszczególne integryny limfocytarne mogą działać współstymulująco (dla sygnałów 3) [wraz z kompleksem receptorowym komórek T (TCR)/CD3 CD4/CD8 asocjującym z kinazami (czarne kropki)] na aktywację limfocytów T; konsekwencją tego jest aktywacja integryn, które gwarantują mocną adhezję do innych komórek (strzałka o czarnych konturach) lub do białek substancji międzykomórkowej (strzałka o czarnych konturach); aktywacji limfocytów towarzyszą również inne efekty komórkowe (duża strzałka czarna); **fibroblasty**: glikoproteinowe ligandy substancji międzykomórkowej oddziałując z integrynami mogą stymulować fosforylację reszt tyrozynowych wielu substratów we wnętrzu komórki; niektóre z nich swe funkcje komórkowe mogą również realizować z pośrednictwem receptorów czynników wzrostowych (druga cienka strzałka 1) lub niereceptorowych kinaz białkowych typu pp60src (cienka strzałka 3); te ostatnie ujawniają szczególnie wysoką aktywność w komórkach transformowanych; zbieganie się bądź współdziałanie różnych sygnałów odpowiedzialne jest za biologiczną odpowiedź komórki w formie np. proliferacji; wzrost zależny od zakotwiczenia wymaga współdziałania sygnałów napływających z adhe-



zyjnych integryn dla białek ECM utrzymujących przyleganie (cienka strzałka 1) z sygnalizacją napływającą z receptorów dla rozpuszczalnych czynników wzrostowych (cienka strzałka 2); natomiast zmiana prowadząca do wzrostu niezależnego od zakotwiczenia, np. w komórkach transformowanych wymaga sygnalizacji za pośrednictwem kinaz src (cienka strzałka 3); wiele domen różnych glikoprotein ECM może skupiać powierzchniowe receptory przyczyniając się do współzbiegania specyficznych "wiązek" sygnałów śródkomórkowych, których rodzaj będzie odpowiadał za ostateczną odpowiedź biologiczną komórki

sprzężonymi z systemem białek G lub czynników wzrostowych (rys. 6) [25]. Wysyłane przez nie sygnały zbiegają się z wewnątrzkomórkową sygnalizacją napływającą z receptorów integrynowych, którą dodatkowo mogą wzmacniać (rys. 6). Często obserwowane jest skupianie powierzchniowych receptorów, być może towarzyszy temu aktywacja międzyreceptorowa. Możliwymi łącznikami między receptorami integrynowymi a receptorami czynników wzrostowych mogą być białka cytoplazmatyczne zawierające domeny SH2, które oddziałują z elementami cytoszkieletu [81]. Ostateczne efekty biologiczne sygnalizacji do wnętrza oraz z wnętrza na zewnątrz komórki z pośrednictwem integryn zwykle są różne, zależnie od typu komórki oraz rodzaju liganda [33, 34, 36], jak przedstawiono przykładowo na rysunku 6. Zainteresowanych szczegółami sygnalizacji międzykomórkowej z udziałem receptorów integrynowych odsyłam do wcześniejszych opracowań polskojęzycznych [8, 40], w których omówiono płytkopochodne receptory integrynowe.

LITERATURA

- [1] BEHRENS J. The role of cell adhesion molecules in cancer invasion and metastasis. *Breast Cancer Res Treat* 1993; **24**: 175–184.
- [2] BERG EL, ROBINSON MK, MANSSON O, BUTCHER EC, MAGNANI JL. A carbohydrate domain common to both sialyl Le^a and sialyl Le^x is recognized by the endothelial cell leukocyte adhesion molecule ELAM-1. *J Biol Chem* 1991; **288**: 14869–14872.
- [3] BERNDORFF D, GESSNER R, KREFT B, SCHNOY N, LAJOUSPETTER AM, LOCH N, REUTTER W, HORTSCH M, TAUBER R. Liver-intestine cadherin: molecular cloning and characterization of a novel Ca⁺⁺-dependent cell adhesion molecule expressed in liver and intestine. *J Cell Biol* 1994; **123**: 1353–1369.
- [4] BEVILACQUA M, NELSON PM. Selectins. *J Clin Inves* 1993; **91**: 379–387.
- [5] BEVILACQUA M, BUTCHER E, FURIE B, FURIE B, GALLATIN M, GIMBRONE M, HARIAN J, KISHIMOTO K, LASKY L, McEVER R, PAULSON J, ROSEN S, SEED B, SIEGELMAN M, SPRINGER T, STOOLMAN L, TEDDER T, VARKI A, WAGNER D, WEISSMAN I, ZIMMERMAN G. Selectins: a family of adhesion receptors. *Cell* 1991; **67**: 233.
- [6] BEVILACQUA MP, STENGELIN S, GIMBRONE MA Jr, SEED B. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 1989; **243**: 1160–1165.
- [7] BONFANTI R, FURIE BC, FURIE B, WAGNER DD. PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood* 1989; **73**: 1109–1112.
- [8] CIERNIEWSKI CS. Budowa i funkcja receptorów integrynowych na przykładzie płytkowego receptora fibrynogenu. *Post Biochem* 1994; **40**: 45–54.
- [9] CUNNINGHAM BA, HEMPERLY JJ, MURRAY BA, FREDIGER EA, BRACKENBURY R, EDELMAN GM. Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* 1987; **236**: 799–806.
- [10] CYBULSKY MI, FRIES JW, WILLIAMS AJ, SULTAN P, DAVIS VM, GIMBRONE MA JR, COLLINS T. Alternative splicing of human VCAM-1 in activated vascular endothelium. *Am J Pathol* 1991; **138**: 815–820.
- [11] CYBULSKY MI, GIMBRONE MA Jr, Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991; **251**: 788–791.
- [12] De FOUGEROLLES AR, KLINKSTEIN LB, SPRINGER TA. Cloning and expression of intercellular adhesion molecule 3 reveals strong homology to other immunoglobulin family

- counter-receptors for lymphocyte function-associated antigen 1. *J Exp Med* 1993; **177**: 1187–1192.
- [13] De FOUGEROLLES AR, SPRINGER TA. Intercellular adhesion molecule 3, a third adhesion counter-receptor for lymphocyte function-associated molecule-1 on resting lymphocytes. *J Exp Med* 1992; **175**: 185–190.
- [14] DeLISSER HM, CHILKOTOWSKY J, YAN HC, DAISE ML, BUCK CA, ALBELDA SM. Deletion in the cytoplasmic domain of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM1, CD31) result in changes in ligand binding properties. *J Cell Biol* 1994; **124**: 195–203.
- [15] DEL POZO MA, CAMPANERO MR, SANCHEZ-MATEOS P, ARROYO AG, PULIDO R, MUNOZ C, HENANDEZ-CASELLES T, APARICIO P, SANCHEZ-MADRID F. Role of ICAM-3 in intercellular adhesion and activation of T lymphocytes. *Cell Adhesion Commun* 1994; **2**: 211–218.
- [16] DETRICK RJ, DICKEY D, KINTNER CR. The effects of N-cadherin misexpression on morphogenesis in *Xenopus* embryos. *Neuron* 1990; **4**: 493–506.
- [17] DIAMOND MS, STAUNTON DE, MARLIN S, TIMOTHY A, SPRINGER TA. Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell* 1991; **65**: 961–971.
- [18] DRICKAMER K. Two distinct classes of carbohydrate recognition domains in animal lectins. *J Biol Chem* 1988; **263**: 9557–9560.
- [19] DRICKAMER K. Engineering galactose-binding activity into a C-type mannose-binding protein. *Nature* 1992; **360**: 183–186.
- [20] DURIEU-TRAUTMANN O, CHAVEROT N, CAZAUBON S, STROSBURG AD, COURAUD PO. Intercellular adhesion molecule 1 activation induces tyrosine phosphorylation of the cytoskeleton-associated protein in brain microvessel endothelial cells. *J Biol Chem* 1994; **269**: 12536–12540.
- [21] ELICES MJ, OSBORN L, TAKADA Y, CROUSE C, LUCHOWSKYJ S, HEMLER ME, LOBB RR. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* 1990; **60**: 577–584.
- [22] FANNON AM, SHERMAN DL, ILYINA-GRAGEROVA G, BROPHY PJ, FRIEDRICH JR VL, COLMAN DR. Novel E-cadherin-mediated adhesion in peripheral nerve: Schwann cell architecture is stabilized by autotypic adherens junctions. *J Cell Biol* 1995; **129**: 189–202.
- [23] FAWCETT J, HOLNESS CLL, NEEDHAM LA, TURLEY LH, GATTER KC, MASON DY, SIMMONS DL. Molecular cloning of ICAM-3, a third ligand for LFA-1, constitutively expressed on resting leukocytes. *Nature* 1992; **360**: 481–484.
- [24] FOXALL C, WATSON SR, DOWBENKO D, FENNIE C, LASKY LA, KISO M, HASEGAWA A, ASA D, BRANDLEY BK. The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis oligosaccharide. *J Cell Biol* 1992; **117**: 895–902.
- [25] FRIXEN UH, BEHRENS J, SACHS M, EBERLE G, VOSS B, WARDA A, LOCHNER D, BIRCHMEIER W. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 1991; **113**: 173–185.
- [26] GAMBLE JR, KHEW-GOODALL Y, VADAS MA. Transforming growth factor- β inhibits E-selectin expression on human endothelial cells. *J Immunol* 1993; **150**: 4494–4503.
- [27] GAMBLE JR, SKINNER MP, BERNDT MC, VADAS MA. Prevention of activated neutrophil adhesion to endothelium by soluble adhesion protein GMP-140. *Science* 1990; **249**: 414–417.
- [28] GEIGER B, AYALON O. Cadherins. *Annu Rev Cell Biol* 1992; **8**: 307–332.
- [29] GRIFFIN JD, SPERTINI O, ERNST TJ, BELVIN MP, LEVINE HB, KANAKURA Y, TEDDER TF. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines regulate surface expression of the leukocyte adhesion molecule-1 on human neutrophils, monocytes and their precursors. *J Immunol* 1990; **145**: 576–584.

- [30] GRUNWALD GB. The structural and functional analysis of cadherin calcium-dependent cell adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* 1993; **5**: 797–805.
- [31] HANDA K, NUDELMAN ED, STROUD MR, SHIOZAWA T, HAKOMORI S. Selectin GMP-140 (CD62: PADGEM) binds to sialosyl-Le/a/ and sialosyl-Le/x/, and sulfated glycans modulate this binding. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **181**: 1223–1230.
- [32] HERMANOWSKI-VOSATKA A, VAN STRIJP JAG, SWIGGARD WJ, WRIGHT SD. Integrin modulating factor-1: a lipid that alters the function of leukocyte integrins. *Cell* 1992; **68**: 341–352.
- [33] HYNES RO, LANDER AD. Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cell and axons. *Cell* 1992; **68**: 303–322.
- [34] HYNES RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; **69**: 11–25.
- [35] INUZUKA H, MIYATANI S, TAKEICHI M. R-cadherin: a novel Ca^{++} -dependent cell-cell adhesion molecule expressed in the retina. *Neuron* 1991; **7**: 69–79.
- [36] JULIANO RL, HASKILL S. Signal transduction from the extracellular matrix. *J Cell Biol* 1993; **120**: 577–585.
- [37] KATAYAMA M, HANDA M, AMBO H, ARAKI Y, HIRAI S, KATO I, KAWAI Y, WATANABE K. Monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for human GMP-140/P-selectin. *J Immunol Meths* 1992; **153**: 41–48.
- [38] KEMLER R. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet* 1993; **9**: 317–321.
- [39] KINTNER C. Regulation of embryonic cell adhesion by the cadherin cytoplasmic domain. *Cell* 1992; **69**: 225–236.
- [40] KRALISZ U. Funkcja białkowych kinaz tyrozynowych podczas aktywacji płytek krwi. *Post Biochem* 1994; **40**: 40–44.
- [41] LAMPUGNANI MG, RESNATI M, RAITERI M, PIGOTT R, PISACANE A, HOUEEN G, RUCO LP, DEJANA E. A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol* 1992; **118**: 1511–1522.
- [42] LAMPUGNANI MG, CORADA M, CAVEDA L, BREVIARIO F, AYALON O, GEIGER B, DEJANA E. The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: differential association of plakoglobin, β -catenin, and α -catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin). *J Cell Biol* 1995; **129**: 203–217.
- [43] LASKY LA, SINGER MS, DOWBENKOD, IMAI Y, HENZEL WJ, GRIMLEY C, FENNIE C, GILLETT N, WATSON SR, ROSEN SD. An endothelial ligand for L-selectin is a novel mucin-like molecule. *Cell* 1992; **69**: 927–938.
- [44] LEACH L, CLARK P, LAMPUGANI MG, ARROYO AG, DEJANA E, FIRTH JA. Immunoelectron characterization of the inter-endothelial junctions of human term placenta. *J Cell Sci* 1993; **104**: 1073–1081.
- [45] LEVINOVITZ A, MUHLHOFF J, ISENMANN S, VESTWEBER D. Identification of a glycoprotein ligand for E-selectin on mouse myeloid cells. *J Cell Biol* 1993; **121**: 449–459.
- [46] LEY K. Molecular mechanisms of leukocyte rolling and adhesion to microvascular endothelium. *Eur Heart J* 1993; **14** /Supl/: 68–73.
- [47] LEY K, GAEHTGENS P, FENNIE C, SINGER MS, LASKY LA, ROSEN SD. Lectin-like cell adhesion molecule 1 mediates leukocyte rolling in mesenteric venules *in vivo*. *Blood* 1991; **77**: 2553–2555.
- [48] LIAW CW, CANNON C, POWER MD, KIBONETA PK, RUBIN LL. Identification and cloning of two species of cadherins in bovine endothelial cells. *EMBO J* 1990; **9**: 2701–2708.
- [49] LO SK, LEE S, RAMOS RA, LOBB R, ROSA M, CHI-ROSSO G, WRIGHT SD. Endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 stimulates the adhesive activity of leukocyte integrin CR3 (CD11b/CD18, Mac-1, alpha m beta 2) on human neutrophils. *J Exp Med* 1991; **173**: 1493–1500.

- [50] LORANT DE, PATEL KD, McINTYRE TM, McEVER RP, PRESCOTT SM, ZIMMERMAN GA. Coexpression of GMP-140 and PAF by endothelium stimulated by histamine or thrombin: A juxtacrine system for adhesion and activation of neutrophils. *J Cell Biol* 1991; **115**: 223–224.
- [51] LOWE JB, STOOLMAN LM, NAIR RP, LARSEN RD, BERHEND TL, MARKS RM. ELAM-1 dependent cell adhesion to vascular endothelium determined by a transfected human fucosyltransferase cDNA. *Cell* 1990; **63**: 475–484.
- [52] MARCHALONIS JJ, HOHMAN VS, KAYMAZ H, SCHLUTER SF, EDMUNDSON AB. Cell surface recognition and the immunoglobulin superfamily. *Ann N Y Acad Sci* 1994; **15**: 20–23.
- [53] McCREA PD, GUMBINER BM. Purification of a 92 kD cytoplasmic protein tightly associated with the cell-cell adhesion molecule E-cadherin (uvomorulin). *J Biol Chem* 1991; **266**: 4514–4520.
- [54] McNEILL H, OZAWA M, KEMLER R, NELSON WJ. Novel function of the cell adhesion molecule uvomorulin as an inducer of cell surface polarity. *Cell* 1990; **62**: 309–316.
- [55] NÄTHKE IS, HINC L, SWEDLOW JR, PAKKOFF J, NELSON WJ. Defining interactions and distributions of cadherin and catenin complexes in polarized epithelial cells. *J Cell Biol* 1994; **125**: 1341–1352.
- [56] HEWMAN PJ, BERNDT MC, GORSKI J, WHITE GC, LYMAN S, PADDOCK C, MULLER WA. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* 1990; **247**: 1219–1222.
- [57] NEWMAN W, BEALL LD, CARSON CW, HUNDER GG, GRABEN N, RANHAWA ZI, GOPAL TV, WIENERKRONISH J, MATTHAY MA. Soluble E-selectin is found in supernatants of activated endothelial cells and is elevated in the serum of patients with septic shock. *J Immunol* 1993; **150**: 644–654.
- [58] NORTAMO P, RUI L, RENKONEN R, TIMONEN T, PRIETO J, PATARROYO M, GAHMBERG CG. The expression of human intercellular adhesion molecule-2 is refractory to inflammatory cytokines. *Eur J Immunol* 1991; **21**: 2629–2632.
- [59] NOSE A, TSUJI K, TAKEICHI M. Localization of specificity determining sites in cadherin cell adhesion molecules. *Cell* 1990; **61**: 147–155.
- [60] OTTO T, BIRCHMEIER W, SCHMIDT U, HINKE A, SCHIPPER J, RUBBEN H, RAZ A. Inverse relation of E-cadherin and autocrine motility factor receptor expression as a prognostic factor in patients with bladder carcinomas. *Cancer Res* 1994; **54**: 3120–3123.
- [61] PHILLIPS ML, NUDELMAN E, GAETA FC, PEREZ M, SINGHAL AK, HAKOMORI S, PAULSON JC. ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of carbohydrate ligand, sialyl-Lex. *Science* 1990; **250**: 1130–1132.
- [62] PHILLIPS DR, CHARO IF, SCARBOROUGH RM. GPIIb-IIIa: the responsive integrin. *Cell* 1991; **65**: 359–362.
- [63] PICKER LJ, WARNOCK RA, BURNS AR, DOLERSCHUK CM, BERG EL, BUTCHER EC. The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140. *Cell* 1991; **66**: 921–933.
- [64] RANSCHT B, BROONER-FRASER M. T-cadherin expression alternates with migrating neural crest cells in the trunk of the avian embryo. *Development* 1991; **111**: 15–22.
- [65] SAGE EH, BORNSTEIN P. Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. *J Biol Chem* 1991; **266**: 14831–14834.
- [66] SALOMON D, AYALON O, PATEL-KING R, HYNES RO, GEIGER B. Extrajunctional distribution of N-cadherin in cultured human endothelial cells. *J Cell Sci* 1992; **102**: 1–11.
- [67] SHORE EM, NELSON WJ. Biosynthesis of the cell adhesion molecule uvomorulin (E-cadherin) in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J Biol Chem* 1991; **266**: 19672–19680.
- [68] SPRINGER TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990; **346**: 425–434.
- [69] STAD RK, BUURMAN WA. Current views on structure and function of endothelial adhesion molecules. *Cell Adhesion Commun* 1994; **2**: 261–268.

- [70] STAUNTON DE, DUSTIN ML, ERICKSON HP, SPRINGER TA. The arrangement of the immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus. *Cell* 1990; **61**: 243–254.
- [71] STAUNTON DE, DUSTIN ML, SPRINGER TA. Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* 1989; **339**: 361–364.
- [72] STENBERG PE, McEVER RP, SHUMAN MA, JACQUES YV, BAINTON DF. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol* 1985; **101**: 880–886.
- [73] SUGAMA Y, TIRUPATHI CH, JANAKIDEVI K, ANDERSEN TT, FENTON JW, MALIK AB. Thrombin-induced expression of endothelial P-selectin and intercellular adhesion molecule-1: a mechanism for stabilizing neutrophil adhesion. *J Cell Biol* 1992; **119**: 935–944.
- [74] SUZUKI S, SANO K, TANIHARA H. Diversity of the cadherin family: evidence for eight new cadherins in nervous tissue. *Cell Regul* 1991; **2**: 261–270.
- [75] TAKEICHI M. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem* 1990; **59**: 237–252.
- [76] TAKEICHI M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenic regulator. *Science* 1991; **251**: 1451–1455.
- [77] TIEMEYER M, SWIEDLER SJ, ISHIHARA M, MORELAND M, SCHWEINGRUBER H, HIRTZER P, BRANDLEY BK. Carbohydrate ligands for endothelial-leukocyte adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 1138–1142.
- [78] TSUKITA S, TSUKITA S, NAGAFUCHI A, YONEMURA S. Molecular linkage between cadherins and actin filaments in cell-cell adherens junctions. *Curr Opin Cell Biol* 1991; **4**: 834–839.
- [79] Von ASMUTH EJ, SMEETS EF, GINSEL LA, ONDERWATER JJ, LEEUWENBERG JF. Evidence for endocytosis of E-selectin in human endothelial cells. *Eur J Immunol* 1992; **22**: 2519–2526.
- [80] WILLIAMS AF, BARCLAY AN. The immunoglobulin superfamily: domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol* 1988; **6**: 381–405.
- [81] WILLIAMS KP, SHOELSON SE. Cooperative self-assembly of SH2 domain fragments restores phosphopeptide binding. *Biochemistry* 1993; **32**: 11270–11284.
- [82] YAMADA KM. Adhesive recognition sequences. *J Biol Chem* 1991; **266**: 12809–12812.
- [83] YOSHIHARA Y, OKA S, NEMOTO Y, WATANABE Y, NAGATA S, KAGAMIYAMA H, MORI K. An ICAM-related neuronal glycoprotein, telencephalin, with brain segment-specific expression. *Neuron* 1994; **12**: 541–553.
- [84] ZIMMERMAN GA, PRESCOTT SM, McINTYRE TM. Endothelial cell interactions with granulocytes – tethering and signaling molecules. *Immunol Today* 1991; **13**: 93–100.
- [85] ŻAK I. Białka mozaikowe. *Post Biochem* 1995; **41**: 120–130.
- [86] ŻAK I. Glikoproteiny ssaków. [w] Jeżewska M (red. serii) Monografia Biochemiczna 35, Warszawa: PWN 1990; 1–113.
- [87] ŻAK I. Proteoglikany: struktura i biosynteza. *Post Biol Kom* 1995; **22**: 317–341.
- [88] ŻAK I, DRÓŹDŹ M. Biologiczne funkcje proteoglikanów. *Czynniki Rzyzka* 1995; **2**: 12–20.

Otrzymano: 25.09.1995 r.

Przyjęto: 12.12.1995 r.

Adres autora: Katedra Biochemii i Chemii, Śl. Akademia Medyczna
40-752 Katowice, ul. Medyków 18

FUNKCJE BIOLOGICZNE RECEPTORA ELASTYNOWEGO*

BIOLOGICAL FUNCTIONS OF THE ELASTIN RECEPTOR

Aleksander HINEK i Alina HINEK

Division of Cardiovascular Research, Hospital for Sick Children,
University of Toronto, Kanada.

Streszczenie. Liczne rodzaje komórek tkanki łącznej: leukocyty, miocyty naczyniowe i pewne komórki nowotworowe produkują białko o masie cząsteczkowej 67 kD, odpowiedzialne za wiązanie ich do elastyny, lamininy i kolagenu typu IV. Białko to, będące odmianą nieaktywnej enzymatycznie β -galaktozydazy ma również domenę lektynową odpowiedzialną za wiązanie galaktocukrów. Przyłączenie reszt galaktocukrowych do domeny lektynowej tak zmienia trzeciorzędową strukturę cząsteczki receptora, że domena zdolna do wiązania białek macierzy zostaje zamaskowana, a samo białko uwolnione z powierzchni komórki. Niniejszy artykuł przedstawia znaczenie pojedynczego białka receptorowego, które reaguje z kilkoma białkami substancji międzykomórkowej i którego czynnościowa ekspresja może być regulowana przez obecność związków zawierających reszty galaktocukrowe. Artykuł podkreśla rolę 67 kD receptora w powstawaniu włókien sprężystych oraz w procesach chemotaksji i migracji komórkowej zachodzących w prawidłowym rozwoju i w procesach patologicznych, takich jak: reakcje zapalne, miażdżyca, rozsiew nowotworowy.

Słowa kluczowe: receptor elastynowy, włókna sprężyste, galaktocukry, interleukina 1, migracja komórkowa, chemotaksja.

Summary. Numerous cell types, including fibroblasts, vascular smooth muscle cells, chondroblasts, monocytes, neutrophils, and several tumor cells express the 67 kD galactoselectin, homologous to the alternatively spliced variant of β -galactosidase. The 67 kD protein resides on the cell surfaces and is capable of interacting with elastin, laminin and collagen type IV. This peripheral membrane protein binds its matrix ligands but only in the absence of galactosugars, whereas binding of galactosugar-containing moieties to its lectin site changes its molecular folding which causes discharge of the ligand and release of the receptor from the cell surface. This review addresses the functional significance of the single receptor that interacts with multiple matrix proteins and can be shed from cell surfaces by galactosugars.

*Praca finansowana przez Heart and Stroke Foundation of Canada.

We emphasize the role of the 67-kD protein in divergent cellular processes, such as cell-matrix attachment, elastic fiber assembly, cellular chemotaxis, and active migration through the vascular walls.

Key words: elastin receptor, elastic fibers, matrix proteins, galactosugars, interleukin 1, cell migration, chemotaxis.

WSTĘP

Praktycznie wszystkie typy komórek na pewnych etapach swojego rozwoju pozostają w kontakcie z substancją międzykomórkową (*extracellular matrix* – ECM). Zarówno sporadyczne, jak i stałe kontakty między powierzchnią komórkową a elementami ECM mogą decydować o przesyłaniu sygnałów do wnętrza komórek i wywoływać będzie to natychmiastowe zmiany czynnościowe lub długotrwałe zmiany fenotypowe mające wpływ na embriogenetyczne formowanie tkanek, gojenie ran, procesy zapalne, formowanie zmian miażdżycowych i rozsiew nowotworowy [1,22]. Dotychczas zidentyfikowano szereg powierzchniowych białek wiążących i receptorów komórkowych, które mogą oddziaływać z licznymi składnikami ECM i w efekcie końcowym pośredniczyć w wywoływaniu szerokiej gamy odpowiedzi komórkowych. Ze względu na podobieństwo strukturalne lub czynnościowe większość receptorów zaklasyfikowano do kilku podstawowych grup, takich jak: integryny, immunoglobuliny, selektyny i kadheryny [1–4,20]. Receptory te zostały w większości dobrze scharakteryzowane, łącznie z określeniem pierwszo- i drugorzędowej budowy ich miejsc wiążących określone domeny elementów ECM [22,24,38]. Wykazano, że te same receptory mogą oddziaływać z kilkoma różnymi elementami ECM, a ten sam składnik substancji międzykomórkowej może wiązać się do różnych receptorów wywołując różne efekty biologiczne [28,38,47,48]. Poznanie zawitych zależności pomiędzy wiązaniem elementów ECM do receptorów komórkowych jest jednym z głównych tematów w aktualnych badaniach nad biologią komórek. Ustalono, że istotny czynnościowo kontakt wybranego receptora z określoną cząsteczką ECM może mieć miejsce tylko wtedy, gdy ekspresji tego receptora na powierzchni określonej komórki towarzyszy ekspozycja odpowiedniego fragmentu białka ECM (domeny), posiadającego zdolność reagowania z tym receptorem. Trzeba sobie jednak zdawać sprawę z faktu, że w nie uszkodzonej i prawidłowo spolimeryzowanej substancji międzykomórkowej, większość domen zdolnych do przyłączenia się do receptorów komórkowych pozostaje ukryta w pofałdowaniach polimerów białkowo-cukrowcowych. Domeny te mogły być ujawnione w czasie częściowej degradacji enzymatycznej elementów ECM lub nagromadzenia się ich niespolimeryzowanych prekursorów, np. prokolagenu czy tropoelastyny. Co więcej enzymy hydrolityczne, rozpuszczalne produkty rozpadu elementów ECM i inne czynniki obecne w przestrzeni okołokomórkowej (kationy, czynniki redukcyjne, zakotwiczone w błonie proteoglikany) mogą odpowiednio aktywować, inaktywować lub usuwać cząsteczkę receptorów z powierzchni komórek [20,21,28,47].

BIAŁKO WIĄŻĄCE ELASTYNĘ, LAMININĘ I KOLAGEN IV

Białko wiążące elastynę – EBP (*Elastin Binding Protein*) wiąże również laminę i kolagen IV. Elastyna stanowi główny element strukturalny dojrzałych włókien i błon sprężystych obecnych w tkance łącznej, a szczególnie licznych w płucach, skórze i naczyniach krwionośnych [29,37]. Elastyna nie zawiera domeny o sekwencji arginina-glicyna-asparagina (RGD) ani żadnej innej odpowiedzialnej za przyłączanie się do powierzchniowych receptorów integrynowych, które wiążą kolagen, fibronektynę, lamininę, tenascynę, czy fibrylinę. Wykazanie specyficznej odpowiedzi chemotaktycznej ludzkich leukocytów i fibroblastów na obecność tropoelastyny i proteolitycznych fragmentów nierozpuszczalnej elastyny sugerowało możliwość istnienia specyficznego receptora komórkowego, który przyłącza się do hydrofobowych sekwencji tego białka, takich jak VGVAPG [39,40]. Przepuszczenia te zostały potwierdzone przez analizę wiązania radioaktywnej elastyny do fibroblastów *ligamentum nuchae* i izolowanych frakcji z ich błon komórkowych [46]. Wykazano, że pojedyncze komórki mają około 2 x 10⁶ miejsc odwracalnie wiążących elastynę ze stałą wiązania K_d=8 nM. Chromatografią powinowactwa ekstraktów z błon komórkowych bydłych chondroblastów i fibroblastów wzięta karkowego wykazano, że komórki te mają białko powierzchniowe o ciężarze cząsteczkowym 67 kD, bezpośrednio wiążące się do hydrofobowych sekwencji, takich jak: VGVAPG, VGAMPG i VGMAPG, powtarzających się wiele razy w cząsteczkach elastyny. W dalszych badaniach ujawniono, że białko to (*Elastin Binding Protein* – EBP) w odróżnieniu od innych receptorów powierzchniowych nie ma domeny przezbłonowej (*transmembrane domain*), a na błonie komórkowej zakotwiczone jest poprzez kontakt z dwoma innymi białkami (61 kD i 55 kD), z którymi tworzy kompleks receptorowy [12,18,26].

Jedną z najbardziej uderzających cech EBP jest jego dodatkowa właściwość wiązania galaktocukrów poprzez oddzielną domenę lektynową. Właściwość ta nie tylko umożliwia ekstrakcję tego białka z frakcji błon komórkowych bez użycia detergentów, ale również ułatwia jego oczyszczenie na kolumnach zawierających β-galaktocukry. Co więcej wykazano, że β-galaktocukry, takie jak: galaktoza, galaktozamina i laktoza, wybiórczo wypłukiwały EBP z kolumn zawierających elastynę. Ta obserwacja pozwoliła ustalić, że ścisły związek pomiędzy elastyną a EBP może być przerwany w momencie przyłączenia się galaktocukru do miejsca lektynowego EBP. Przyłączenie galaktocukru powoduje bowiem taką konformacyjną zmianę cząsteczki EBP, że jego domena wiążąca hydrofobowe sekwencje elastyny zostaje ukryta, a wiązanie z elastyną przerwane. Przyłączenie galaktocukru przerywa również wiązanie EBP do białek błony komórkowej i powoduje uwolnienie go z powierzchni komórki.

Wykorzystując spektrofлуorometrię połączoną z videomikroskopią wykazano, że przyłączenie rozpuszczalnych fragmentów elastyny lub peptydów VGVAPG do miocytów naczyniowych powoduje gwałtowny wzrost poziomu wolnego wapnia wewnątrz tych komórek. Usunięcie zaś EBP z powierzchni komórkowych przy pomocy galaktocukrów (galaktozy i laktozy) znosi zależny od elastyny napływ wapnia.

To zjawisko sugeruje, że EBP nie tylko wiąże komórki do elastyny, ale pełni również rolę receptora, który pośredniczy w indukowaniu zmian wewnątrzkomórkowych w odpowiedzi na kontakt z elastyną lub produktami jej rozpadu zawierającymi peptydy VGVAPG. Szczegółowy mechanizm wewnątrzkomórkowego przewodnictwa indukowanego przy współdziałaniu EBP jest tematem obecnych badań w naszym laboratorium.

W dalszych pracach nad EBP wykazano, że może ono również wiązać lamininę ze stałą powinowactwa zbliżoną do elastyny [27,28]. Co więcej udało się nam wykazać, że 67 kD EBP jest identyczne z 67 kD receptorem lamininowym obecnym na wielu komórkach nowotworowych, wyizolowanym przez inną grupę badawczą [25]. Oba białka mają identyczny ciężar cząsteczkowy, skład aminokwasowy i krzyżowo reagują z przeciwciałami przeciwko ludzkiemu 67 kD receptorowi lamininy i 67 kD bydłecemu EBP. Mapowaniem miejsca wiążącego na lamininie wykazano, że 67 kD białko wyizolowane z ludzkich komórek nowotworowych reaguje z hydrofobową sekwencją LGTIPG obecną na domenie V B pierwszego łańcucha lamininy. Co więcej, wykazano, że drugorzędowa budowa lamininowego peptydu LGTIPG jest identyczna z hydrofobowym heksapeptydem VGVAPG, który powtarza się kilka razy w cząsteczce elastyny i odpowiedzialny jest za jej wiązanie do EBP. W następnych badaniach wykazano, że oczyszczony receptor elastynowy wiąże się do kolumny zawierającej lamininę, a oczyszczony receptor lamininowy do kolumny zawierającej elastynę. Białko 67 kD może być następnie wypłukane z obu kolumn zarówno przy użyciu wysokich stężeń rozpuszczalnych peptydów LGTIPG pochodzących z lamininy, VGVAPG peptydów elastynowych, jak i przy pomocy laktozy. Wiązanie 67 kD białka do elastyny lub lamininy może być zablokowane przez przeciwciało monoklonalne (BA-4) powstałe po immunizacji syntetycznym peptydem o sekwencji VGVAPG. Przeciwciało to rozpoznaje bowiem obie podobne strukturalnie, choć nie identyczne sekwencje hydrofobowe na obu białkach, które są odpowiedzialne za wiązanie 67 kD receptora. Fakt wiązania się lamininy i elastyny do tego samego receptora powierzchniowego został dodatkowo potwierdzony przez dane uzyskane po zastosowaniu techniki videomikroskopowej, która umożliwia prześledzenie wiązania cząstek złota koloidalnego pokrytych lamininą i elastyną do tych samych miejsc na powierzchni żywych miocytów naczyńowych. Przyłączanie obu znakowanych złotem ligandów do powierzchni komórek było zniesione po zastosowaniu wstępnej inkubacji komórek z laktozą, a rozpuszczalna laminina blokowała wiązanie opłaszczonych elastyną cząstek złota koloidalnego i *vice versa* [30]. Sugerowano, że to samo białko 67 kD mające właściwości galaktolektynowe może wiązać się z elastyną i lamininą. Podkreślić jednak należy, że 67 kD EBP różni się od innego receptora lamininowego o tym samym ciężarze cząsteczkowym, który reaguje z innym fragmentem lamininy i jest chimeryczną cząsteczką powstałą w wyniku postranslacyjnego związku pomiędzy dwoma różnymi białkami o ciężarze cząsteczkowym 37 kD i 32 kD [7].

