

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

POLISH
ANATOMICAL
SOCIETY

POLISH SOCIETY
FOR CELL
BIOLOGY

VOL. 28, ISSUE 2/2001
(161–294)

1.6.2001
Postępy
Biologii
Komórki

Advances
in Cell
Biology



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.

Quarterly of the Polish Anatomical Society, the Polish Society of Cell Biology, the Polish UNESCO Net, and the Foundation for Cell Biology and Molecular Biology, partially supported by the Committee for Scientific Research (KBN)

Redaguje Kolegium – Editors:

Szczepan BILIŃSKI – biologia rozwoju, embriologia, cytoszkielet, połączenia międzykomórkowe – developmental biology, embryology, cytoskeleton, cell junctions – *Inst. Zoologii UJ, 30-060 Kraków, Ingardena 6*

Lilla HRYNIEWIECKA – energetyka komórki, mitochondria – cell energetics, mitochondria – *Zakład Bioenergetyki, Uniwersytetu im. A. Mickiewicza, 61-701 Poznań, ul. Fredry 10*

Bożena KAMIŃSKA – neurobiologia, biologia molekularna – neurobiology, molecular biology – *Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego 02-097 Warszawa, ul. Pasteura 3*

Jerzy KAWIAK – immunologia, cytometria, hematologia, biologia nowotworów – immunology, cytometry, hematology, cancer biology – *Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*

Wincenty KILARSKI – mięśnie, skurcz mięśniowy, ruchy komórek – muscles, muscle contraction, cell movements – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*

Maria OLSZEWSKA – komórki roślinne, informacja genetyczna w komórkach roślinnych i zwierzęcych – plant cells, genetic information in plant and animal cells – *Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin Instytutu Fizjologii i Cytologii UŁ, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16*

Barbara PŁYTYCZ – immunologia – immunology – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*

Maciej ZABEL – histologia ogólna, endokrynologia, histochemia (immunocytochemia, hybrydocytochemia), ultrastruktura komórek – histology, endocrinology, histochemistry (immunocytochemistry, hybrydocytochemistry), cell ultrastructure – *Zakład Histologii AM, 50-368 Wrocław, ul. Chatubińskiego 6a*

Jan ŻEROMSKI – patologia, immunologia, cytometria – pathology, immunology, cytometry – *Katedra i Zakład Immunologii AM 60-355 Poznań, ul. Przybyszewskiego 49*

Rada Redakcyjna – Advisory Board:

Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca, Mieczysław CHORAŻY, Leszek CIECIURA, Antoni HORST, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŻNICKI, Olgierd NARKIEWICZ, Aleksandra PRZEŁĘCKA, Aleksandra STOJAŁOWSKA, Lech WOJTCZAK

Adres Redakcji – Editorial Office: Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, Poland, tel. 8340 344, fax 8340470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl.

© Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej – Foundation for Cell Biology and Molecular Biology

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

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced in any form or by any means without the prior written permission of the publisher. Requests for permission should be addressed to the Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

W tym zeszycie Postępów Biologii Komórki

- Problemy molekularnej systematyki i molekularnej ewolucji u roślin okrytozających to nowe kierunki badań, których podstawy przedstawiono na stronie 197. Za charakterystyczne cechy gatunku przyjmuje się rozmiar genomu (zawartość DNA), liczbę i morfologię chromosomów, wzór prążków C oraz lokalizację genów rRNA. Liczba chromosomów nie jest skorelowana z rozmiarami genomu, lecz z ich całkowitą objętością podczas metafazy mitozy. Natomiast rozmiary genomu u roślin są skorelowane z zawartością sekwencji powtarzalnych.
- Na końcach chromosomów znajdują się powtarzalne sześci nukleotydowe sekwencje określane jako telomery. Z każdym podziałem dochodzi do skrócenia telomerów, a krótkie telomery są sygnałem wstrzymania podziałów komórki. Mechanizmy replikacji telomerów, które umożliwiają nieograniczoną proliferację komórek nowotworowych opisano na stronie 243.
- Bardzo dyskutowanym problemem są możliwości wykorzystania komórek macierzystych do przeszczepów. Jolanta Karasiewicz i Jacek Modliński z Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu przedstawili bardzo kompetentnie jak otrzymano linie pierwotnych komórek zarodkowych człowieka z węzłów zarodkowych blastocyst. Omówili również komórki macierzyste tkanek oraz możliwości ich transdyferencjacji (str. 219).
- Omówienie udziału połączeń międzykomórkowych typu gap w procesie kancerogenezy przedstawiono w artykule na stronie 277.



Streszczenia artykułów z bieżących zeszytów Postępów Biologii Komórki można znaleźć w Internecie pod adresem: www.pbkom.pl, natomiast z wcześniejszych roczników pod adresem: www.mol.uj.edu.pl/pbk, póki nie zostaną przeniesione pod nowy adres.

STRUKTURA I BIOLOGIA KOMPLEKSU RECEPTORA LIMFOCYTÓW T (TCR/CD3)

THE STRUCTURE AND BIOLOGY OF T CELL RECEPTOR COMPLEX TCR/CD3

Agata KOSMACZEWSKA¹, Irena FRYDECKA^{1, 2},
Lidia CISZAK¹, Dorota BOĆKO¹

¹Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu,
²Katedra i Klinika Hematologii i Chorób Rozrostowych AM we Wrocławiu

Streszczenie: TCR/CD3 jest kompleksem ośmiu podjednostek, który wskutek stymulacji antygenowej inicjuje serię procesów biochemicznych w limfocycie T prowadzących do zmiany stanu aktywności komórki. Pełnienie właściwych funkcji efektorowych przez limfocyty T umożliwia charakterystyczna struktura, w której wyróżnia się dwie funkcjonalnie odmiennie części: region polimorficzny, służący do swoistego rozpoznawania antygenów (receptor TCR), oraz region wysoce zachowawczy, pośredniczący w transdukcji sygnału aktywującego limfocyt T (kompleks CD3). Wszystkie podjednostki kompleksu CD3 uczestniczą w aktywacji komórki T oraz w syntezie i transporcie całego receptora do powierzchni błony komórkowej. Szczególna pozycja homodimeru ζ - ζ wynika z obecności w częściach cytoplazmatycznych każdego z łańcuchów ζ aż trzech sekwencji ITAM, odgrywających kluczową rolę we wczesnych etapach przekazywania sygnału w limfocycie T, oraz maskowania sygnału internalizacji receptora. W artykule przedstawiono obecny stan wiedzy na temat struktury kompleksu TCR/CD3, a także udziału jego poszczególnych podjednostek w procesach związanych z powstawaniem kompletnego receptora oraz jego przemieszczaniem się w obrębie limfocyty T, z uwzględnieniem transportu do błony komórkowej oraz jego poaktywacyjnej internalizacji.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28: 163–181)

Słowa kluczowe: limfocyt T, kompleks TCR/CD3, transdukcja sygnału, sekwencja ITAM, sekwencja di-leucynowa, internalizacja.

Summary: TCR/CD3 is a complex of eight subunits, which initiates biochemical events in T cell after antigen stimulation leading to T cell activation. The effector functions of T lymphocytes results from their specific structure including two functionally opposed regions: the polymorphic region specialized in specific antigen recognition (T cell receptor – TCR), and the signal transducing region (CD3 complex). All subunits of CD3 complex are involved in T cell activation, assembly of TCR/CD3 complex and its transport to the cell membrane. The special role of ζ - ζ homodimer results from the presence of

three ITAM motifs in cytoplasmic domain of each ζ chain, what significantly amplifies the signal transduction in T cell, and additionally ζ - ζ inhibits the signal leading to internalization of TCR/CD3 complex. In this article we reviewed the present knowledge of the structure of TCR/CD3 complex, the role of individual TCR/CD3 subunits in assembly events of octameric TCR/CD3 complex and intracellular transport of TCR/CD3 complex, including its transport to the cell membrane and its internalization after T cell activation.

(*Advances in Cell Biology 2001; 28: 163–181*)

Keywords: T cell, TCR/CD3 complex, signal transduction, ITAM motif, di-leucine motif, internalization.

WPROWADZENIE

Podstawą sprawnej odpowiedzi układu odpornościowego jest skuteczna wymiana informacji pomiędzy jego komórkami. Błona cytoplazmatyczna wszystkich komórek stanowi nie tylko barierę zapewniającą integralność środowiska wewnętrznego komórki, ale jednocześnie umożliwia kontakt ze środowiskiem zewnętrznym i innymi komórkami. Sygnały aktywacji komórki dzięki wykształconym receptorom powierzchniowym zostają odebrane przez komórkę, wzmocnione, a następnie przeniesione przez błonę komórkową do cytoplazmy i jądra komórkowego. Systemy sprawnej wymiany informacji dotyczą wszystkich komórek żywego organizmu, w tym również układu odpornościowego.