Po stwierdzeniu, że EBP może reagować z podobnymi drugorzędowo, lecz nie identycznymi w liniowej sekwencji peptydami elastyny i lamininy, wykazano następnie, że podobna strukturalnie domena mogąca przyłączać się do 67 kD EBP jest

również obecna w kolagenie typu IV. Wstępna inkubacja ludzkich neutrofilów z elastynowymi peptydami VGVAPG, które nasycają EBP lub z laktozą, która usuwa to białko z powierzchni komórek, znosiło całkowicie chemotaksję ludzkich neutrofilów do poddanego trawieniu pepsyn kolagenu IV i jego fragmentów 7S [41,42].

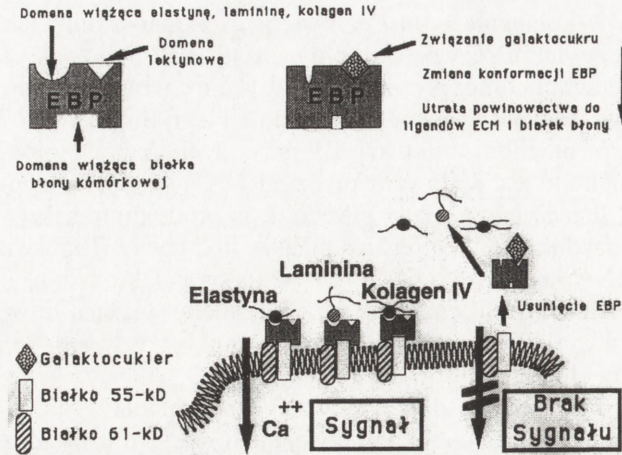
Szczegółowym badaniem struktury EBP przy użyciu metod biologii molekularnej wykazano, że białko to jest kodowane przez mRNA powstały w wyniku alternatywnego składania (*alternative splicing*) pierwotnego produktu transkrypcji genu kodującego β -galaktozydazę. Wyizolowany mRNA kodujący 67-kD wariant różni się znacznie od mRNA kodującego 64-kD lizosomalną galaktozydazę [32]. Utracił on egzony kodujące aktywność enzymatyczną i domenę wiążącą do receptora fosfomannozowego, a zyskał nową domenę (kodowaną przez *frame shift*) zdolną do wiązania elastyny i lamininy [16].

W dalszych badaniach nad powinowactwem tropoelastyny do syntetycznych peptydów odzwierciedlających różne sekwencje 67-kD odmiany ludzkiej β -galaktozydazy ustalono, że sekwencja (VVGSPSAQDASPL) obecna w unikalnym odcinku kodowanym przez *frame shift* jest odpowiedzialna za wiązanie elastyny i lamininy.

EBP – CZYNNIK KONTROLUJĄCY WYDZIELANIE TROPOELASTYNY I FORMOWANIE WŁÓKIEN SPRĘŻYSTYCH

Na długo przed izolacją i scharakteryzowaniem EBP zauważono, że agaroz (polimer laktozy) i wolne galaktocukry (galaktoza i galaktozamina) przeszkadzają w formowaniu włókien sprężystych w hodowlach i przeszczepach chondroblastów pochodzących z chrząstki sprężystej i miocytów aortalnych [11]. Mechanizm tego zjawiska pozostawał nie wyjaśniony aż do czasu, kiedy wykazano, że wolne galaktocukry lub zawierające N-acetyl-galaktozaminę glikozaminoglikany, takie jak: siarczan chondroityny (CS) i siarczan dermatanu (DS), przyłączając się do miejsca lektynowego EBP mogą powodować dysocjację jego kompleksu z tropoelastyn i usuwać EBP z powierzchni komórek [12,13]. Sugerowano, że obecność EBP na powierzchni komórek jest niezbędna dla prawidłowego tworzenia się włókien sprężystych. Założenie to potwierdziło się w doświadczeniach, kiedy bezpośrednie zablokowanie EBP przeciwciałem skierowanym do jego domen wiążących elastynę całkowicie znosiło formowanie włókien sprężystych w hodowli miocytów aortalnych, nie zaburzając przy tym syntezy samej tropoelastyny.

Następnie wykazano, że proces zewnątrzkomórkowego formowania się włókien sprężystych zależy od precyzyjnego uwalniania tropoelastyny z kompleksu z EBP i przyłączania tego prekursora nierozpuszczalnej elastyny do uprzednio uformowanych 10–12 nm mikrowłókienek (*microfibrils*) stanowiących szkielet włókien sprężystych. Ustalono, że EBP wykorzystuje swą domenę lektynową do dokowania kompleksu EBP-tropoelastyna do reszt galaktocukrów rozmieszczonych regularnie na cząsteczkach fibryliny [10] (glikoproteidu stanowiącego jeden z głównych składników mikro-



Rys. 1. EBP ma trzy odrębne domeny: 1 – mogącą wiązać elastynę, lamininę lub kolagen IV, 2 – lektynową zdolną do przyłączenia związków zawierających galaktocukry i 3 – odpowiedzialną za wiązanie białek błony komórkowej (61-kD i 55-kD); wiązanie elastyny, lamininy lub kolagenu IV do EBP zachodzi tylko pod nieobecność galaktocukrów; przyłączenie reszt galaktocukrowych do domeny lektynowej tak zmienia trzeciorzędową strukturę cząsteczek receptora, że miejsce wiązania białek ECM zostaje zamaskowane, a samo EBP zostaje uwolnione z powierzchni komórki; przyłączenie elastyny, lamininy lub kolagenu IV do obecnego na powierzchni komórek EBP powoduje szybki wzrost poziomu wolnego wapnia wewnątrz komórek; usunięcie EBP z powierzchni komórkowych przy pomocy galaktocukrów znosi powstanie sygnału wewnątrzkomórkowego

włókienek), a ich kontakt z miejscem lektynowym EBP prowadzi do uwolnienia cząsteczek tropoelastyny z kompleksu [13,17,18].

Uwolniona tropoelastyna zostaje zakotwiczona do następnego składnika heteropolimeru mikrowłókienkowego zwanego MAGP (*Microfibrils Associated Glycoprotein*) dzięki obecności cysteiny na jej końcu karboksylowym. Takie uporządkowane (zależne od tworzenia wiązań cystynowych) unieruchomienie cząsteczek tropoelastyny na szkieletie mikrowłókienkowym pozwala na równoległe ułożenie wielu cząsteczek tropoelastyny względem siebie i wzajemne zbliżenie reszt lizylowych obecnych we fragmentach cząsteczki tworzących α -helisę. Tak dokładne "dopasowanie" reszt lizylowych ułatwia formowanie trwałych wiązań desmodynowych (powstających po oksydatywnej deaminacji 3 lub 4 lizyn) i polimeryzację cząsteczek tropoelastyny pod wpływem działania oksydazy lizylowej [29,37].

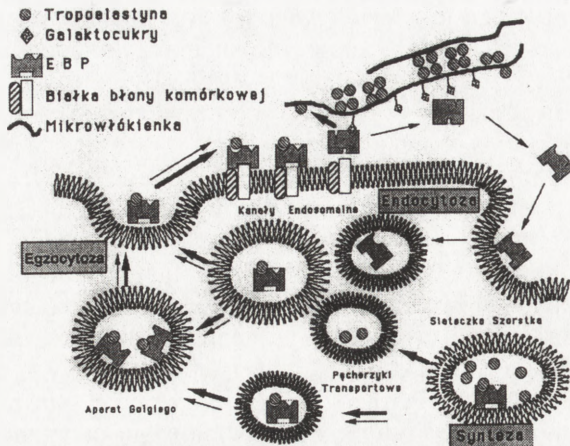
Proces systematycznego odkładania tropoelastyny może jednak ulec dezorganizacji lub przerwaniu w przypadku pojawienia się w przestrzeni okołokomórkowej wolnych glikozaminoglikanów zawierających galaktocukry (CS, DS). Związki te przyłączając się do miejsca lektynowego EBP mogą powodować przedwczesne usunięcie kompleksu EBP-tropoelastyna z powierzchni komórek i nieskoordynowane uwolnienie tropoelastyny. Zjawisko to zaobserwowane we wspomnianych poprzednio doświadczeniach *in vitro* i w przeszczepach izolowanych elastoblastów może wskazywać na istnienie unikalnego mechanizmu, w którym komórki poprzez produkcję galaktozaminoglikanów mogą miejscowo kontrolować tworzenie włókien i błon

sprężystych zarówno w czasie prawidłowego rozwoju embrionalnego, jak i w czasie gojenia się ran, procesach patologicznego włóknienia czy tworzenia zmian miażdżycowych.

Mechanizm prowadzący do poporodowego zamykania się przewodu tętniczego (*ductus arteriosus*), który w życiu płodowym łączy aortę z tętnicą płucną zachodzi w wyniku intensywnej migracji miocytów z błony środkowej (*tunica media*) do błony wewnętrznej (*tunica intima*) tego naczynia. Tworzące się pogrubienia błony wewnętrznej (*intimal cushions*) przypominają szybko rosnące zmiany miażdżycowe, doprowadzające do zamknięcia tętnic [13]. Zmienione fenotypowo miocyty obecne w poduszeczkach błony wewnętrznej produkują zmienioną substancję międzykomórkową, która swoim składem i organizacją przypomina płytki miażdżycowe.

Miocyty te w odróżnieniu od komórek innych tętnic płodowych, produkują więcej kolagenu typu I, fibronektyny i proteoglikanów bogatych w siarczan chondroityny i siarczan dermatanu, ale nie są zdolne do prawidłowego tworzenia błon i włókien sprężystych [50]. Wykazaliśmy, że jedną z przyczyn braku powstawania włókien sprężystych w *tunica intima ductus arteriosus* jest fakt, że miocyty migrujące do błony wewnętrznej produkują niepełnowartościową tropoelastynę o ciężarze cząsteczkowym 52-kD, która ulegała szybkiej, częściowej degradacji proteolitycznej i traciła swój koniec karboksylowy odpowiedzialny za przyłączanie nienaruszonych cząsteczek tropoelastyny do szkieletu mikrofibrylarnego włókien sprężystych [15]. Tę częściową degradację cząsteczek tropoelastyny wiązaliśmy z faktem, że miocyty *ductus arteriosus* mają znacznie mniej EBP niż ich odpowiedniki obecne w aorcie i innych dużych tętnicach typu sprężystego [13]. Kojarząc te dwa fakty z dodatkową obserwacją, że w miocytach aorty EBP może być kolokalizowane immunohistochemicznie z wewnątrzkomórkową tropoelastyną, zasugerowaliśmy, że EBP może wiązać się również z tym prekursorem elastyny oraz że brak takiego wiązania może mieć związek z wewnątrzkomórkowym, proteolitycznym rozpadem tropoelastyny. To założenie zostało potwierdzone w dalszych badaniach, w których ustalono, że EBP i tropoelastyna mogą rzeczywiście tworzyć wewnątrzkomórkowy kompleks o ciężarze cząsteczkowym 140-kD i że tworzenie kompleksów z EBP jest niezbędne do prawidłowego wydzielania nieglikozylowanych i wysoce hydrofobowych cząsteczek elastyny [17]. Wykazano, że stymulowana galaktocukrami doświadczalna dysocjacja kompleksów EBP z tropoelastyn obecnymi w lizatach miocytów aorty powoduje stopniowy rozkład świeżo zsyntetyzowanej tropoelastyny przez endogenne proteiny serynowe. W zrozumieniu mechanizmu, jakim EBP może ochraniać elastynę przed atakiem proteinaz serynowych, pomógł nam fakt, że domena EBP odpowiedzialna za wiązanie tego białka do elastyny (VVGSPSAQDASPL) wykazuje wysoki stopień podobieństwa do domen obecnych na końcach aminowych szeregu proteinaz serynowych [16].

Homologia ta sugerowała, że EBP i elastazy serynowe mając podobne domeny wiążące elastynę mogą konkurować ze sobą o wiązanie tego substratu. To założenie zostało potwierdzone doświadczalnie, kiedy ustaliliśmy, że wstępna inkubacja zarówno tropoelastyny, jak i spolimeryzowanej, nierozpuszczalnej elastyny z oczyszczono-



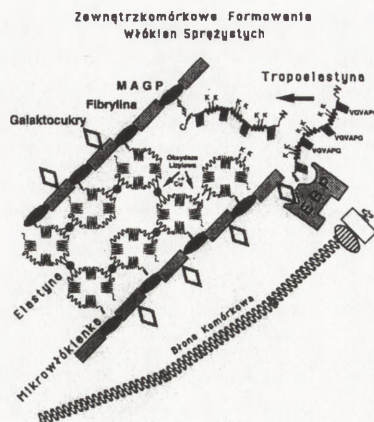
Rys. 2. Transport wewnątrzkomórkowy i wydzielanie tropoelastyny (grube strzałki) zależy od sprawnej recykulacji EBP (cienkie strzałki); pierwsze kompleksy EBP z tropoelastyną powstają zaraz po syntezie obu białek; kompleksy te są następnie transportowane do aparatu Golgiego i wydzielane z komórki; po zewnątrzkomórkowej dysocjacji kompleksów i uwolnieniu tropoelastyny, większość cząsteczek EBP powraca do kanałów endosomalnych komórki, aby związać tam nowe cząsteczki tropoelastyny i przetransportować je do przestrzeni zewnątrzkomórkowej

nym EBP, może konkurencyjnie hamować wiązanie szeregu proteinaz serynowych do tego substratu i w konsekwencji hamować jego rozkład proteolityczny [17].

Następnie udało się wykazać, że kilkuminutowa inkubacja miocytów aortalnych z laktozą, która powoduje rozszczepienie wewnątrzkomórkowych kompleksów EBP z tropoelastyną, jest przyczyną wewnątrzkomórkowej agregacji cząsteczek tropoelastyny. Tworzenie się wielocząsteczkowych agregatów tropoelastyny zupełnie uniemożliwiało wydzielenie tego prekursora i przyspieszało jego proteolityczny rozpad. Sugerowano więc, że 67-kD EBP wiąże tropoelastynę na wczesnych etapach transportu wewnątrzkomórkowego pełniąc rolę molekularnego przewodnika "*molecular chaperone*", który ochrania ten hydrofobowy, nieglikozylowany prekursor elastyny, podobnie jak robią to białka szoku termicznego (*heat shock proteins*, HSP), które eskortują inne hydrofobowe proteidy przeznaczone do wydzielenia z komórki [33]. W przypadku popularnego Hsp-70 uwolnienie białka eskortowanego wymaga stymulacji endogennej ATP-azy, podczas gdy tropoelastyna może być uwolniona z kompleksu z EBP pod wpływem galaktocukrów, przyłączających się do jego domeny lektynowej.

Ponieważ niektóre z cząsteczek EBP zostają na stałe wcielone do włókien sprężystych i pozostają jako ich integralny składnik wykrywalny immunohistochemicznie w wiele lat po zakończeniu elastogenezy, podejrzewamy, że EBP może również ochraniać nierozpuszczalną elastynę przed proteolizą. Obecność tego białka we włóknach sprężystych może częściowo tłumaczyć wyjątkową trwałość tych elementów substancji międzykomórkowej, które w przeciwieństwie do kolagenu, fibronektyny czy proteoglikanów mogą egzystować w tkankach przez dziesiątki lat.

Rys. 3. Proces zewnątrzkomórkowego formowania się włókien sprężystych zależy od precyzyjnego uwalniania tropoelastyny z kompleksu z EBP i przyłączenia do mikrowłóknowego szkieletu włókien sprężystych; wykorzystując swą domenę lektynową EBP dokuje do reszt galaktocukrów rozmieszczonych regularnie na cząsteczkach fibryliny; kontakt z resztami galaktocukrów prowadzi do uwolnienia cząsteczek tropoelastyny z kompleksu; uwolnione cząsteczki tropoelastyny zostają zakotwiczone do MAGP; formowanie się dezmozynowych wiązań krzyżowych pomiędzy cząsteczkami tropoelastyny powoduje ich polimeryzację do nierozpuszczalnej elastyny



Pewnym problemem w pełnym zrozumieniu proponowanego mechanizmu molekularnego ochrania tropoelastyny przez EBP był fakt, że produkcja tropoelastyny przez miocyty naczyniowe przewyższa ilościowo produkcję EBP. Założyliśmy więc dodatkowo, że pewna ilość cząsteczek EBP po uwolnieniu eskortowanej elastyny (po kontakcie z galakto-glikolizowanymi białkami mikrowłókierek) może powrócić do wnętrza komórki i być ponownie użyta jako nośnik dla nowych cząsteczek tropoelastyny.

Znakując cząsteczki EBP obecne na powierzchni hodowanych miocytów aortalnych udało się nam wykazać, że wiele z nich może powrócić do wnętrza komórki, aby po przejściu przez system endosomów (*sorting endosome, recycling endosome*) i przez kanały trans-aparatu Golgiego powrócić w ciągu 45–60 min na powierzchnię błony komórkowej [19]. Używając chlorochiny i bafilomycyny A1 (związków, które blokując transport protonów przez błony alkalinizują różne fragmenty systemu endosomalnego) wykazaliśmy, że mogą one blokować normalną recykulację EBP, a w konsekwencji również wydzielanie tropoelastyny i powstawanie włókien sprężystych w hodowlach miocytów naczyniowych.

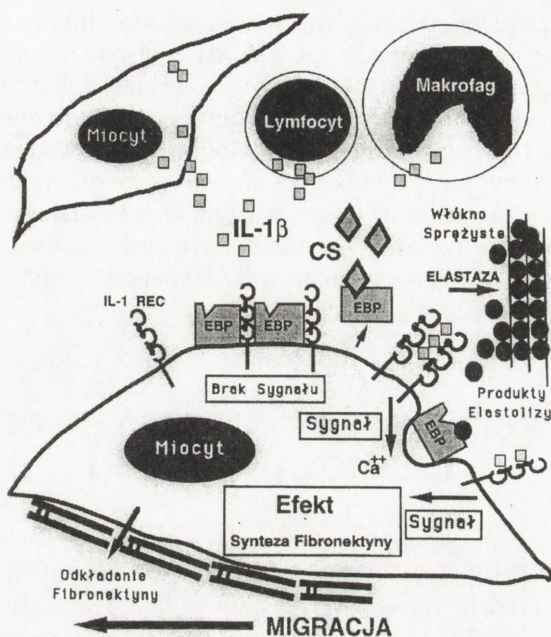
Wyniki przytoczone powyżej sugerują, że EBP jest głównym czynnikiem regulującym efektywne wydzielanie i odkładanie tropoelastyny oraz że procesy te zależą od sprawnej recykulacji tego wahadłowego przewodnika molekularnego (*shuttle molecular chaperone*) zdolnego do wielokrotnego przenoszenia cząsteczek hydrofobowego i nieglikozylowanego prekursora elastyny poprzez aparat wydzielniczy elastoblastów.

EBP – CZYNNIK KONTROLUJĄCY MIGRACJĘ MIOCYTÓW NACZYNIOWYCH

Zarówno pogrubienie błony wewnętrznej embrionalnego przewodu tętniczego, jak i patologiczne formowanie się neointymy w chorobach naczyń (miażdżyca, nadciśnienie systemowe i płucne) jest związane z czynną migracją komórek mięśni gładkich

wywodzących się z błony środkowej naczyń krwionośnych [5,20,35,43]. Sugerowano istnienie kilku czynników stymulujących migrację miocytów naczyniowych (np. zmiany składu ECM, wzrost ilościowy odłożonej fibronektyny i glikozaminoglikanów, nadprodukcja czynników wzrostu, takich jak: bFGF, PDGF i TGF- β – [5,8,9,20,23,31,34,45,50], ale nadal nieznanym jest czynnik inicjujący odrywanie się komórek mięśni gładkich od błon i włókien sprężystych obecnych w *tunica media*. Nie do końca wiadomo, co decyduje o ukierunkowaniu migracji miocytów medialnych w stronę błony wewnętrznej tętnic. W naszych badaniach nad tym problemem, jako modelu doświadczalnego używaliśmy miocytów wyizolowanych z poduszczek błony wewnętrznej *ductus arteriosus* pobranego z 280-dniowych płodów owczych (czyli tuż przed porodem). Ponieważ wykazaliśmy, że komórki te zawierają znacznie mniej EBP niż miocyty błony środkowej aorty, zasugerowaliśmy, że istnieje ścisła zależność pomiędzy niedoborem EBP w tych komórkach a ich odrywaniem się od elastyny i następującą po tym migracją w kierunku intymy [14]. W badaniach *in vitro* obserwowaliśmy, że komórki *ductus arteriosus* nie przylegają do płytek hodowlanych pokrytych elastyną, tak jak robią to miocyty aorty bogate w EBP. Dodanie siarczanu chondroityny, który usuwa EBP z powierzchni hodowanych miocytów aorty, hamowało przyleganie tych komórek do powierzchni pokrytych elastyną. Stopień upośledzenia przylegania miocytów aortalnych do elastyny był zależny od dawki siarczanu chondroityny i mógł być całkowicie zniesiony, jeżeli dodatkowo traktowano komórki cykloheksimidem, monenzyną lub azydkiem sodu, które hamowały produkcję i wydzielanie nowych cząsteczek EBP (zastępujących te usunięte z powierzchni komórkowej przez siarczan chondroityny). Specyficzne zaangażowanie się EBP w zjawisko przylegania miocytów do elastyny potwierdził fakt, że wstępna inkubacja komórek aorty z pochodzącymi z elastyny peptydami VGVAPG (które nasycały ich powierzchniowy receptor EBP) konkurencyjnie blokowała wiązanie się tych komórek do powierzchni pokrytych elastyną.

W następnej serii doświadczeń badaliśmy czynnościowe zależności pomiędzy przyleganiem miocytów aortalnych do elastyny a ich możliwościami migracji przez trójwymiarową sieć błon elastynowych (otrzymanych po wygotowaniu aort owczych i bydlęcych w 1N NaOH). Okazało się, że miocyty aortalne (posiadające dużo cząsteczek EBP) posadzone na powierzchni tych błon przylegały do najbardziej powierzchniowej błony sprężystej i pozostawały unieruchomione przez cały czas trwania eksperymentu (7 dni). W odróżnieniu od nich ubogie w EBP komórki *ductus arteriosus* nie przylegały do błon elastynowych, ale migrowały przez ich trójwymiarową sieć. Dodanie siarczanu chondroityny (usuwającego EBP z powierzchni komórkowych) powodowało odklejenie się miocytów aortalnych od błony sprężystej i ich następową głęboką migrację do wnętrza siatki elastynowej. Przytoczone wyżej wyniki sugerują, że indukowane siarczanem chondroityny, a więc nieproteolityczne, usunięcie EBP z powierzchni miocytów naczyniowych może być bezpośrednio odpowiedzialne za odszczepianie się tych komórek od błon elastynowych obecnych w błonach środkowych tętnic. Utrata zaś kontaktu fizycznego z podłożem może być jednym z głównych mechanizmów inicjujących migrację miocytów w chorobach naczyniowych.



Rys. 4. EBP zlokalizowane w bezpośredniej bliskości receptorów dla IL-1 typu I może zapobiegać wiązaniu IL-1b do jej receptorów; usunięcie EBP z powierzchni komórek (zależne od związania galaktocukrów lub produktów rozpadu elastyny) pozwala na swobodny dostęp IL-1b do swego receptora i w konsekwencji na inicjację sygnału prowadzącego do zwiększonej produkcji fibronektyny, która ułatwia migrację miocytów naczyniowych

Nasze niedawno wykonane eksperymenty wykazały, że zależne od siarczanu chondroityny usunięcie EBP z powierzchni komórkowych powoduje również stymulację syntezy fibronektyny w hodowlach miocytów naczyń wieńcowych, w stopniu podobnym do tego, który uzyskuje się po ich stymulacji interleukiną-1b (IL-1b) [8,9].

Dodatkowo wykazano, że nasycenie obecnego na powierzchni komórek EBP przy pomocy peptydów elastynowych (produktów proteolitycznego rozpadu elastyny) prowadzi do szybkiej endocytozy tego receptora, a to również podwyższa syntezę fibronektyny. Zaskoczeniem był natomiast wynik wskazujący, że stymulowana siarczanem chondroityny czy peptydami elastynowymi nadprodukcja fibronektyny mogła być zniesiona w obecności rozpuszczalnego antagonisty receptora IL-1. Wynik ten sugerował, że usunięcie EBP z powierzchni komórek jest tylko stymulującym ogniwem w reakcji łańcuchowej, a właściwy sygnał do zwiększenia produkcji fibronektyny zależy od receptora dla interleukiny [21]. Immunohistochemicznie wykazano, że EBP i receptory typu I, które wiążą IL-1b, lokalizują się bardzo blisko siebie na niepobudzonych miocytach naczyń wieńcowych. Miocyty te poddane działaniu siarczanu chondroityny, który powodował utratę EBP, przyłączały znacznie więcej znakowanej jodem IL-1b niż komórki kontrolne.

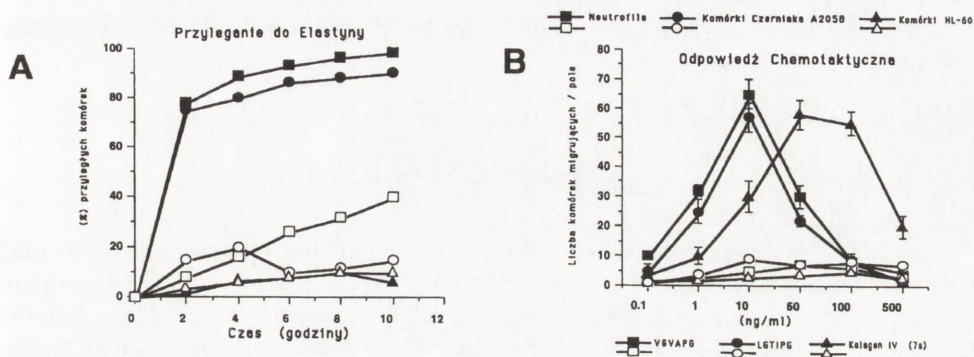
Na podstawie tych wyników zasugerowaliśmy, że bezpośrednia bliskość EBP i receptorów IL-1 może zapobiegać wiązaniu krążącej cytokiny do spoczynkowych miocytów naczyniowych. Usunięcie zaś EBP stwarza sytuację swobodnego dostępu IL-1b do swego receptora typu pierwszego, a w konsekwencji inicjację sygnału aktywującego miocyty spoczynkowe. Postulujemy, że jednym z pierwszych objawów aktywacji poprzez IL-1b jest odpowiedź komórkowa prowadząca do zwiększonej produkcji fibronektyny, która ułatwia (*sliding paths*) migrację miocytów naczyniowych i leukocytów penetrujących ściany naczyniowe. Wydaje się, że usunięcie EBP z powierzchni miocytów może być jednym z pierwszych etapów mechanizmu prowadzącego do rozwoju rozsianych zmian miażdżycopodobnych i zamykania tętnic wieńcowych po przeszczepach serca [20,21].

EBP – RECEPTOR POŚREDNICZĄCY W ODPOWIEDZI CHEMOTAKTYCZNEJ

Badaniem immunohistochemicznym przy użyciu przeciwciała monoklonalnego rozpoznającego 67-kD EBP wykazano, że białko to występuje również na powierzchniach komórek, które nie produkują elastyny i nie pozostają w stałym kontakcie z włóknami sprężystymi. EBP obecne jest na powierzchni makrofagów tkankowych, dojrzałych monocytów, neutrofilów i pobudzonych limfocytów. Ekspresja 67-kD EBP na powierzchni leukocytów jest zależna od ich stopnia zróżnicowania i aktywacji. Wykazaliśmy, że niezróżnicowane leukocyty białaczkowe linii komórkowej HL-60 nie mają na swej powierzchni EBP i w testach *in vitro* nie przyłączają się do powierzchni pokrytych elastyną, lamininą lub kolagenem typu IV. Te same komórki poddane wcześniej działaniu estrów forbolowych lub DMSO, które powodują ich różnicowanie w kierunku dojrzałych neutrofilów, przylegają do tych białek dzięki pojawieniu się EBP na ich powierzchni [41,42]. Immunochemiczne wykrywanie EBP połączone z cytometrią przepływową może służyć jako jeszcze jedna metoda do oceny efektów terapeutycznych w niektórych chorobach szpiku. Wydaje się, że obecność EBP na powierzchniach dojrzałych neutrofilów i monocytów może być odpowiedzialna za ich szybką chemotaksję w kierunku uszkodzonych tkanek, w których doszło do częściowej proteolizy elementów substancji międzykomórkowej i uwolnienia rozpuszczalnych produktów degradacji elastyny, lamininy lub kolagenu IV. Jednocześnie brak EBP na powierzchni neutrofilów białaczkowych może wyjaśniać ich szybką migrację przez błony podstawne.

Migracja dojrzałych neutrofilów poprzez tkankę objętą reakcją zapalną może zachodzić skokowo w wyniku następujących po sobie: zależnego od EBP przylegania do elementów ECM i odrywania się od podłoża w wyniku usunięcia powierzchniowego EBP pod wpływem galakto-glikozaminoglikanów lub wolnych galaktocukrów, uwolnionych ze zniszczonych proteoglikanów [5,35].

EBP wykryto również na powierzchni komórek linii wywodzących się z ludzkiego czerniaka, raka płuc i raka sutka [6,49]. Sugeruje się, że białko to może być odpowie-



Rys. 5. A – przyleganie różnych typów komórek do płytek hodowlanych pokrytych elastyną; komórki inkubowano w normalnej pożywce MEM (zamknięte symbole) lub w pożywce zawierającej siarczan chondroityny (otwarte symbole); większość ludzkich neutrofilów i komórek A2058 wywodzących się ze złośliwego czerniaka, które mają na swej powierzchni EBP, przylegało do elastyny podczas pierwszych 2–4 godzin inkubacji; dodanie 10 $\mu\text{g/ml}$ siarczanu chondroityny (który usuwa EBP z powierzchni komórek) wyraźnie zmniejszało przyleganie tych komórek do elastyny; komórki ludzkiej białaczki HL-60, które nie mają EBP na swej powierzchni, nie przylegały do elastyny; B – normalna odpowiedź chemotaktyczna ludzkich neutrofilów na pochodzące z elastyny peptydy VGVAPG, pochodzące z lamininy peptydy LGTIPG i 7S fragmenty kolagenu typu IV (zamknięte symbole) została zupełnie zniesiona, kiedy komórki preinkubowano w pożywce zawierającej 10 mM laktozy (otwarte symbole); stopień odpowiedzi chemotaktycznej na wymienione peptydy mierzono liczbą komórek migrujących z górnej do dolnej komory Boydena zawierającej chemoatraktanty

działne za chemotaksję komórek nowotworowych w kierunku elastyny i lamininy. Chemotaksja komórek czerniaka czy komórek raka sutka w kierunku tropoelastyny, lamininy lub peptydów VGVAPG i LGTIPG może być zablokowana przez wstępną inkubację z laktozą czy galaktozą (ale nie glukozą czy fukozą), które usuwają EBP z powierzchni komórek [18,26,27].

Galaktocukry nie zmieniają jednak migracji wspomnianych komórek nowotworowych w kierunku płytkowego czynnika wzrostowego (PDGF), modulowanej przez inny swoisty receptor powierzchniowy. Wyniki te sugerują, że ekspresja EBP na powierzchni uwolnionych z ogniska pierwotnego komórek nowotworowych (czerniak, rak sutka) może być odpowiedzialna za wybiórcze przerzuty tych komórek do płuc i innych tkanek bogatych w elastynę. Wydaje się, że komórki nowotworowe i towarzyszące im leukocyty mogą przylegać do włókien sprężystych obecnych w zrębie płucnym, niszczyć elastynę, uwalniać rozpuszczalne produkty rozpadu tego

białka, które z kolei mogą stymulować chemotaksję krążących komórek nowotworowych [6,49]. Możliwość usunięcia EBP z powierzchni krążących komórek nowotworowych przez nietoksyczne galaktocukry, które znoszą odpowiedź chemotaktyczną i następujące po niej zjawisko przylegania do zrębu bogatego w elastynę, może otworzyć dodatkowy kierunek terapeutyczny w pewnych nowotworach dających przerzuty do płuc.

ZAKOŃCZENIE

67-kD EBP jest przykładem wieloczynnościowego białka, które może być również powierzchniowym receptorem komórkowym. Białko to różni się budową i funkcjami od innych cząsteczek adhezyjnych. Nie jest ono integralnym białkiem błony komórkowej, tak jak integryny lub kadheryny. Może być unieruchomione na powierzchni komórki przez połączenie z innymi białkami trwale związanymi ze strukturą błony komórkowej. Białko to wyeksponowane na powierzchni komórki może pośredniczyć we wzajemnych relacjach pomiędzy komórką a substancją podstawową w mechanizmie niezależnym od obecności kationów wapnia. Co więcej, w odróżnieniu od większości integryn, które rozpoznają identyczne liniowe sekwencje (RGD) obecne w kolagenie, fibronektynie czy vitronektynie, EBP rozpoznaje różne sekwencje pierwszorzędowe elastyny, lamininy i kolagenu IV w momencie, gdy formują one podobną drugorzędową konfigurację. Podobnie jak selektyny, EBP ma właściwości lektynowe z preferencjami wiązania galaktocukrów. Jednakże przyłączanie związków zawierających galaktocukry powoduje takie konformacyjne zmiany EBP, że białko to traci powinowactwo do ligandów substancji międzykomórkowej (elastyny, lamininy i kolagenu IV) i powinowactwo do wiążących je białek błony komórkowej. Istnienie białka, które może oddziaływać z kilkoma białkami substancji podstawowej i może być usunięte z powierzchni komórki przez kontakt z galakto-cukrowcami, stwarza wiele możliwości regulacji takich procesów, jak: migracja komórek mięśni gładkich w czasie pogrubiania ściany naczyńowej, przerzuty nowotworowe, naciekanie tkanek przez leukocyty, które zależą od kontaktów zachodzących pomiędzy komórką a ECM. Komórki zapalne lub komórki nowotworowe, które naciekają tkanki, mogą używać tego receptora, by przylgnąć do elastyny, lamininy lub kolagenu typu IV, podczas gdy ich oderwanie od tych elementów ECM (umożliwiające dalszą migrację) zachodzi po ich kontakcie z galaktocukrami. Wydaje się, że dalsze badania nad relacjami pomiędzy cukrowcami a cząsteczkami adhezyjnymi mogą nie tylko poszerzyć nasze rozumienie mechanizmów interakcji pomiędzy komórkami a ECM, ale także otworzyć nowe terapeutyczne możliwości wpływu na te relacje w wielu sytuacjach patologicznych.

LITERATURA

- [1] ABELDA S, BUCK C. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J* 1990; **4**: 2868–2880.
- [2] ABELDA S. Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Laboratory Investigation* 1993; **68**: 4–17.
- [3] ABELDA S, SMITH CW, WARD PA. Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J* 1994; **8**: 504–512.
- [4] AKIYAMA SK, NAGATA K, YAMADA KM. Cell surface receptor for extracellular matrix components. *Biochem Biophys Acta* 1990; **1031**: 91–110.
- [5] BENITZ WE, BERNFIELD M. Endothelial cell proteoglycans. Possible mediators of vascular response to injury. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1990; **2**: 407–408.
- [6] BLOOD CH, SASSE J, BRODT P, ZETTER BR. Identification of a tumor cell receptor for VGVAPG, an elastin-derived chemotactic peptide. *J Cell Biol* 1988; **107**: 1987–1993.
- [7] CASTRONOVO V. Laminin receptors and laminin-binding proteins during tumor invasion and metastasis. *Invasion Metastasis* 1993; **13**: 1–30.
- [8] CLAUSELL N, RABINOVITCH M. Upregulation of fibronectin synthesis by interleukin-1 in coronary artery smooth muscle cells is associated with the development of the post-cardiac transplant arteriopathy in piglets. *J Clin Invest* 1993; **92**: 1850–1858.
- [9] CLAUSELL N, MOLOSSI S, RABINOVITCH M. Increased interleukin-1 and fibronectin expression are early features of the development of the post-cardiac transplant coronary arteriopathy in piglets. *Am J Pathol* 1993; **42**: 1772–1786.
- [10] GIBSON M, KUMARATILAKE JS, CLEARY EG. The protein components of the 12-nm microfibrills of elastic and nonelastic tissues. *J Biol Chem* 1989; **264**: 4590–4598.
- [11] HINEK A, KAWIAK J, BARCEW B, CZARNOWSKA B. Effect of agarose and dexamethasone on the nature and production of extracellular matrix components by elastic cartilage chondrocytes. *Acta Biol Hung Acad Sci* 1984; **35**: 245–258.
- [12] HINEK A, WRENN DS, BARONDES SH, MECHAM RP. The elastin receptor-galactoside binding protein. *Science* 1988; **239**: 1539–1541.
- [13] HINEK A, MECHAM RP, KEELEY F, RABINOVITCH M. Impaired elastin fiber assembly is related to reduced 67 kD elastin binding protein in fetal lamb ductus arteriosus and in cultured aortic smooth muscle cells treated with chondroitin sulfate. *J Clin Invest* 1991; **88**: 2083–2094.
- [14] HINEK A, BOYLE J, RABINOVITCH M. Vascular smooth muscle cell detachment from elastin and migration through elastic laminae is promoted by chondroitin sulfate-induced shedding of the cell surface elastin binding protein. *Exp Cell Res* 1992; **203**: 344–353.
- [15] HINEK A, RABINOVITCH M. Ductus arteriosus smooth muscle cells produce a 52 kD tropoelastin associated with impaired assembly of elastic laminae. *J Biol Chem* 1993; **268**: 1405–1413.
- [16] HINEK A, RABINOVITCH M, KEELEY F, CALLAHAN J. The 67 kD elastin/laminin-binding protein is related to an alternatively spliced b-Galactosidase. *J Clin Invest* 1993; **91**: 1198–1205.
- [17] HINEK A, RABINOVITCH M. 67-kD elastin binding protein is a protective companion of extracellular insoluble elastin and intracellular soluble tropoelastin. *J Cell Biol* 1994; **126**: 563–574.
- [18] HINEK A. Nature and multiple functions of the 67 kD elastin/laminin binding protein. *Cell Adh Commun* 1994; **2**: 185–193.
- [19] HINEK A, KEELEY FW, CALLAHAN J. Recycling of the 67-kD elastin binding protein in arterial myocytes is imperative for secretion of tropoelastin. *Exp Cell Res* 1995; **220**: 312–324.

- [20] HINEK A. Adhesion molecules and cell surface receptors in the heart transplant-associated arteriosclerosis. *Fol Histochem Cytobiol* 1996; in press.
- [21] HINEK A, MOLOSSI S, RABINOVITCH M. Exploration of the molecular mechanisms leading to upregulation of fibronectin production by the arterial smooth muscle cells. *Exp Cell Res* 1996; in press.
- [22] JULIANO RL, HASKILL S. Signal transduction from the extracellular matrix. *J Cell Biol* 1993; **120**: 577-585.
- [23] KINSELA MG, QWARNSTROM WE. The role of proteoglycans in cell adhesion migration and proliferation. *Cur Op Cell Biol* 1994; **4**: 793-801.
- [24] LIN CQ, BISSELL M. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *FASEB J* 1993; **7**: 737-743.
- [25] LIOTTA LA, RAO CN, WEWER UM. Biochemical interactions of tumor cells with the basement membrane. *Annu Rev Biochem* 1986; **55**: 300-311.
- [26] MECHAM RP, HINEK A, ENTWISTLE R, WRENN DS, GRIFFIN G, SENIOR R. Elastin binds to a multifunctional 67 kD peripheral membrane protein. *Biochemistry* 1989; **28**: 3716-3722.
- [27] MECHAM RP, HINEK A, GRIFFIN G, SENIOR RM, LIOTTA LR. 67 kD elastin binding protein is homologous to the tumor cell 67-kD laminin receptor. *J Biol Chem* 1989; **264**: 16652-16657.
- [28] MECHAM RP. Receptors for Laminin on mammalian cells. *FASEB J* 1991; **5**: 2538-2546.
- [29] MECHAM RP, HEUSER JE. The elastic fiber.[w] *Cell Biology of Extracellular Matrix*. Hay E [Red]. Plenum Press, New York 1991.
- [30] MECHAM RP, WHITEHOUSE L, HAY M, HINEK A, SHEETZ MP. Visualization of elastin/laminin receptor complexes with gold-tagged ligands. Modulation by carbohydrate and cytoskeleton attachment. *J Cell Biol* 1991; **113**: 187-194.
- [31] MOLOSSI S, CLAUSELL N, RABINOVITCH M. Coronary artery endothelial interleukin-1b mediates enhanced fibronectin production related to post-cardiac transplant arteriopathy in piglets. *Circulation* 1993; **88**: 248-256.
- [32] MORREAU HN, GALJART NJ, GILLEMANS N, WILLEMSSEN R, VAN DER HORST GTJ, D'AZZO A. Alternative splicing of b-Galactosidase mRNA generates the classic lysosomal enzyme and a related protein β -Galactosidase. *J Biol Chem* 1989; **264**: 20655-20663.
- [33] NAKAI A, SATOH M, HIRAYOSHI K, NAGATA K. Involvement of the stress protein HSP47 in procollagen processing in endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 1992; **117**: 903-914.
- [34] NILSON J. Cytokines and smooth muscle cells in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 1993; **27**: 1184-1190.
- [35] RABINOVITCH M. Elastase and cell extracellular matrix interactions in the pathogenesis of intimal proliferation. [w] *Atherosclerosis* 1994 Woodford EP, Davignon J, Sniderman A. [red], Elsevier Science B.V. New York. 338-349.
- [36] RAINES E, ROSS R. Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Brit Heart J* 1993; **69** (Suppl): 30-37.
- [37] ROSENBLOOM J, ABRAMS WR, MECHAM RP. Extracellular Martix 4, Elastic Fiber. *FASEB J* 1993; **7**: 1208-1218.
- [38] RUOSLAHTI E . Integrins. *J Clin Invest* 1991; **87**: 1-5.
- [39] SENIOR RM, GRIFFIN G, MECHAM RP. Chemotactic activity of elastin derived peptides. *J Clin Invest* 1980; **66**: 859-862.
- [40] SENIOR RM, GRIFFIN G, WRENN DS, MECHAM RP, PRASAD KU, URRY DW. Val-Gly-VAL-Ala-Pro-Gly, a repeating peptide in elastin, is chemotactic for fibroblasts and monocytes. *J Cell Biol* 1984; **99**: 870-877.
- [41] SENIOR RM, HINEK A, GRIFFIN G, CRAUCH E, MECHAM RP. Neutrophils are chemotactic to type IV collagen and its 7S domain and contain 67 kDa type IV collagen binding protein with galactoselectin properties. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1989; **1**: 479-487.

- [42] SENIOR RM, ROMAN J, HINEK A, MECHAM RP. Extracellular matrix components as mediators of inflammation. [w] Handbook of Inflammation vol 6 1989 - Mediators of Inflammatory process. Hanson MP, Murphy PC [Red], Elsevier Science Publ.
- [43] SIMIONESCU M, SIMIONESCU N. Proatherosclerotic events: pathobiochemical changes occurring in the arterial wall before monocyte migration. *FASEB J* 1993; **7**: 1359–1366.
- [44] WAGNER WD. Proteoglycan structure and function as related to atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1985; **3**: 52–68
- [45] WIGHT TN. The role of proteoglycans in cell adhesion migration and proliferation. *Curr Op Cell Biol* 1992; **4**: 793–801.
- [46] WRENN DS, HINEK A, MECHAM RP. Kinetics of receptor mediated binding of tropoelastin to ligament fibroblasts. *J Biol Chem* 1988; **238**: 2280–2284.
- [47] YAMADA KM. Adhesive recognition sequences. *J Biol Chem* 1991; **266**:12809–12812.
- [48] YAMADA Y, KLEINMAN HK. Functional domains of cell adhesion molecules. *Current Biol* 1992; **4**: 819–823.
- [49] YUSA T, BLOOD CH, ZETTER BR. Tumor cell interaction with elastin. Implications for pulmonary metastasis. *Am Rev Resp Dis* 1989; **140**: 1458–1462.
- [50] ZHU LE, DAGHER D, JOHNSON D, BEDELL-HOGAN D, KEELEY F, KAGAN H. RABINOVITCH M. A developmentally regulated program restricting insolubilization of elastin and formation of laminae in fetal lamb ductus arteriosus. *Lab Invest* 1993; **68**: 321–331.

Otrzymano: 15.02. 1996 r.

Przyjęto: 08.03. 1996 r.

Adres autora: Division of Cardiovascular Research

The Hospital for Sick Children

555 University Avenue, McMaster Bld, Rm. 3010

Toronto, Ontario, Canada. M5G 1X8

INTERAKCJE RECEPTORÓW HORMONU TARCZYCY I POCHODNYCH WITAMIN A I D Z DNA

THYROID HORMONE RECEPTORS AND VITAMIN A AND D DERIVATIVES RECEPTORS: INTERACTIONS WITH DNA

Piotr CZEKAJ

II Katedra Histologii i Embriologii, Śląska Akademia Medyczna, Katowice

Streszczenie: Receptory jądrowe wykazują podobieństwo strukturalne i stanowią grupę czynników transkrypcyjnych aktywowanych przez ligand, które regulują ekspresję genów docelowych wiążąc się ze specyficznymi sekwencjami HRE jako homodimery, lub heterodimery z receptorem retinoidu X. Receptory hormonu tarczycy, kwasów retinowych i witaminy D₃ aktywują transkrypcję poprzez elementy odpowiedzi będące modyfikacjami konsensusowej sekwencji AGGTCA. Orientacja sekwencji tworzących HRE, ich skład nukleotydowy oraz długość przerywnika nukleotydowego oddzielającego je, determinują selektywność efektów transkrypcyjnych każdego z receptorów. Specyficzność wiązania HRE przez homo- i heterodimery uzależniona jest od domeny wiążącej DNA receptorów, oraz – częściowo – od domeny wiążącej ligand. Sygnalizacja komórkowa z udziałem niektórych receptorów jądrowych podlega autoregulacji drogą dodatnich i ujemnych sprzężeń zwrotnych. Charakterystyka biologicznego działania heterodimerów jest istotna dla zrozumienia molekularnych podstaw wzajemnych interakcji hormonu tarczycy i pochodnych witaminy A i D.

Słowa kluczowe: receptory jądrowe, homodimery, heterodimery, elementy odpowiedzi hormonalnej.

Summary: All nuclear receptors are structured in a similar way and are ligand-activated transcription factors which regulate the expression of target genes by binding to specific HRE sequences as homodimers or as heterodimers with retinoid X receptors. Thyroid hormone, retinoic acid and vitamin D₃ receptors activate transcription through response elements containing degenerated copies of the consensus half-site AGGTCA. The orientation, sequence and spacing of the half-sites appear to dictate selective transcriptional effects by each of the receptor. The binding site specificities of both homo- and heterodimers is determined by their DNA binding domains and – in part – by the ligand binding domains. Some nuclear receptors signaling appears to be the subject of autoregulation by positive and negative feedback mechanisms. The potential biological actions of heterodimers make their functional characterization

important for an understanding of the molecular basis of retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D₃ interactions.

Key words: nuclear receptors, homodimers, heterodimers, hormone response elements.

Wykaz skrótów: **TR** – receptor trój-jodotyroniny; **RAR** – receptor kwasu retinowego; **RXR** – receptor retinoidu X; **VDR** – receptor 1,25(OH)₂D₃; **HRE** – regulatorowe sekwencje DNA wiążące receptory jądrowe – odpowiednio dla poszczególnych receptorów: TRE, RARE, RXRE, VDRE; **ER** – receptor estrogenów; **NAP** – jądrowe białka pomocnicze; **T₃** – trój-jodotyronina; **9cRA** – izomer 9cis kwasu retinowego; **atRA** – izomer all-trans kwasu retinowego; **RA** – kwas retinowy; **VD** – witamina D₃; **DR** – proste (bezpośrednie) powtórzenie; **P** – palindrom; **IP** – odwrotny palindrom; **TF** – czynnik transkrypcji; **RBP** – białko wiążące retinol; **CRBP** – cytoplazmatyczne białko wiążące retinol; **CRABP** – cytoplazmatyczne białko wiążące kwas retinowy.

1. RECEPTORY JĄDROWE

Lipofilne związki o budowie pierścieniowej, takie jak hormony sterydowe, trój-jodotyronina, witamina D₃, czy retinowe pochodne witaminy A, kontrolują szereg podstawowych procesów życiowych na zasadzie mechanistycznie podobnego sposobu uruchamiania lub hamowania ekspresji genu. Są one inicjatorem transdukcji sygnałowej, w której rolę pośrednika, a zarazem czynnika transkrypcji odgrywa specyficzny, aktywowany przez ligand receptor jądrowy [3, 8, 27]. Wszystkie receptory jądrowe reprezentują jedną wspólną nadrodzinę genową, wyodrębnioną na podstawie porównania sekwencji cDNA oraz struktury samych białek [21, 40, 42].

Przedstawiciele nadrodziny mają podobną budowę domenową. Za wiązanie z ligandem odpowiada zróżnicowana pod względem sekwencji aminokwasów domena E, zlokalizowana w końcu karboksylowym receptora. Połączenie z DNA odbywa się dzięki dwum "palcem cynkowym" konserwatywnej domeny C, rozpoznającym odcinki regulatorowe genu – HRE (*hormone response elements*). Domena E wraz z N-terminalną domeną A-B uczestniczy w aktywacji transkrypcji, natomiast wspólnie z domeną C bierze udział w dimeryzacji. Dokonanie wymiany odpowiadających sobie domen pomiędzy receptorami jądrowymi nie powoduje utraty funkcji czynnika transkrypcji [3, 8, 12, 27, 40, 42].

Receptory hormonu tarczycy, kwasów retinowych i witaminy D₃, określane jako "małe", wykazują szereg dalszych podobieństw (tab. 1). Są zbudowane z mniejszej liczby aminokwasów niż receptory hormonów sterydowych; w postaci wolnej, nie związanej z ligandem identyfikuje się je wyłącznie w jądrze komórkowym; nie tworzą kompleksów z białkami szoku termicznego uniemożliwiającymi rozpoznawanie specyficznych sekwencji DNA, w związku z czym mogą wchodzić w interakcję z sekwencjami regulatorowymi genów bez obecności hormonu i powodować ich represję [8, 14, 21, 23, 35].

Interakcje małych receptorów jądrowych z sekwencjami regulatorowymi DNA sprowadzają się do charakterystycznych subregionów palców cynkowych ich domen C, bardzo podobnych w TR, RAR, RXR i VDR (oraz w ER) [21]. Dlatego wszystkie

TABELA 1. Porównanie budowy małych receptorów jądrowych; podano liczbę aminokwasów w każdej z domen oraz % homologii domen wiążących ligand (E) oraz DNA (C) w stosunku do RAR

Receptor	A-B	C	Stopień homologii C [%]	D	E	Stopień homologii E [%]	F
RAR α	88	66	100	46	220	100	42
RXR α	140	65	61	25	237	27	–
TR β	102	67	62	63	224	35	–
VDR	24	65	47	111	227	27	–

receptory tej grupy aktywują transkrypcję łącząc się z podobnymi sekwencjami DNA, określanymi odpowiednio jako: TRE, RARE, RXRE i VDRE, rozróżnianymi przy udziale specyficznego regionu drugiego palca cynkowego [21, 42]. W związku z tym, wiele genów np. T₃-zależnych jest obiektem kontroli retinoidów. Taka współregulacja odgrywa zasadniczą rolę w funkcji omawianych hormonów w rozwoju i różnicowaniu, a także powoduje funkcjonalne podobieństwo [37]. Różnorodność efektów biologicznych wywoływanych przez poszczególne hormony zapewnia orientacja heksanukleotydydowych połówek motywu wiążącego receptor, liczba par zasad oddzielających połowki (przerwy) oraz niewielkie różnice w sekwencji nukleotydydowej połówek motywu wiążącego HRE [10, 13].

2. RECEPTOR RETINOIDU X

Przyłączanie z wysokim powinowactwem małych receptorów do ich sekwencji regulatorowych DNA jest stabilizowane przez koregulatory – jądrowe białka pomocnicze NAP (*nuclear auxiliary proteins*), kontaktujące się z danym receptorem poprzez konserwatywne sekwencje C-terminalne, które funkcjonują jako miejsca dimeryzacji [30, 35, 46]. Białka te są szeroko rozpowszechnione i charakteryzują się różnymi ciężarami cząsteczkowymi, w różnych typach komórek. W większości przypadków, NAP są identyfikowane jako zdolne do tworzenia heterodimerów receptory retinoidu X [1, 37, 46].

U ludzi (i kręgowców) zidentyfikowano 3 geny RXR (α, β, γ). U myszy zlokalizowano je w chromosomie 2, 17 i 1. Mysi RXR γ generuje dwie pochodne białkowe ($\gamma 1$ i $\gamma 2$) różniące się długością domeny A-B [14, 24, 26]. Transkrypty RXR α i β ulegają powszechnej ekspresji zarówno w czasie rozwoju, jak i w tkankach osobników dorosłych, natomiast ekspresja RXR γ zachodzi w kilku określonych miejscach [6, 16, 18]. W okresie płodowym RXR γ pojawia się wraz z RXR α w nabłonkach wielowarstwowych (naskórek, jama ustna), a niezależnie w liniach komórek miogennych, tj. w miotomach i ich pochodnych (pierwotne mięśnie tułowia, kończyn i ogona) oraz w niektórych częściach płodowego ośrodkowego układu nerwowego (międzymózgowie, kresomózgowie, rdzeń kręgowy) [6]. W tkankach dojrzałych stwierdzono eks-

presję mRNA RXR α przede wszystkim w: wątrobie, nerkach, płucach, naskórku, śledzionie, mięśniach i skórze; z kolei mRNA dla RXR γ wykryto w: wątrobie, nerkach, płucach, naskórku, nadnerczach i mózgu. Transkrypty RXR β występują w większości badanych tkanek [14].

RXR, opisany początkowo jako receptor sierocy, okazał się być aktywowany przez wykryty w nerkach i wątrobie izomer 9-cis kwasu retinowego (9cRA), który wiąże i aktywuje wszystkie podtypy RXR w stężeniach fizjologicznych [15]. 9cRA jest wspólnym ligandem dla RXR i RAR, chociaż RXR reprezentuje inną podrodzinę receptorów jądrowych powstałą niezależnie w ewolucji [1, 14, 21]. 9cRA wiąże się z RXR z mniejszym powinowactwem i przy wyższych stężeniach ($> 10^{-6}$ M) niż z RAR przez co jest silniejszym stymulatorem transkrypcji poprzez RAR β czy RAR γ niż przez któryś z RXR. Poza 9cRA ligandem dla RAR jest izomer all-trans kwasu retinowego (atRA) a dla RXR - nietretinoidowe eikozanoidy [1, 6, 14, 44]. 9cRA i atRA wiążą się z RAR z porównywalną siłą i oba mogą być naturalnymi hormonami retinoidowymi regulującymi szlaki RAR-zależne [1].

RXR różni się istotnie od RAR: strukturą pierwszorzędową, powinowactwem do naturalnych i syntetycznych retinoidów oraz sposobem regulacji genów docelowych [1, 14, 20]. Ponieważ RXR, w odróżnieniu od RAR wykryto u bezkręgowców przypuszcza się, że szlak sygnałowy 9cRA/RXR mógł wyprzedzać atRA/RAR w czasie ewolucji. Przynależność RXR i RAR do różnych podrodzin, aktywowanie przez różne naturalne ligandy i łączenie się z różnymi HRE wskazują, że oba te szlaki sygnalizacji retinoidowej ewoluowały niezależnie i spełniają różne role fizjologiczne, przy czym RXR spełnia podwójną funkcję: jako niezależny receptor dla 9cisRA i jako partner heterodimerski w różnych szlakach metabolicznych [14, 46]. Pomimo wielu różnic, dzięki heterodimerom sygnały przekazywane przez receptory retinoidów mogą być zbieżne [10, 25].

3. DIMERY RECEPTOROWE

Warunkiem efektywnej ekspresji genu docelowego jest dimeryzacja receptorów. VDR, RXR, RAR i TR są zdolne do homodimerszacji, jak i heterodimerszacji we wszystkich możliwych kombinacjach [38]. Transaktywacji sprzyja łączenie się receptorów małych w heterodimery, pomiędzy sobą lub (najczęściej) z receptorem retinoidu X [1, 14, 22, 25, 37, 46]. Sygnalizacja jądrowa z udziałem receptorów małych może więc być zależna od RXR (heterodimery z RXR, homodimery RXR), bądź niezależna od RXR i odbywać się przez:

1) tworzenie odpowiednich homodimerów, o innych niż heterodimery RXR właściwościach wiązania DNA [13, 37, 38,];

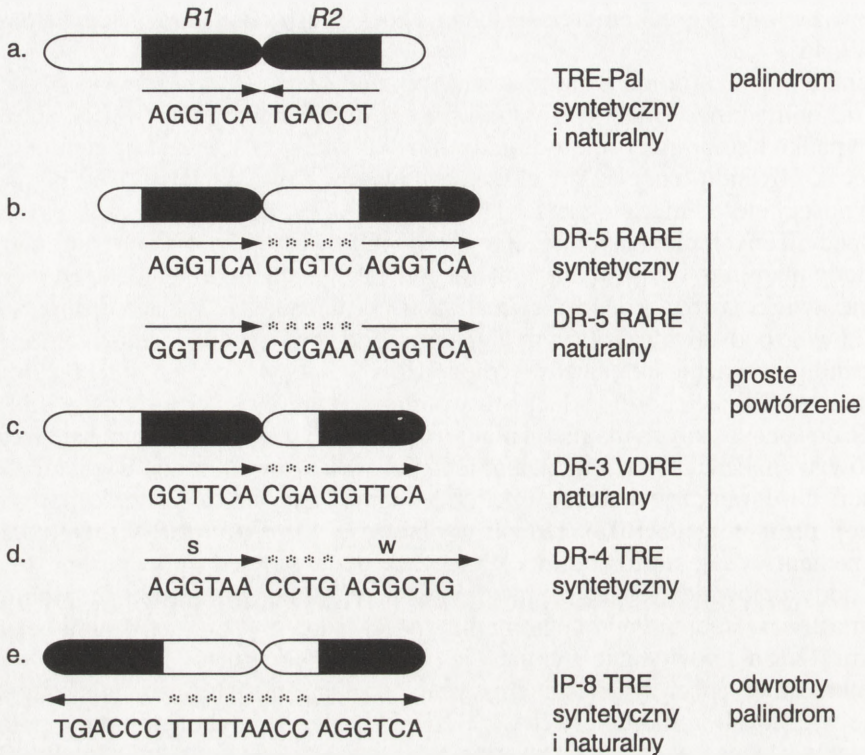
2) tworzenie heterodimerów między sobą, tzn. bez RXR, co powoduje nakładanie się sygnałów hormonalnych pochodzących od odpowiednich ligandów. Składniki heterodimerów nie zawierających RXR, nie spełniają względem siebie funkcji białek NAP, np. TR *in vivo* nie zwiększa wiązania RAR do sekwencji, takich jak RARE,

ponieważ w większości komórek nie ulegają koekspresji w wystarczających ilościach [38, 39, 46].

Generalnie, heterodimery podwyższają powinowactwo receptorów do DNA, bardziej niż homodimery, ale w różny sposób względem poszczególnych HRE. Zarówno w przypadku homo-, jak i heterodimerów do aktywacji często wystarcza pojedyncza cząsteczka ligandu, chociaż zwiększenie powinowactwa do DNA i funkcjonalnej aktywności heterodimerów (np. RXR-TR, RXR-VDR, RXR-RAR) może wymagać obu specyficznych dla danych receptorów ligandów [14, 37, 38]. Heterodimer staje się wtedy miejscem bezpośredniej interakcji funkcjonalnej pomiędzy hormonami co istotnie zwiększa różnorodność sygnalizacji hormonalnej [37]. Heterodimeryzacja spełnia więc podstawową rolę w modulacji transkrypcji genów docelowych zależnej od ligandu i wskazuje na kluczową rolę RXR (i 9cRA) w T₃-, RA- i VD-zależnych szlakach sygnalizacji hormonalnej, który preferencyjnie zwiększa wiązanie RAR, TR i VDR do specyficznych dla nich HRE [46]. Transkrypcyjne nakładanie się różnych szlaków sygnalizacyjnych z udziałem receptorów jądrowych może wynikać z kompetencji do ograniczonej liczby RXR (np. hamowanie przez TR zależnej od RA indukcji promotora RARβ2). Jednak w obecności samego 9cisRA preferowanym połączeniem wydaje się homodimer RXR-RXR, ponieważ pod wpływem tego ligandu RXR oddysocjuje z każdego z możliwych heterodimerów i formuje homodimery, natomiast wcześniej utworzone homodimery RXR koegzystują z różnymi heterodimerami RXR nie powodując wymiany ich białkowego partnera [14].

Heterodimery, poza zwiększaniem wydajności wiązania DNA, zmieniają repertuar miejsc wiążących homodimery RAR, RXR, TR jako, że wybór orientacji połówek motywu wiążącego wraz z przerywnikiem może zależeć od kontaktów białko-białko zachodzących w dimerach [13, 25, 37]. Kooperacja odpowiednio przestrzennie dopasowanych powierzchni dimeryzacyjnych zwiększa powinowactwo dimeru receptorowego do określonego HRE. Domeny odpowiedzialne za dimeryzację i wiązanie DNA (C i E) wydają się być głównymi determinantami wiązania receptora do elementów HRE zawierających powtórzone motywy o różnej orientacji z przerywnikiem o zmiennej długości [25], choć można też przyjąć, że różne powierzchnie dimeryzacyjne biorą udział w stabilizacji wiązania do różnych elementów odpowiedzi [37]. Współdziałanie domeny C i E jest możliwe dzięki występowaniu bardzo giętkiego połączenia zawiasowego (domena D). Uważa się, że zarówno w homo- jak i heterodimerach RAR, TR i RXR, domena C jest odpowiedzialna za selekcję elementów wiążących (rys. 1), podczas gdy powierzchnie dimeryzacyjne w rejonie E są odpowiedzialne za siłę wiązania niezależnie od elementu wiążącego, tj. niespecyficznie. Brak powierzchni homodimeryzacyjnej w domenie C TR i RAR sprzyja ich funkcjonowaniu przede wszystkim w postaci heterodimerów z RXR, uzależniając stopień odpowiedzi na dany hormon od zawartości RXR w komórce [16, 25].

Domena C rozpoznaje sekwencje DNA wrażliwe na małe receptory za pomocą pierwszego (region *P-box*) i drugiego (region *D-box*) palca cynkowego. Wśród aminokwasów *P-box* ludzkiego TR zasadniczo rozpoznających TRE-specyficzne fragmenty DNA (pierwsza reszta aminokwasowa *P-box*) częściowo zlokalizowany jest potencjał transaktywacyjny: drugi aminokwas *P-box* nie uczestniczy bezpośred-



Rys. 1. Zmienność konfiguracyjna receptorów tworzących heterodimer wynikająca z asymetrii domeny C i zawiasowego działania domeny D, umożliwiające rozpoznanie motywów wiążących o różnej orientacji połówek HRE (strzałki) i długości przerywnika (kropki); R1, R2 – domeny C receptorów tworzących heterodimer: część jasna to region A/T domeny C położony poza palcami cynkowymi, powodujący jej asymetrię; część ciemna zawiera "palce cynkowe"; S i W – odpowiednio "silne" i "słabe" połówki HRE, o różnej sekwencji nukleotydów i różnej sile wiązania receptorów

nie w wiązaniu DNA, lecz jest kluczowym czynnikiem w aktywacji transkrypcyjnej [32]. W RXR α 8-aminokwasowa helisa położona za drugim palcem cynkowym stanowi powierzchnię interakcji białko-białko i może decydować strukturalnie o selektywności dimeryzacyjnej RXR [25, 37]. Aminokwasy kodowane w regionach A- i T-box, położonych poza palcami cynkowymi wpływają też na specyficzną receptorowo asymetrię domeny C. Obrót asymetrycznej domeny C wokół zawiasu w postaci domeny D stwarza możliwość kontaktu różnych powierzchni domen wiążących DNA receptorów tworzących dimer, zmienia odległość dzielącą ich palce cynkowe, a tym samym, nie wpływając na przebieg dimeryzacji z udziałem domeny E, pozwala rozpoznawać różnie zorientowane motywy HRE z przerywnikiem o różnej długości (rys. 1). Na tej zasadzie RXR mogą używać odmiennych powierzchni kontaktu do interakcji z RAR, TR czy VDR, a odpowiednie heterodimery będą odczytywać różne HRE.

Funkcja dimeryzacyjna, która jest zlokalizowana w domenie E stabilizuje, lecz zasadniczo nie zmienia repertuaru ustalonego przez odpowiednią domenę C. W niektórych przypadkach powierzchnie homo- lub heterodimeryzacyjne związane z domeną E mogą odgrywać rolę w definiowaniu selektywności HRE [25]. Istotne w dimeryzacji wydają się być konserwatywne odcinki domeny C-terminalnej, podobne do "suwaka" leucynowego uczestniczącego w interakcjach białko-białko czynników transkrypcji. Podstawowe dla heterodimeryzacji ludzkiego VDR na VDRE są reszty aminokwasowe między lizyną-382 i arginina-402, a szczególnie lizyna-382, metionina-383, glutamina-385 i leucyna-390. Niezbędna w heterodimeryzacji VDR jest także leucyna-332, zamykająca inny konserwatywny region między aminokwasem 325 i 332. Trzeci ważny region dimeryzacyjny domeny E stanowi 20 aminokwasów odpowiadających resztom 224–263 ludzkiego VDR, z dominującą rolą leucyn: 254 i 262. Region ten jest porównywalny z konserwatywną domeną receptora glukokortykoidów niezbędną do wiązania białek szoku termicznego HSP90. Wszystkie trzy konserwatywne regiony dimeryzacyjne domeny E przypominają analogiczne w TR i RAR. W TR β , który podobnie jak inne receptory małe nie łączy się z białkami HSP, region trzeci uczestniczy w homodimeryzacji [11, 30]. Domenie E przypisuje się homokooperatywne wiązanie RXR do większości HRE oraz RAR i TR do wszystkich elementów, do których się one przyłączają. Silniejsze interakcje pomiędzy powierzchniami heterodimeryzacyjnymi RAR i RXR zlokalizowanymi w domenie E w porównaniu z homo-interakcjami powierzchni dimeryzacyjnych RXR powodują, że heterodimery RXR-RAR wiążą się silniej z określonymi HRE niż homodimery RXR [25].