Limfocyty T wraz z limfocytami B stanowią dwa podstawowe rodzaje komórek układu odpornościowego. Limfocyty T rozpoznają antygeny za pomocą powierzchniowych receptorów TCR (ang. *T cell receptor*). W przeciwieństwie do limfocytów B, które produkują immunoglobuliny zarówno w formie związanej z ich błoną komórkową, jak i w formie wolnych cząsteczek, limfocyty T w zasadzie nie uwalniają swoich receptorów. Większość limfocytów T ma na swojej powierzchni receptory TCR typu $\alpha\beta$. W 1985 r. wykryto nową populację limfocytów T, która ma receptor TCR typu $\gamma\delta$. Główną funkcją limfocytów T jest rozpoznawanie i stymulacja odpowiedzi na obce peptydy antygenowe związane z cząsteczkami MHC na komórkach prezentujących antygen APC (ang. *antigen presenting cells*). Rozpoznanie antygeny przez kompleks TCR/CD3 różni się od rozpoznania antygeny przez immunoglobuliny. Przeciwciała rozpoznają antygeny rozpuszczalne, które mogą mieć różny charakter chemiczny. Ligandami TCR są natomiast kompleksy krótkich peptydów antygenowych z cząsteczkami klasy I lub II, kodowanymi przez geny głównego kompleksu zgodności antygenowej MHC (ang. *major histocompatibility complex*). Zjawisko prezentacji limfocytom T antygenów związanych z cząsteczkami MHC przez komórki APC nazywane jest mianem restrykcji MHC. Receptor TCR tworzy w błonie limfocytów T kompleks ze strukturą CD3, który w wyniku stymulacji antygenowej inicjuje serię procesów biochemicznych w limfocytach T prowadzących do aktywacji komórki. Stymulacja antygenowa kompleksu TCR/CD3 może pro-

wadzić do reakcji cytotoksycznej przeciwko komórkom prezentującym określony antygen lub/i do rekrutacji i aktywacji innych komórek układu odpornościowego przez sekrecję bioaktywnych cytokin.

BUDOWA KOMPLEKSU TCR/CD3

Receptor TCR $\alpha\beta$ /CD3 jest kompleksem wielołańcuchowym o charakterze zgrupowania hetero-oligomerycznego, składającym się z receptora TCR o strukturze heterodimerskiej $\alpha\beta$ oraz podjednostek kompleksu CD3 (γ , δ , $\epsilon\epsilon$ i $\zeta\zeta$) [37]. Kompleks TCR/CD3 pod względem funkcjonalnym zbudowany jest z dwóch części [55]:

- regionu różnorodnego strukturalnie, służącego do rozpoznawania i łączenia szerokiego spektrum antygenów (TCR),
- regionu stałego, pośredniczącego w przekazywaniu sygnału aktywującego komórkę z receptora limfocytów TCR do wnętrza (CD3).

Natomiast pod względem strukturalnym kompleks TCR/CD3 zbudowany jest z trzech domen: zewnątrzkomórkowej (N-końcowej), przezbłonowej i cytoplazmatycznej (C-końcowej).

Łańcuchy α i β receptora TCR

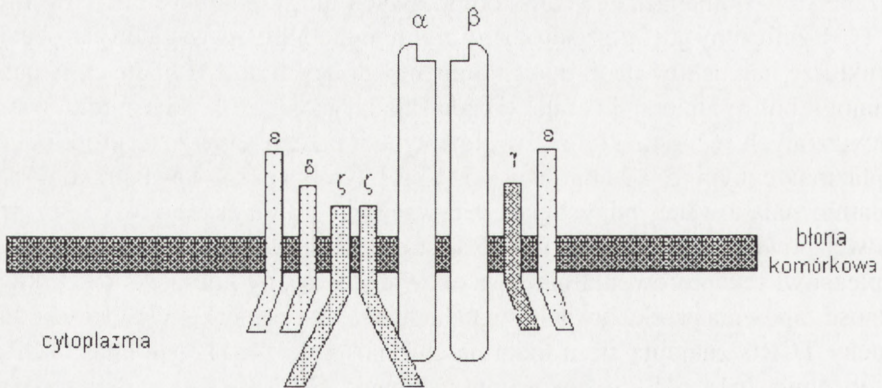
Ponad 90% limfocytów krwi obwodowej ma receptory TCR $\alpha\beta$, a zaledwie 1–10% TCR typu $\gamma\delta$. Rola limfocytów T $\gamma\delta$ w układzie odpornościowym jest stosunkowo mało poznana i nie wchodzi w zakres niniejszej pracy. Częsteczką TCR typu $\alpha\beta$ jest heterodimer o masie cząsteczkowej ok. 90 kDa, którego łańcuchy związane są w domenach zewnątrzkomórkowych mostkiem dwusiarczkowym [32, 37]. TCR zaliczany jest do nadrodziny immunoglobulin ze względu na obecność w strukturze łańcuchów α i β dwóch domen podobnych do spotykanych w obrębie immunoglobulin: zmiennej i stałej (każda składająca się z ok. 110 aminokwasów), zakotwiczonej w błonie komórkowej peptydem przezbłonowym o krótkim końcu cytoplazmatycznym (5–12 aminokwasów) [41]. Krótka część wewnątrzkomórkowa i dodatnio naładowane, odpychające się wzajemnie aminokwasy w części przezbłonowej powodują, że struktura TCR jest niestabilna. Stabilności nadaje całemu kompleksowi receptorowemu niekowalencyjnie związany kompleks CD3, którego obecność zapewnia przekazywanie sygnału do wnętrza komórki [37]. Geny kodujące łańcuchy TCR α znajdują się u ludzi na chromosomie 14q11, natomiast TCR β na chromosomie 7p14-p15. Swoistość antygenowa TCR związana z polimorfizmem części zmiennych łańcuchów α i β wynika z somatycznej rearanżacji fragmentów V (ang. *variable*), D (ang. *diversity*) i J (ang. *joining*) genów kodujących łańcuchy

α i β [29, 61]. Informacja o sekwencji aminokwasowej części cytoplazmatycznej i zewnątrzkomórkowej TCR w jej domenie stałej, wchodzącej w kontakt z białkami kompleksu CD3, zawarta jest w regionach stałych genów kodujących łańcuchy α i β ($C\alpha$ i $C\beta$). W obrębie części zmiennej heterodimeru $TCR\alpha\beta$, analogicznie do części zmiennej immunoglobulin, postuluje się istnienie 3 nadzmiennych domen przestrzennych biorących udział w wiązaniu kompleksu MHC-peptyd. Domeny CDR1 i CDR2 (ang. *complementarity determining regions*) wchodzą w interakcję z polimorficzną częścią cząsteczki MHC, podczas gdy domeny CDR3 są odpowiedzialne za wiązanie z peptydem antygenowym [18, 21]. Dodatkowym źródłem zmienności receptorów TCR jest obecność aktywnej dezoksyrybonukleotydylotransferazy (TdT), której działanie polega na niezależnym od matrycy DNA dołączaniu pojedynczych nukleotydów do końców 3' nici DNA ulegających rearanżacji. Tak działająca maszyna rekombinacyjna może teoretycznie dostarczyć 10^{15} różnych cząsteczek $TCR\alpha\beta$, mających różną swoistość antygenową.

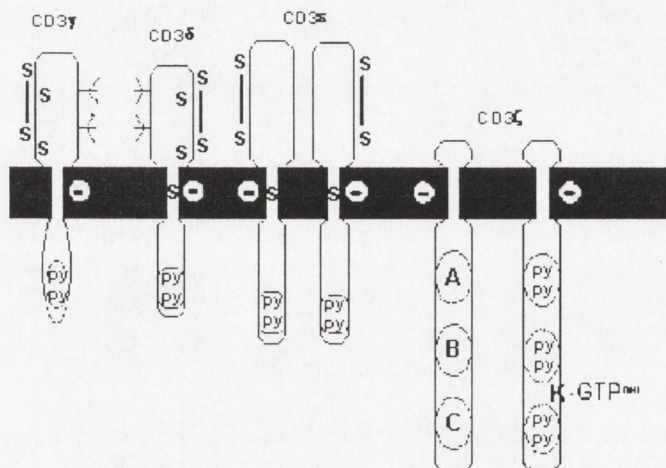
Receptory $TCR\alpha\beta$ tworzą w błonie limfocytów T kompleks ze strukturą CD3, która uformowana jest przez 6 łańcuchów: γ , δ , $\epsilon\epsilon$, $\zeta\zeta$ zwanych niezmiennymi w odróżnieniu od łańcuchów TCR. Polipeptydy kompleksu CD3 tworzą 3 dimeryczne cząsteczki: $\gamma\epsilon$, $\delta\epsilon$ i $\zeta\zeta$ (lub $\zeta\eta$) rozłożone po obu stronach TCR [37, 41]. Budowę struktury TCR/CD3 przedstawiono schematycznie na rysunku 1.

Podjednostki γ , δ i ϵ kompleksu CD3

Łańcuchy γ , δ i ϵ kompleksu CD3 są produktami trzech ściśle sprzężonych genów znalezionych u ludzi na chromosomie 11q23 [29]. Z uwagi na stwierdzone podobieństwo sekwencji nukleotydowych genów kodujących łańcuchy γ i δ oraz



RYSUNEK 1. Struktura kompleksu TCR/CD3 (na podstawie [61]): α , β – łańcuchy receptora TCR odpowiedzialne za swoiste rozpoznanie antygeny; γ , δ , ϵ , ζ – podjednostki kompleksu CD3 uczestniczące w przenoszeniu sygnału aktywującego limfocyt T

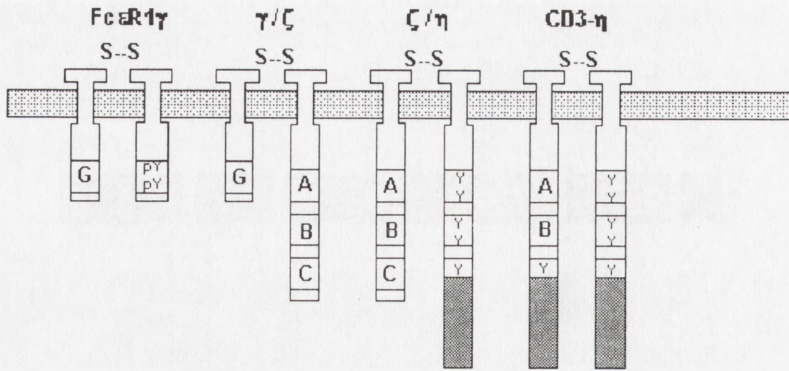


RYSUNEK 2. Ogólny schemat budowy podjednostek kompleksu CD3: A, B, C – sekwencje ITAM; pY – miejsce fosforylacji reszty tyrozynowej (Y)

ich bliską lokalizację (oddalone są od siebie tylko o 1,4 kb) postuluje się, że geny te powstają wskutek duplikacji [50]. Konsekwencją podobieństwa tych podjednostek na poziomie genetycznym jest wysoki stopień homologii sekwencji aminokwasowych. Ze względu na obecność charakterystycznych domen podjednostki γ , δ i ϵ zaliczane są do nadrodziny immunoglobulin. Każdy z tych łańcuchów zawiera w swojej strukturze domenę zewnątrzkomórkową, odcinek przezbłonowy i wysoce konserwatywny koniec cytoplazmatyczny (rys. 1 i 2). Polipeptydy γ i δ kompleksu CD3 są glikozylowanymi proteinami o masie cząsteczkowej odpowiednio 21 kDa i ok. 25–28 kDa, występującymi w dojrzałych kompleksach TCR/CD3 jako podjednostki pojedyncze. W przeciwieństwie do nich nieglikozylowany łańcuch ϵ , o masie cząsteczkowej ok. 20 kDa, wykrywany jest w powierzchniowych strukturach TCR/CD3 w liczbie dwóch, tworząc z łańcuchami γ i δ heterodimery $\epsilon\gamma$ i $\delta\epsilon$ [4, 51]. Przezbłonowe regiony łańcuchów γ , δ i ϵ zawierają ujemnie naładowane aminokwasy (kwas glutaminowy lub kwas asparaginowy), które odgrywają istotną rolę w połączeniach międzylańcuchowych z dodatnio naładowanymi odcinkami przezbłonowymi podjednostek TCR α i TCR β . Neutralizacja ładunków w regionach przezbłonowych w strukturach tworzących kompleks TCR/CD3 sprzyja stabilizacji całego kompleksu w błonie komórkowej.

Łańcuchy ζ , η i Fc ϵ RI γ kompleksu CD3

Szczególne zainteresowanie wśród wszystkich podjednostek budujących kompleks TCR/CD3 budzi łańcuch ζ występujący w ok. 90% obwodowych mysich



RYSUNEK 3. Struktura dimerycznych podjednostek z rodziny ζ : A, B, C, G – sekwencje ITAM; Y – reszty tyrozynowe; łańcuchy ζ i η są produktami tego samego genu; łańcuch η powstaje wskutek alternatywnego cięcia i składania pierwotnego transkryptu mRNA podjednostki ζ ; obie podjednostki zawierają w swych strukturach wewnątrzkomórkowych po trzy sekwencje ITAM, jednakże różnią się długością części cytoplazmatycznych: domena wewnątrzkomórkowa podjednostki η jest o 42 aminokwasy dłuższa niż odpowiadająca jej domena podjednostki ζ oraz pozbawiona jednej reszty tyrozynowej; nie rozstrzygnięto dotychczas, czy pomimo wspólnego pochodzenia i bardzo dużej homologii strukturalnej, podjednostki te wypełniają takie same funkcje

limfocytów T w postaci homodimera ζ - ζ . Pozostałe 10% limfocytów krwi obwodowej zawiera dimery utworzone przez łańcuchy ζ - η i η - η [7, 26]. Szczegółowe badania materiału genetycznego potwierdziły wspólne pochodzenie podjednostek ζ i η : polipeptydy te są produktami tego samego genu znalezione w ludzkich komórkach T na chromosomie 1q22-q25, różniącymi się długością domen cytoplazmatycznych. Struktura wewnątrzkomórkowa łańcucha η jest o 42 aminokwasy dłuższa niż odpowiadająca jej domena podjednostki ζ (112 aminokwasów) [26] (rys. 2 i 3). Wykazano, że łańcuch η powstaje wskutek alternatywnego cięcia i składania pierwotnego transkryptu mRNA CD3 ζ (ang. *alternative splicing*) [7]. Nie rozstrzygnięto dotychczas, czy pomimo wspólnego pochodzenia i bardzo dużego stopnia homologii obu podjednostek kompleksu CD3, wypełniają one takie same funkcje. W świetle sprzecznych doniesień rola podjednostki η w przewodzeniu sygnału aktywacji w komórce T nie została jeszcze ostatecznie określona. Potwierdzono natomiast włączenie łańcucha η w szlak przemian fosfatydyloinozytolu (PI) indukowanego w następstwie stymulacji TCR/CD3 [40] oraz w proces transdukcji sygnałów apoptotycznych w mysich hybrydomach limfocytów T [39]. W przeciwieństwie do populacji mysich limfocytów T, których 10% zawiera w strukturze kompleksu TCR/CD3 łańcuch η [26], w ludzkich obwodowych komórkach T alternatywny produkt transkrypcji mRNA ζ nie podlega translacji i nie pojawia się na powierzchni.

W niewielkim odsetku komórek T izolowanych z ludzkiej krwi obwodowej i z mysiego nabłonka jelitowego, znaleziono w strukturze kompleksu TCR/CD3 podjednostkę FcεRIv (charakterystyczną dla receptora wysokiego powinowactwa dla IgE występującego na powierzchni mastocytów) tworzącą homo-lub heterodimer wspólnie z łańcuchem ζ lub η [34, 44]. Obwodowe limfocyty T mogą więc posiadać różne izoformy kompleksu CD3 i jest wielce prawdopodobne, że każda z nich odgrywa inną rolę w rozwoju, różnicowaniu i funkcjonowaniu komórek T.

Sekwencja ITAM

Motywym wspólnym dla podjednostek kompleksu CD3 jest sekwencja ITAM (ang. *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*), której obecność w łańcuchach cytoplazmatycznych wykazano w procesie analizy sekwencji aminokwasowych (rys. 2 i 3). Ta wysoko zachowawcza sekwencja o strukturze: D(E)-X₇-D(E)-X₂-Y-X-X-L-X₇-Y-X-X-L(I) (gdzie: D – kwas asparaginowy, E – kw. glutaminowy, Y – tyrozyna, L – leucyna, I – izoleucyna, X – inny aminokwas) [6, 46] warunkuje uczestnictwo każdej podjednostki CD3, która ją zawiera, w procesie zainicjowania transdukcji sygnału aktywującego komórkę. Sześć szczególnie wyróżnionych w tej strukturze reszt aminokwasowych (2 reszty kw. asparaginowego, 2 reszty tyrozyny, 2 reszty leucyny) znajduje się w precyzyjnie określonej odległości od siebie. W procesie sieciowania stymulowanego receptora aminokwasy te mogą razem formować miejsca dla oddziaływania kinaz tyrozynowych, generujących w komórce T sygnał wiodący do szlaku przemian prowadzących do proliferacji i różnicowania limfocytów T w komórki efektorowe. Funkcjonalna analiza proksymalnej sekwencji ITAM zawartej w strukturze łańcucha ζ przeprowadzona przez Sunder Plassmanna [53] dostarczyła interesujących informacji dotyczących różnicowania funkcjonalnego segmentów YxxL w zależności od ich położenia. Mutacja reszt tyrozyny (Y) i leucyny (L) położonych w obrębie segmentu YxxL znajdującego się w pobliżu N-końca sekwencji ITAM całkowicie uniemożliwia uczestniczenie tej sekwencji ITAM w transdukcji sygnału aktywującego komórkę T. Z drugiej strony dowiedziono, że substytucja w pozycję Y+1 tego segmentu reszty alaniny ułatwia aktywację limfocytu T. Natomiast mutacja reszt tyrozyny i leucyny w obrębie sekwencji YxxL położonej przy C-końcu sekwencji ITAM nie zapobiega fosforylacji tyrozyny N-końcowej. Nie wpływa też na połączenie sekwencji ITAM z kinazami tyrozynowymi rodziny Src, aktywację szlaku zależnego od fosfolipazy C i mobilizację jonów wapniowych w komórce, jednakże w bliżej nie określony sposób redukuje nasilenie sygnałów wiodących do produkcji IL-2 przez komórkę T. Dodatkowo zmutowanie leucyny segmentu YxxL C-końcowego ogranicza stabilność wiązania kinazy ZAP-70 do ufosforylowanej sekwencji ITAM. Wyniki tych badań dowiodły różnego znaczenia poszczególnych segmentów YxxL pojedynczej sekwencji ITAM

oraz aminokwasów wchodzących w skład segmentów YxxL w indukcji sygnału aktywującego komórkę T [53].