4. INTERAKCJE RECEPTOR-HRE

Związanie ligandu z receptorem aktywuje kompleks ligand(y)-dimer-HRE, który wpływa na szybkość transkrypcji genowej. Efektem jest zazwyczaj stymulacja, lecz może nim być także inhibicja, jak to ma miejsce w ujemnym sprzężeniu zwrotnym z udziałem TSH wydzielanego w przysadce mózgowej. Skutek uzależniony jest od rodzaju HRE powiązanego z określonym promotorem [28, 29, 46]. *In vivo* lub *in vitro* homo- i heterodimery mogą oddziaływać z HRE różniącymi się:

- (1) orientacją połówek motywu wiążącego (rys. 1a, 1b-d, 1e);
- (2) liczbą par zasad w przerywniku oddzielającym połowki HRE (rys. 1b–e);
- (3) długością sekwencji nukleotydowych połówek;
- (4) obu sekwencjami wiążącymi dimer;
- (5) sekwencjami każdej z połówek w obrębie danego HRE (rys. 1d).

Możliwa asymetria motywów wiążących (np. pkt 1 i 5) wraz ze strukturalną polarnością tandemu receptorowego występującą w heterodimerach może być istotnym parametrem w transaktywacji specyficznej promotorowo [29]. Konfiguracja sekwencji nukleotydowej połówek motywu wiążącego decyduje nie tylko o specyficzności, ale także o sile działania HRE. Zmienność konfiguracji HRE zwiększa

różnorodność szlaków sygnalizacyjnych zależnych od receptorów małych, będącą wynikiem kombinacji ligandów, receptorów i elementów odpowiedzi.

TR, RAR, RXR i VDR (oraz ER) modulują transkrypcję poprzez konsensusowe sekwencje regulatorowe zawierające dwie lub więcej kopii stałego motywu heksanukleotydowego: (A/G)G(G/T)T(C/A)A [46]. RARE z połówką motywu GGTTCA lub AGGTCA są silniejsze niż RARE z innymi motywami. Motyw AGGTCA jest rozpoznawany preferencyjnie w stosunku do sekwencji AGTTCA [25]. Ponieważ jednak nukleotydy ograniczające końce 5' i 3' sekwencji AGGT(C/A)A mają zdolność zmieniania wiązania TR, ER i RAR poprzez silną, kilkunastokrotną zmianę aktywności HRE oraz determinowania specyficzności HRE, niewykluczone, że połówki HRE mogą mieć długość odpowiadającą nawet 10–11 nukleotydom [10].

Palindromowy układ motywu zasadniczego: AGGTCA TGACCT (TRE-pal), warunkuje odpowiedź transkrypcyjną na TR, RAR i RXR α . Układ składający się z prostych powtórzeń (DR): AGGTCA(n)_x AGGTCA, inicjuje specyficzne odpowiedzi transkrypcyjne w zależności od długości przerywnika (n) położonego między jego połówkami. I tak, przerywniki 1-, 3-, 4- i 5-nukleotydowe naturalnych i sztucznych HRE, zapewniają specyficzną transaktywację odpowiedzi dla RXR α , VDR, TR i RAR, podczas gdy przerywnik podwójny może powodować negatywną regulację przez TR [13, 14, 30, 37, 45, 46]. Nie oznacza to jednak ściślej specyficzności, bowiem poszczególne RAR mogą łączyć się z HRE zawierającymi proste powtórzenia rozdzielone przez 1, 2, 3, 4 lub 5 par zasad oraz odwrotny palindrom (IP) GGTC A z 8 parami zasad, podczas gdy RXR wiążą się z motywami DR rozdzielonymi przez 1, 2 i 5 par zasad [10, 14, 22]. Z powyższego zestawienia widać, że niektóre receptory mogą rozpoznawać ten sam HRE, ale ze skutkiem przeciwnym. Wiążąc się z określoną sekwencją DNA receptor może działać jako represor, negatywny regulator działania innych hormonów poprzez kompetencyjne blokowanie wspólnego HRE. W ten sposób np. receptor sierocy COUP-TF hamuje działanie RA poprzez DR-1 RARE, a RAR powoduje represję RXR zależnej aktywacji transkrypcji poprzez DR-1 RXRE genu CRBP-II [14].

Sekwencja połówek HRE determinuje rodzaj przyłączanego receptora, a tym samym może decydować o charakterze tworzonego na DNA tandemu receptorowego. Przykładowo, sekwencja AGGTCA reprezentuje elementy rozpoznające dla heterodimerów, ponieważ wiązanie *in vitro* do DR AGGTCA odpowiednich receptorów wymaga obecności RXR [13]. Sekwencje takie jak DR-3 AGTTCA mogą działać jako miejsca o wysokim powinowactwie dla ludzkiego VDR w nieobecności RXR (przyłączające monomery i homodimery). Heterodimer VDR-RXR także wiąże się silnie z tym motywem, ale z nieco niższym powinowactwem niż dla AGGTCA DR-3. Tak więc, heterodimer wiąże się do obu elementów odpowiedzi DR-3 (AGGTCA i AGTTCA), a homodimer tylko do AGTTCA. Prawdopodobnie, za różnicę w powinowactwie odpowiada para zasad (T/A) w trzeciej pozycji, krytyczna w homodimerycznym (ale nie w heterodimerycznym) rozpoznawaniu VDR. Wskazuje to na możliwość występowania dwóch różnych klas VDRE *in vivo* i dwóch funkcjonalnie ważnych odmian VDR: homo- i VDR-RXR heterodimerycznej.

Stopień aktywacji transkrypcyjnej zależy od receptorów jądrowych wynika także z molekularnych interakcji na innym poziomie niż wiązanie DNA i może obejmować bezpośrednie współdziałanie z czynnikami transkrypcji TF. Receptory małe, takie jak VDR, TR- β , czy sierocy COUP-TF1 asocjują z TFIIB, podstawowym czynnikiem limitującym szybkość formowania kompleksu przedinicyjacyjnego. Interakcja ta jest konieczna dla zależnej od ligandu aktywacji transkrypcji i *in vivo* jest dodatkowo modulowana przez komórkowo-specyficzny(e) czynnik(i) towarzyszący(e). Ludzki VDR oddziałuje fizycznie z TFIIB poprzez jego C-terminalny region, natomiast TR- β wymaga zarówno N-, jak i C-terminalnej domeny TFIIB. Interakcja TFIIB z czynnikami specyficznymi, *in vitro* odbywa się przez inne domeny niż te, które łączą się z czynnikami podstawowymi, np. z RNA polimerazą II. W interakcji VDR-TFIIB, ze strony receptora uczestniczy część proksymalna domeny wiążącej ligand (E) i prawdopodobnie domena wiążąca DNA. Interakcje receptorów małych z TFIIB przypominają oddziaływania *in vitro* opisane dla receptora progesteronowego [4].

4.1. INTERAKCJE Z UDZIAŁEM RXR

4.1.1. Heterodimery z RXR

RXR odgrywają istotną rolę w szlakach sygnałowych poprzez tworzenie heterodimerów z receptorami atRA, hormonu tarczycy i jego onkogennej pochodnej v-erb A, receptorem witaminy D₃ lub niektórymi receptorami sierocymi oraz homodimerów RXR/RXR [1, 6, 14, 22]. Połączenie z RXR wpływa na powinowactwo i, w niektórych przypadkach na selektywność wybieranych przez heterodimery sekwencji DNA [13]. Jest on absolutnie niezbędny do wiązania z wysokim powinowactwem RAR do DNA *in vitro* i nieznacznie zwiększają indukcję transaktywacji przez RAR *in vivo* [14]. Modyfikując wiązanie receptorów do DNA ułatwia spełnianie pozytywnych funkcji transkrypcyjnych tym z nich, które w danym typie komórek są obecne w niewielkiej liczbie (np. RAR występuje często poniżej 1000–5000 cząsteczek) [46]. Populacja RXR występuje w konformacji odpowiedniej dla tworzenia dimerów i wiązania się z HRE także podczas nieobecności ligandu, a jego przyłączenie powoduje tylko dalsze przesunięcie równowagi konformacyjnej w tym kierunku [22, 35].

Heterodimery z RXR funkcjonują poprzez wszystkie trzy konfiguracje HRE: proste powtórzenie, palindrom i odwrotny palindrom (rys. 1, tab. 2). W przypadku TR-RXR i RAR-RXR najbardziej specyficznymi HRE są odwrotne palindromy z przerwaniem odpowiednio 5, 6 lub 7, 8 [14, 37]. *In vivo* potwierdzono występowanie IP HRE dla TR w genie lizozymu kurcząt oraz dla RAR w mysim genie γ F-krystaliny [37]. Heterodimery te wykazują także maksymalną transaktywację i *in vitro* wiązanie DNA, kiedy motywem wiążącym jest DR oddzielone przez odpowiednio 1, 2, 4, lub 2, 5 nukleotydów bądź palindrom (TRE-pal). Heterodimery RXR/RAR wiążą się do DR-1 RXRE genu CRBP-II jako represory [14, 37, 45]. Powinowactwo heterodimerów RXR-RAR do prostego powtórzenia zależy od jego sekwencji nukleotydu, powinowactwo do palindromu takiej zależności nie wykazuje. Przykładowo, dla układu GTTCA hierarchia doboru DR przedstawia się następująco: DR-5>DR-2>DR-

TABELA 2. Przykłady HRE dla homo- i heterodimerów receptorów hormonu tarczycy i pochodnych witaminy A i D (skrótów jak w tekście); możliwe są interakcje dimerów z HRE przypisanymi w tabeli innym dimerom, np. RXR-RXR z DR-2, czy RXR-RAR z DR-1

HRE	DIMER	Orientacja połówek HRE i długość przerywnika	Przykłady genów zależnych
RXRE	RXR-RXR	DR-1	CRBP II, CRABP II
RARE	RXR-RAR	DR-2 DR-5 IP-8	CRBP I, CRABP II RAR (α, β, γ) – zależne γ F-kryształina
VDRE	RXR-VDR	DR-3	ludzka i szczurza osteokalcyna mysia osteopontyna szczurza kalbindyna ludzka osteokalcyna
	VDR-VDR	DR-6	
	VDR-RAR		
	VDR-TR	DR-3	mysia osteopontyna szczurza kalbindyna
	VDR-TR	DR-4	mysia kalbindyna
TRE	RXR-TR	DR-4	geny TR-zależne

4>>DR-3>DR-1; natomiast dla motywu GGTC A: DR-5=DR-4>DR-2>DR-1>DR-3. W obu przypadkach obserwowano brak wiązania do DR-0. Wiązanie heterodimerów RXR-TR jest najsilniejsze do DR-4 niezależnie od sekwencji połówki motywu wiążącego. Odróżnia to wymienione typy heterodimerów od odpowiednich homodimerów [25].

Heterodimery VDR-RXR mogą wiązać się z optymalnym powinowactwem do HRE składających się z DR dwóch heksamerycznych połówek GGGTGA, AGGTCA lub AGTTCA motywu wiążącego oddzielonych 3-nukleotydowym przerywnikiem (VDRE DR-3) [13, 30]. Funkcjonalna aktywność heterodimerów VDR-RXR wydaje się wymagać obu specyficznych ligandów, sugerując bezpośrednią interakcję pomiędzy VD i 9-cisRA [38]. Sekwencje DNA VDRE zidentyfikowano *in vivo* w rejonach promotorowych genów kodujących niekolagenowe białka kości (osteokalcyna, osteopontyna) oraz wiążące wapń (kalbindyna) (tab. 2, rys. 1) [13, 30, 38, 39].

Sekwencyjna asymetria motywu DR, różniąca go od palindromu, sugerowała występowanie polarność w interakcjach białko-DNA i/lub pomiędzy powierzchniami dimeryzacyjnymi białek receptorowych w odniesieniu do heterodimerów receptor-RXR. Eksperymentalnie potwierdzono, że białka receptorowe wiążą się z sekwencją DR jako asymetryczny tandem (*head-to-tail*). RXR okupuje połówkę 5' (a RAR - 3') zarówno w DR-2, jak i DR-5 RARE w heterodimerach RAR-RXR, oraz w DR-4 TRE (a TR - 3') w heterodimerach TR-RXR [13, 14, 22, 25].

Na przykładzie RXR-TR wykazano istotność niewielkich różnic w sekwencjach dwóch połówek motywu wiążącego DR HRE, które przez to w różnym stopniu mogą być odpowiedzialne za siłę wiązania receptorów do DNA i transaktywację przy

udziale z natury swej asymetrycznych heterodimerów. Na tej podstawie w motywie wiążącym TRE dokonano rozróżnienia połówki "silnej" (S – typowa: AGGTAA) i "słabej" (W – o zmienionej sekwencji) różniących się powinowactwem do monomerów α -TR i β -TR (rys. 1) [10]. Liczba i kolejność silnych i słabych miejsc wiążących TR do DR-4 TRE determinuje czy pośredniczy ono w zależności od ligandu (T_3 i 9cRA), czy niezależnej aktywacji transkrypcji (bądź hamowaniu), wpływa na specyficzność wiązania homodimerów TR oraz heterodimerów NAP-TR i TR-RXR γ . Powinowactwo podjednostki TR heterodimeru TR-RXR do połówki 3', która jest silna (S) determinuje maksymalną transaktywację. Homodimery łączą się przede wszystkim z TRE utworzonymi z 5'-S i 3'-W (SW) i odwrotnym (WS) układem połówek. Heterodimery TR-RXR γ – z SW lepiej niż z WS; heterodimery TR-NAP – z WS niż z SW. W sumie, heterodimery TR-NAP łączą się z motywami wiążącymi w kolejności SS>WS>SW; heterodimery TR-RXR: SS>SW>WS.

4.1.2. Homodimery RXR

Wiązanie 9cRA przez RXR powoduje strukturalną zmianę białka receptorowego, która faworyzuje konfigurację receptora kompetentną dla homodimeryzacji, a następnie do wiązania kompleksów homodimerycznych RXR z DNA oraz określa warunki aktywacji transkrypcyjnej kompleksów RXR związanych z HRE zlokalizowanym w regionie promotorowym genów zależnych od 9cRA. Przemiana strukturalna pod wpływem wiązania ligandu dotyczy znacznego regionu białka receptorowego i może prowadzić do zmiany różnych funkcji domeny E RXR. Region ten w RXR α myszy kończy się na Ser-229 położonej w obrębie domeny D. *In vitro* 9cRA nasila formowanie homodimerów RXR w nieobecności DNA. W obecności specyficznych HRE zwiększa się stabilność homodimerów RXR, prawdopodobnie poprzez formowanie bardziej stabilnego potrójnego kompleksu ligand-homodimer RXR-HRE [22].

9cRA powoduje formowanie i wiązanie homodimerów RXR z kilkoma HRE o różnej orientacji co sugeruje, że odmienne powierzchnie dimeryzacyjne mogą uczestniczyć w każdym z tych przypadków, a interakcje białko-białko zachodzące w czasie formowania homodimeru mogą być inne niż odpowiednie interakcje heterodimeryczne (np. z TR) [1, 14]. Homodimery RXR wykazują znaczną preferencję wiązania się z DR-1 (tab. 2) [25], ale wiążą się także silnie z DR-2, z syntetycznym TRE-pal, z β RARE, z DR-5 RARE. Helisa zlokalizowana za drugim palcem cynkowym pośredniczy zarówno w interakcji białko-białko, jak i białko-DNA niezbędnej do kooperacyjnego homodimerycznego wiązania domeny C RXR do DR-1 RXRE [14].

Nakładające się występowanie różnych typów RXR w niektórych tkankach sprzyja tworzeniu dimerów pomiędzy nimi [6]. Będą to więc różne homodimery RXR, podobnie jak różne RXR mogą uczestniczyć w formowaniu heterodimerów z określonym partnerem białkowym [14]. Różnice tego typu mogą determinować specyficzność tkankową działania retinoidów przy powszechnym występowaniu ich receptorów w tkankach.

4.2. Interakcje bez udziału RXR

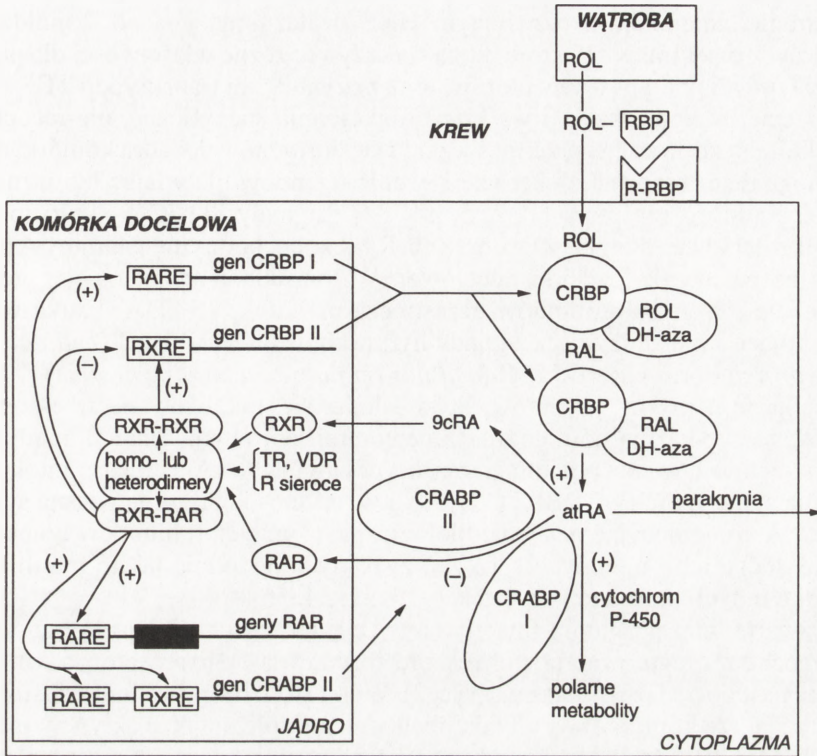
Homodimery wiążą się mniej wydajnie do ich HRE niż odpowiednie heterodimery, co wynika z mniejszej stabilności homodimerycznych kompleksów na DNA. *In vitro*, heterodimery tworzą się na połówkach HRE w warunkach, w których odpowiednie homodimery nie mogłyby się związać. Z drugiej strony homodimery RXR nie łączą się z połówkami HRE, nawet w wysokich stężeniach białka, w których inne homodimery wiążą się z DNA, co świadczy, że powinowactwo homodimerów RXR do niektórych motywów HRE (np. G(G/T)TCA) jest niższe niż homodimerów RAR lub TR [25].

Homodimery wykazują też częściowo odmienną specyficzność wiązania DNA w stosunku do ich heterodimerów z RXR (tab. 2, rys. 2). Optymalny przerywnik dla TR-TR i RAR-RAR wynosi odpowiednio 4 i 5 nukleotydomów w prostym powtórzeniu, 0 w palindromie i odpowiednio 8 i 10 dla odrotnego palindromu. Oznacza to, że wymienione homodimery różnią się od heterodimerów w odniesieniu do IP [37].

Homodimery VDR preferują VDRE DR-6, np. w VDRE ludzkiej osteokalcyny, oraz sztuczne VDRE utworzone przez palindromy bez przerywnika (P0) lub odwrotne palindromy z 12-nukleotydomowym przerywnikiem (IP-12) [38]. Ludzki VDR wiąże się też silnie z VDRE pochodzącym z genu mysiej osteopontyny (GGTTCA DR-3) lub z pokrewnym, syntetycznym AGTTCA DR-3. *In vitro*, ludzki VDR występujący w roztworze jako monomer może wiązać się z motywem DR-3 zarówno jako dimer, jak i monomer (podobnie do niektórych receptorów sierocych) (tab. 2) [13].

Spośród heterodimerów powstających bez udziału RXR można wymienić VDR-RAR, powstający na VDRE DR-6 ludzkiej osteokalcyny i wymagający do maksymalnej aktywności obu specyficznych ligandów, oraz VDR-TR wykazujący aktywność funkcjonalną zarówno na VDRE ludzkiej osteokalcyny, jak i na VDRE DR-3 mysiej osteopontyny, jednak z różnym skutkiem. W pierwszym przypadku następuje efekt addytywny VDR i TR w stosunku do transaktywacji, w drugim - indukcja ekspresji genu pod wpływem TR [38]. W genie białka wiążącego wapń - kalbindyny, HRE dla heterodimerów VD jest DR-3 (u szczura) lub DR-4 (u myszy) (tab. 2). Wśród motywów wiążących o orientacji odwrotnego palindromu wykazano maksymalne powinowactwo heterodimerów VDR-TR do IP-7 [39].

Heterodimer VDR-TR wykazuje polarność wiązania do motywu VDRE DR-3 odmienną niż dla DR-4. W DR-3, TR łączy się z połówką 5' (VDR z 3'), natomiast w DR-4 - z 3' (VDR z 5'). Taką samą polarność obserwowano w odwrotnych palindromach (z natury swej symetrycznych), w których asymetrię zapewniały odmiennie nukleotydy sąsiadujące z każdą z połówek. Położenie VDR w pozycji 3' zapewniało większą wrażliwość heterodimeru na VD już w niskich stężeniach, dlatego m.in. uważa się, że aktywność transkrypcyjną w heterodimerach kontroluje ligand rozpoznawany przez receptor 3' [39].



Rys. 2. Wewnątrzkomórkowa autoregulacja ekspresji genów zależnych od receptorów jądrowych, na przykładzie receptorów kwasów retinowych: (+) – stymulacja; (–) – hamowanie; ROL – retinol; RAL – retinal; RBP – białko wiążące retinol; R-RBP – receptor RBP; ROL DH-aza – dehydrogenaza retinolowa; RAL DH-aza – dehydrogenaza retinalowa; czarny prostokąt – drugi promotor, specyficzny dla danego genu RAR; pozostałe skróty jak w tekście

5. AUTOREGULACJA SYGNAŁOWA ZALEŻNA OD LIGANDU

Analiza mechanizmu działania receptorów małych wskazuje, że istnieje cały szereg czynników determinujących efektywną interakcję aktywowanego przez ligand receptora z wybranym HRE [1] nie tylko na poziomie jądra komórkowego, ale także w obrębie cytoplazmy komórkowej i we krwi (rys. 2). Po pierwsze, zasięg występowania cząsteczek hormonu musi pokrywać się z dystrybucją ustrojową białek receptorowych, aby ligand mógł być osiągalny dla receptora. Pojawienie się hormonu w danej komórce powoduje selekcję określonego receptora, powstanie homo- lub heterodimeru, a w końcu wybór HRE sprzężonego z konkretnym promotorem genu strukturalnego. W stosunku do heterodimerów ważnym czynnikiem może być równoczesne pojawienie się w jądrze dwóch różnych ligandów.

Po drugie, interakcja z określonym HRE uzależniona jest od współdziałania receptorów z białkami NAP, które mogą wykazywać różne właściwości dla poszczególnych typów i podtypów receptorów, oraz z czynnikami transkrypcji TF.

Po trzecie, w komórkach (i we krwi) funkcjonują specyficzne, nie-receptorowe białka, które uczestniczą w przemieszczaniu się hormonów do jądra komórki docelowej i mogą determinować efektywne stężenie ligandów ułatwiając lub utrudniając dostęp ligandu do receptora [1, 2, 5, 14, 34]. Ligandy dla RXR, który odgrywa centralną rolę w heterodimeryzacji, oraz dla RAR są pochodnymi witaminy A powstającymi już na terenie komórki docelowej. W transdukcji sygnałowej z udziałem biologicznie czynnych retinoidów uczestniczą małe (ok. 15 kDA) białka wiążące, transportujące i metabolizujące ligandy hydrofobowe: CRBP I i II (*cellular retinol binding protein*) oraz CRABP I i II (*cellular retinoic acid binding protein*) [9, 19, 20, 33]. Białka te u myszy, szczurów, krów i ludzi są zlokalizowane w cytoplazmie komórek, nie wykazują homologii z receptorami jądrowymi i nie są mediatorami działania retinoidów na poziomie transkrypcyjnym. 9cRA i atRA, autokrynowo stymulują syntezę białek CRBP i CRBAP, i w ten sposób regulują własną syntezę z retinolu. Autoregulacyjne działanie biologicznie czynnych retinoidów opiera się na zasadzie dodatnich i ujemnych sprzężeń zwrotnych podobnie jak to ma miejsce w przypadku innych hormonów (ryc. 2) [1, 14, 31, 34, 36].

Po czwarte, niezależnie od funkcji aktywacji receptora inicjującej transkrypcję, ligand może sam regulować poziom ekspresji genu własnego receptora a tym samym wpływać na jego podaż komórkową (ryc. 2). Wiąże się to bezpośrednio z dostępnością ligandu w jądrze komórkowym. I tak, pochodne retinolu, a także aktywny metabolit witaminy D₃ - 1,25(OH)₂D₃, pobudzają syntezę swoich własnych receptorów zwiększając ich liczbę [1, 14, 34, 36, 43]. Mechanistycznie oznacza to, że ligand i jego receptor działają na poziomie transkrypcji genu receptora powodując pozytywne autoregulacyjne sprzężenie zwrotne, oraz na etapie posttranskrypcyjnym stabilizując białko receptorowe. W przypadku 1,25(OH)₂D₃ mechanizm ten jest podobny u ssaków i drożdży, co świadczy o jego konserwatywnym charakterze. Regulacja za pomocą ligandu dotyczy tylko specyficznego receptora i pozostaje bez wpływu na ekspresję innych białek receptorowych (np. ER) [36]. Nie jest ani promotorowo, ani tkankowo specyficzna.

Autoregulacyjne działanie 9cRA jest słabiej zbadane niż atRA. Nie znamy jeszcze szlaku metabolicznego prowadzącego do syntezy 9cRA. Wymaga wyjaśnienia czy jego występowanie jest ograniczone do metabolizujących komórek czy jest także transportowany z krwią [1, 2, 5]. Być może ligand dla RXR powstaje w czasie wytwarzania atRA dzięki specyficznej izomerazie. Poza tym działanie 9cRA jest niezależne od białek CRABP, z którymi nie łączy się, lub zachodzi przy udziale innych białek [14]. Jeśli 9cRA nie współpracuje z komórkowymi białkami wiążącymi może być bardziej dostępny dla jądrowych receptorów retinoidów [1]. Udział 9cRA w autoregulacji transdukcji sygnałowej polega na kontrolowaniu ekspresji genu CRABP-II na poziomie transkrypcyjnym i posttranskrypcyjnym [1, 14, 34].

Znacznie więcej można powiedzieć na temat transdukcji sygnałowej i jej autoregulacji zależnej od atRA. Po wnikięciu do komórki docelowej retinol łączy się z

CRBP I (w jelicie cienkim z CRBP II), który chroni go przed oksydacyjnym działaniem niespecyficycznych dehydrogenaz mikrosomalnych i cytoplazmatycznych oraz bierze udział w przemianie do atRA przy udziale specyficznych dehydrogenaz (ryc. 2). atRA może:

(1) opuścić komórkę jako czynnik parakrynowy;

(2) uczestniczyć w autokrynowej regulacji ekspresji genów RAR-zależnych; lub

(3) łączyć się z CRBP I zapobiegającym przedostawaniu się atRA do jądra komórkowego i interakcji z receptorem, a następnie ulec katabolicznej przemianie do bardziej polarnych metabolitów [1, 9, 14, 19, 20, 31].

CRBP I nie jest syntetyzowany we wszystkich komórkach znajdujących się pod kontrolą retinoidów. Te komórki, w których nie występuje wykazują większą wrażliwość na atRA, ponieważ ligand jest bardziej osiągalny dla receptora jądrowego [1].

atRA dostający się do jądra komórkowego powoduje aktywację genów CRBP-I oraz silną autoindukcję ekspresji RAR (wszystkie trzy geny RAR zawierają RARE w jednym ze swoich dwóch promotorów) [14, 41, 43]. W pierwszym przypadku skutkiem będzie wzrost syntezy atRA, w drugim – jego receptorów; w obu przypadkach przez sprzężenie zwrotne dodatnie. Promotor genu CRBP-II, który zawiera zarówno RXRE (DR-1) jak i RARE (DR-2), jest także obiektem regulacji atRA-zależnej (ryc. 2) [14, 34]. Nie wiadomo, czy CRBP II spełnia podobną funkcję jak CRBP I, ale jeśli regulacja syntezy CRBP I odbywa się podobnie, to indukcja ekspresji genów CRBP przez atRA stanowi przykład ujemnego sprzężenia zwrotnego.

O istnieniu systemu ujemnego sprzężenia zwrotnego uczestniczącego w regulacji genów zależnych od kwasów retinowych świadczy działanie receptora sierociego COUP-TF1, którego homolog występujący u *Drosophila* uczestniczy w tworzeniu oka i ośrodkowego układu nerwowego. COUP-TF1 ulega indukcji pod wpływem pochodnych retinolu w komórkach P19, formuje heterodimery z RXR i powoduje represję aktywacji genowej zależnej od RXR, na przykład CRBP-II RARE regulowanego przez homodimery RXR [18]. Z drugiej jednak strony promotor RAR β 2, który zawiera RARE i jest aktywowany przez heterodimery RAR/RXR, jest stosunkowo niewrażliwy na COUP-TF1.

Przebieg autoregulacji w sygnalizacji retinoidowej uzależniony jest od interakcji dimerów receptorowych z DNA. Z kolei rodzaj dimerów efektywnych w aktywacji transkrypcji wynika z dostępności do konkretnego ligandu. W obecności 9cRA, RXR odgrywa rolę niezależnego receptora tworzącego tandemy RXR-RXR, w obecności atRA - kofaktora dla RAR. Zarówno homodimery RXR, jak i heterodimery RXR/RAR wiążą się silnie z CRBP-II DR-1 RXRE z tym, że RXR-RXR doprowadza do aktywacji transkrypcji, podczas gdy wiązanie heterodimeru może powodować represję transkrypcji. Działanie heterodimeru RAR-RXR wydaje się specyficzne genowo, ponieważ ten sam kompleks aktywuje transkrypcję wiążąc się z RXRE DR-1 mysiego promotora CRBP II [7, 17]. Który ze szlaków retinoidowych zostanie uruchomiony, zależy od stężenia atRA i 9cRA, poprzez kontrolę szybkości formowania kompleksów homo- i heterodimerycznych pomiędzy RAR i RXR (rys. 2) [14, 46].

LITERATURA

- [1] ALLEGRETTO E, MCCLURG M, LAZARCHIK S, CLEMM D, KERNER S., ELGORT M, BOEHM M, WHITE S, PIKE J, HEYMAN R. Transactivation properties of retinoic acid and retinoid X receptors in mammalian cells and yeast. *J Biol Chem* 1993; **268**: 26625–26633.
- [2] BAVIK C, BUSCH C, ERICKSSON U. Characterization of a plasma retinol-binding protein membrane receptor expressed in the retinal pigment epithelium. *J Biol Chem* 1992; **267**: 23035–23042.
- [3] BEATO M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 1989; **56**: 335–344.
- [4] BLANCO J, WANG I, TSAI S, TSAI M, O'MALLEY B, JURUTKA P., HAUSSLER M, OZATO K. Transcription factor TFIIIB and the vitamin D receptor cooperatively activate ligand-dependent transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 1535–1539.
- [5] BLANER W. Retinol-binding protein: the serum transporter protein for vitamin A. *Endocr Rev* 1989; **10**: 308–316.
- [6] DOLLE P, FRAULOB V, KASTNER P, CHAMBON P. Developmental expression of murine retinoid X receptor (RXR) genes. *Mech Dev* 1994; **45**: 91–104.
- [7] DURAND B, SAUNDERS M, LEROY P, LEID M, CHAMBON P. All-trans and 9-cis retinoic acid induction of CRABPII transcription is mediated by RAR-RXR heterodimers bound to DR1 and DR2 repeated motifs. *Cell* 1992; **71**: 73–85.
- [8] EVANS R. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988; **240**: 889–895.
- [9] FOGH K, VOORHESS J, ASTROM A. Expression, purification, and binding properties of human cellular retinoic acid-binding protein type I and type II. *Arch Biochem Biophys* 1993; **300**: 751–755.
- [10] FORCE W, TILLMAN J, SPRUNG C, SPINDLER S. Homodimer and heterodimer DNA binding and transcriptional responsiveness to triiodothyronine (T₃) and 9-cis-retinoic acid are determined by the number and order of high affinity half-sites in a T₃ response element. *J Biol Chem* 1994; **269**: 8863–8871.
- [11] FORMAN B, YANGE C, AU M, CASANOVA J, GHYSDAEL J., SAMUELS H. A domain containing leucine-zipper-like motifs mediate novel *in vivo* interactions between the thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Mol Endocrinol* 1989; **3**: 1610–1626.
- [12] FREEDMAN L. Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocr Rev* 1992; **13**: 129–145.
- [13] FREEDMAN L, ARCE V, FERNANDEZ R. DNA sequences that act as high affinity targets for the vitamin D₃ receptor in the absence of the retinoid X receptor. *Mol Endo* 1994; **8**: 265–273.
- [14] GIGUERE V. Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling. *Endo Rev* 1994; **15**: 61–79.
- [15] HEYMAN R, MANGELSDORF D, DYCK J, STEIN R, EICHELE G, EVANS R, THALLER C. 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 1992; **68**: 397–406.
- [16] HODIN R, MENG S, CHAMBERLAIN S. Thyroid hormone responsiveness is developmentally regulated in the rat small intestine: a possible role for the α -2 receptor variant. *Endocrinology* 1994; **135**: 564–568.
- [17] HUSMANN M, HOFFMANN B, STUMP D, CHYTIL F, PFAHL M. A retinoic acid response element from the rat CRBPI promoter is activated by an RAR/RXR heterodimer. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **187**: 1558–1564.
- [18] JONK L, DE JONGE M, VERVAART J, WISSINK S, KRUIJER W. Isolation and developmental expression of retinoic-acid-induced genes. *Dev Biol* 1994; **161**: 604–614.