W przenoszeniu sygnału przez błonę komórkową teoretycznie mogą uczestniczyć wszystkie podjednostki CD3 z obecnością sekwencji ITAM w ich częściach cytoplazmatycznych [34, 42, 52]. Szczególna pozycja homodimeru ζ - ζ wśród podjednostek uczestniczących w przenoszeniu sygnału pobudzenia limfocytów T przez błonę komórkową wynika z obecności aż trzech sekwencji ITAM w jednym łańcuchu ζ [23, 53], z których każda zawiera po dwie reszty tyrozynowe ulegające fosforylacji pod wpływem kinaz tyrozynowych [45, 60]. W wyniku fosforylacji za pomocą kinaz z rodziny Src każda z dwóch fosfotyrozyn sekwencji ITAM przyłącza dwie domeny SH2 kinazy ZAP-70 (ang. *Zeta Associated Protein*) na zasadzie przestrzennego dopasowania. Kinaza ZAP-70 jest enzymem uczestniczącym w inicjacji szlaków sygnałowych TCR/CD3 we wnętrzu limfocyta T [55, 56, 61]. Sekwencje ITAM w łańcuchu ζ mogą przyłączać również inne cząsteczki biorące udział w przenoszeniu sygnału w komórce T, m.in. kinazę PI3 i białko adaptorowe Grb2/Sos. Przyłączenie tych molekuł do sekwencji ITAM nasila kaskadę sygnałową i sprzyja aktywacji limfocytów T. Dimer łańcuchów ζ uważany jest za kluczową molekułę uczestniczącą w aktywacji limfocytów T nie tylko z powodu posiadania w swojej strukturze aż trzech sekwencji ITAM i możliwości przyłączania, poza kinazami tyrozynowymi, również innych molekuł szlaku sygnałowego [23, 24]. Obecność sekwencji ITAM we wszystkich podjednostkach kompleksu CD3 sprzyja tylko częściowej kompensacji ewentualnego braku łańcucha ζ przez pozostałe podjednostki CD3, bowiem jego wyjątkowa rola polega także na tym, że dimer ζ - ζ ma zdolność przewodzenia sygnału zależnego od obecności nie scharakteryzowanego dotąd motywu specyficznego wyłącznie dla homodimeru ζ - ζ , co może powodować istotne zaburzenia w odpowiedzi limfocytów T przy braku podjednostki ζ [1]. Dokładna charakterystyka tej sekwencji wymaga dalszych badań. Znaczenie podjednostki ζ w procesie przekazywania sygnału indukowanego stymulacją kompleksu TCR/CD3 zostało udowodnione po raz pierwszy w badaniach na modelu mysim z wyłączonym genem kodującym łańcuch ζ [54]. Hybrydomy komórek T pochodzące od mutantów CD3 ζ -/- wykazywały zaburzenia funkcjonalne związane z brakiem odpowiedzi na stymulację antygenową oraz znacznie osłabioną reakcją na stymulację w warunkach *in vitro* [54]. Natomiast porównanie chimerycznej molekuły zawierającej domenę cytoplazmatyczną łańcucha ζ z nie zaburzonym strukturalnie kompleksem TCR/CD3, nie wykazało różnic w sposobie przenoszenia sygnału z powierzchni do wnętrza komórki T, dowodząc istnienia właśnie w cytoplazmatycznej części łańcucha ζ sekwencji o kluczowym znaczeniu w aktywacji [24]. Dodatkowo stwierdzono, że mutacja w cytoplazmatycznej domenie łańcucha ζ prowadzi do upośledzenia funkcji limfocytów T [16].

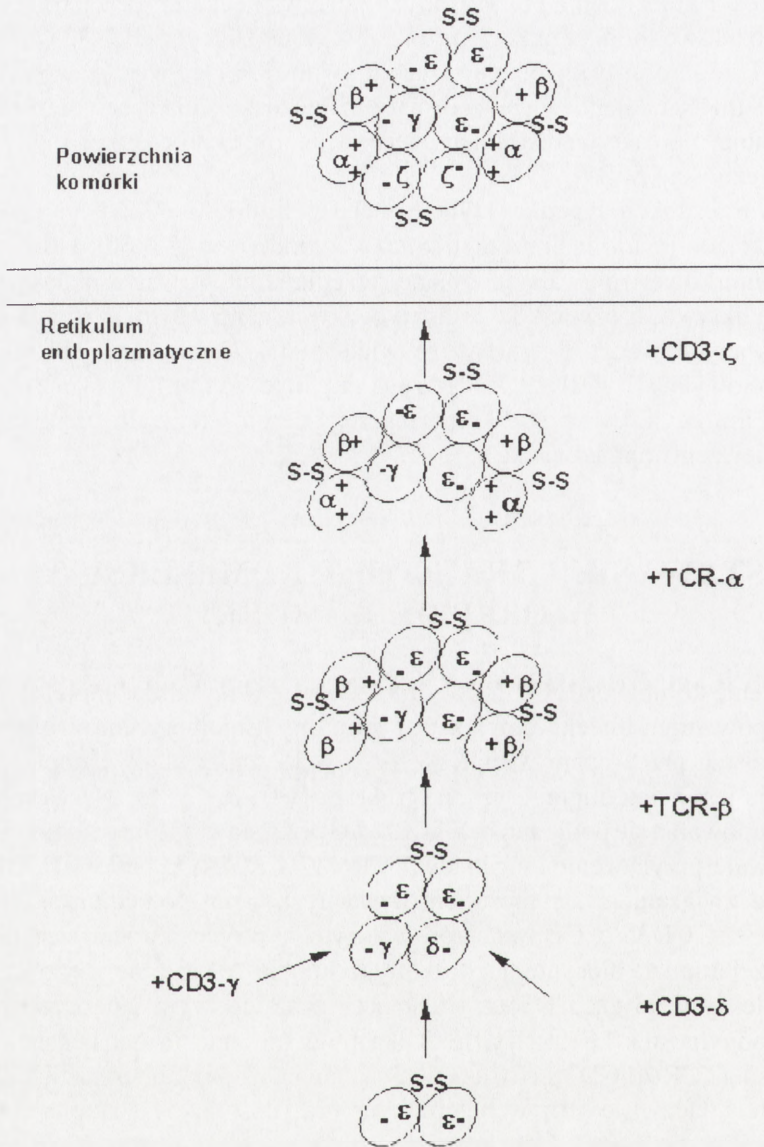
Niejasna jest dotąd jedynie rola sekwencji ITAM obecnej w łańcuchu cytoplazmatycznym podjednostki CD3 δ . Przeprowadzenie badań z wykorzystaniem klo-

nu komórek T selektywnie pozbawionych mRNA dla części wewnątrzkomórkowej łańcucha δ udowodniło, że brak całej domeny cytoplazmatycznej CD3 δ nie pozbawia komórki T zdolności przejścia do stanu aktywności. Przeciwnie, pozbawienie limfocytów T mRNA całego łańcucha δ sprzyjało pozostawianiu tych komórek w stanie funkcjonalnej niereaktywności, mierzonej niezdolnością do produkcji IFN- γ i brakiem cytotoksyczności [5, 35].

Proces transdukcji sygnału aktywacyjnego w limfocycie T polega na łańcuchowych reakcjach fosforylacji szeregu kinaz komórkowych [33, 60]. Ufosforylowane białka komórkowe wpływają na zmianę stężenia komórkowego jonów wapnia, pH komórki i aktywację czynników transkrypcyjnych genów cytokin i ich receptorów. Zaktywowany limfocyt T syntetyzuje wiele białek uczestniczących w reakcjach odpornościowych (IL-2, IL-2R, IFN- γ , enzymy lityczne i in.). Przenoszenie sygnału aktywacji limfocyta T w obrębie komórki jest procesem wielce złożonym i przekracza ramy niniejszego opracowania.

POWSTAWANIE I TRANSPORT KOMPLEKSU TCR/CD3 W OBREBIE KOMÓRKI T

Tworzenie kompleksu TCR/CD3 rozpoczyna się w retikulum endoplazmatycznym (RE) grupowaniem białek kompleksu w struktury oligomeryczne. Do opuszczenia RE i przejścia przez aparat Golgiego (AG) w kierunku błony cytoplazmatycznej wymagana jest pełna oligomeryzacja struktury [19, 20, 22, 38, 51]. Schematycznie proces grupowania się podjednostek TCR/CD3 przedstawiono na rysunku 4. Sugeruje się, że trwałe przyłączenie łańcuchów TCR α i TCR β do kompleksu CD3 jest poprzedzone związaniem się mostkiem dwusiarczkowym podjednostek ϵ , γ i δ w pary: CD3 ϵ/ϵ , CD3 δ/ϵ , CD3 γ/ϵ , które wykryto w próbie immunoprecypitacji już w pierwszej minucie biosyntezy. Struktury te stopniowo łączą się w coraz to większe subkompleksy CD3 $\gamma\epsilon\epsilon$, CD3 $\delta\epsilon\epsilon$ i CD3 $\delta\epsilon\epsilon\gamma$ z następowym jednoczasowym wiązaniem podjednostek TCR α i TCR β . Kilka minut po syntezie tego heksamerycznego kompleksu (TCR $\alpha\beta$ /CD3 $\gamma\epsilon\epsilon\delta$) łańcuchy ζ ulegają homodimeryzacji lub rzadziej – łańcuch ζ łączy się z η w heterodimer [12, 38, 43, 51]. Dopiero w wyniku dimeryzacji podjednostek ζ dochodzi do ich połączenia z niedojrzałym heksamerycznym kompleksem TCR/CD3 i powstania dojrzałej oktamerycznej struktury spotykanej na powierzchni limfocyta T [49]. Przyłączenie podjednostki CD3 ζ jest więc ostatnim krokiem w grupowaniu podjednostek kompleksu TCR/CD3, a cały proces przebiega bardzo szybko. Jednak pomimo wbudowania łańcuchów ζ utworzony kompleks TCR/CD3 nie jest jeszcze funkcjonalnie gotów opuścić RE i AG, prawdopodobnie z powodu konieczności przemian konformacyjnych umożliwiających pełnienie właściwych dla receptora funkcji.



RYSUNEK 4. Schemat powstawania kompleksu TCR/CD3: synteza kompleksu rozpoczyna się w RE grupowaniem podjednostek w kolejne struktury oligomeryczne. Ostatnim etapem powstawania kompleksu TCR/CD3 jest dimeryzacja podjednostek ζ z następowym ich przyłączeniem do niekompletnego heksamerycznego receptora TCR $\alpha\beta$ /CD3 $\gamma\delta\epsilon$; pełny, funkcjonalnie aktywny kompleks TCR/CD3 jest strukturą oktameryczną, która po zmianach konformacyjnych opuszcza RE i AG, i zostaje przetransportowana do błony komórkowej; włączenie dimeru podjednostek ζ - ζ w strukturę powstającego kompleksu TCR/CD3 jest warunkiem koniecznym dla prawidłowej powierzchniowej ekspresji receptora. bowiem dimer ζ - ζ w nieznanym bliżej sposób „maskuje” sygnał internalizacji receptora TCR/CD3 płynący z aktywnej sekwencji di-leucynowej obecnej w domenie cytoplazmatycznej podjednostki CD3 γ

Początkowe badania nad losem nowopowstałych komponentów receptora TCR/CD3 wykazały, że większość ze zgrupowanych w czasie syntezy podjednostek receptora szybko ulega degradacji jeszcze przed związaniem w pełny kompleks TCR/CD3 [38]. Poszczególne podjednostki różnią się bowiem między sobą swoim okresem półtrwania, co wynika z ich odmiennej podatności na działanie enzymów proteolitycznych. Podjednostki CD3 γ , ϵ i ζ mają wielokrotnie dłuższe okresy półtrwania i ich obecność w powstających subkompleksach w połączeniach z labilnymi łańcuchami TCR α , TCR β i CD3 δ nadaje subkompleksom cech oporności na szybką degradację [62]. Dość trwale wydają się połączenia typu: TCR α /CD3 γ , TCR β /CD3 γ , TCR β /CD3 ϵ , TCR α /CD3 ϵ . Przeciwnie zachowują się dimery składające się jedynie z labilnych podjednostek (TCR α /CD3 δ i TCR β /CD3 δ), które podlegają szybko procesowi rozpadu. Inkorporacja w strukturę tworzonego subkompleksu w początkowej fazie grupowania stabilnej podjednostki jest więc obligatoryjnie wymagana do przeżycia receptora. Badania nad metabolizmem struktury TCR/CD3 przeprowadzone przez Ono i wsp. [43] dowiodły dynamicznej natury przemian, jakim podlega łańcuch ζ oraz dostarczyły dowodów na to, że podjednostka wieloskładnikowego kompleksu może prezentować niezależny metabolizm. Wykazano bowiem, że synteza i wbudowywanie CD3 ζ jest momentem ograniczającym formowanie dojrzałych kompleksów TCR/CD3. Stwierdzono, że łańcuch ζ syntetyzuje się 10-krotnie szybciej w porównaniu do pozostałych podjednostek i w mniejszej od nich liczbie. Ponadto podjednostki ζ zwykle nie poddają się procesowi degradacji i ulegają natychmiastowemu po syntezie wbudowaniu w pełny kompleks receptora komórki T [43].

Udział podjednostek kompleksu CD3 w transporcie receptora TCR/CD3

Łańcuchowi CD3 ζ przypisuje się kluczową rolę w mechanizmach odpowiedzialnych za grupowanie i transport całego kompleksu TCR/CD3 do błony komórkowej, odkąd stwierdzono, że limfocyty T pozbawione tej podjednostki mają na swojej powierzchni śladową liczbę kompleksów TCR/CD3 lub są ich zupełnie pozbawione. Heksameryczne subkompleksy TCR $\alpha\beta$ CD3 $\gamma\epsilon\delta$ powstają w tych warunkach z pominięciem ostatniego etapu polegającego na przyłączeniu dimeru łańcuchów ζ . Ten niedojrzały kompleks po opuszczeniu RE zostaje przetransportowany przez aparat Golgiego do lizosomów w celu degradacji [12, 47, 54]. Wykazano bowiem, że włączenie w niedojrzałą heksameryczną strukturę kompleksu receptora komórki T łańcucha ζ dostarcza całemu kompleksowi swoistego sygnału niezbędnego do transportu pełnego dojrzałego receptora TCR/CD3 do powierzchni błony komórkowej.

Badania eksperymentalne ostatnich lat poszerzyły naszą wiedzę na temat znaczenia współdziałania podjednostki ζ z innymi łańcuchami kompleksu TCR/CD3 w procesach dobłonowego transportu tegoż receptora. Wykazano w nich, że motywem

bezpośrednio odpowiedzialnym za zahamowanie transportu do powierzchni komórki T niedojrzałego kompleksu TCR/CD3 jest swoista sekwencja obecna w domenie cytoplazmatycznej łańcucha CD3 γ (zwana sekwencją di-leucynową), indukująca silny sygnał internalizacji receptora TCR/CD3 [10, 11, 13]. Wydaje się, że motyw łańcucha CD3 γ , kierujący niekompletnie uformowany receptor TCR/CD3 na drogę degradacji, musi być w nim stale aktywny. Dodatkowo stwierdzono, że przyłączenie dimeru ζ - ζ do heksamerycznego kompleksu w trakcie grupowania powoduje wyhamowanie aktywności sekwencji di-leucynowej z następową stabilizacją ekspresji powierzchniowej kompletnie uformowanego receptora. Wprawdzie mechanizm blokady sekwencji di-leucynowej w podjednostce γ przez łańcuchy ζ nie został dotąd dokładnie wyjaśniony, jednak ich znaczenie w procesie maskowania sygnału internalizacji receptora TCR/CD3 zostało jednoznacznie potwierdzone w badaniach z wykorzystaniem chimerycznych molekuł CD16/CD3 γ i CD4/CD3 γ , z których tylko cząsteczka CD16/CD3 γ ma zdolność przyłączania łańcuchów ζ - ζ z następowym transportem do powierzchni błony komórki T [9]. Stabilizacja ekspresji powierzchniowej cząsteczki CD16/CD3 γ - $\zeta\zeta$ świadczy o braku aktywności sekwencji di-leucynowej oraz ograniczeniu internalizacji receptora. Dopiero ufosforylowanie seryny w pozycji 126 w wyniku stymulacji komórki T nasila proces wychwytu receptora z powierzchni błony i wyraźnie zmniejsza jego ekspresję. Przeciwnie zjawisko obserwowano w przypadku molekuly CD4/CD3 γ , która nie ma zdolności łączenia dimeru ζ - ζ . Ekspresja powierzchniowa chimery była niewielka, a szybkość jej internalizacji bardzo duża, co świadczy o silnym sygnale wychwytu cząsteczki CD4/CD3 γ , płynącym z aktywnej sekwencji di-leucynowej. Wyniki tego eksperymentu dowodzą udziału dimeru łańcuchów ζ - ζ w maskowaniu sygnału internalizacji receptora spoczynkowych komórek T [9].

Wiadomo już, że poza podjednostkami ζ w proces grupowania i transportu kompleksu TCR/CD3 do powierzchni komórki zaangażowane są również pozostałe podjednostki kompleksu CD3. Analiza materiału genetycznego pochodzącego od pacjentów z zaburzeniami ekspresji powierzchniowej kompleksu TCR/CD3 spowodowanymi defektem w genach kodujących podjednostki CD3 ϵ i CD3 γ dowodzi znaczenia tych podjednostek w transporcie do błony receptora TCR/CD3 [27, 57]. Z kolei udział łańcucha CD3 δ w wewnątrzkomórkowym przenoszeniu receptora limfocytów T potwierdzono w eksperymentach z udziałem klonu komórek pozbawionych podjednostki CD3 δ . Zaburzenia ekspresji powierzchniowej kompleksu TCR/CD3 obserwowane w tych komórkach były następstwem nieprzyłączenia się łańcuchów TCR α i TCR β do powstających subkompleksów pozbawionych CD3 δ . W wyniku transfekcji do komórek CD3 δ -/- genu zarówno całego łańcucha CD3 δ , jak i genu z wyłączonym eksonem kodującym część cytoplazmatyczną CD3 δ , uzyskano przywrócenie ekspresji powierzchniowej całego kompleksu TCR/CD3. W związku z tym wysunięto przypuszczenie, że to w części zewnątrzkomórkowej CD3 δ mieści się sekwencja odpowiedzialna za przyłączenie TCR α i TCR β do

tworzącego się kompleksu TCR/CD3 oraz jego transport do powierzchni błony [5]. Udział domeny zewnątrzkomórkowej podjednostki CD3 δ oraz dodatkowo CD3 γ w przemianach kompleksu TCR/CD3 związanych z grupowaniem i transportem na powierzchnię błony komórkowej i z aktywacją limfocyta T potwierdził też Luton [35]. Co więcej, wykazał on, że również części cytoplazmatyczne obu podjednostek zawierają specyficzne sekwencje aminokwasowe kontrolujące regulację ekspresji powierzchniowej kompleksu TCR/CD3 w następstwie aktywacji komórki, przy czym postuluje się znacznie większą rolę w tym procesie łańcucha CD3 γ . Na podstawie wyników tych badań [35, 59] można wysunąć wniosek, że w podjednostkach CD3 δ i CD3 γ regiony cytoplazmatyczne i zewnątrzkomórkowe funkcjonują niezależnie od siebie w procesie przemieszczania się receptora komórki T na jej powierzchnię.