- [19] KOPEĆ-SZŁĘZAK J. Rola komórek gwiaździstych w metabolizmie witaminy A. *Post Biol Kom* 1992; **19**: 77–86.
- [20] KWIATKOWSKA J. Kwas retinowy reguluje procesy wzrostu i różnicowania. *Post Biochem* 1992; **38**: 32–36.
- [21] LAUDET V., HANNI C., COLL J, CATZEFLIS F, STEHELIN D. Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J* 1992; **11**: 1003–1013.
- [22] LEID M. Ligand-induced alteration of the protease sensitivity of retinoid X receptor. *J Biol Chem* 1994; **269**: 14175–14181.
- [23] LIPIŃSKA B. Rola białek szoku termicznego. *Post Biochem* 1990; **1-2**: 32-42.
- [24] LIU Q, LINNEY E. The mouse retinoid-X receptor-gene: evidence for functional isoforms. *Mol Endocrinol* 1993; **7**: 651–658.
- [25] MADER S, CHEN J, CHEN Z, WHITE J, CHAMBON P, GRONEMEYER H. The patterns of binding of RAR, RXR and TR homo- and heterodimers to direct repeats are dictated by the binding specificities of the DNA binding domains. *EMBO J* 1993; **12**: 5029–5041.
- [26] MANGELSDORF D, BORGMAYER U, HEYMAN R, ZHOU J, ONG E., ORO A, KAKIZUKA A, EVANS R. Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis-retinoic acid. *Genes Dev* 1992; **6**: 329–344.
- [27] McDONNELL D, CLEVENGER B, DANA S, SANTISO-MERE D, ZUKERMAN M, GLEESON M. The mechanism of action of steroid hormones: a new twist to an old tale. *J Clin Pharmacol* 1993; **33**: 1165–1172.
- [28] NAAR A, BOUTIN J, LIPKIN S, YU V, HOLLOWAY J, GLAS C., ROSENFELD M. The orientation and spacing of core DNA-binding motifs dictate selective transcriptional responses to three nuclear receptors. *Cell* 1991; **65**: 1267-1279.
- [29] NAGPAL S, SAUNDERS M, KASTNER P, DURAND B, NAKSHATRI H., CHAMBON P. Promoter context- and response element-dependent specificity of the transcriptional activation and modulating functions of retinoic acid receptors. *Cell* 1992; **70**: 1007–1019.
- [30] NAKAJIMA S, HSIEH J, MACDONALD P, GALLIGAN M, HAUSSLER C, WHITFIELD G, HAUSSLER M. The C-terminal region of the vitamin D receptor is essential to form a complex with a receptor auxiliary factor required for high affinity binding to the vitamin D-responsive element. *Mol Endo* 1994; **8**: 159–172.
- [31] NAPOLI J. Biosynthesis and metabolism of retinoid acid: roles of CRBP and CRABP in retinoic acid homeostasis. *J Nutr* 1993; **123**: 362–366.
- [32] NELSON C, FARIS J, HENDY S, ROMANIUK P. Functional analysis of the amino acids in the DNA recognition α -helix of the human thyroid hormone receptor. *Mol Endo* 1993; **7**: 1185–1195.
- [33] ONG D. Cellular retinoid-binding proteins. *Arch Dermatol* 1987; **123**: 1693-1695.
- [34] PILETTA P SAURAT J. Cellular retinoic acid-binding proteins (CRABP). *Exp Dermatol* 1993; **2**: 191–195.
- [35] REFETTOFF S. How clinical observations of a congenital disease can be translated in terms of molecular biology. *Persp Biol Med* 1994; **37**: 315–326.
- [36] SANTISO-MERE D, SONE T, HILLIARD G, PIKE J, MCDONNELL D. Positive regulation of the vitamin D receptor by its cognate ligand in heterologous expression systems. *Mol Endo* 1993; **7**: 833–839.
- [37] SCHRADER M., CARLBERG C. Thyroid hormone and retinoic acid receptors form heterodimers with retinoid X receptors on direct repeats, palindromes and inverted palindromes. *DNA Cell Biol* 1994; **13**: 333–341.
- [38] SCHRADER M, MULLER K, CARLBERG C. Specificity and flexibility of vitamin D signaling. *J Biol Chem* 1994; **269**: 5501–5504.
- [39] SCHRADER M, MULLER K, NAYERI S, KAHLEN J, CARLBERG C. Vitamin D₃-thyroid hormone receptor heterodimer polarity directs ligand sensitivity of transactivation. *Nature* 1994; **370**: 382–386.

- [40] SŁOMCZYŃSKA M. Receptory hormonów steroidowych – budowa i funkcja. *Post Biol Kom* 1995; **22**: 3–21.
- [41] SMITH W, NAKSHATRI H, LEROY P, REES J, CHAMBON P. A retinoic acid response element is present in the mouse cellular retinol binding protein I (mCRBPI) promoter. *EMBO J* 1993; **10**: 2223–2230.
- [42] SOKÓŁ-MISIAK W. Jądrowe receptory jako czynniki regulujące transkrypcję. *Post Biochem* 1992; **38**: 12–23.
- [43] SUCOV H, MURAKAMI K, EVANS R. Characterization of an autoregulated response element in the mouse retinoic acid receptor type β gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 5392–5396.
- [44] TAIRIS N, GABRIEL J, GYDA M., SOPRANO K, SOPRANO D. Arg 269 and Lys 220 of retinoic acid receptor- β are important for the binding of retinoic acid. *J Biol Chem* 1994; **269**: 19516–19522.
- [45] UMESONO K, MURAKAMI K, THOMPSON C, EVANS R. Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D receptors. *Cell* 1991; **65**: 1255–1266.
- [46] YU V, DELSERT C, ANDERSEN B, HOLLOWAY J, DEVARY O, NAAR A, KIM S, BOUTIN J, GLASS C, ROSENFELD M. RXR: A coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements. *Cell* 1991; **67**: 1251–1266.

Otrzymano: 29.12. 1995 r.

Przyjęto: 05.03.1996 r.

Adres autora: II Katedra Histologii i Embriologii, Śląska Akademia Medyczna, 40-757 Katowice-Ligota, ul. Medyków 20

GENETYCZNE PODSTAWY TRANSFORMACJI NOWOTWOROWEJ JELITA GRUBEGO*

GENETIC BACKGROUND OF COLORECTAL CARCINOGENESIS

Wanda Małgorzata KRAJEWSKA, Wojciech MŁYNARSKI, Magdalena WÓJCIK

Katedra Cytobiochemii, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie. W pracy przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat zmian w aparacie genetycznym komórki leżących u podstaw karcynogenezy jelita grubego. Transformacja nowotworowa prawidłowego nabłonka jelita grubego uwarunkowana jest przez mutacje zarówno o charakterze dziedzicznym, jak i somatycznym. Nowotwory jelita grubego są wynikiem akumulacji efektów inaktywacji genów przeciwnowotworowych, aktywacji protoonkogenów oraz mutacji genów zaangażowanych w poreplikacyjną naprawę DNA. W transformacji nowotworowej jelita grubego szczególną rolę wydają się odgrywać mutacje genów *APC*, *DCC*, *MCC*, *p53*, *ras*, *hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1* i *hPMS2* prowadzące do zmiany struktury i funkcji ich produktów białkowych.

Słowa kluczowe: karcynogeneza jelita grubego; geny przeciwnowotworowe: *APC*, *DCC*, *MCC*, *p53*; protoonkogeny: *ras*; geny naprawy poreplikacyjnej: *hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1*, *hPMS2*.

Summary. This review presents the contemporary knowledge on molecular events that underline the initiation and progression of colorectal carcinogenesis. Both inherited and somatic genetic alterations contribute to the transition of normal colonic epithelium to a carcinoma. Colorectal carcinomas appear to arise as a result of the inactivation of tumor suppressor genes and the activation of protooncogenes, as well as the mutation of the genes involved in maintaining DNA fidelity during replication. Current data suggest the particular role of *APC*, *DCC*, *MCC*, *p53*, *ras*, *hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1*, *hPMS2* genes and their protein product alterations in colorectal cancer development.

Key words: colorectal carcinogenesis; tumor suppressor genes: *APC*, *DCC*, *MCC*, *p53*; protooncogenes: *ras*; mismatch repair genes: *hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1*, *hPMS2*.

1. WSTĘP

Rak jelita grubego jest jednym z najczęstszych nowotworów złośliwych człowieka i doskonałym modelem złożonego i wielostopniowego procesu karcynogenezy. W

*Praca dofinansowana w ramach badań własnych UE, projekt badawczy nr 505/652

trakcie przemian komórki prawidłowej w nowotworową nabywa ona wielu nowych cech, takich jak: nieograniczona proliferacja, nieśmiertelność (immortalizacja), inwazyjność czy zdolność do dawania przerzutów. Każda z tych cech wiąże się ze zwiększeniem potencjału złośliwości, czyli przejściem komórek prawidłowych do stadium gruczolaka (*adenoma*), a następnie gruczolakoraka (*adenocarcinoma*). Stadium gruczolaka rozpoczyna się od łagodnej formy nowotworowej zwanej gruczolakiem typu cewkowego (*adenoma tubulare*), kosmkowego (*adenoma villosum*) lub cewkowo-kosmkowego (*adenoma tubulovillosum*), w którym stopniowo narastają zmiany histologiczne, takie jak: zaburzenie architektониki tkanki, atypia komórkowa, wzrost wskaźnika jądrowo-cytoplazmatycznego, zwiększenie masy guza, a następnie przekroczenie błony podstawnej i zajęcie regionalnych węzłów chłonnych charakterystyczne dla postaci złośliwej. Największe ryzyko zachorowania na raka obserwuje się w przypadku gruczolaków kosmkowych (50–60%).

Rak jelita grubego powstaje na podłożu dziedzicznych predyspozycji genetycznych lub częściej, spontanicznie jako wynik przypadkowych mutacji somatycznych genomu nabłonka błony śluzowej. Zaobserwowano również, że wiele czynników środowiskowych, dieta, a także pewne choroby o podłożu autoimmunologicznym (*colitis ulcerosa*) mogą przyspieszać nabywanie złośliwości przez komórki jelita grubego.

2. WRODZONE PREDYSPOZYCJE DO ROZWOJU NOWOTWORÓW ZŁOŚLIWYCH JELITA GRUBEGO

Wyróżniono wiele zespołów chorobowych dziedziczących się jako cechy mendelowskie autosomalne, które są podłożem dla nowotworzenia w obrębie jelita grubego. Można je podzielić na trzy grupy, mianowicie:

1^o zespoły, które predysponują do powstawania bardzo dużej ilości polipów zwiększających znacznie ryzyko powstania raka jelita grubego,

2^o zespoły nie związane z powstawaniem dużej ilości polipów, ale w których gruczolaki mają znaczny potencjał złośliwości,

3^o zespoły, w których punktem wyjścia przemiany złośliwej są polipy hamartomatyczne wywodzące się z komórek embrionalnych [7].

Przykładem z pierwszej grupy jest gruczolakowa polipowatość rodzinna – FAP (ang. *familial adenomatous polyposis*) będąca zespołem klinicznym objawiającym się występowaniem setek lub tysięcy polipów w błonie śluzowej jelita. Prowadzi ona praktycznie w 100% przypadków do raka gruczolowego, najczęściej umiejscowionego w dystalnej części okrężnicy. Odmianą FAP jest zespół Gardnera, w którym gruczolakom jelita grubego towarzyszą zmiany poza jelitami typowe dla zespołu FAP, a ponadto torbiele gruczolów łojowych skóry, kostniaki, guzy tkanki łącznej oraz zespół Turcota charakteryzujący się współistnieniem gruczolaków okrężnicy i guzów neuroektodermalnych.

Ważnym zespołem z drugiej grupy, predysponującym do raka gruczołowego jest zespół dziedzicznego raka niepolipowatego jelita grubego – HNPCC (ang. *hereditary nonpolyposis colorectal cancer*). Występuje on w dwóch podstawowych postaciach: w pierwszej nowotwór dotyczy tylko błony śluzowej jelita (zespół Lynch I), w drugiej natomiast guz jelita współistnieje z rakiem gruczołowym endometrium, jajnika, układu moczowego, żołądka, trzustki lub dróg żółciowych (zespół Lynch II). Innym zespołem klinicznym w tej grupie jest gruczolakowa polipowatość rodzinna o małej ilości polipów – AAPC (ang. *attenuated adenomatous polyposis coli*) będąca postacią poronną FAP.

Zmiany hamartomatyczne powstają na podłożu zaburzeń różnicowania komórek w rozwoju embrionalnym. Nowotwory złośliwe w grupie zespołów hamartomatycznych pojawiają się bardzo rzadko. Zespoły kliniczne predysponujące do powstania nowotworów jelita grubego przedstawiono w tabeli 1.

3. ZMIANY GENETYCZNE W KARCINOGENEZIE JELITA GRUBEGO

Analiza cytogenetyczna spontanicznych gruczolakoraków jelita grubego wykazała istnienie aberracji dotyczących zarówno liczby, jak i struktury chromosomów. Aneuploidię obserwuje się najczęściej w przypadku chromosomów 7, 13, 14, 15, 18, 20 i Y. Zmiany struktury dotyczą natomiast głównie chromosomów 1, 7, 8, 13 i 17 [3].

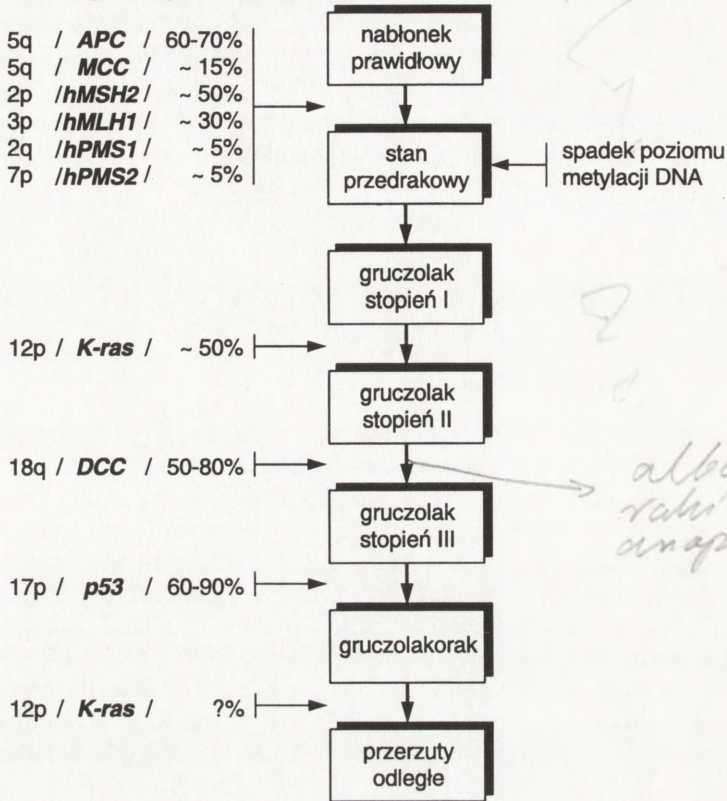
Nowoczesnymi technikami biologii molekularnej można identyfikować mutacje w locus określonych genów. Stwierdzono, że w neoplazmatycznej przemianie nabłonka błony śluzowej jelita grubego dochodzi od trzech do siedmiu mutacji w obrębie różnych genów, tj. genów przeciwnowotworowych, onkogenów oraz genów odpowiedzialnych za naprawę DNA. Szczególnie często delecje alleli zaobserwowano w regionach 5q, 17p oraz 18q zawierających loci odpowiednio dla genu *APC* (ang. *adenomatous polyposis coli*), *MCC* (ang. *mutated in colorectal cancer*), *p53* oraz *DCC* (ang. *deleted in colorectal cancer*), a mutacje punktowe w obrębie chromosomu 12p w locus protoonkogenu *K-ras* [7, 15, 37, 70]. Wykazano, że zmiany w genomie komórki w czasie transformacji nowotworowej są ściśle zlokalizowane w czasie i skorelowane z przekształceniem polip–gruczolak–rak. Na tej podstawie Fearon i Vogelstein [19] zaproponowali model sekwencji zmian genetycznych towarzyszących powstawaniu gruczolakoraka jelita grubego (rys. 1). W modelu tym pojawienie się zmian w obrębie prawidłowej błony śluzowej jelita grubego predysponujących do powstania raka związane jest z dziedzicznymi i somatycznymi mutacjami w genie *APC*. Kolejne mutacje w obrębie genu *MCC*, a także obniżenie poziomu metylacji DNA, stanowiące czynnik epigenetyczny, wydają się być odpowiedzialne za powstawanie gruczolaków. Wzrostowi wielkości i dysplazji gruczolaków towarzyszą mutacje w genach *K-ras* i *DCC*, a ostatecznemu przekształceniu w raka gruczołowego zmiana w obrębie genu *p53*.

TABELA 1. Dziedziczne zespoły* predysponujące do raka jelita grubego (wg [7], zmienione)

Zmiany w obrębie jelita grubego	Zmiany poza jelitem
<i>Predyspozycja do dużej ilości polipów</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • gruczolakowa polipowatość rodzinna (FAP) setki lub tysiące gruczolaków prowadzących do raka gruczołowego • zespół Gardnera jw. • zespół Turcota różna liczba gruczolaków, może być mniej niż 100 	<p>polipy dwunastnicy, łagodne hipertroficzne polipy dna żołądka, gruczolaki żołądka, wrodzony przerost nabłonka siatkówki, rak tarczycy (u kobiet), astrocytoma, medulloblastoma, hepatoblastoma</p> <p>jak w przypadku FAP oraz torbiele gruczołów łojowych skóry, kostniaki, guzy tkanki łącznej</p> <p>jak w przypadku FAP oraz guzy neuroektodermalne</p>
<i>Predyspozycja do małej ilości polipów</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • gruczolakowa polipowatość rodzinna o małej ilości polipów (AAPC) różna ilość gruczolaków od pięciu do kilkuset • zespół dziedzicznych płasko naciekających (niepolipowatych) gruczolaków różna ilość gruczolaków, zwykle mniej niż 100 • zespół dziedzicznego raka niepolipowatego (HNPCC) kilka gruczolaków prowadzących do raka gruczołowego • zespół Lynch I • zespół Lynch II • zespół Muir-Torrea 	<p>polipy gruczołów dna żołądka</p> <p>możliwe różne ogniska neoplastyczne</p> <p>brak</p> <p>rak endometrium, układu moczowego, jajnika, żołądka, trzustki i dróg żółciowych</p> <p>jak w przypadku zespołu Lynch II oraz guzy gruczołów łojowych, rak podstawnokomórkowy i kolczystokomórkowy skóry</p>
<i>Predyspozycje do polipów hamartomatycznych</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • zespół Peutz-Jegersa • polip młodzieńczy • zespół Gorlina kilka polipów młodzieńczych • zespół Cowdena, polipy młodzieńcze i gruczolaki, 	<p>hiperpigmentacja jamy ustnej, rak sutka, macicy, jajników, jąder</p> <p>microcephalia, niedorozwój umysłowy, drożny uchyłek Meckela</p> <p>rak podstawnokomórkowy, znamiona barwnikowe, zwapnienia patologiczne, wady żeber</p> <p>brodawczakowatość śluzówki jamy ustnej, włókniaki, tłuszczaki, naczyniaki, wady układu nerwowego, rozrosty łagodne i złośliwe tarczycy oraz sutka</p>

* Wszystkie zespoły dziedziczą się autosomalnie dominująco z wyjątkiem zespołu Turcota, który dziedziczy się w sposób autosomalny recesywny.

Chromosom /gen/ częstość mutacji



Rys. 1. Molekularne podstawy transformacji nowotworowej jelita grubego (wg [19], zmienione)

W nowotworach spontanicznych, w tym również nowotworach, których rozwój nie jest uwarunkowany występowaniem zmian polipowatych, szczególną rolę pełnią mutacje genów naprawy poreplikacyjnej błędnie sparowanych zasad (ang. *mismatch repair genes*), będących homologami układów naprawczych typu mutS i mutL bakterii. Loci dla tych genów zlokalizowano na chromosomach 2p, 2q, 3p i 7p [4, 67].

Biorąc pod uwagę zmiany cytogenetyczne sugeruje się podział raków jelita grubego na trzy typy:

1^o MT (ang. *monosomic type*) charakteryzujący się dużą ilością delecji chromosomowych oraz zaburzeń strukturalnych chromosomów, endoreplikacją, obniżoną ekspresją genu i obniżoną aktywnością syntazy tymidylanowej, lokalizacją guza najczęściej w dystalnym odcinku okrężnicy (70% przypadków),

2^o TT (ang. *trisomic type*), w którym występuje mniejsza ilość zmian cytogenetycznych, brak endoreplikacji, wysoka ekspresja genu i wysoka aktywność syntazy tymidylanowej, przewaga lokalizacji w proksymalnym odcinku okrężnicy (20–25% przypadków),

3^o NT (ang. *normal type*) mający prawidłowy kariotyp oraz wysoką ekspresję genu i wysoką aktywność syntazy tymidylanowej, w większości lokalizację w proksymalnym odcinku okrężnicy (7% przypadków). W przypadku typów TT i NT obserwuje się występowanie niestabilności sekwencji mikrosatelitarnych związanych z błędami replikacji DNA (fenotyp RER, ang. *replication errors*). Fakt ten może sugerować, że istnieją co najmniej dwa sposoby inicjacji przemian nowotworowych, tj. uszkodzenie chromosomów i/lub zaburzenie naprawy poryplikacyjnej [53].

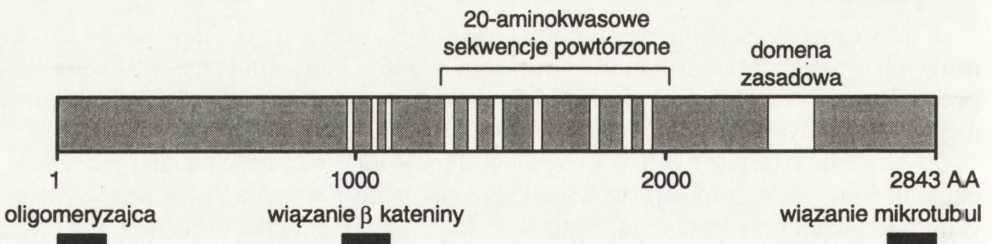
4. MUTACJE GENÓW PRZECIWNOWOTWOROWYCH

APC

W zespole gruczolakowej polipowatości rodzinnej FAP predysponującym do powstawania raka jelita grubego zaobserwowano występowanie delecji w chromosomie 5q21. W locus tym zidentyfikowano gen *APC*, którego zmiany stwierdzono nie tylko w nowotworach okrężnicy rozwijających się na podłożu zmian dziedzicznych (zespół FAP, Gardnera, Turcota, AAPC), ale również nowotworów spontanicznych. Fakt występowania mutacji w genie *APC* z podobną częstością w przypadku gruczolaków (63%) i gruczolakoraków (60–77%) wskazuje na udział tego genu we wczesnych etapach transformacji nowotworowej komórek [26, 36, 39, 47].

Gen *APC* zbudowany jest z 15 eksonów, w którym eksony 1–14 obejmują około 2000 par zasad, a ekson ostatni – około 6500 par zasad. Region kodujący po stronie 5' genu zawiera niekodujące sekwencje, których alternatywne składanie odpowiedzialne jest za istnienie odmiennych transkryptów [26, 34, 39, 66].

Przyпуска się, że produkt białkowy genu *APC* zaangażowany jest w proliferację komórek, a jego funkcja związana jest z rolą cytoszkieletu w tym procesie. Gen *APC* koduje hydrofobowe białko o masie cząsteczkowej ponad 300 000 zawierające 2843 aminokwasy (rys. 2). W jego obrębie stwierdzono występowanie wielu potencjalnych miejsc glikozylacji, fosforylacji i mirystylacji. Za pomocą technik immunologicznych stwierdzono, że białko APC zlokalizowane jest w cytoplazmie. Analizą komputerową cDNA genu *APC* i sekwencji produktu białkowego wykazano, że



Rys. 2. Strukturalne i funkcjonalne domeny białka APC (wg [54], zmienione)

koniec 5' aminowy zawiera krótkie, około 20-aminokwasowe odcinki homologiczne do białek strukturalnych typu miozyna, keratyna, wimentyna, czy białka neurofilamentów. W regionie N-terminalnym zidentyfikowano ponadto występowanie kilku powtarzających się 7-aminokwasowych sekwencji aminokwas apolarny-XX-aminokwas apolarny-XXX zdolnych do tworzenia amfipatycznych α -heliksów umożliwiających tworzenie homo- i heterooligomerów. Domena środkowa zawiera natomiast 7-krotnie powtórzone 20-aminokwasowe odcinki o sekwencji F-X-VE-X-TP-X-CFSR-X-SSLSSLS. W domenie tej znajdują się również trzy 15-aminokwasowe sekwencje powtórzone (kodony 1020–1169) stanowiące miejsce interakcji z β -kateniną, białkiem cytoplazmatycznym wiążącym się z kadherynami zaangażowanymi w oddziaływanie międzykomórkowe. Ostatnio wykazano, że białko APC i E-kadheryna asocjują z kateninami tworząc podobne, ale niezależne kompleksy. Stwierdzono również, że białko APC wiąże się *in vivo* z mikrotubulami [26, 54, 61].

Najczęstszymi mutacjami w obrębie genu *APC* są delecje jednego lub dwóch nukleotydów oraz insercje o charakterze mutacji nonsensownych i mutacji miejsc składowania prowadzące do zmiany ramki odczytu i powstania skróconego produktu białkowego. Większość mutacji (ponad 90%) zlokalizowana jest po stronie 5' genu (kodony 1–1597). W klasycznym zespole polipowatości rodzinnej FAP oraz 50–60% nowotworów spontanicznych mutacje występują przede wszystkim po stronie 5' eksonu 15 (kodony 713–1597). W zespole klinicznym AAPC charakteryzującym się łagodniejszym przebiegiem (choć ryzyko zachorowania na raka jest wyższe) zmiany genu *APC* dotyczą głównie eksonów 1–4 [16, 26, 47, 49, 52, 61, 63]. Zróżnicowane fenotypowe efekty zmutowanego genu *APC* wydają się być wynikiem stopnia skrócenia produktu białkowego, manifestując się zmianą jego zdolności do oligomeryzacji i tworzenia kompleksów z białkami cytoszkieletu [27]. Mutacje genu *APC* zaobserwowano nie tylko w nowotworach jelita grubego, ale również w nowotworach przełyku, żołądka, jelita cienkiego, kości, skóry, czy układu nerwowego, co wskazuje, że ekspresja tego genu ma miejsce w wielu tkankach prawidłowych i sugeruje uniwersalną rolę jego produktu białkowego.

DCC

Alleliczne delecje lub mutacje punktowe na ramieniu długim chromosomu 18 pojawiają się w około 50% gruczolaków oraz 70–80% gruczolakoraków jelita grubego. W regionie 18q21 Fearon i wsp. [20] zlokalizowali gen *DCC*. Stwierdzono, że utrata heterozygotyczności (LOH –ang. *loss of heterozygosity*) lub/i brak produktu białkowego tego genu towarzyszą nie tylko nowotworom jelita grubego, ale także nowotworom przełyku, żołądka, trzustki, prostaty, układu krwiotwórczego, endometrium, komórek zarodkowych czy glejaków. Transfekcja genu *DCC* do ludzkich komórek epitelialnych o fenotypie nowotworowym hamuje ich zdolność do wzrostu i tworzenia guzów [40].

Gen *DCC* ma wielkość 1,4 megapar zasad i składa się z 29 eksonów, co pozwala sklasyfikować go jako jeden z największych zidentyfikowanych dotychczas genów przeciwnowotworowych. Mutacje somatyczne tego genu związane są z delecją końca

DCC → adhesion molecule 106 superfamily
 glikoprotein - 170 kD - 150 kD

5' w obu allelach lub mutacją punktową czy insercją DNA w obrębie jednego z intronów. Gen *DCC* koduje polipeptyd zbudowany z 1447 aminokwasów o charakterze białka błonowego wykazującego sekwencyjną homologię z cząsteczkami adhezyjnymi komórek nerwowych (N-CAMs, ang. *neural cell adhesion molecules*) i odpowiadających im glikoprotein powierzchniowych zaangażowanych prawdopodobnie w interakcje komórek i transmisję sygnałów komórkowych. W strukturze pierwszorzędowej domeny zewnątrzkomórkowej białka, odpowiadającej około 1100 aminokwasom, zidentyfikowano 25-aminokwasową sekwencję sygnałową typową dla białek związanych z błoną komórkową, 328-aminokwasową sekwencję zawierającą cztery regiony homologiczne do domeny C2 immunoglobulin oraz sześć powtórzonych regionów o charakterze fibronektyny typu III. Poprzez hydrofobowy 25-aminokwasowy odcinek transbłonowy domena zewnątrzkomórkowa łączy się z 325-aminokwasową domeną cytoplazmatyczną. Masa cząsteczkowa białka *DCC* waha się w granicach 153 000–170 000 i zależy prawdopodobnie od glikozylacji domeny zewnątrzkomórkowej na grupach aminowych asparaginy.

Ekspresję genu *DCC* zaobserwowano w wielu różnicowanych i niedzielących się komórkach prawidłowych. Przypuszcza się, że obniżenie lub brak ekspresji genu *DCC* prowadzi do zaburzeń kontroli wzrostu i różnicowania komórek. Analiza zależności pomiędzy utratą ekspresji genu *DCC* i poziomu różnicowania komórek nabłonka jelita grubego wykazała, że nowotworom charakteryzującym się brakiem różnicowania komórek nabłonka jelita grubego towarzyszy utrata genu *DCC*. Natomiast w przypadku nowotworów śluzotwórczych częstość mutacji genu *DCC* jest bardzo niska. Pozwala to sugerować istnienie co najmniej dwóch szlaków karcynogenezy jelita grubego – jeden związany z utratą genu *DCC* i anaplazją komórek błony śluzowej oraz drugi nie związany z zaburzeniami genetycznymi w genie *DCC* [32].

MCC

Gen *MCC* zlokalizowany jest na chromosomie 5q21 w odległości 150 000–300 000 par zasad od genu *APC* [38]. Mutacje genu *MCC* obserwuje się w około 15% nowotworów jelita grubego, przy czym pojawiają się one z częstością znaczącą statystycznie w nowotworach spontanicznych, a rzadziej występują w polipowatości rodzinnej. Są to najczęściej mutacje punktowe zmiany sensu.

Gen *MCC* ulega ekspresji w wielu tkankach prawidłowych kodując białko o długości 829 aminokwasów i masie cząsteczkowej około 93 000. W obrębie białka *MCC* zidentyfikowano region (aminokwasy 220–248) o sekwencji zbliżonej do regionu cholinergicznego receptora muskarynowego m3mAChR (ang. *m3 muscarinic acetylcholine receptor*; aminokwasy 249–277) regulującego specyficzność wiązania białek G. Wydaje się to interesujące w świetle wcześniejszych badań wskazujących na rolę białkowych produktów onkogenów *ras* należących do rodziny białek G czy produktu genu przeciwnowotworowego *NF1* (ang. *neurofibromatosis type 1*) zidentyfikowanego w nerwiakowłókniałości (choroba Recklinghausena), regulującego aktywność GTP-azową białek Ras w procesie karcynogenezy. Nie można również wykluczyć udziału białka *MCC* w transmisji sygnału poprzez białka G w

MCC - 93 kD

wyniku wzajemnych oddziaływań z białkiem APC. Jednak dotychczas nie udało się ustalić funkcji produktu genu *MCC*. Mutacje tego genu przeciwnowotworowego pojawiają się bardzo wcześnie w procesie nowotworzenia, tj. na etapie przejścia nabłonka prawidłowego w stadium gruczolaka. Występowanie mutacji w genie *MCC* głównie w przypadku nowotworów spontanicznych, podczas gdy w genie *APC* obserwuje się mutacje zarówno dziedziczne, jak i somatyczne, może sugerować z jednej strony różny udział obu genów w różnych nowotworach, z drugiej natomiast, że mutacja w tylko jednym z tych genów jest wystarczająca dla spowodowania podobnego efektu fenotypowego [39, 47].

p53

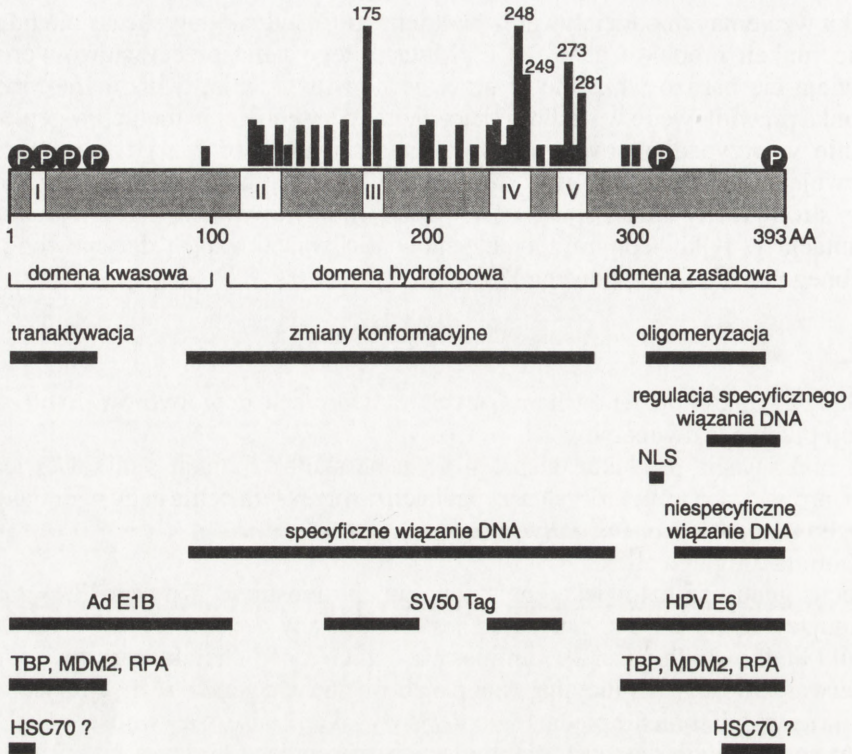
Gen *p53* należy do genów hamujących transformację nowotworową, a utrata jego funkcji przebiega dwuetapowo:

1^o inaktywacja produktu ekspresji genu na skutek mutacji punktowej jednego allele, prowadząca w niektórych przypadkach do przekształcenia genu *p53* w aktywny onkogen (ang. *dominant-negative mutation*),

2^o utrata drugiego allele.