Udział innych białek w transporcie kompleksu TCR/CD3

Wydaje się, że poza łańcuchami kompleksu TCR/CD3 w proces transportu kompleksu do powierzchni komórki zaangażowane są również białka obecne w RE, jedynie przejściowo wiążące się ze składnikami struktury TCR/CD3, jak CD3 ω i IP 90 (kalneksyna) [19, 28, 38, 58]. Dowiedziono, że białka te włączane są zarówno we wczesne, jak i późne etapy grupowania poszczególnych łańcuchów w subkompleksy oraz aktywnie uczestniczą w procesie przemieszczania się pełnego kompleksu poza obszar RE. CD3 ω jest dość słabo poznanym składnikiem TCR/CD3 o masie cz. 28 kDa, zidentyfikowanym w ludzkich i mysich limfocytach T. Białko CD3 ω nie stanowi integralnej części funkcjonalnie aktywnego powierzchniowego kompleksu TCR/CD3, natomiast wiązuje się z powstającymi subkompleksami jedynie w RE. Ścisłe ograniczenie jego lokalizacji do obszaru retikulum endoplazmatycznego powoduje, że oddysocjowanie kompleksu receptora TCR/CD3 od CD3 ω następuje bezpośrednio przed jego transportem do aparatu Golgiego. Znaczenie białka CD3 ω w transporcie kompleksu do powierzchni komórki zostały potwierdzone przez dokonanie transfekcji genów kodujących poszczególne podjednostki TCR/CD3 (TCR α i TCR β , CD3: γ , δ , ϵ , ζ) do linii komórkowej COS [20]. Brak podjednostki CD3 ω w komórkach tej linii w bardzo znacznym stopniu ograniczył poziom powierzchniowej ekspresji receptora TCR/CD3, co świadczy o pełnieniu przez CD3 ω roli ważnego regulatora procesu przemieszczania się kompleksu do błony komórkowej limfocytów T. Drugim białkiem uczestniczącym w transporcie kompleksu TCR/CD3 poza region RE jest kalneksyna (IP 90) [19, 28, 38, 58] będąca integralnym białkiem błony RE. Kalneksyna bierze udział w nieswoistym wiązaniu wielu protein powstających w obszarze RE, jak TCR/CD3, BCR (ang. *B cell receptor*), cząsteczka MHC klasy I, oraz z jonami Ca⁺⁺ i prawdopodobnie jest odpowiedzialna za ich transport poza rejon RE [44].

Liczne badania procesu formowania dojrzałego i stabilnego kompleksu TCR/CD3 dowodzą znaczenia ładunku, jakim obdarzone są reszty aminokwasowe w odcinkach

przezbłonowych łańcuchów TCR α , TCR β i podjednostkach CD3. Łańcuch TCR α ma w tym odcinku dodatnio naładowane reszty: argininy 239 i argininy 244, zaś TCR β – lizyny 271, reagujące z ujemnie naładowanymi aminokwasami w odcinkach transmembranowych podjednostek CD3. Pozbawienie podjednostek tworzących kompleks TCR/CD3 swoistych dla nich aminokwasów obdarzonych ładunkiem w odcinkach przezbłonowych ogranicza zdolność reagowania podjednostek CD3 z łańcuchami receptora TCR [3, 20], nie wpływa natomiast na tworzenie połączeń pomiędzy poszczególnymi podjednostkami CD3. Wyjątek stanowią łańcuchy ζ , wymagające do dimeryzacji obecności w swoich regionach transmembranowych reszt aminokwasowych naładowanych jednoimiennie [49].

Przemieszczanie się receptora TCR/CD3 w obrębie limfocyta T w następstwie stymulacji

Po swoistym rozpoznaniu antygeny przez limfocyt T i usieciowaniu receptora TCR/CD3 z następową aktywacją komórki, kompleks ten ulega internalizacji. Silny sygnał internalizacji kompleksu TCR/CD3 z powierzchni błony komórkowej w aktywowanych limfocytach T indukuje sekwencja położona w proksymalnym odcinku łańcucha CD3 γ (uczestnicząca także w hamowaniu transportu niedojrzałego receptora do powierzchni komórki) o budowie: S126-D127-XXX-L131-L132 (gdzie S – seryna, X – in. aminokwas, D – kwas asparaginowy, L – leucyna) [10, 11, 13]. Ufosforylowanie seryny w pozycji 126 w czasie aktywacji komórki T oraz obecność sekwencji di-leucynowej (L131/L132) warunkują poaktywacyjne osłabienie ekspresji TCR/CD3 związane ściśle z aktywnością kinazy białkowej C (ang. *protein kinase C*) [10]. Na podstawie badań własnych Dietrich [11] zaproponował dwustopniowy przebieg procesu internalizacji kompleksu TCR/CD3 w następstwie stymulacji komórki. W pierwszym etapie dochodzi do rozpoznania przez aktywną kinazę białkową C podjednostki CD3 γ i ufosforylowaniu przez nią reszty seryny w pozycji 126. Następnie w wyniku rozpoznania ufosforylowanej już sekwencji indukującej sygnał internalizacji przez cząsteczki białek adaptorowych AP-1 i AP-2 dochodzi do ich przyłączenia z następowym przemieszczeniem receptora TCR/CD3 z powierzchni błony komórkowej do wnętrza komórki T i skierowaniem go na drogę degradacji w strukturach RE, AG i lizosomach [11, 13]. Dalsze badania nad regulacją ekspresji powierzchniowej TCR/CD3 wykazały, że poza S126 i sekwencją di-leucynową L131/L132 do związania białek adaptorowych AP-1 i AP-2 konieczna jest obecność reszty kwaśnego aminokwasu w pozycji 127 [13]. Mechanizm molekularny zjawiska poaktywacyjnej internalizacji receptora TCR/CD3 polega prawdopodobnie na indukowaniu zmian konformacyjnych kompleksu TCR/CD3 pod wpływem ufosforylowania S126, które sprzyjają następowej ekspozycji sekwencji D127-XXX-L131-L132, wiążącej kolejno białka AP-1 i AP-2. Konsekwencją tego połączenia jest przyspieszenie internalizacji TCR/CD3 z po-

wierzchni komórki T i zmniejszenie jego ekspresji powierzchniowej. Pojawiły się ponadto sugestie, że kompleksy TCR/CD3, które uległy poaktywacyjnej internalizacji nie ulegają całkowitej degradacji i mogą powracać na powierzchnię komórki T podczas ponownej aktywacji komórki [8]. Ten swoisty recykling receptora TCR/CD3 miałby być uzależniony od defosforylacji S126 pod wpływem swoistej fosfatazy serynowo-treoninowej [30]. Wynika z tego, że regulacja ekspresji powierzchniowej kompleksu TCR/CD3 może opierać się na procesach fosforylacji i defosforylacji podjednostki CD3 γ , ponieważ w kompletnie uformowanym powierzchniowym kompleksie TCR/CD3 sekwencja z obecnością S126 i L131/L132 jest tak długo nieaktywna, dopóki nie zostanie ufosforylowana przez kinazę białkową C. Przeciwnie, defosforylacja S126 może sprzyjać inaktywacji całego motywu podjednostki CD3 γ indukującej sygnał do internalizacji receptora TCR/CD3 z następowym powrotem kompleksu na powierzchnię komórki w stanie jej spoczynku. Wydaje się więc, że może to stanowić jeden ze sposobów fizjologicznej regulacji ekspresji powierzchniowej kompleksu TCR/CD3 oraz aktywności komórek T [30, 48].