Locus genu *p53* człowieka znaleziono na chromosomie 17p (17p13.1). Gen ten obejmujący około 20 000 par zasad jest zbudowany z 11 eksonów, które kodują produkt białkowy długości 393 aminokwasów. Gen *p53* charakteryzuje się znaczną konserwatywnością ewolucyjną. Analiza porównawcza genów różnych zwierząt pozwoliła na wyodrębnienie pięciu regionów o wysokiej konserwatywności – HCD (ang. *highly conservative domain*), obejmujących następujące kodony: 13–19 (HCD I), 117–132 (HCD II), 171–181 (HCD III), 234–258 (HCD IV) i 270–286 (HCD V).

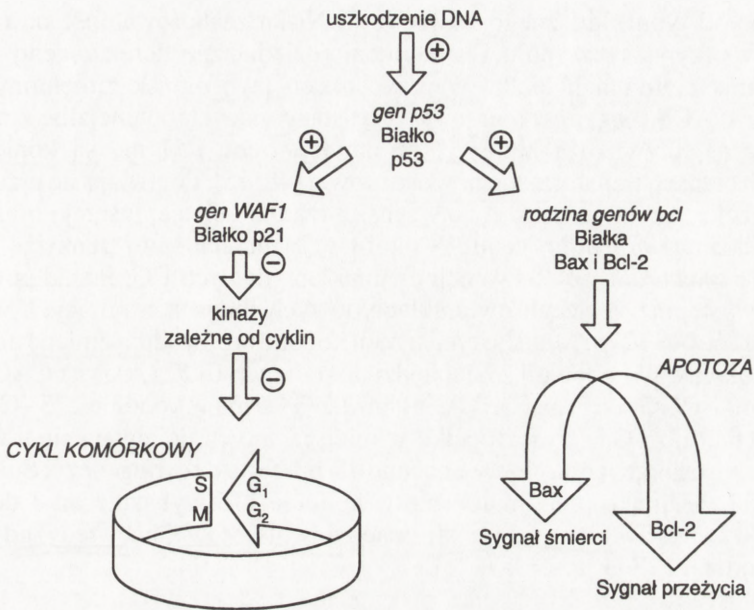
Produktem ekspresji genu przeciwnowotworowego *p53* jest fosfoproteina o masie cząsteczkowej 53 000. Na końcu aminowym białka przeważają aminokwasy kwaśne, a koniec karboksylowy zawiera liczne aminokwasy zasadowe. W tym też rejonie znajduje się sekwencja NLS (ang. *nuclear localization signal*) odpowiedzialna za transport białka *p53* do jądra komórkowego. Funkcjonalną postacią białka *p53* jest struktura tetrameryczna, która występuje tylko na obszarze jądra komórkowego. Okres połowicznego rozpadu prawidłowego białka *p53* wynosi około 20 minut, natomiast zmutowane białko może pozostawać w komórce do 12 godzin. Białko zmutowane może tworzyć heterodimery z białkiem prawidłowym, co wydłuża okres półtrwania tego ostatniego. Białko *p53* wykazuje zdolność wiązania się z innymi białkami komórkowymi, takimi jak: TBP (ang. *TATA-box binding protein*), RPA (ang. *eukaryotic replication protein A*), HSC70 (ang. *heat shock cognate protein*), czy z białkiem MDM2 (ang. *mouse double minute protein*) będącym fizjologicznym inaktywatorem białka *p53*. Ma ono także zdolność wiązania produktów białkowych wirusów onkogennych, co stanowi drugi po mutacjach mechanizm inaktywacji prawidłowej funkcji białka *p53*. Białko *p53* zaliczane do czynników transkrypcyjnych może łączyć się niespecyficznie z dwuniciowym i jednoniciowym DNA oraz z RNA poprzez domenę znajdującą się na C-końcu, jak również oddziaływać ze specyficz-



Rys. 3. Strukturalne i funkcjonalne domeny białka p53 (wg [65], zmienione): cyfry rzymskie – regiony konserwatywne ewolucyjnie; liczby arabskie i oznaczenie pionowe – częstość i lokalizacja mutacji; NLS – sygnał lokalizacji jądrowej; Ad E1B – białko E1B adenowirusa; SV40Tag – antygen T wirusa SV40; HPV E6 – białko E6 wirusa brodawczaka ludzkiego; TBP – białko wiążące się z sekwencją TATA-box; MDM2 – białko transformujące o aktywności inhibitora p53; RPA – białko A replikacji komórek eukariotycznych; HSC70 – białko typu szoku termicznego

nymi sekwencjami DNA poprzez domenę obejmującą aminokwasy od 100 do 300 (rys. 3) [5, 28, 35, 51, 56, 62, 65, 68].

Prawidłowe białko p53 regulując transkrypcję szeregu genów w wyniku oddziaływania z DNA (aktywacja genów hamujących wzrost) lub innymi czynnikami transkrypcyjnymi (represja genów stymulujących wzrost) oddziałuje na cykl komórkowy. Jako czynnik transkrypcyjny białko p53 aktywuje transkrypcję genu *WAF1* (ang. *wild-type p53-activated fragment 1*) [16]. Gen ten koduje białko p21, które łącząc się z kinazami zależnymi od cyklin, hamuje ich funkcję i w konsekwencji uniemożliwia wejście komórki w fazę S i przejście z fazy G_2 do M, co z kolei daje czas enzymom naprawiającym uszkodzenia nici DNA na reperację ewentualnych błędów. Jeżeli naprawa jest nieskuteczna, białko p53 może skierować komórkę na tor zaprogramowanej śmierci (apoptozy). Zaobserwowano, że wysoki poziom tego białka powoduje przesunięcie równowagi produktów ekspresji rodziny genów *bcl* na korzyść białka Bax poprzez obniżenie aktywności białka Bcl-2. Białko Bcl-2 uważa się za



Rys. 4. Schemat ilustrujący udział białka p53 w regulacji cyklu komórkowego i apoptozie

czynnik przeżycia komórki, natomiast białko Bax odpowiada za ukierunkowaną śmierć komórki. Obydwa te białka tworzą aktywne dimery (Bax-Bax, Bax-Bcl-2, Bcl-2-Bcl-2), a zaburzenie równowagi między ich stężeniami kieruje komórkę na drogę śmierci lub przeżycia (rys. 4) [28, 55, 59,72].

Białko p53 jest jednym z najważniejszych dotychczas poznanych regulatorów transkrypcji, cyklu komórkowego, reperacji DNA oraz ukierunkowanej śmierci komórki, co upoważnia do uznania go za główny czynnik hamujący procesy nowotworzenia każdej tkanki [10].

Mutacje w obrębie genu *p53* są najczęstszym defektem genetycznym towarzyszącym nowotworom wszystkich typów. Rozkład mutacji w obrębie genu jest nierównomierny. Znalaziono około 300 różnych mutacji punktowych w genie *p53*, z których większość (98%) zlokalizowana jest w eksonach od piątego do ósmego (kodony od 110 do 307). W tym obszarze występują cztery z pięciu regionów konserwatywnych (HCD II-V), przez co mutacje najprawdopodobniej indukują zmiany konformacyjne białkowego produktu ekspresji genu prowadzące do zmniejszenia obrotu metabolicznego białka p53 w komórce. Porównując częstość i lokalizację mutacji w genie *p53* wyodrębniono pięć tak zwanych miejsc gorących HSR (ang. *hot spot region*). Obejmują one kodony: 132–143 (HSR A), 151–159 (HSR A'), 172–179 (HSR B), 237–249 (HSR C) i 272–286 (HSR D). W tych miejscach zaobserwowano ponad 70% wszelkich mutacji genu *p53* [4, 14,33].

W przemianie neoplastycznej jelita grubego mutacje genu *p53* powodują przejście gruczolaka do stadium nowotworu złośliwego i występują w 60–90% raków jelita

niezależnie od typu klinicznego nowotworu. Niska zachorowalność na raka jelita grubego w przypadku zespołu Li-Fraumeni (dziedziczne defekty genu *p53*), jak również brak akumulacji białka w przypadkach tzw. ognisk zmienionych krypt jelitowych – ACF (ang. *aberrant crypt foci*) stanowiących potencjalne zmiany pre-neoplastyczne, potwierdza hipotezę, że mutacje genu *p53* nie są konieczne we wczesnych etapach transformacji nowotworowej [48, 75]. Pojawiają się przede wszystkim mutacje punktowe typu zmiany sensu i rzadko delecje, insercje oraz mutacje miejsc składania (*splicingu*) genu. W około 80% mutacji są to tranzykcje GC→AT i większość z nich dotyczy sekwencji dwunukleotydowych CG. Ponad połowa tych tranzykcji występuje w trzech dwunukleotydowych miejscach gorących w obrębie kodonów 175, 248 i 273. Mutacje tych trzech kodonów powodują zmianę argininy na inny aminokwas. W kodonie 175 dochodzi do tranzykcji CGC (Arg) na CAC (His), w kodonie 248 – CGG (Arg) na CAG (Gln) lub TGG (Trp) i w kodonie 273 – CGT (Arg) na CAT (His) lub TGT (Cys). Rzadko w miejscach tych pojawiają się transwersje. Mutacje miejsc gorących są nierównocenne dla procesu karcynogenezy. Stwierdzono na przykład, że białko *p53* zmutowane w kodonie 175 wykazuje od 3 do 10 razy większą aktywność w kierunku transformacji nowotworowej niż wtedy, gdy mutacja dotyczy kodonu 273 [1, 6, 13, 57, 76].

5. MUTACJE PROTOONKOGENÓW

Ras

Wykazano, że mutacje protoonkogenu *ras* mogą pojawiać się nawet w bardzo wczesnym etapie transformacji nowotworowej jelita grubego. Rodzina genów *ras* (*H-ras*, *K-ras* oraz *N-ras*) należy do najczęściej mutujących protoonkogenów w nowotworach wszystkich typów. Produkt białkowy genów *ras* o długości 189 aminokwasów i masie cząsteczkowej około 21 000 wykazuje strukturalne i biochemiczne podobieństwo do podjednostki α białek G o aktywności GTP-azy uczestniczących w przekazywaniu sygnałów z błony komórkowej do wnętrza komórki [2, 25, 71]. W strukturze pierwszorzędowej białek Ras wyodrębnia się trzy regiony, tj. niezmienny region obejmujący 86 N-końcowych aminokwasów, wysoce konserwatywny (85%) region zawierający reszty 87–165 oraz zmienny, poza czterema terminalnymi aminokwasami, region C-końcowy odpowiadający pozycjom 165–189. Określone domeny odgrywają rolę w subkomórkowej lokalizacji i funkcji białek Ras. Cztery aminokwasy C-terminalne (reszty 186–189) reprezentujące sekwencję C-aminokwas alifatyczny–aminokwas alifatyczny–X (CAAX-box) zaangażowane są w modyfikacje potranslacyjne białka warunkujące jego lokalizację w błonie komórkowej. Związanie cytoplazmatycznej formy białka Ras z błoną komórkową jest wynikiem kolejno po sobie następujących modyfikacji polegających na przyłączeniu reszty farnezyłu do cysteiny 186, odłączeniu trzech terminalnych aminokwasów (pozycje 187–189), metylacji uwolnionej grupy α -karboksylowej cysteiny 186 i ostatecznie przyłączeniu

Ras 21kD

↑ modyfikacja
→ przyłączenie

<http://rcin.org.pl>

jednej lub dwóch reszt kwasu palmitynowego do cysteiny 181 i/lub 184. W wiązaniu GDP i GTP wydają się brać udział dwa wysoce konserwatywne regiony obejmujące aminokwasy 116–119 i 145–147 odpowiedzialne za oddziaływanie z guaniną oraz aminokwasy 12–20, 32–35 i 60 odpowiedzialne za oddziaływanie z grupami fosforanowymi. Z kolei białko GAP regulujące aktywność GTP-azową białka Ras (ang. *GTP-ase activating protein*) oddziałuje z tzw. domeną efektorową obejmującą aminokwasy 32–40.

Przekształcenie protoonkogenu *ras* w onkogen jest najczęściej wynikiem mutacji punktowej pojawiającej się w kodonach 12, 13 lub 61. Mutacja punktowa powoduje utratę aktywności GTP-azy przez białko Ras na skutek zmiany konformacji w rejonie odpowiedzialnym za hydrolizę GTP niezbędną dla inaktywacji białek G w warunkach prawidłowych. Nowotworom jelita grubego towarzyszą mutacje genu *K-ras* zlokalizowanego na chromosomie 12p, które w 84% dotyczą kodonów 12 i 13. W kodonie dwunastym GGT(Glu) dochodzi najczęściej do tranzycji G→A lub transwersji G→T i G→C, natomiast w kodonie trzynastym GGC(Gly) często ma miejsce tranzycja G→A [8, 23, 24, 29, 60].

Zmiany w genie *K-ras* pojawiają się w około 50% nowotworów złośliwych jelita grubego oraz z podobną częstością w gruczolakach o średnicy większej niż 1cm. W gruczolakach o średnicy mniejszej niż 1cm mutacje te występują w około 10% przypadków. Dane te skłaniają do wniosków, że mutacje onkogenu *K-ras* prawdopodobnie wpływają na progresję masy i potencjału złośliwości gruczolaka. Jednocześnie porównując zmiany w genie *K-ras* (kodon 12) we wczesnych etapach nowotworzenia jelita grubego stwierdzono wyższą częstość mutacji w przypadku nowotworów rosnących w postaci polipów w porównaniu z nowotworami płasko naciekającymi wskazując na istnienie korelacji między występowaniem mutacji genów *ras* i morfologicznymi oraz klinicznymi cechami powstającego nowotworu [31, 73, 76]. Wykazanie istnienia mutacji genu *K-ras* (kodon 12) w prawidłowej błonie śluzowej u około 20% chorych ze spontanicznym nowotworem jelita grubego, jak również w przypadku 58–73% ognisk zmienionych krypt jelitowych ACF pozwala sugerować, że molekularne mechanizmy zaangażowane we wczesne etapy nowotworzenia jelita grubego mogą być różne [44, 74]. Mutacje kodonu 12 genu *K-ras* zaobserwowano również w przerzutach raka gruczołowego jelita grubego, nawet w przypadkach, gdy w komórkach ogniska pierwotnego nie znaleziono zmian w obrębie tego genu, co sugeruje jego potencjalną rolę w procesie metastazy [7].

6. SEKWENCJE MIKROSATELITARNE I GENY NAPRAWY DNA

Mutacje powstałe w wyniku błędów w procesie replikacji DNA, które nie zostaną usunięte dzięki aktywności 3'→5' egzonukleazowej jednej z polimeraz DNA mogą podlegać naprawie błędnie sparowanych zasad – naprawie poreplikacyjnej (ang. *mismatch repair*) przed rekombinacją czy podczas rekombinacji DNA. Mechanizm

takiej naprawy został wykryty u bakterii *Escherichia coli*, u których zaobserwowano niestabilność mikrosatelitarnych, powtarzających się sekwencji DNA (tandemy CA). Niestabilność tę powiązano z mutacjami szeregu genów nazwanych mutatorowymi. Należą do nich takie geny jak *mutH*, *mutL*, *mutS*, *mutT*, oraz *uvrD* (*mutU*). Stwierdzono, że produkty białkowe tych genów tworzą kompleks o właściwościach reperycyjnych błędnie sparowanych zasad. Kompleks ten rozpoznaje niewłaściwe zasady poprzez porównywanie stopnia metylacji adeniny w sekwencjach GATC obu nici DNA, przy czym nie znany jest mechanizm samej naprawy błędu. Kompleks o podobnych właściwościach wykryto także u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. W ostatnich latach udało się znaleźć, homologiczne do bakteryjnych i drożdżowych, geny mutatorowe w genomie człowieka, których mutacje odpowiedzialne są za akumulację błędów replikacji DNA [45].

Niestabilność sekwencji CA obserwuje się w około 90% przypadków przemiany złośliwej powstającej na podłożu zespołu HNPCC (Lynch I i Lynch II) oraz 15–20% nowotworów spontanicznych jelita grubego [11]. Analiza DNA z komórek nowotworowych pozwoliła na identyfikację na chromosomie 2p16 jednego z genów naprawy poreplikacyjnej DNA człowieka – *hMSH2* (ang. *human MutS homologue*), którego mutacje stwierdza się w 50% przypadków HNPCC. Jest on homologiczny w około 50% do genu *MSH2* drożdży, obejmuje 16 eksonów i koduje białko o długości około 900 aminokwasów. W genie tym wykryto liczne mutacje typu nonsensownego oraz zmiany ramki odczytu. Najczęściej są to tranzycje C→T lub T→C oraz delecje prowadzące w efekcie do skrócenia produktu ekspresji genu. Zaobserwowano, że mutacje eksonu 12 typu nonsensownego towarzyszą także zespołowi Muir-Torrea będącego klinicznym wariantem HNPCC [21, 22, 43, 69].

Na chromosomie 3p21 zlokalizowano natomiast gen *hMLH1* (ang. *human MutL homologue*) homologiczny do genu *mutL* bakterii, który koduje białko o długości 756 aminokwasów wykazujące 41% homologii z produktem genu *yMLH1* u drożdży (13 aminokwasów C-końcowych jest identycznych). Mutacje tego genu identyfikowane w 30% przypadków HNPCC dotyczą przede wszystkim domen konserwatywnych i mają charakter delecji, insercji oraz transwersji i tranzycji [9, 50]. Dodatkowe homologi prokariotycznego *mutL*, określone jako *hPMS1* i *hPMS2*, zidentyfikowano odpowiednio na chromosomach 2q31-33 i 7p22. Produktem ekspresji genu *hPMS1* jest białko o długości 932 aminokwasów, a genu *hPMS2* – białko zawierające 862 aminokwasy. Białka te wykazują 30–42% homologii z N-końcowym fragmentem i 22–47% homologii z C-końcowym fragmentem drożdżowego białka *yPMS1*. Mutacje genów *hPMS1* i *hPMS2* obserwowane w komórkach nowotworowych jelita grubego w większości powodują skrócenie białkowego produktu ekspresji i obserwuje się je w 10% przypadków HNPCC [46].

Znalezione w genach naprawy poreplikacyjnej błędnie sparowanych zasad mutacje potwierdzają hipotezę, że mogą być one odpowiedzialne za powstanie fenotypu zespołu dziedzicznego niepolipowatego raka jelita grubego – HNPCC stanowiącego 6–15% nowotworów okrężnicy, jak również za 15–20% nowotworów spontanicznych. Jednakże w pewnym procencie nowotworów jelita grubego, szczególnie o charakterze spontanicznym, nie obserwuje się zmian w genach naprawy poreplika-

cyjnej, mimo występowania u nich niestabilności sekwencji mikrosatelitarnych. Przyпуска się, że w tych przypadkach niestabilność sekwencji mikrosatelitarnych jest związana z mutacjami w innych genach zaangażowanych w replikację DNA, takich jak na przykład gen fosforybozylotransferazy hipoksantynowej *hprt* (ang. *hypoxanthine phosphoribosyl transferase*) [18].

7. UWAGI KOŃCOWE

Obecnie nie ulega już wątpliwości, że u podstaw transformacji nowotworowej leżą zmiany w aparacie genetycznym o charakterze dziedzicznym czy somatycznym, a ich akumulacja w komórce odpowiedzialna jest za przekształcenie komórki prawidłowej w nowotworową [12, 30, 41, 58, 64]. Sekwencja akumulacji w komórce kolejnych mutacji wydaje się być natomiast odpowiedzialna za zróżnicowanie fenotypowe powstających nowotworów przejawiające się odmiennym typem wzrostu i stopniem anaplazji komórek. W komórkach nowotworowych jelita grubego obserwuje się wiele zaburzeń chromosomowych oraz niestabilności sekwencji mikrosatelitarnych. Na podstawie dotychczasowych badań na poziomie genów wydaje się, że model zaproponowany przez grupę Vogelsteina nie oddaje w całości złożoności molekularnego mechanizmu karcynogenezy jelita grubego. Ponadto badania epidemiologiczne i histologiczne wskazują na istnienie obok przedstawionego mechanizmu określanego jako *adenoma – carcinoma* innego, bliżej niewyjaśnionego mechanizmu zwanego *de novo carcinoma*, w którym nie stwierdza się występowania formy gruczolaka [42].

PIŚMIENNICTWO

- [1] BAKER SJ, PREISINGER AC, JESSUP JM, PARASKEVA C, MARKOWITZ S, WILLSON JKV, HAMILTON S, VOGELSTEIN B. p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 1990; **50**: 7717–7722.
- [2] BARAŃSKA J, Białka G – Nagroda Nobla 1994. *Post Biol Kom* 1994; **4**: 479–488.
- [3] BARDI G, SUKHIKH T, PANDIS N, FENGER C, KRONBORG O, HEIM S. Karyotypic characterization of colorectal adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1995; **12**: 97–109.
- [4] BENNETT WP, HOLLSTEIN MC, HSU I-C, SIDRANSKY D, LANE DP, VOGELSTEIN B, HARRIS CC. Mutational spectra and immunohistochemical analyses of p53 in human cancers. *Chest* 1992; **101**: 19S–20S.
- [5] BERBEĆ H. Gen p53 człowieka. *Post Bioch* 1994; **40**: 6–10.
- [6] BERTORELLE R, ESPOSITO G, DEL MISTRO A, BELLUCO C, NITTI D, LISE M, CHIECO-BIANCHI L. Association of p53 gene and protein alterations with metastases in colorectal cancer. *Am J Surg Pathol* 1995; **19**: 463–471.
- [7] BISHOPDT, HALL NR. The genetic of colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1994; **30A**: 1946–1956.
- [8] BOS JL. *ras* oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989; **49**: 4682–4689.

- [9] BRONNER CE, BAKER SM, MORRISON PT, WARREN G, SMITH LG, LESCOE MK, KANE M, EARABINO C, LIPFORD J, LINDBLOM A, TANNERGARD P, BOLLAG RJ, GODWIN AR, WARD DC, NORDENSKJOLD M, FISHEL R, KOLODNER R, LISKAY RM. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue *hMLH1* is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 1994; **368**: 258–261.
- [10] CHANG F, SYRJÄNEN S, SYRJÄNEN K. Implications of the p53 tumor-suppressor gene in colorectal cancers. *J Clin Oncol* 1995; **13**: 1009–1022.
- [11] CHEN J, HEERDT BG, AUGENLICHT LH. Presence and instability of repetitive elements in sequences the altered expression of which characterizes risk for colonic cancer. *Cancer Res* 1995; **55**: 174–180.
- [12] CHORAŻY M, DUX K. Wprowadzenie do biologii nowotworów. *Kosmos* 1995; **44**: 259–277.
- [13] COSTA A, MARASCA R, VALENTINIS B, SAVARINO M, FARANDA A, SILVESTRINI R, TORELLI G. p53 gene point mutations in relation to p53 nuclear protein accumulation in colorectal cancers. *J Pathol* 1995; **176**: 45–53.
- [14] DE FROMENTEL CC, SOUSSI T. *TP53* tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. *Gene Chromosomes Cancer* 1992; **4**: 1–15.
- [15] DELATTRE O, OLSCHWANG S, LAW DJ, MELOT T, REMVIKOS Y, SALMON RJ, SASTRE X, VALIDIRE P, FEINBEGR AP, THOMAS G. Multiple genetic alterations in distal and proximal colorectal cancer. *Lancet* 1989; **2**: 353–356.
- [16] DOBBIEZ, SPYCHER M, HÜRLIMAN R, AMMANN R, AMMAN NT, ROTH J, MÜLLER A, MÜLLER H, SCOTT RJ. Mutational analysis of the first 14 exons of the adenomatous polyposis coli (APC) gene. *Eur J Cancer* 1994; **30A**: 1709–1713.
- [17] EL-DEIRY WS, TOKINO T, WALDMAN T, OLINER JD, VELCULESCU VE, BURRELL M, HILL DE, HEALY E, REES JL, HAMILTON SR, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Topological control of p21^{WAF1/CIP1} expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 1995; **55**, 2910–2919.
- [18] ESHLEMAN JR, LANGEZ, BOWERFIND GK, PARSONS R, VOGELSTEIN B, WILLSON JKV, VEIGL ML, SEDWICK WD, MARKOWITZ SD. Increased mutation rate at the *hprt* locus accompanies microsatellite instability in colon cancer. *Oncogene* 1995; **10**: 33–37.
- [19] FEARON ER, VOGELSTEIN B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; **61**: 759–767.
- [20] FEARON ER, CHO KR, NIGRO JM, KERN SE, SIMONS JW, HAMILTON SR, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 1990; **247**: 49–56.
- [21] FISHEL R, LESCOE MK, RAO MRS, COPELAND NG, JENKINS NA, GARBER J, KANE M, KOLODNER R. The human mutator gene homolog *MSH2* and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993; **75**: 1027–1038.
- [22] FISHEL R, EWEL A, LEE S, LESCOE MK, GRIFFITH J. Binding of mismatched microsatellite DNA sequences by the human *MSH2* protein. *Science* 1995; **266**: 1403–1405.
- [23] FORRESTER K, ALMOGUERA C, HAN K, GRIZZLE WE, PERUCHO M. Detection of high incidence of *K-ras* oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature* 1987; **327**: 298–303.
- [24] GIARETTI W, PUJIC N, RAPALLO A, NIGRO S, DI VINCI A, GEIDO E, RISIO M. *K-ras* G-C and G-T transversions correlate with DNA aneuploidy in colorectal adenomas. *Gastroenterology* 1995; **108**: 1040–1047.
- [25] GRAND JA, OWEN D. The biochemistry of *ras* p21. *Biochem J* 1991; **279**: 609–631.

- [26] GRODEN J, THLIVERIS A, SAMOWITZ W, CARLSON M, GELBERT L, ALBERTSEN H, JOSLYN G, STEVENS J, SPIRIO L, ROBERTSON M, SARGEANT L, KRAPCHO K, WOLFF E, BURT R, HUGHES JP, WARRINGTON J, MCPHERSON J, WASMUTH J, LE PASLIER D, ABDERRAHIM H, COHEN D, LEPPERT M, WHITE R. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 1991; **66**: 589–600.
- [27] GRODEN J, JOSLYN G, SAMOWITZ W, JONES D, BHATTACHARYYA N, SPIRIO L, THLIVERIS A, ROBERTSON M, EGAN S, MEUTH M, WHITE R. Response of colon cancer cell lines to the introduction of *APC*, a colon-specific tumor suppressor gene. *Cancer Res* 1995; **55**: 1531–1539.
- [28] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Geny supresorowe – molekularne mechanizmy działania i ich znaczenie w kontroli proliferacji komórek. *Kosmos* 1995; **44**: 323–352.
- [29] GULBIS B, GALAND P. Immunodetection of the p21-*ras* products in human normal and preneoplastic tissues and solid tumors. *Human Pathol* 1993; **24**: 1271–1285.
- [30] HARŁOZIŃSKA-SZMYRKA A. Nowotwory jako choroba genów. *Post Bioch* 1995; **41**: 7–15.
- [31] HASEGAWA H, VEDA M, WATANABE M, TERAMOTO T, MUKAI M, KITAJIMA M. *K-ras* gene mutations in early colorectal cancer... flat elevated vs polyp-forming cancer. *Oncogene* 1995; **10**: 1413–1416.
- [32] HEDRICK L, CHO KR, FEARON ER, WU T-C, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. The *DCC* gene product in cellular differentiation and colorectal tumorigenesis. *Genes Develop* 1994; **8**: 1174–1183.
- [33] HOLLSTEIN M, SIDRANSKY D, VOGELSTEIN B, HARRIS CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; **253**: 49–53.
- [34] HORII A, NAKATSURU S, ICHII S, NAGASE H, NAKAMURA Y. Multiple forms of the *APC* gene transcripts and their tissue-specific expression. *Hum Mol Genet* 1993; **2**: 283–287.
- [35] HORST A. Geny przeciwnowotworowe jako czynniki regulatorowe wzrostu i różnicowania komórek. *Post Biol Kom* 1992; **19**: 3–21.
- [36] JOSLYN G, CARLSON M, THLIVERIS A, ALBERTSEN H, GELBERT L, SAMOWITZ W, GRODEN J, STEVENS J, SPIRIO L, ROBERTSON M, SARGEANT L, KRAPCHO K, WOLFF E, BURT R, HUGHES JP, WARRINGTON J, MCPHERSON J, WASMUTH J, LE PASLIER D, ABDERRAHIM H, COHEN D, LEPPERT M, WHITE R. Identification of deletion mutations and three new genes at the familial polyposis locus. *Cell* 1991; **66**: 601–613.
- [37] KELEMEN PR, YAREMKO ML, KIM AH, MONTAG A, MICHELASSI F, WESTBROOK CA. Loss of heterozygosity in 8p is associated with microinvasion in colorectal carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1994; **11**: 195–198.
- [38] KINZLER KW, NILBERT MC, VOGELSTEIN B, BRYAN TM, LEVY DB, SMITH KJ, PREISINGER AC, HAMILTON SR, HEDGE P, MARKHAM A, CARLSON M, JOSLYN G, GRODEN J, WHITE R, MIKI Y, MIYOSHI Y, NISHISHO I, NAKAMURA Y. Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science* 1991; **251**: 1366–1370.
- [39] KINZLER KW, NILBERT MC, SU L-K, VOGELSTEIN B, BRYAN TM, LEVY DB, SMITH KJ, PREISINGER AC, HEDGE P, MC KECHNIE D, FINNIEAR R, MARKHAM A, GROFFEN J, BOGUSKI MS, ALTSCHUL SF, HORII A, ANDO H, MIYOSHI Y, MIKI Y, NISHISHO I, NAKAMURA Y. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 1991; **253**: 661–665.
- [40] KLINGELHUTZ AJ, HEDRICK L, CHO KR, MCDOUGALL JK. The *DCC* gene suppresses the malignant phenotype of transformed epithelial cells. *Oncogene* 1995; **10**: 1581–1586

- [41] KRAJEWSKA WM. Molekularne podstawy transformacji nowotworowej komórki. [w] Kiliańska Z, Krajewska WM, Lipińska A [red.] Białka Komórek Prawidłowych i Patologicznych. Prace Wydziału III ŁTN 1994; **118**: 13–33.
- [42] KURAMOTO S, TAKESHI O. Flat early cancers of the large intestine. *Cancer* 1989; **64**: 950–955.
- [43] LEACH FS, NICOLAIDES NC, PAPADOPOULOS N, LIU B, JEN J, PARSONS R, PELTOMÄKI P, SISTONEN P, AALTONEN LA, NYSTRÖM-LAHTI M, GUAN X-Y, ZHANG J, MELTZER PS, YU J-W, KAO F-T, CHEN DJ, CEROSALETTI KM, FOURNIER REK, TODD S, LEWIS T, LEACH RJ, NAYLOR SL, WEISSENBACH J, MECKLIN J-P, JÄRVINEN H, PETERSEN GM, HAMILTON SR, GREEN J, JASS J, WATSON P, LYNCH HT, TRENT JM, DE LA CHAPELLE A, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Mutations of a *mutS* homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993; **75**: 1215–1225.
- [44] MINAMOTO T, YAMASHITA N, OCHIAI A, MASAYOSHI M, SUGIMURA T, RONAI Z, ESUMI H. Mutant *K-ras* in apparently normal mucosa of colorectal cancer patients. *Cancer* 1995; **75**: 1520–1526.
- [45] MODRICH P. Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Ann Rev Genet* 1991; **25**: 229–253.
- [46] NICOLAIDES NC, PAPADOPOULOS N, LIU B, WEI Y-F, CARTER KC, RUBEN SM, ROSEN CA, HASELTINE WA, FLEISCHMANN RD, FRASER CM, ADAMS MD, VENTER JC, DUNLOP MG, HAMILTON SR, PETERSEN GM, DE LA CHAPELLE A, VOGELSTEIN B, KINZLER KW. Mutations of two *PMS* homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 1994; **371**: 75–80.
- [47] NISHISHO I, NAKAMURA Y, MIYOSHI Y, MIKI Y, ANDO H, HORII A, KOYAMA K, UTSONOMIYA J, BABA S, HEDGE P, MARKHAM A, KRUSH AJ, PETERSEN G, HAMILTON SR, NILBERT MC, LEVY DB, BRYAN TM, PREISINGER AC, SMITH KJ, SU L-K, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 1991; **253**: 665–669.
- [48] OHUE M, TOMITA N, MONDEN T, FUJITA M, FUKUNADA M, TAKAMI K, YANA I, OHNISHI T, ENOMOTO T, INOUE M, SHIMANO T, MORI T. A frequent alteration of *p53* gene in carcinoma of colon. *Cancer Res* 1994; **54**: 4798–4804.
- [49] OSHIMA M, OSHIMA H, KITAGAWA K, KOBAYASHI M, ITAKURA C, TAKETO M. Loss of *Apc* heterozygosity and abnormal tissue building in nascent intestinal polyps in mice carrying a truncated *Apc* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 4482–4486.
- [50] PAPADOPOULOS N, NICOLAIDES NC, WEI Y-F, RUBEN SM, CARTER KC, ROSEN CA, HASELTINE WA, FLEISHMANN RD, FRASER CM, ADAMS MD, VENTER JC, HAMILTON SR, PETERSEN GM, WATSON P, LYNCH HT, PELTOMÄKI P, MECKLIN J-P, DE LA CHAPELLE A, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Mutation of a *mutL* homolog in hereditary colon cancer. *Science* 1994; **263**: 1625–1629.
- [51] PIETENPOL JA, VOGELSTEIN B. No room at the *p53* inn. *Nature* 1993; **365**: 17–18.
- [52] POWELL SM, ZILZ N, BEAZER-BARCLAY Y, BRYAN TM, HAMILTON SR, THIBODEAU SN, VOGELSTEIN B, KINZLER KW. *APC* mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992; **359**: 235–237.
- [53] REMVIKOS Y, VOGT N, MULERIS M, SALMON RJ, MALFOY B, DUTRILLAUX B. DNA-repeat instability is associated with cancers presenting minimal chromosome rearrangements. *Genes Chromosomes Cancer* 1995; **12**: 272–276.
- [54] RUBINFELD B, SOUZA B, ALBERT I, MUNEMITSU S, POLAKIS P. The APC protein and E-cadherin form similar but independent complexes with α -catenin, β -catenin, and plakoglobin. *J Biol Chem* 1995; **270**: 5549–5555.
- [55] SELIVANOVA G, WIMAN KG. *p53*: a cell cycle regulator activated by DNA damage. *Adv Cancer Res* 1995; **66**: 143–180.

- [56] SELTER H, MONTENARH M. The emerging picture of p53. *Int J Biochem* 1994; **26**: 145–154.
- [57] SHAW P, TARDY S, BENITO E, OBRADOR A, COSTA J. Occurrence of Ki-ras and p53 mutations in primary colorectal tumors. *Oncogene* 1991; **6**: 2121–2128.
- [58] SIEDLECKI JA. Molekularne podstawy chorób nowotworowych. *Kosmos* 1995; **44**: 311–321.
- [59] SIKORA E. Apoptoza a onkogeneza. *Kosmos* 1995; **44**: 353–363.
- [60] SINDRANSKY D, TOKINO T, HAMILTON SR, KINZLER KW, LEVIN B, FROST P, VOGELSTEIN B. Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science* 1992; **256**: 101–105.
- [61] SMITH KJ, JOHNSON KA, BRYAN TM, HILL DE, MARKOWITZ S, WILLSON JKV, PARASKEVA C, PETERSEN GM, HAMILTON SR, VOGELSTEIN B, KINZLER KW. The APC gene product in normal and tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 2846–2850.
- [62] SOUISSI T, DE FROMENTEL CC, MAY P. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* 1990; **5**: 945–952.
- [63] SPIRIO L, OLSCHWANG S, GRODEN J, ROBERTSON M, SAMOWITZ W, JOSLYN G, GELBERT L, THLIVERIS A, CARLSON M, OTTERUD B, LYNCH H, WATSON P, LYNCH P, LAURENT-PUIG P, BURT R, HUGHES JP, THOMAS G, LEPPERT M, WHITE R. Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis. *Cell* 1993; **75**: 951–957.
- [64] STEFFEN J. Uwarunkowania dziedziczne w zachorowaniach na nowotwory złośliwe u ludzi. *Kosmos* 1995; **44**: 295–310.
- [65] STÜRZBACHER HW, DEPPERT W. Structural and functional analysis of tumor suppressor p53. *Methods Mol Genet* 1994; **3**: 319–339.
- [66] THLIVERIS A, SAMOWITZ W, MATSUNAMI N, GRODEN J, WHITE R. Isolation of a promoter and alternatively spliced sequence 5' to exon 1 of the APC gene. *Cancer Res* 1994; **54**: 2991–2995.
- [67] TORIBARA NW, SLEISENGER MH. Screening for colorectal cancer. *N Engl J Med* 1995; **332**: 861–867.
- [68] VOGELSTEIN B, KINZLER KW. p53 function and dysfunction. *Cell* 1992; **70**: 523–526.
- [69] WIJNEN J, VASEN H, KHAN PM, MENKO FH, KLIFT H, LEEUWEN C, BROEK M, LEEUWEN-CORNELISSE I, NAGENGAST F, MEIJERS-HEIJBOER A, LINDHOUT D, GRIFFIOEN G, CATS A, KLEIBEUKER J, VARESCO L, BERTARIO L, BISGAARD ML, MOHR J, FODDE R. Seven new mutations in hMSH2, an HNPCC gene, identified by denaturing gradient-gel electrophoresis. *Am J Hum Genet* 1995; **56**: 1060–1066.
- [70] WILLIAMS AC, BROWNE SJ, MANNING AM, HAGUE A, VAN DER STAPPEN JWJ, PARASKEVA C. Biological consequences of the genetic changes which occur during human colorectal carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 1993; **4**: 153–159.
- [71] WITTINGHOFER A, PAIEF. The structure of Ras protein: a model for a universal molecular switch. *Trends Biochem Sci* 1991; **16**: 382–387.
- [72] WYLLIE AH, CARDER PJ, CLARKE AR, CRIPPS KJ, GLEDHILL S, GREAVES MF, GRIFFITHS S, HARRISON DJ, HOOPER ML, MORRIS RG, PURDIE CA, BIRD CC. Apoptosis in carcinogenesis: the role of p53. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1994; **59**: 403–409.
- [73] YAMAGATA S, MUTOT, UCHIDA Y, MASAKIT, HIGUCHI Y, SAWADA T, HIROOKA T. Polypoid growth and K-ras codon 12 mutation in colorectal cancer. *Cancer* 1995; **75**: 953–957.
- [74] YAMASHITA N, MINAMOTO T, OCHIAI A, ONDA M, ESUMI H. Frequent and characteristic K-ras activation in aberrant crypt foci of colon. *Cancer* 1995; **75**: 1527–1533.

- [75] YAMASHITA N, MINAMOTO T, OCHIAI A, ONDA M, ESUMI H. Frequent and characteristic K-ras activation and absence of p53 protein accumulation in aberrant crypt foci of the colon. *Gastroenterology* 1995; **108**: 434-440.
- [76] YUKAWA M, FUJIMORI T, MAEDA S, TABUCHI M, NAGASAKO K. Comparative chimicopathological and immunohistochemical study of ras and p53 in flat and polypoid type colorectal tumours. *Gut* 1994; **35**: 1258-1261.

Otrzymano: 14.12.1995 r.

Przyjęto: 09.01.1996 r.

*Adres autora: Katedra Cytobiochemii, Uniwersytet Łódzki
90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16,*

ZJAWISKO APOPTOZY W UKŁADZIE NERWOWYM

PHENOMENON OF APOPTOSIS IN THE NERVOUS SYSTEM

Jerzy SŁOWIŃSKI*¹, Marzena HARABIN-SŁOWIŃSKA**, Józef KAŁUŻA***

* Klinika Neurochirurgii i Neurotraumatologii w Bytomiu, Śląska Akademia Medyczna w Katowicach, ** I Katedra i Zakład Histologii i Embriologii w Zabrze, Śląska Akademia Medyczna w Katowicach, *** Zakład Neuropatologii Instytutu Neurologii CM UJ w Krakowie

Streszczenie. Przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat apoptozy, czyli programowanej śmierci komórkowej ze szczególnym uwzględnieniem roli tego zjawiska w fizjologii i patologii układu nerwowego. Zestawiono dane dotyczące cech morfologicznych apoptozy, metod jej identyfikacji w tkankach oraz mechanizmów molekularnych regulujących jej przebieg. Zwrócono uwagę na prawdopodobny udział zjawiska apoptozy i jego zaburzeń w patogenezie chorób układu nerwowego. Omówiono perspektywy terapii ukierunkowanej na przywrócenie homeostazy zaburzonego cyklu komórkowego.

Słowa kluczowe: apoptoza, programowana śmierć komórki, układ nerwowy

Summary. The up-to-date state of knowledge concerning apoptosis i. e. programmed cell death with a special regard to its role in the nervous system is presented. Data with reference to the morphological features of apoptosis, methods of its identification in tissues as well as molecular mechanisms regulating this process are collected. Authors paid attention to probable contribution of apoptosis and its disorders to the pathogenesis of neurological diseases. The perspectives of therapy directed to restoration of disturbed cell cycle homeostasis are discussed.

Key words: apoptosis, programmed cell, death, the nervous system

WSTĘP

Termin apoptoza został wprowadzony przez Kerr'a i wsp. w 1972 r. [17]. Został on zaproponowany dla nazwania obrazu morfologicznego mechanizmów kontrolujących fizjologiczną eliminację komórek. W literaturze często stosuje się jako synonim

¹ Czasowo w Zakładzie Neuropatologii

termin programowanej śmierci komórki (*programmed cell death-PCD*). Określenie PCD wprowadzili w 1965 r. Lockshin i Williams dla opisanego rozwojowo regulowanej śmierci ściśle określonych grup mięśni przeobrażającej się larwy ćmy [48]. Apoptoza jest pojęciem węższym, jedną, ale nie jedyną z form PCD [38,53], charakteryzującą się określonymi zjawiskami biochemicznymi i morfologicznymi determinowanymi ekspresją odpowiednich genów. W niniejszej pracy określenia te stosowane są zamiennie, za wyjątkiem sporadycznych przypadków wymagających rozdzielenia tych terminów. Fizjologiczna śmierć komórkowa jest filogenetycznie starym procesem, spotykanym już u bezkręgowców. Klasycznym już modelem do badań nad apoptozą są postacie larwalne nicienia *Caenorhabditis elegans* oraz motyla nocnego *Manduca sexta* [44,59]. Przykładem, gdzie śmierć komórki jest zdeterminowana fizjologicznie i odbywa się drogą apoptozy jest m.in.: tworzenie keratynocytów, złuszczenie nabłonka jelitowego, eliminacja autoreaktywnych limfocytów T, inwolucja komórek pozbawionych koniecznych czynników wzrostu, morfogenetyczna śmierć komórek podczas rozwoju embrionalnego, bądź eliminacja komórek docelowych dla limfocytów T lub komórek NK [4,7].

ZMIANY MORFOLOGICZNE W PROCESIE ŚMIERCI KOMÓRKI

W tkankach kręgowców opisano dwie formy śmierci komórkowej- martwicę i apoptozę [7].

Martwica (*necrosis*) odnosi się do obrazu obserwowanego w przypadku ciężkiego i nagłego urazu takiego jak ischemia, przedłużona hipertermia, czy uraz chemiczny. Należy podkreślić, że te same bodźce, które wywołują martwicę, działając w mniejszym natężeniu mogą indukować apoptozę [40,53]. W martwicy wcześniej dochodzi do obrzęku mitochondriów i zaburzeń ich funkcji, komórka szybko przestaje być zdolna do utrzymania homeostazy. Pierwszym miejscem uszkodzenia zwykle są błony cytoplazmatyczne, tracące zdolność regulacji ciśnienia osmotycznego, w efekcie czego dochodzi do obrzęku komórki i jej rozerwania. Zawartość obumarłej w ten sposób komórki zostaje wyrzucona do otaczającej tkanki powodując odpowiedź zapalną, wtórnie uszkadzającą otaczającą tkankę [48].

W apoptozie, w przeciwieństwie do martwicy dominują zmiany w obrębie jądra komórkowego, aczkolwiek pierwszą zauważalną zmianą morfologiczną jest pofałdowanie błony komórkowej i wytworzenie na jej powierzchni wielu drobnych uwypukleń, określane terminem *zeiosis* [7]. W dalszej kolejności komórka ulega obkurczeniu, a badaniem w mikroskopie elektronowym (ME) wykazano ekstremalne zagęszczenie cytoplazmy z prawidłowymi organellami. Zjawisko to tłumaczy się utratą wody, najpewniej w drodze izoosmozy [7,11,17]. W jądrze komórkowym dochodzi do znacznego zagęszczenia chromatyny, wytworzenia tzw. półksiężycy umiejscowionego przy błonie jądrowej w ścisłym z nią kontakcie. Ostatecznie chromatyna najczęściej tworzy pojedynczą, gęstą, kulistą masę [17]. Na poziomie mole-

kularnym tym procesom odpowiada fragmentacja DNA poprzez jego rozszczepienie w miejscach nukleosomów na regularne podjednostki liczące ok. 180 par zasad lub ich wielokrotność, odbywająca się przy udziale endogennej wapniowo zależnej endonukleazy [31,48,55]. W każdej komórce może dojść do ponad miliona rozerwań struktury DNA dających w efekcie tzw. drabinę DNA (*DNA ladder*), widoczną w czasie elektroforezy w żelu agarowym [54,55]. Dla porównania, w przypadku martwicy przypadkowej, nieregularne rozszczepienia DNA dają w elektroforezie obraz tzw. rozmazu DNA (*DNA smear*) [37]. W dalszej kolejności dochodzi do sekwestracji komórki wskutek zerwania połączeń międzykomórkowych, a następnie do jej fragmentacji i uwalniania do przestrzeni międzykomórkowej tzw. ciałek apoptotycznych, obserwowanych w ME, a widocznych w mikroskopie świetlnym, jeżeli tworzą skupiska w przestrzeni międzykomórkowej i zawierają resztki jądra [17]. Charakterystyczne dla nich jest to, że zawierają dobrze zachowane organella komórkowe. Błony plazmatyczne otaczające ciała apoptotyczne zachowują zdolność usuwania barwników, takich jak: błękit trypanu czy nigrozyna [59], a więc mają cechy, których komórki w procesie martwicy pozbawione są już we wczesnych etapach [37]. Usunięcie ciałek apoptotycznych z przestrzeni międzykomórkowej poprzedzone jest zmianami w budowie molekularnej otaczających je błon, ułatwiającymi ich późniejszą fagocytozę przez układ makrofagów [38]. Proces usuwania ciałek apoptotycznych przez układ fagocytów jest zwykle bardzo intensywny, co powoduje, że w obrazie mikroskopowym widuje się je prawie wyłącznie w obrębie komórek żernych [46]. Fagocytoza komórek apoptotycznych wyprzedza w czasie utratę integralności ich błon plazmatycznych, co zapobiega wypływowi składników cytoplazmy do otoczenia [40]. Sprawia to, że proces apoptozy nie wywołuje reakcji zapalnej, tak jak to się dzieje w przypadku martwicy, powodując tym samym minimalne zakłócenia struktury tkanki [59].

Niejasna jest rola jonów wapnia w procesie apoptozy. Powszechnie uważa się, że napływ tych jonów do wnętrza komórki jest mechanizmem inicjującym apoptozę poprzez aktywację enzymów, głównie endonukleazy [4]. Nowsze badania wskazują na bardziej złożoną rolę jonów wapnia w PCD. Można się spotkać z opinią, że wewnątrzkomórkowy wzrost stężenia wapnia jest zjawiskiem wtórnym w PCD, czy też z twierdzeniem, że w trakcie PCD dochodzi wręcz do spadku stężenia wapnia [53]. Coraz więcej uwagi poświęca się zaburzeniom wewnątrzkomórkowej homeostazy i kompartmentacji wapnia w procesie apoptozy. Nasuwają one pewne skojarzenia ze zjawiskiem stresu oksydacyjnego w komórkach nerwowych, gdzie po aktywacji receptora NMDA i wzroście stężenia wapnia wraz ze zmianą jego dystrybucji w komórce dochodzi do generowania wolnych rodników, tlenu azotu, peroksydacji lipidów i co najistotniejsze, uszkodzenia DNA [3,10,53]. Enokido i Hatanaka hodując neurony hipokampa szczura w atmosferze 50% tlenu stwierdzili w nich biochemiczne cechy apoptozy hamowanej w środowisku NGF i bFGF. Autorzy wnioskowali, że zaburzenia metabolizmu tlenu mogą w neuronach indukować PCD [10]. Podobnie obserwowano apoptozę neuronów kory szczura poddawanych bezpośrednio działaniu nadtlenu wodoru [57]. W najnowszych pracach donoszą również o możliwym udziale wolnych rodników jako czynnika wyzwalającego apoptozę w stanach fizjo-

logii i patologii [58]. Na możliwe powiązania apoptozy ze stresem oksydacyjnym wskazują też pośrednio m.in.: fakt zapobiegania apoptozie przez antyoksydanty, hamowanie peroksydacji lipidów przy nadmiernej ekspresji bcl-2 [3] czy też omówiony w dalszej części tekstu udział apoptozy w niedokrwieniu mózgu.

IDENTYFIKACJA ZJAWISKA APOPTOZY W TKANKACH

Uważa się, że skondensowane, piknotyczne jądra widoczne w tkance mogą odpowiadać komórkom apoptotycznym [52], jednak nie jest to pewne kryterium, albowiem podobne cechy mają m.in. limfocyty czy dzielące się komórki w stadium telofazy [31]. Iwanowski [16] zwrócił uwagę na trudności, jakie napotyka odróżnienie w mikroskopie świetlnym neuronów apoptotycznych od tzw. ciemnych neuronów (*dark neurons*), sugerując na podstawie własnych obserwacji z użyciem ME, że te drugie mogą odpowiadać wczesnej fazie apoptozy. Identyfikację zjawiska apoptozy utrudnia dodatkowo brak cech odczynu zapalnego w otaczającej tkance, stosunkowo krótki czas trwania samego procesu oraz szybkie usuwanie komórek apoptotycznych przez komórki żerne [31,59]. Szacuje się, że połowiczny czas, w którym apoptotyczna komórka pozostaje widoczna w mikroskopie świetlnym, wynosi poniżej 9 h [59]. Brak jednoznacznych cech morfologicznych komórek ulegających apoptozie pozwalających na ich pewne rozpoznanie w mikroskopie świetlnym jest powodem ciągłych poszukiwań swoistych, powtarzalnych metod ich identyfikacji.

Fakt rozerwania łańcucha DNA w komórkach apoptotycznych dał podstawy do ich rozpoznawania dzięki możliwości znakowania *in situ* końcowych fragmentów przerywanych łańcuchów DNA z użyciem znanych nukleotydów w środowisku odpowiednich enzymów (tzw. metoda ISEL) [47]. W rozwijającym się mózdzku myszy przy użyciu tej metody rozpoznano 6-krotnie większą liczbę komórek apoptotycznych niż w badaniu histologicznym [31]. Rozbieżność tą przypisuje się zdolności wykrywania wczesnych stadiów fragmentacji DNA poprzedzających pojawienie się kondensacji chromatyny. Przy interpretacji badań z użyciem techniki ISEL należy jednak pamiętać, że może ona uwidaczniać fragmentację DNA nie związaną z apoptozą, np. w polach martwicy i pośmiertnej autolizy, dlatego też za apoptotyczne uważa się tylko izolowane komórki, a nie ich skupiska [31]. Za immunohistochemiczny marker apoptozy uważany jest m.in. antygen Le(Y). Jest to determinanta cukrowa biorąca udział w glikozylacji białek, mającej miejsce m.in. w procesach rozwoju, różnicowania i onkogenezy [14].

Inną metodą uwidaczniania komórek ulegających apoptozie jest barwienie oranżem akrydyny, w którym jądra tych komórek dają pomarańczową fluorescencję, podobnie jak RNA lub DNA o pojedynczym łańcuchu, a przeciwnie do prawidłowego DNA, które daje fluorescencję zieloną [47]. Ormerod [36] w celu ilościowego określenia apoptozy wykorzystał cytometrię przepływową po znakowaniu komórek barwnikami fluorescencyjnymi, wykorzystując opisane wyżej właściwości fluorochromowe różnych form kwasów nukleinowych.

Inna metoda badania apoptozy w cytometrii polega na określeniu odsetka komórek z hipodiploidalnym DNA [37]. Fakt znacznej utraty wody i tym samym wzrostu ciężaru właściwego komórek apoptotycznych umożliwia ich izolację w gradiencie gęstości [13].

MECHANIZMY REGULUJĄCE APOPTOZĘ I ICH ZABURZENIA

Sygnal inicjujący proces apoptozy pochodzi najczęściej ze środowiska komórki, jest nim np. zmiana stężenia hormonu lub czynnika wzrostu, tak więc los pojedynczej komórki zależy od czynności innych. Wyjątkowymi pod tym względem właściwościami wśród komórek ssaków odznaczają się blastomery, są to prawdopodobnie jedyne komórki zdolne do przeżycia i podziałów bez sygnałów ze środowiska zewnętrznego [40]. Na wybiórczy związek apoptozy z aktywnością niektórych hormonów wskazują m.in. obserwacje Slovitera [50]. Wykazał on wpływ adrenalektomii szczurów na wybiórczą śmierć komórek warstwy ziarnistej zakrętu zębatego hipokampa mającą w ME wszystkie cechy apoptozy. Znanymi induktorami apoptozy są: TNF- α , TGF- β_1 , leki cytostatyczne, promieniowanie jonizujące, niska lub wysoka temperatura [13].

Programowana śmierć komórkowa jest procesem aktywnym, wymagającym ekspresji genów, syntezy białek oraz RNA [20,27]. Białka biorące udział w apoptozie w normalnych warunkach nie znajdują się w komórce i muszą być syntetyzowane *de novo* [10]. Genową regulację apoptozy poznano najlepiej u nicienia *Caenorhabditis elegans*, u którego określono czynność 10 genów tzw. układu *ced* (*cell death abnormal*). Geny *ced-3* i *ced-4* inicjują PCD (*killers*), *ced-9* zapobiega PCD, a pozostałe mogą mieć wielokierunkowe działanie [44,53]. Jak dotąd nie udało się wykryć u ssaków kompletnego zespołu genów zawiadujących apoptozą, odpowiadającemu układowi *ced* u nicieni, jednak badania porównawcze wykazują pewne analogie, m.in. gen *ced-9* uznaje się za homologiczny z *bcl-2* u ssaków [53]. Ludzki gen *bcl-2* przeniesiony do komórki nicienia wywołuje w niej supresję PCD [40]. Dowodzi to, że samo zjawisko PCD, jak i niektóre mechanizmy kontrolujące go zachowały się w ewolucji już od prymitywnych form istnienia. Część genów modulujących przebieg cyklu komórkowego, np. protoonkogen *c-myc* może odgrywać rolę w wyborze pomiędzy apoptozą a proliferacją zależnie od wzajemnych proporcji ekspresji tego genu i stężenia czynników wzrostu [13]. Wymieniony wyżej protoonkogen *bcl-2* (B-cell leukemia/lymphoma) należy do grupy genów zapobiegających naturalnej śmierci komórki [48]. Często obserwuje się jego nadmierną ekspresję w ludzkich chłoniakach z komórek B [7,18,21]. Gen *bcl-2* odgrywa prawdopodobnie znaczącą rolę w fizjologicznej regulacji procesów odpornościowych z udziałem limfocytów T utrzymując homeostazę tych komórek po aktywacji układu immunologicznego [1]. Zagadnienie wpływu genów z rodziny *bcl* na regulację cyklu komórkowego, w tym na procesy PCD zostało szerzej omówione w pracy Rożynkowej [44].

Bardzo intensywnie badanym genem związanym z regulacją cyklu komórkowego jest anty-onkogen *p53*. Gen ten nazywany obrazowo strażnikiem genomu bierze udział w indukowaniu apoptozy, a także w zatrzymywaniu komórek w fazie G_1 , inicjacji naprawy DNA oraz w promocji różnicowania komórkowego [15,25]. Przy braku *p53* typu dzikiego komórki nowotworowe nie reagują apoptozą na radio- czy chemioterapię [25,44]. Działanie genu *p53* łączy się z jego zdolnością wiązania antygeny T SV40 niezbędnego do zapoczątkowania replikacji DNA [22], ponadto wiążąc się ze swoistymi sekwencjami DNA działa on jako czynnik regulujący transkrypcję białek hamujących proliferację komórek [15,25,30]. Mutacje genu *p53* stwierdzono w wielu nowotworach pierwotnych mózgu, przede wszystkim w gwiąździakach i rdzeniaku płodowym, jednak ich znaczenie diagnostyczne i prognostyczne w tych guzach nie jest jeszcze jednoznacznie określone [25]. Wykazano, że gen *p53* jest czynnościowo związany układem ujemnego sprzężenia zwrotnego z onkoproteiną MDM2, i tak, w przypadkach nowotworów bez mutacji *p53* obserwuje się nadmierną ekspresję MDM2 i odwrotnie [15,30]. Amplifikację i nadmierną ekspresję genu *MDM2* opisano m.in. w glejakach [30].

W ostatnim czasie w centrum zainteresowania znajduje się grupa genów, tzw. *cIEGs* (*cellular immediate-early genes*), a wśród niej głównie geny *c-fos* i *c-jun*. Grupa genów *cIEGs* koduje czynniki transkrypcyjne uznawane za tzw. jądrowy trzeci przekaźnik [6]. Chen i wsp. [6] wykazali u transgenicznych myszy wzmocnienie ekspresji *c-fos* w rozwijającym się układzie nerwowym, w przebiegu długotrwałego pobudzenia receptora NMDA, jak również w chorobach zwyrodnieniowych OUN. W przypadkach tych ekspresja *c-fos* poprzedzała lub występowała równolegle z PCD, jednak pozostaje pytanie, czy odpowiedź *cIEG* indukuje apoptozę, jest tylko epifenomenem, czy też reakcją stresową przeciwdziałającą procesom prowadzącym do śmierci neuronów.

W procesie inicjowania apoptozy biorą również udział powierzchniowe cząstki komórkowe, których rola w regulacji zjawisk związanych ze wzrostem była już wcześniej znana [55]. Spośród nich najlepiej poznane jest białko Fas (zwane też APO-1) o masie 52 kD. Trauth i wsp. wykazali że za pomocą przeciwciała skierowanego przeciw tej proteinie błonowej można w liniach komórkowych zarówno ludzkich limfoblastów, jak i nowotworowych limfocytów zaindukować apoptozę [55]. Fas jest powierzchniowym białkiem receptorowym rodziny NGF/TNF indukującym apoptozę poprzez związanie się ze swoim ligandem (FasL) [34,48,53]. Fizjologiczna rola układu Fas/FasL polega głównie na wywoływaniu apoptozy w autoreaktywnych limfocytach T [34]. Znajduje to potwierdzenie w przypadku myszy i szczurów z mutacjami genów układu Fas/FasL, mianowicie obserwuje się u nich występowanie chorób autoimmunologicznych [34,53]. Modyfikowanie procesu apoptozy za pośrednictwem cząstek powierzchniowych, takich jak Fas, może otworzyć możliwości skutecznej terapii chorób nowotworowych, w tym również układu nerwowego. Barięą przed zastosowaniem już obecnie tej metody *in vivo* jest toksyczność przeciwciał monoklonalnych anty-Fas także w stosunku do prawidłowych komórek [55].

ROLA PROGRAMOWANEJ ŚMIERCI KOMÓREK W ROZWOJU UKŁADU NERWOWEGO

Apoptoza jest zjawiskiem charakterystycznym dla rozwoju układu nerwowego. Bierze ona udział w szeroko rozumianym procesie plastyczności rozwojowej [20]. W czasie neurogenezy dochodzi do znacznej nadprodukcji neuronów, które obumierają w okresie embrionalnym i okołonarodzeniowym. Apoptoza danej grupy neuronów następuje szybko, w określonym przedziale czasu. Jest zjawiskiem masowym, ulega jej 40–80% neuronów [20,40]. Soriano i wsp. [52] wykorzystali znakowanie bromodeoksyurydyną ciężarnych myszy i następowe badanie immunocytochemiczne jej potomstwa do wykazania obecności komórek ulegających apoptozie w tkance nerwowej. Wykazali oni, że piknotyczne, BrdU-dodatnie jądra odpowiadające obumierającym komórkom w rozwijającym się układzie nerwowym myszy w 50% są pochodzenia glejowego, a w 20% neuralnego, udowadniając zarazem, że zmiany te obejmują zarówno komórki nerwowe, jak i glejowe. Zjawisko PCD jest procesem zachodzącym w większości z badanych struktur układu nerwowego. Jak dotąd jedynie w niewielu okolicach OUN nie obserwowano znaczącej eliminacji komórek w czasie rozwoju, są to m.in. pewne jądra mostu mózgu ptaków oraz miejsce sinawe i jądro czerwienne [8].

Zjawisko apoptozy w układzie nerwowym zostało poznane dzięki pionierskim badaniom prowadzonym w latach 40- i 50-tych przez Hamburgera i Levi-Montalcini [20,40]. Udokumentowali oni występowanie naturalnej śmierci neuronów w embrionach kurzych, odkrywając przy tym czynnik wzrostu nerwu (NGF). Śmierć części neuronów w czasie rozwoju układu nerwowego wynikająca z braku struktury docelowej lub też braku substancji troficznych wydzielanych przez te struktury nazwano dopasowaniem ilościowym [20]. Z pewnym uproszczeniem można powiedzieć, że śmierć neuronów jest mechanizmem dopasowującym rozmiary poszczególnych populacji komórkowych do wielkości ich pola projekcyjnego, a ściślej do czynnościowych potrzeb tego pola [8]. Badania wykonywane w laboratorium Cowana wykazały ponadto, że mechanizm PCD służy także eliminowaniu niewłaściwie powstałych połączeń neuronalnych. Na przykładzie siatkówki oka szczura wykazano zanikanie komórek, które wcześniej w rozwoju wysyłają aksony w niewłaściwe miejsca wzgórków górnych [8].

ZNACZENIE KLINICZNE PROCESU APOPTOZY

Zagadnienie programowanej śmierci komórkowej i jej modyfikacji poprzez ekspresję pewnych genów budzi ostatnio bardzo żywe zainteresowanie głównie w aspekcie proliferacji nowotworowej. Do nowotworzenia może dojść w drodze wzmożonej proliferacji bądź poprzez zahamowanie fizjologicznej śmierci pewnej populacji komórek [19,39]. Tak zwana III kategoria protoonkogenów wyróżniona przez Korsmeyera [19] obejmuje geny związane z PCD. I tak np. podjęcie funkcji przez gen

bcl-2, który jest blokerem apoptozy, da efekt taki jak utrata funkcji genu *p53*, który apoptozę aktywuje, prowadząc w obu tych przypadkach do nowotworzenia. Uniknięcie przez pewną populację PCD może być wydarzeniem kluczowym, doprowadzającym do wzrostu prawdopodobieństwa nabycia dodatkowych defektów genetycznych w obrębie genów wzrostu i proliferacji [2,19,60]. Ekspresję genu *bcl-2* stwierdzono w neuronach, w pierwszej kolejności układu współczulnego. Eksperymenty genetyczne przeprowadzone przez Garcia i wsp. [12] dowiodły, że sztucznie uzyskana nadmierna ekspresja *bcl-2* zapobiega apoptozie wywoływanej pozbawieniem neuronów w hodowli czynnika NGF. Skłoniło to wymienionych badaczy do przypuszczenia, że *bcl-2* jako mediator wpływu czynnika troficznego na przetrwanie neuronów może brać udział w powstawaniu chorób zwyrodnieniowych OUN. Castle i wsp. [5] zlokalizowali metodą immunocytochemiczną białko *bcl-2* w 16 spośród 40 badanych przypadków neuroblastoma. Stwierdzili oni, że ekspresja tego genu koreluje z amplifikacją genu *N-myc* jak i niekorzystnym obrazem histologicznym oraz przebiegiem klinicznym wnioskując z tego, że rozregulowanie PCD w związku z nadmierną ekspresją *bcl-2* przyczynia się do powstania bądź progresji neuroblastoma. Reed i wsp [41] analizowali poziomy białka *bcl-2* w liniach komórkowych nowotworów układu nerwowego stwierdzając ich podwyższenie w części *neuroblastoma*, *neurofibroma*, *retinoblastoma*, *medulloblastoma*, a także w kilku liniach *glioblastoma multiforme* pozbawionych markerów neuronalnych. Autorzy wnioskują z tego, że ekspresja *bcl-2* w układzie nerwowym nie ogranicza się tylko do neuronów.

Immunohistochemiczną lokalizacją białka *bcl-2* w 140 nowotworach OUN przeprowadzoną przez Nakasu i wsp. [35] wykazano najczęstszą obecność tego białka w nerwiakach i wyściółczakach, a także w prawidłowych ependymocytach i komórkach Schwanna. Prawidłowe astrocyty w tym badaniu były *bcl-2*-negatywne, podczas gdy postaci odczynowe i nowotworowe wykazywały różnie nasiloną, pozytywną reakcję na *bcl-2*. W przeciwieństwie do wyników uzyskanych przez Castlea i wsp. badających przypadki *neuroblastoma* Nakasu i wsp. stwierdzili w glejakach odwrotną zależność między stopniem złośliwości i ekspresją białka *bcl-2*. Autorzy ci nie potwierdzili ponadto w swoich obserwacjach opinii o ochronnym wpływie nadmiernej ekspresji *bcl-2* na komórki poddawane radio- i chemioterapii, albowiem nie odnotowali oni zależności między ekspresją *bcl-2* i czasem przeżycia u chorych z nawrotowymi złośliwymi glejakami mózgu.

Schiffer i wsp. [47] stosując technikę ISEL (*in situ end labelling of DNA*) stwierdzili cechy apoptozy w rozproszonych w obrębie rdzeniaków tzw. limfocytopodobnych jądrach. Te silnie zasadochłonne i piknotyczne jądra uznawane były zazwyczaj za wyraz martwicy lub zatrzymania komórki w końcowym stadium patologicznej mitozy. Autorzy sugerują, że apoptoza w rdzeniakach płodowych odzwierciedla zachowaną zdolność do PCD charakterystyczną dla tkanki embrionalnej.

Mahalik i wsp. [26] badając przeszczepy płodowej substancji czarnej u szczurów stwierdzili w nich morfologiczne, biochemiczne i molekularne cechy apoptozy, z maksimum zmian wyrażonym ok. 14 dnia po transplantacji, a więc w okresie najintensywniejszego wzrostu aksonów i synaptogenezy. Fakt ten może odzwierciedlać

eliminację komórek przeszczepu niezdolnych do połączenia się z komórkami gospodarza.