UWAGI KOŃCOWE

Procesy powstawania i transportu kompleksu TCR/CD3 uzależnione są od prawidłowej syntezy poszczególnych jego podjednostek oraz od obecności białek pomagających te przemiany. Jednakże optymalna ekspresja powierzchniowa kompleksu TCR/CD3 wydaje się być raczej wynikiem subtelnej równowagi pomiędzy procesami jego powstawania i degradacji. Ogromne znaczenie prawidłowej ekspresji powierzchniowej kompleksu TCR/CD3 wynika z faktu, że limfocyty T z obecnością zaburzonych strukturalnie i funkcjonalnie kompleksów TCR/CD3 wykazują różnego rodzaju zaburzenia w przebiegu procesu aktywacji, decydujące o nieprawidłowościach w różnicowaniu komórek T w grasicy i wypełnianiu przez nie funkcji efektorowych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AOE T, GOTO S, OHNO H, SAITO T. Different cytoplasmic structure of the CD3 zeta family dimer modulates the activation signal and function of T cells. *Int Immunol* 1994; **6**(11): 1671–1679.
- [2] BERRIDGE MJ. Lymphocyte activation in health and disease. *Crit Rev Immunol* 1997; **17**: 155–178.
- [3] BLUMBERG R, ALARCON B, SANCHO J, MC DERMOTT F, LOPEZ P., BTEITMEYER J, TERHORST C. Assembly and function of the T cell antigen receptor: requirements of either

- the lysine or arginine residues in the transmembrane region of the α chain. *J Biol Chem* 1990; **265**: 14036–14043.
- [4] BLUMBERG RS, LEY S, SANCHO J, LONBERG N, LACY E, MCDERMOTT F, SCHAD V, GREENSTEIN JL, TERHORST C. Structure of the T cell antigen receptor: evidence for two CD ϵ subunits in the T cell receptor/CD3 complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 7220–7224.
- [5] BUFERNE M, LUTON F, LETOURNEUR F, HOEVELER A, COUEZ D, BARAD M, MALISSEN B, SCHMITT-VERHULST AM, BOYER C. Role of CD3delta in surface expression of the TCR/CD3 complex and in activation for killing analyzed with a CD3delta-negative cytotoxic T lymphocyte variant. *J Immunol* 1992; **148**: 657–664.
- [6] CAMBIER JC. New nomenclature for the Reth motif (or ARH1/TAM/ARAM/YXXL). *Immunology Today* 1995; **16**: 110–110.
- [7] CLAYTON LK, D'ADAMIO L, HOWARD FD, SIEH M, HUSSEY RE, KOYASU S, REINHERZ EL. CD3 η and CD3 ζ are alternatively spliced products of a common genetic locus and are transcriptionally and/or post-transcriptionally regulated during T-cell development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 5202–5206.
- [8] DIETRICH J, BACKSTROM T, LAURITSEN JP, KASTRUP J, CHRISTENSEN MD, VON BULOW F, PALMER E, GEISLER C. The phosphorylation state of CD3 γ influences T cell responsiveness and controls T cell receptor recycling. *J Biol Chem* 1998; **273**: 24232–24238.
- [9] DIETRICH J, GEISLER C. T cell receptor ζ allows stable expression of receptors containing the CD3 γ leucine-based-receptor-sorting motif. *J Biol Chem* 1998; **273**: 26281–26284.
- [10] DIETRICH J, HOU X, WEGENER AM, GEISLER C. CD3 γ contains a phosphotyrosine-dependent di-leucine motif involved in down-regulation of the T cell receptor. *EMBO J* 1994; **13**: 2156–2166.
- [11] DIETRICH J, HOU X, WEGENER AM, PEDERSEN LO, ODUM N, GEISLER C. Molecular characterization of the di-leucine-based internalization motif of the T cell receptor. *J Biol Chem* 1996; **271**: 11441–11448.
- [12] DIETRICH J, KASTRUP J, LAURITSEN JP, MENNE C, VON BULOW F, GEISLER C. TCR zeta is transported to and retained in the Golgi apparatus independently of other TCR chains: implications for TCR assembly. *Eur J Immunol* 1999; **29**: 1719–1728.
- [13] DIETRICH J, KASTRUP J, NIELSEN BL, ODUM N, GEISLER C. Regulation and function of the CD3 γ DxxxLL motif: a binding site for adaptor protein-1 and adaptor protein-2 *in vitro*. *J Cell Biol* 1997; **138**: 271–281.
- [14] DIETRICH J, NEISIG A, HOU X, WEGENER AM, GAJHEDE M, GEISLER C. Role of CD3 gamma in T cell receptor assembly. *J Cell Biol* 1996; **132**: 299–310.
- [15] EXLEY M, VARTICOVSKI L, PETER M, SANCHO J, TERHORST C. Association of phosphatidylinositol 3-kinase with a specific sequence of the T cell receptor ζ chain is dependent on T cell activation. *J Biol Chem* 1994; **269**: 15140–15146.
- [16] FRANK SJ, NIKLINSKA BB, ORLOFF DG, MERCEP M, ASHWELL JD, KLAUSNER RD. Structural mutation of the T cell receptor ζ chain and its role in T cell activation. *Science* 1990; **249**: 174–177.
- [17] FRYDECKA I, KACZMAREK P, BOČKO D, KOSMACZEWSKA A, CISZAK L. Alternations in signal transducing molecule CD3 ζ in patients with neoplastic diseases. *Arch Immunol Ther Exp* 1998; **46**: 355–359.
- [18] GARCIA KC, DEGANO M, STANFIELD RL, BRUNMARK A, JACKSON MR, PETERSON PA, TEYTON L, WILSON IA. An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* 1996; **274**: 209–219.
- [19] GARDNER TG, FRANKLIN RA, ROBINSON PJ, PEDERSON NE, HOWE C, KEARSE KP. T cell receptor assembly and expression in the absence of calnexin. *Arch Biochem Biophys* 2000; **378**: 182–189.

- [20] HALL C, BERKHOUT B, ALARCON B, SANCHO J, WILEMAN T, TERHORST C. Requirements for cell surface expression of the human TCR/CD3 complex in non-T cells. *Int Immunol* 1991; **3**: 359–368.
- [21] HOUSSET D, MAZZA G, GREGOIRE C, PIRAS C, MALISEN B, FONTECILLA-CAMPS JC. The three-dimensional structure of a T cell antigen receptor V alpha V beta heterodimer reveals a novel arrangement of the V beta domain. *EMBO J* 1997; **16**: 4205–4216.
- [22] HUPPA JB, PLOEGH HL. *In vitro* translation and assembly of a complete T cell receptor-CD3 complex. *J Exp Med* 1997; **186**: 393–403.
- [23] IRVING B, CHAN A, WEISS A. Functional characterization of a signal transducing motif present in the T cell antigen receptor ζ chain. *J Exp Med* 1993; **177**: 1093–1103.
- [24] IRVING B, WEISS A. The cytoplasmic domain of the T cell receptor ζ chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. *Cell* 1991; **64**: 891–901.
- [25] JANEWAY CA jr., GOLSTEIN P. Lymphocyte activation and effector functions. *Curr Opin Immunol* 1993; **5**: 313–323.
- [26] JENSEN JP, CENCIARELLI C, HOU D, RELLAHAN BL, DEAN M, WEISSMAN AM. T cell antigen receptor η subunit. *J Immunol* 1993; **150**: 122–130.
- [27] KAPPES DJ, ALARCON B, REGUEIRRO JR. T lymphocyte receptor deficiencies. *Curr Opin Immunol* 1995; **7**: 441–447.
- [28] KEARSE KP. Calnexin associates with monomeric and oligomeric (disulfide-linked) CD3 delta proteins in murine T lymphocytes. *J Biol Chem* 1998; **273**: 14152–14157.
- [29] KLIG S, CHIARAMONTE L, VERMA RS. The T cell receptor gene and its associated with human diseases. *Exp Clin Immunogenet* 1992; **9**: 117–124.
- [30] LAURITSEN JP, CHRISTENSEN MD, DIETRICH JP, KASTRUP J, ODUM N, GEISLER C. Two distinct pathways exist for down-regulation of the TCR. *J Immunol* 1998; **161**: 260–267.
- [31] LEGENDRE V, GUIMEZANES A, BUFRERNE M, BARADM, SCHMITT-VERHULST AM, BOYER C. Antigen-induced TCR/DC3 down-modulation does not require CD3 delta or CD3 gamma cytoplasmic domains, necessary in response to anti-CD3 antibody. *Int Immunol* 1999; **11**: 1731–1738.
- [32] LI ZG, WU WP, MANOLIOS N. Structural mutations in the constant region of the T cell antigen receptor (TCR)beta chain and their effect on TCR alpha and beta chain interaction. *Immunology* 1996; **88**: 524–530.
- [33] LICHTMAN AH. T lymphocyte activation. *Curr Opin Haematol* 1993: 160–166.
- [34] LIU CP, EUDA R, SHE J, SANCHOJ, WANG B, WEDDEL G. Abnormal T cell development in CD3 ζ -/- mutant mice and identification of a novel T-cell population in the intestine. *EMBO J* 1993; **12**: 4863–4875.
- [35] LUTON F, BUFRERNE M, LEGENDRE V, CHAUVET E, BOYER C, SCHMITT-VERHULST AM. Role of CD3 γ and CD3 δ cytoplasmic domains in cytolytic T lymphocyte function and TCR/CD3 down-modulation. *J Immunol* 1997; **158**: 4162–4170.
- [36] MANOLIOS N, LI ZG. The T cell antigen receptor beta chain interacts with the extracellular domain of CD3 gamma. *Immunol Cell Biol* 1995; **73**: 532–536.
- [37] MANOLIOS N, KEMP O, LI ZG. The T cell antigen receptor alpha i beta chains interact via distinct regions with CD3 chains. *Eur J Immunol* 1994; **24**: 84–92.
- [38] MANOLIOS N. Hierarchy of T cell antigen receptor assembly. *Immunol Cell Biol* 1995; **73**: 544–548.
- [39] MERCEP M, WEISSMAN AM, FRANKS SJ, KLAUSNER RD, ASHWELL JD. Activation-driven programmed cell death and T cell receptor $\zeta\eta$ expression. *Science* 1989; **246**: 1162–1165.
- [40] MERCEP M, BONIFACINO JS, GARCIA-MORALES P, SAMELSON LE, KLAUSNER RD, ASHWELL JD. T cell CD3- $\zeta\eta$ heterodimer expression and coupling to phosphoinositide hydrolysis. *Science* 1988; **242**: 571–574.
- [41] NOWAK JZ, ZAWILSKA JB. Receptory – struktura, charakterystyka, funkcja. Wyd. Naukowe PWN 1997.