W rozwoju układu nerwowego kręgowców przeżycie neuronu wymaga dostarczenia mu czynników troficznych, takich jak NGF czy czynnik troficzny pochodzenia mózgowego (BDNF) [40]. W ostatnich latach zwraca się uwagę na czynniki troficzne wpływające na apoptozę wytwarzane oprócz neuronów również przez glej oraz na białka substancji międzykomórkowej [20]. Z coraz większej grupy czynników neurotroficznych najlepiej poznanym jest NGF. Egzogennie podany NGF zmniejsza obumieranie komórek w czasie rozwoju układu nerwowego [27]. Mechanizm, dzięki któremu NGF pozwala na przetrwanie zależnych od niego neuronów, nie jest jeszcze poznany. W grę mogą wchodzić tutaj dwie możliwości:

1) neurony wymagają substancji troficznych dla podtrzymania aktywności metabolicznej,

2) trofiny powstrzymują apoptozę [27].

Martin i wsp. [27] wykazali, że podanie do hodowli neuronów układu współczulnego pozbawionych NGF inhibitorów syntezy białek i RNA (cykloheksimid i aktynomycyna D) zapobiegało śmierci tych neuronów. Wynik ten pośrednio świadczy o tym, że czynniki troficzne hamują samobójczą aktywność komórek wymagającą, jak wiadomo, syntezy RNA i białek. Badacze ci sformułowali hipotezę, w myśl której NGF powoduje represję kaskady syntezy nowych białek z nowego mRNA, odpowiedzialnych za śmierć komórki. Stwierdzenie zjawiska apoptozy neuronów u dorosłych połączone z obserwacją, że NGF ma działanie neurotroficzne również w obrębie OUN, stwarza teoretyczne przesłanki do prób leczenia neurologicznych chorób zwyrodnieniowych przy pomocy substancji troficznych.

Terapia choroby Alzheimera, Parkinsona, czy stwardnienia zanikowego bocznego wymagałaby stosowania swoistych dla danych neuronów czynników troficznych, które do tej pory nie zostały wyizolowane, po drugie, dla uzyskania klinicznego efektu konieczne byłoby przewlekłe i ściśle wybiórcze, miejscowe podawanie tych leków [51]. Na udział apoptozy w degeneracji neuronów w chorobie Alzheimera wskazują badania Loo [24]. Udowodnił on, że syntetyczny beta-amyloid uważany za istotny czynnik sprawczy tej choroby, w warunkach doświadczalnych wywołuje w neuronach zmiany morfologiczne typowe dla apoptozy. Hipotezy dotyczące potencjalnej roli apoptozy w chorobach neurodegeneracyjnych nie są dostatecznie potwierdzone w badaniach *in vivo*, a rozbieżne wyniki podawane przez różnych autorów mogą wynikać ze stosowania różnych metod badawczych i ich interpretacji. I tak np. Yoshiyama i wsp. [61] donieśli o pozytywnej reakcji immunohistochemicznej na antygen Le(Y) w neuronach rdzenia kręgowego u chorych z SLA, podczas gdy Migheli i wsp. [31] stosując technikę ISEL nie stwierdzili obecności fragmentacji DNA w żadnej z badanych chorób zwyrodnieniowych OUN. Autorzy [31] przypuszczają, że za śmierć neuronów w tych jednostkach mogą być odpowiedzialne alternatywne, nie-apoptotyczne odmiany programowanej śmierci komórek, np. autofagowa bądź cytoplazmatyczna PCD. Odrębność mechanizmu i obrazu morfologicznego zjawiska PCD w neuronach podkreślają też Maślińska i Muzylak [28], sugerując

nawet, że neurony nie ulegają apoptozie, lecz programowana śmierć zachodzi w nich w wyniku innych, niepoznanych jeszcze mechanizmów molekularnych.

Można się spodziewać, że na problem patogenezy chorób zwyrodnieniowych OUN nowe światło rzuca postępy genetyki molekularnej. Przykładem na to mogą być badania genetyczne w rdzeniowym zaniku mięśni (SMA). Jedną z teorii tej choroby zakłada jako czynnik sprawczy zaburzenie procesu fizjologicznej inhibicji apoptozy neuronów ruchowych (*persistence of apoptosis*) na pewnym etapie embriogenezy układu nerwowego [43]. Stwierdzono, że niedawno odkryty gen białka hamującego neuronalną apoptozę (NAIP) zlokalizowany w regionie SMA na chromosomie 5q13.1 w przypadku SMA jest aż w 67% zmutowany (delecja dwóch pierwszych kodujących egzonów), w porównaniu z 2% w chromosomach ludzi zdrowych [43].

Coraz więcej uwagi poświęca się udziałowi apoptozy w ischemicznym uszkodzeniu mózgu. Badania doświadczalne Crumrina i wsp. [9] przeprowadzone na myszach linii c57 wykazały, że osłabienie ekspresji genu *p53* ma działanie neuroprotektoryjne w ogniskowym niedokrwieniu. Wśród tzw. dzikiego typu tych myszy obserwowano znacznie większe uszkodzenie po niedokrwieniu niż u myszy transgenicznych pozbawionych tego genu. Linnik i wsp. [23] przeprowadzali u szczurów dokomorowy wlew cykloheksimidu (inhibitora syntezy białek), a następnie poddawali je ogniskowemu niedokrwieniu mózgu stwierdzając przy tym 70% redukcję syntezy protein a wraz z nią znamienne ograniczenie strefy zawału. Oczyszczony DNA z obszaru ischemicznego wykazywał przy elektroforetycznym frakcjonowaniu cechy endonukleolitycznej degradacji, co może pośrednio świadczyć o udziale PCD w ischemicznej śmierci komórek. Powyższe obserwacje poparte są także wynikami pracy Roberts-Lewis i wsp. [42], którzy wykazali ochronny wpływ kwasu auryntrójkarboksylowego (ATA) na neurony hipokampa poddane ischemii bądź mikroinjekcji NMDA. ATA jest polimerycznym barwnikiem hamującym aktywność wapniowo zależnej endonukleazy. Wśród mechanizmów molekularnych mogących uczestniczyć w wyzwalaniu apoptozy w niedokrwieniu mózgu wymienia się aktywację układu Fas/FasL. Matsuyama i wsp. [29] stosując Northern blot stwierdzili wzrost ekspresji Fas mRNA w mózgu myszy po przejściowej globalnej ischemii.

Ze względów praktycznych największe z wymienionych aspektów apoptozy znaczenie ma jej związek z procesem nowotworzenia. Jeśli założymy, że jednym z możliwych mechanizmów onkogenezy jest nabycie oporności na apoptozę [49], to działania terapeutyczne ukierunkowane na reindukcję PCD mogą okazać się skuteczną bronią w walce z niektórymi nowotworami, na marginesie metody lecznicze, takie jak chemioterapia czy radioterapia, uznane są za induktory apoptozy [28,32]. Uważa się, że znajomość tzw. indeksu apoptotycznego (AI) w nowotworach może mieć wartość prognostyczną, a w trakcie leczenia pozwoli na lepszą ocenę jego skuteczności [31]. Warto dodać, że apoptoza może być także zjawiskiem niekorzystnym jatrogennej pochodzenia. Dowodem na to mogą być badania Vrdoljaka [56], który wykazał, że po doświadczalnym napromieniowaniu hodowli dojrzałych oligodendrocytów dochodzi w nich do apoptozy, co klinicznie może odpowiadać popromiennej demielinizacji.

Potencjalnie reindukcję apoptozy w komórkach nowotworowych można uzyskać przy pomocy wirusów onkolitycznych (uzyskanych metodami inżynierii genetycznej), deaktywację lub neutralizację białka bcl-2, reintrodukcję utraconej informacji z antygenów (np. p53) do komórek za pomocą wektorów czy poprzez aktywację enzymów swoistych dla apoptozy [4,49]. Pewne nadzieje można także łączyć z perspektywą syntezy chemioterapeutyków o mechanizmie działania skupionym na aktywacji apoptozy [49]. Rozważając możliwości manipulacji zjawiskiem apoptozy w chorobach nowotworowych warto nadmienić, że indukowanie jej jest prawdopodobnie spontanicznym, choć nie zawsze skutecznym sposobem walki organizmu z komórkami guza. Sarraf [45] badając u gryzoni kinetykę mięsaka zauważył, że ze wzrostem masy guza stopniowo rosła w nim ilość komórek apoptotycznych, jednak po osiągnięciu pewnej masy krytycznej ilość ta gwałtownie spadała i utrzymywała się dalej na stałym poziomie. Może to odzwierciedlać dążenie do autoregulacji wielkości guza, która ostatecznie zawodzi. W badaniu tym wykazano, że apoptoza odpowiadała za 7% całkowitej utraty komórek w mięsaku.

Nowsze badania wskazują na możliwość odwrotnego zjawiska tzn. nadmiernej indukcji PCD w patogenezie niektórych chorób, jak np. AIDS. Według Ameisen [2] większość immunologicznych i pozaimmunologicznych defektów w AIDS, włączając w to demencję i zanik mózgu może być odniesiona do indukcji procesu samobójczego limfocytów CD4 T oraz neuronów, spowodowanych pośrednią interferencją wirusa HIV z sygnalizacją śród- i międzykomórkową. Zjawiskiem indukującym apoptozę limfocytów w AIDS jest prawdopodobnie wiązanie się glikoproteiny gp 120 wirusa HIV-1 z antygenem CD4 [4,33]. Badania Mullera i wsp. [33] wykazały, że memantyna, antagonist receptorów NMDA, zapobiega apoptozie w hodowli neuronów szczu- rzych zachodzącej po 12-godzinnej inkubacji z białkiem gp120. Działanie to można wytłumaczyć hamowaniem przez ten lek NMDA-zależnego napływu jonów wapnia do neuronów, który ma fundamentalne znaczenie dla aktywacji enzymów biorących udział w apoptozie. Myśląc o sztucznym blokowaniu patologicznej apoptozy w przypadku AIDS należy się liczyć z negatywnymi tego następstwami, m.in. przełamanie autotolerancji, dysregulacją odpowiedzi immunologicznej czy wreszcie indukowaniem wzrostu nowotworów [2].

Z powyższych faktów wynika, że poznanie mechanizmów zawiadujących PCD może stworzyć nowe możliwości leczenia chorób, których istota łączy się z szeroko pojętymi zaburzeniami cyklu komórkowego. Przy planowaniu ingerencji w te procesy konieczna będzie ogromna rozważa i dalekowzroczność, albowiem dotyczy ona układu, rozregulowanie którego może przynieść nieobliczalne następstwa.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AKBAR AN, SALMON M, SAVILL J, JANOSSY G. A possible role for bcl-2 in regulating T-cell memory – a balancing act between cell death and survival. *Immunology Today* 1993;14:526–531.

- [2] AMEISEN J. Programmed cell death and AIDS: from hypothesis to experiment. *Immunology Today* 1992; 13: 388–391.
- [3] BONDY SC, LEE DK. Oxidative stress induced by glutamate receptor agonists. *Brain Res* 1993;610:229233.
- [4] CARSON DA, RIBEIRO JM. Apoptosis and disease. *Lancet* 1993;341:1251–1254.
- [5] CASTLE VP, HEIDELBERGER KP, BROMBERG J, OU X, DOLE M, NUNEZ G. Expression of the Apoptosis-Suppressing Protein bcl-2, in Neuroblastoma Is Associated with Unfavorable Histology and N-myc Amplification. *Am J Pathol* 1993;143:15431550.
- [6] CHEN S-C, CURRAN T, MORGAN JI. Apoptosis in the nervous system: New revelations. *J Clin Pathol* 1995;48:7–12.
- [7] COHEN JJ. Apoptosis. *Immunology Today* 1993;14:126–130.
- [8] COWAN WM, FAWCETT JW, OLEARY DDM, STANFIELD BB. Regressive Events in Neurogenesis. *Science* 1984;225:1258–1265.
- [9] CRUMRINE RC, THOMAS AL, MORGAN PF. Attenuation of p53 expression protects against focal ischemic damage in transgenic mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994;14:887–891.
- [10] ENOKIDO Y, HATANAKA H. Apoptotic cell death occurs in hippocampal neurons cultured in a high oxygen atmosphere. *Neuroscience* 1993;57:965–972.
- [11] FAWTHROP DJ, BOOBIS AR, DAVIES DS. Mechanisms of cell death. *Arch Toxicol* 1991;65:437–444.
- [12] GARCIA I, MARTINOU I, TSUJIMOTO Y, MARTINOU JC. Prevention of Programmed Cell Death of Sympathetic Neurons by the bcl-2 Proto-Oncogene. *Science* 1992;258:302–304.
- [13] GÓRA-TYBOR J, ROBAK T. Apoptoza – zaprogramowana śmierć komórki. *Post Hig Med Dośw* 1994;48:209–225.
- [14] HIRAIISHI K, SUZUKI K, HAKOMORI S, ADACHI M. Le(y) antigen expression is correlated with apoptosis (programmed cell death). *Glycobiology* 1993;3:381–390.
- [15] HORST A. Działanie produktów genów przeciwnowotworowych w aspekcie cyklu komórkowego. *Post Biol Kom* 1993;20:311–329.
- [16] IWANOWSKI L. Apoptosis and dark neurons. *Neuropatol Pol* 1988;26:573–579.
- [17] KERR JFR, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239–257.
- [18] KOCKI J, ROZYŃKOWA D. Gen bcl-2 w patofizjologii limfocytów B. *Post Biol Kom* 1991;18:169–182.
- [19] KORSMEYER SJ. Bcl-2: a repressor of lymphocyte death. *Immunology Today* 1992;13:285–288.
- [20] KOSSUT M. Plastyczność rozwojowa. Zjawiska wzrostu i regresu. [w] Kossut M. [red.] Mechanizmy plastyczności mózgu. Warszawa: PWN 1994:15–47.
- [21] LEONCINI L, DELVECCHIO MT, MEGHA T, BARBINI P, GALIENI P, PILERI S, SABATTINI E, GHERLINZONI F, TOSI P, KRAFT R, COTTIER H. Correlations Between Apoptotic and Proliferative Indices in Malignant Non-Hodgkin's Lymphomas. *Am J Pathol* 1993;142:755–763.
- [22] LEVINE AJ, MOMAND J, FINLAY CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991;351:453–456.
- [23] LINNIK MD, ZOBRIST RH, HATFIELD MD. Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1993;24:2002–2008.
- [24] LOO DT, COPANI A, PIKE CJ, WHITTEMORE ER, WALENCEWICZ AJ, COTMAN CW. Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:7951–7955.
- [25] LOUIS DN. The p53 Gene and Protein in Human Brain Tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 1994;53:11–21.
- [26] MAHALIK TJ, HAHN WE, CLAYTON GH, OWENS GP. Programmed Cell Death in Developing Grafts of Fetal Substantia Nigra. *Exp Neurol* 1994;129:27–36.

- [27] MARTIN DP, SCHMIDT RE, DISTEFANO PS, LOWRY OH, CARTER JG, JOHNSON EM. Inhibitors of Protein Synthesis and RNA Synthesis Prevent Neuronal Death Caused by Nerve Growth Factor Deprivation. *J Cell Biol* 1988;106:829-844.
- [28] MAŚLIŃSKA D, MUZYŁAK M. Apoptosis, programmed cell death in the central nervous system. *Folia Neuropathol* 1995;33:69-76.
- [29] MATSUYAMA T, HATAR, TAGAYA M, YAMAMOTO Y, NAKAJIMA T, FURUYAMA J, WANAKA A, SUGITA M. Fas antigen mRNA induction in postischemic murine brain. *Brain Res* 1994;657:342-346.
- [30] MELTZER PS. MDM2 and p53: a Question of Balance. *J Ntl Cancer Inst* 1994;86:1265-1266.
- [31] MIGHELI A, CAVALLA P, MARINO S, SCHIFFER D. A Study of Apoptosis in Normal and Pathologic Nervous Tissue After *In situ* End-Labeling of DNA Strand Breaks. *J Neuropathol Exp Neurol* 1994;53:606-616.
- [32] MOUNTZ JD, TALAL N. Retroviruses, apoptosis and autogenes. *Immunology Today* 1993;14:532-536.
- [33] MULLER WEG, SCHRODER HC, USHIJAMA H, DAPPER J, BORMANN J. gp 120 of HIV-1 induces apoptosis in rat cortical cell cultures: prevention by memantine. *Eur J Pharmacol* 1992;226:209-214.
- [34] NAGATA S, SUDA T. Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunology Today* 1995;16:39-43.
- [35] NAKASU S, NAKASU Y, NIOKA H, NAKAJIMA M, HANDA J. *bcl-2* protein expression in tumors of the central nervous system. *Acta Neuropathol (Berl)* 1994;88:520-526.
- [36] ORMEROD MG, SUN X, BROWN D, SNOWDEN RT, COHEN GM. Quantification of apoptosis and necrosis by flow cytometry. *Acta Oncol* 1993;32:417-424.
- [37] PERANDONES CE, ILLERA VA, PECKHAM D, STUNZ LL, ASHMAN RF. Regulation of Apoptosis In Vitro in Mature Murine Spleen T Cells. *J Immunol* 1993;151:3521-3529.
- [38] RADZISZEWSKA E. Fizjologiczna rola apoptozy. *Post Biol Kom* 1995;22:247-263.
- [39] RAFF MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992;356:397-400.
- [40] RAFF MC, BARRES BA, BURNE JF, COLES HS, ISHIZAKI Y, JACOBSON MD. Programmed Cell Death and the control of Cell Survival: Lessons from the Nervous System. *Science* 1993;262:695-700.
- [41] REED JC, MEISTER L, TANAKA S, CUDDY M, YUM S, GEYER C, PLEASURE D. Differential Expression of *bcl-2* Protooncogene in Neuroblastoma and Other Human Tumor Cell Lines of Neural Origin. *Cancer Research* 1991;51:6529-6538.
- [42] ROBERTS-LEWIS JM, MARCY VR, ZHAO Y, VAUGHT JL, SIMAN R, LEWIS ME. Aurintricarboxylic acid protects hippocampal neurons from NMDA- and ischemia-induced toxicity in vivo. *J Neurochem* 1993;61:378-381.
- [43] ROY N, MAHADEVAN MS, Mc LEAN M, SHUTLER G, YARAGHI Z, FARAHANI R, BAIRD S, BESNER-JOHNSTON A, LEFEBVRE C, KANG X. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* 1995;80:167-178.
- [44] ROŻYŃKOWA D. Genetyczne regulacje apoptozy, programowanej śmierci komórek. *Post Biol Kom* 1994;21:303-318.
- [45] SARRAF CE, BOWEN ID. Kinetic studies on a murine sarcoma and analysis of apoptosis. *Br J Cancer* 1986;54:989-998.
- [46] SAVILL J, FADOK V, HENSON P, HASLETT C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunology Today* 1993;14:131-136.
- [47] SCHIFFER D, CAVALLA P, CHIO A, GIORDANA MT, MARINO S, MAURO A, MIGHELI A. Tumor cell proliferation and apoptosis in medulloblastoma. *Acta Neuropathol (Berl)* 1994;87:362-370.
- [48] SCHWARTZ LM, OSBORNE BA. Programmed cell death, apoptosis and killer genes. *Immunology Today* 1993;14:582-590.

- [49] SINKOVICS J. Programmed cell death (apoptosis): its virological and immunological connections. *Acta Microbiol Hung* 1991;38:321–334.
- [50] SLOVITER RS, SOLLAS AL, DEAN E, NEUBORT S. Adrenalectomy-induced granule cell degeneration in the rat hippocampal dentate gyrus: Characterization of an in vivo model of controlled neuronal death. *J Comp Neurol* 1993;330:324–336.
- [51] SNIDER WD, JOHNSON EM. Neurotrophic Molecules. *Ann Neurol* 1989;26:489–506.
- [52] SORIANO E, DEL RIO JA, AULADELL C. Characterization of the phenotype and birthdates of pyknotic dead cells in the nervous system by a combination of DNA staining and immunohistochemistry for 5-bromodeoxyuridine and neural antigens. *J Histochem Cytochem* 1993;41:819–827.
- [53] STEWART BW. Mechanisms of Apoptosis: Integration of Genetic, Biochemical, and Cellular Indicators. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:1286–1295.
- [54] TAKANO YS, HARMON BV, KERR JFR. Apoptosis induced by mild hyperthermia in human and murine tumour cell lines: A study using electron microscopy and DNA gel electrophoresis. *J Pathol* 1991;163:329–336.
- [55] TRAUTH BC, KLAS C, PETERS AMJ, MATZKU S, MOLLER P, FALK W, DEBATIN KM, KRAMMER PH. Monoclonal Antibody-Mediated Tumor Regression by Induction of Apoptosis. *Science* 1989;245:301–305.
- [56] VRDOLJAK E, BILL C, STEPHENS LC, VAN DER KOGEL AJ, ANG K, TOFILON PJ. Radiation-induced apoptosis of oligodendrocytes in vitro. *Int J Radiat Biol* 1992;62:475–480.
- [57] WHITTEMORE ER, LOO DT, COTMAN CW. Exposure to hydrogen peroxide induces cell death via apoptosis in cultured rat cortical neurons. *Neuroreport* 1994;5:1485–1488.
- [58] WOOD KA, YOULE RJ. Apoptosis and free radicals. *Ann N Y Acad Sci* 1994;738:400–407.
- [59] WYLLIE AH. Apoptosis: Cell Death Under Homeostatic Control. *Arch Toxicol Suppl* 1987;11:3–10.
- [60] WYLLIE AH. Apoptosis (The 1992 Frank Rose Memorial Lecture). *Br J Cancer* 1993;67:205–208.
- [61] YOSHIYAMA Y, YAMADA T, ASANUMA K, ASAHI T. Apoptosis related antigen, Le(Y) and nick-end labeling are positive in spinal motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol Berl* 1994;88:207–211.

Otrzymano: 14.07.1995 r.

Przyjęto: 20.02.1996 r.

Adres autora: 41-813 Zabrze, ul. Łąpkowskiego 20/8

KOMUNIKATY

VI Ogólnopolska Konferencja Biologii Komórki

po raz kolejny odbędzie się w dniach 12–14 września 1996 r. w Lublinie.

Program naukowy Konferencji stwarza możliwość prezentacji najnowszych osiągnięć teoretycznych i doświadczalnych z zakresu biologii komórki w ramach 10 niżej wymienionych sekcji tematycznych:

- ▶ Błony biologiczne
- ▶ Patologia komórki
- ▶ Starzenie się i śmierć komórek
- ▶ Biologia rozwoju
- ▶ Ruch i cytoskielet– Komunikacja międzykomórkowa
- ▶ Komórka a środowisko
- ▶ Współczesne metody w biologii komórki
- ▶ Morfologiczna analiza ilościowa
- ▶ Varia.

Przewiduje się 40-minutowe wykłady (po 3 w każdej sekcji) oraz prezentacje prac w formie plakatów – w ramach poszczególnych sekcji.

Zgłoszenie chęci uczestnictwa w Konferencji powinno nastąpić przed 31 stycznia 1996 roku (z podaniem tytułu zgłaszanej pracy, trzech słów kluczowych oraz sugestią sekcji tematycznej).

Obrady Konferencji będą prowadzone w języku polskim.

Wszelkich informacji związanych z Konferencją udziela

dr hab. K. Trębacz
Zakład Biofizyki Instytutu Biologii UMCS
20-033 Lublin, ul. Akademicka 19
Fax: (81) 375102, tel. 375080
E-mail: TREBACZ BIOTOP. UMCS. LUBLIN. PL

Komunikat Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej

Zarząd Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej przyznaje doroczną nagrodę naukową, w tym również w roku 1995 i 1996, za wyróżniającą się oryginalną pracę z zakresu biologii komórki, indywidualną lub zespołową, wykonaną wyłącznie w krajowej placówce naukowej, opublikowaną w ostatnich dwóch latach w czasopiśmie figurującym w Current Content.

Wysokość nagrody w 1995 i 1996 r. wyniesie 60 NZŁ

Zgłoszenia wraz z dwoma odbitkami należy kierować do dnia 15 listopada każdego roku pod adresem Fundacji. Regulamin nagrody poniżej.

Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa
tel. 34-03-44, fax 3404470

Regulamin

dorocznej nagrody Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej

- * 1. Raz w roku przyznawana będzie jedna nagroda za wyróżniającą się, oryginalną pracę z zakresu biologii komórki, indywidualną lub zespołową, wykonaną wyłącznie w krajowej placówce naukowej.
- * 2. Praca musi być wydrukowana w czasopiśmie naukowym referowanym w Current Content.
- * 3. Praca powinna być opublikowana nie wcześniej niż w ostatnich dwóch latach poprzedzających nadanie nagrody.
- * 4. Preferowane będą prace młodych autorów.
- * 5. Wysokość nagrody w danym roku kalendarzowym ustala Zarząd Fundacji.
- * 6. Zgłaszać pracę do nagrody może każdy.
- * 7. Pracę należy zgłaszać do Zarządu Fundacji ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, pokój 314 do 15 października każdego roku.
- * 8. Ocenę kwalifikującą prace do nagrody przeprowadza Komisja Nagród powołana przez Zarząd Fundacji zasięgając w razie potrzeby opinii specjalistów.
- * 9. Decyzja Komisji ogłaszana będzie w "Postęпах Biologii Komórki".
- * 10. Nagroda wręczana będzie w czasie jednej z konferencji naukowych z zakresu biologii komórki.



W. Mejbaum-Katzenellebogen's Seminars in Molecular Biology

3. LIPOSOMES IN BIOLOGY AND MEDICINE

Czerwiec 3–5 1996, Wrocław-Jarnołtówek, Poland

Celem seminarium jest przedstawienie osiągnięć oraz wymiana doświadczeń w dziedzinie konstrukcji liposomów, jak i ich zastosowań praktycznych jako nośników leków, a także modeli błon biologicznych.

W czasie konferencji poruszane będą m.in. następujące zagadnienia:

- liposomy, techniki preparacji i zamykania leków,
- stabilność liposomów i jej regulowanie,
- liposomy w badaniach błon biologicznych,
- technologia liposomowa, od stołu laboratoryjnego do klinik,
- inne systemy przenoszenia leków.

Wykładowcy:

T. M. Allen (University of Alberta): Antibody-targeted liposomes in the treatment of cancer

Y. Barenholz (The Hebrew University) tytuł do ustalenia

G. V. Betageri (Auburn University): Factors affecting encapsulation of drugs in liposomes.

J. Bouwstra (Leiden/Amsterdam Center for Drug Research): The skin barrier and the transport of model drugs through this barrier by means of vesicles.

H. Eibl (Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie): Novel synthetic phospholipids and phospholipid analogs as liposomal carriers and potent drugs in the treatment of cancer and of parasitic infections.

I. Fichtner (Max-DElbruck-Center for Molecular Medicine): Preparation and pharmacology of liposomal anticancer agents.

J. de Gier (University of Utrecht): Comparison of liposomal bilayers with biological membranes.

G. Gregoriadis (University of London): Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems.

P. Le Conte (Nantes University): tytuł do ustalenia.

G. Lopez-Berestein (University of Texas): Nucleic acid-based therapeutic: Implications of lipid carriers in antisense oligonucleotide and gene delivery.

J. Monkkonen (University of Kuopio): Liposomal targeting and anti-inflammatory effects of bisphosphonates in macrophages.

N. Oku (Shizuoka University): Basic study and application of functional liposomes.

J. G. Riess (University of Nice): Elaboration and specific properties of fluorinated liposomes and related supramolecular systems.

G. L. Scherphof (University of Groningen): Effect of lipid composition on in vivo behaviour of liposomes.

M. Sentjerc (University of Ljubljana): Influence of lipid composition and size on the transport of liposomes entrapped substances into the skin.

R. Zeisig (Max-Delbruck-Center for Molecular Medicine): Preparation and properties of sterically stabilized liposomes made from anti-neoplastic alkylphosphocholines.

Koszt uczestnictwa do 1.04.96 wynosi 195 PLN, a po 1.04.96 – 280 PLN/uczestnika krajowego. Prosimy o zgłoszenia faxem na adres Komitetu Organizacyjnego. Drugi i finalny komunikat zostanie przesłany tylko zarejestrowanym uczestnikom.

LIPOSOMES IN BIOLOGY AND MEDICINE

Zakład Biochemii Genetycznej Instytutu Biochemii Uniwersytet Wrocławski

Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław

tel/tax +71 252930 e-mail:zubik @ angband.microb.uni.wroc.pl

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, nie publikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem biochemicznym, histologicznym, anatomicznym i embriologicznym. Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody redakcji publikowane w innych periodykach. Prosimy Autorów o nadsyłanie prac bezpośrednio do Redaktorów odpowiedniej specjalności, a do Redakcji w Warszawie tylko te artykuły, które nie odpowiadają żadnej z wymienionych specjalności.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

1) artykuły przeglądowe nie przekraczające 20 stron maszynopisu i do 100 pozycji bibliograficznych w zasadzie z ostatnich 5 lat (do 10% pozycji bibliograficznych starszych);

2) doniesienia z ostatniej chwili na 3–5 stronach maszynopisu z kilkoma pozycjami bibliograficznymi ostatniego roku (licząc od daty wysłania do redakcji);

3) listy do redakcji (do 1 strony maszynopisu).

Tekst pracy i załączniki należy przysyłać w dwóch egzemplarzach na adres redakcji w Warszawie bądź jednego z Redaktorów (adresy na 2 str. okładki). Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 z podwójną interlinią i marginesem 4 cm po lewej stronie. Strony powinny być kolejno numerowane. Nadesłanie tekstu pracy, poprawionego po recenzjach, na dyskietce przyspieszy publikację.

Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona jest dla redakcji i powinna zawierać: imiona i nazwiska autorów oraz ich tytuły naukowe, adresy w pracy i domowy wraz z telefonem, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rysunków. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następna strona powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 150 słów) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (Index Medicus), o ile są tam zawarte. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rysunków, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, rys. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawiać alfabetycznie według następującego wzoru:

[1] HNİLICA LS, McLURE ME, SPELTZBERG TC. Histone biosynthesis and the cell cycle. [w] Philips MP, Schwartz E [red.]Histone and Nucleohistones. London, New York: Philips, Plenum Press 1977: 60–64.

[2] SACHSENMAJER W, REMY V, PLATTNER R. Initiation of synchronous mitosis in *Physarium polycephalum*. *Exptl Cell Res* 1980; 2: 41–48.

Tabele, opisy schematów i rysunków powinny być załączone na oddzielnych stronach. Schematy i rysunki muszą być wykonane w postaci nadającej się do reprodukcji. Fotografie powinny być kontrastowe i wykonane na błyszczącym papierze. Wymiary poszczególnych rysunków, schematów i fotografii nie mogą przekraczać 125 x 180 mm lub ich połowy. Jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, należy podać, skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na reprodukcję, jeżeli materiały te zamieszcza się w niezmienionej formie. Wszystkie załączniki muszą być opatrzone na odwrocie nazwiskiem pierwszego autora i oznaczeniem góry i dołu ilustracji. Stosowane jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu 3 dni. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 1 egz. zeszytu PBK z opublikowaną pracą, a ponadto mogą zamówić odbitki odpłatnie.

Redakcja prosi o propozycję do 5 osób (nazwisko, imię, adres, fax), które byłyby odpowiednimi recenzentami maszynopisu, nie powinny jednak być pracownikami instytucji, w której pracuje autor, ani jego współpracownikami. Redakcja prosi także głównego Autora o dołączenie do maszynopisu podpisanej odpowiedzi na następujące pytania:

Dołączono 2 kopie maszynopisu,

Treść pracy nie była uprzednio publikowana i nie została wysłana do innej redakcji.

tak nie

Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę.

Dołączono kopię pracy na dyskietce z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego z komputera IBM

tak nie

Jest zgoda osób, których informacje niepubli-

Odpowiadam za całość pracy opisanej w zał. maszyn.

tak nie

kowane są zamieszczone w tekście artykułu

Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w "Postęпах Biologii Komórki" przechodzi na własność reda-

tak nie

kcji i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji.

tak nie

podpis

TREŚĆ

W tym zeszycie	145
Wspomnienie pośmiertne o prof. K. Stojałowskim	147
BANDOROWICZ-PIKUŁA J.: Rola aneksyn, białek wiążących Ca^{2+} i fosfolipidy w komórce – o fuzji błon biologicznych do przekazywania informacji	151
HAUS O.: Cytogenetyka przewlekłej białaczki szpikowej. I. Przewlekła białaczka szpikowa Ph-dodatnia [Ph(+) CML]	169
HAUS O.: Cytogenetyka przewlekłej białaczki szpikowej. II. Cytogenetyczne podtypy przewlekłej białaczki szpikowej (CML); Ph-ujemna CML, mozaikowatość Ph, warianty translokacyjne Ph	183
KOWALCZYK D.: Analiza różnorodności receptorów limfocytów T wiążących antygen w guzach litych	197
SZCZYGIĘŁ M., KURPISZ M.: Struktura plemnikowego DNA ssaków	211
ŻAK I.: Receptory adhezyjne	221
HINEK A., HINEK A.: Funkcje biologiczne receptora elastynowego	243
CZEKAJ P.: Interakcje receptorów hormonu tarczycy i pochodnych witamin A i D z DNA	261
KRAJEWSKA W. M., MŁYNARSKI W., WÓJCIK M.: Genetyczne podstawy transformacji nowotworowej jelita grubego	279
SŁOWIŃSKI J., HARABIN-SŁOWIŃSKA M., KAŁUŻA J.: Zjawisko apoptozy w układzie nerwowym	299
Komunikaty	313

**Warunki prenumeraty kwartalnika
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI**

Prenumerata na rok 1996

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1996 na konto:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 501132-40006576-2701-3-1110.

Cena prenumeraty rocznika (4 zeszyty + ew. 2 suplementy) na rok 1996:

dla instytucji (bibliotek) wynosi 40 zł,

a dla odbiorców indywidualnych 16 zł.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 1996 should be placed at local press distributors or directly at Editorial Board of POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa/Poland, account No:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 501132-40006576-2701-3-1110.

Price per year 20 US dollars.

Indeks 369705