- [42] OHNO H, AOE T, TAKI S, KITAMURA D, ISHIDA Y, RAJEWSKY K, SAITO T. Developmental and functional impairment of T cells in mice lacking CD3 ζ chains. *EMBO J* 1993; **12**: 4357–4366.
- [43] ONO S, OHNO H, SAITO T. Rapid turnover of the CD3 zeta chain independent of the TCR-CD3 complex in normal T cells. *Immunity* 1995; **2**(6): 639–644.
- [44] ORLOFF DG, RA C, FRANK SJ, KLAUSNER RD, KINET JP. Family of disulfide-linked dimers containing the ζ and η chains of the T cell receptor and γ chain of Fc receptors. *Nature* 1990; **347**: 189–191.
- [45] PERLMUTTER R, LEVIN S, APPLEBY M, ANDERSON S, ALBEROLA-ILA J. Regulation of lymphocyte function by protein phosphorylation. *Ann Rev Immunol* 1993; **11**: 451–499.
- [46] RETH M. Antigen receptor tail clue. *Nature* 1989; **338**: 383–384.
- [47] RODRIGUEZ-TARDUCHY G, SAHUQUILLO AG, ALARCON B, BRAGADO D. Apoptosis but not other activation events is inhibited by a mutation in the transmembrane domain of T cell receptor beta that impairs CD3zeta association. *J Biol Chem* 1996; **271**: 30417–30425.
- [48] RUBIN B, LLOBERA R, GOUAILLARD C, ALCOVER A, ARNAUD J. Dissection of the role of CD3gamma chains in profound but reversible T cell receptor down-regulation. *Scand J Immunol* 2000; **52**: 173–183.
- [49] RUTLEDGE T, COSSON P, MANOLOIS M, BONIFACINO J, KLAUSNER R. Transmembrane helical interactions: zeta chain dimerization and functional association with T cell antigen receptor. *EMBO J* 1992; **11**: 3245–3254.
- [50] SAITO H, KOYAMA T, GEORGOPOULOS K, CLEVERS H, HASER WG, LEBIEN T, TONEGAWA S, TERHORST C. Close linkage of the mouse and human CD3 γ - and δ -chain genes suggests that their transcription is controlled by common regulatory elements. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 9131–9134.
- [51] SAN JOSE E, SAHUQUILLO AG, BRAGADO R, ALARCON B. Assembly of the TCR/CD3 complex: CD3 epsilon/delta and CD3 epsilon/gamma dimers associates indistinctly with both TCR alpha and TCR beta chains. Evidence for double TCR heterodimer model. *Eur J Immunol* 1998; **28**: 12–21.
- [52] SANCHO J, FRANCO R, CHATILA T, HALL C, TERHORST C. The T cell receptor associated CD3- ϵ protein is phosphorylated upon T cell activation in the two tyrosine residues of a conserved signal transduction motif. *Eur J Immunol* 1993; **23**: 1636–1642.
- [53] SUNDER-PLOSSMANN R, LIALIOS F, MADSEN M, KOYASU S, REINHERZ EL. Functional analysis of immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)-mediated signal transduction: the two YxxL segments within a single CD3 ζ -ITAM are functionally distinct. *Eur J Immunol* 1997; **27**: 2001–2009.
- [54] SUSSMAN JJ, BONIFACINO JS, LIPPINCOTT SCHWARTZ J, WEISSMAN AM, SAITO T, KLAUSNER RD, ASHWELL JD. Failure to synthesize the T-cell CD3- ζ chain: structure and function of a partial T-cell-receptor complex. *Cell* 1988; **52**: 85–95.
- [55] TAYLOR-FISHWICK DA, JUNE CH, SIEGEL JN. Antigen receptor structure and signaling in T cells. [w] Harnet MM, Ringley KP (red.) *Lymphocyte signalling: mechanisms, subversion and manipulation*. Chichester, New York: Wiley J & Sons 1997: chapter 2.
- [56] THOME M, DUPLAY P, GUTTINGER M, ACUTO O. Syk and ZAP-70 mediate recruitment of p56 lck/CD4 to the activated T cell receptor/CD3/zeta complex. *J Exp Med* 1995; **181**(6): 1997–2006.
- [57] TIMON M, ARNAIZ-VILLENA A, RODRIGUEZ-GALLEGO C, PEREZ-ACIEGO P, REGUEIRO J. Selective disbalances of peripheral blood T lymphocytes subsets in human CD3 γ deficiency. *Eur J Immunol* 1993; **23**: 1440–1444.
- [58] VAN LEEUVEN JEM, KEARSE KP. The related molecular chaperones calnexin and calreticulin differentially associate with nascent T cell antigen receptor proteins within the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1996; **271**: 25345–25349.

- [59] WEGENER AM, HOU X, DIETRICH J, GEISLER C. Distinct domains of the CD3-gamma chain are involved in surface expression and function of the T cell antigen receptor. *J Biol Chem* 1995; **270**: 4675–4680.
- [60] WEISS A. T cell antigen receptor signal transduction: a tails and cytoplasmic protein-tyrosine kinases. *Cell* 1993; **73**: 209–212.
- [61] WEISSMAN AM. The T cell antigen receptor: a multisubunit signaling complex. *Chem Immunol* 1994; **59**: 1–18.
- [62] WILEMAN T, KANE L, YOUNG J, CARSON G, TERHORST C. Associations between subunit ectodomains promote T cell antigen receptor assembly and protect against degradation in the ER. *J Cell Biol* 1993; **122**: 67–78.

Redaktor prowadzący – Jan Żeromski

Otrzymano: 08.12.2000 r.

Przyjęto: 03.02.2001 r.

Adres autora: 53-114 Wrocław, ul. R. Weigla 12,

e-mail: kosmacz@immuno.iitd.pan.wroc.pl

TRIJODOTYRONINA I JEJ RECEPTORY JĄDROWE W PROCESIE NOWOTWORZENIA*

TRIIODOTHYRONINE AND ITS NUCLEAR RECEPTORS IN TUMORIGENESIS

Monika PUZIANOWSKA-KUŹNICKA^{1,2}, Agnieszka MADEJ³, Agnieszka
KRYSTYNIAK¹, Elżbieta STACHLEWSKA-NASFETER⁴, Alicja NAUMAN²,
Janusz NAUMAN^{1,3}

¹Zakład Endokrynologii ICMDiK PAN, Warszawa; ²Zakład Biochemii CMKP,
Warszawa; ³Klinika Endokrynologii, Akademia Medyczna, Warszawa;
⁴Zakład Brachyterapii, Instytut Onkologii, Warszawa;

Streszczenie: Zgodnie z ogólnie przyjętymi zasadami uważa się, że gen i jego białkowy produkt mogą brać udział w procesie nowotworzenia, jeśli w tkance guza stwierdza się obecność anomalii chromosomalnych lub/i mutacji dotyczących tego genu, oraz gdy ekspresja i funkcja kodowanego przez ten gen białka ulegają istotnemu zaburzeniu. Wydaje się, iż receptory trijodotyroniny (TR) należą do grupy takich białek. Hipotezę tę wspierają cztery fakty. Po pierwsze, fizjologiczne działanie trijodotyroniny (T₃), wywierane za pośrednictwem TR, polega na regulacji proliferacji, różnicowania i apoptozy, czyli procesów, które są głęboko zaburzone w tkance nowotworowej. Po drugie, działanie TR jest powiązane z działaniem niektórych protoonkogenów (c-Jun, Mdm2) i supresorów nowotworowych (p53). Po trzecie, w tkankach nowotworowych często obserwuje się utratę heterozygotyczności (LOH) fragmentów chromosomów zawierających między innymi allel *TR*. Praktycznie we wszystkich typach badanych nowotworów obserwuje się zaburzoną ekspresję TR na poziomie mRNA oraz białka. Po czwarte, TR α jest komórkowym odpowiednikiem v-erbA, wirusowego onkogenu, który posiada cechy dominującego negatywnego mutanta. Co więcej, bardzo często w nowotworach stwierdza się obecność punktowych mutacji genów *TR*, zmieniających sekwencję aminokwasową, z konsekwencjami w postaci upośledzenia funkcji receptora jako aktywatora transkrypcji. Na przykładzie raka wątroby wykazano również, że zmutowane TR zachowują się jak dominujące negatywne mutanty. Wydaje się, iż w raku wątroby i raku brodawkowatym tarczycy nieprawidłowe działanie TR może być współodpowiedzialne za proces nowotworzenia.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28: 183–196)

*Praca finansowana z grantu KBN 4P05B04115, 4P05B12708 i CMKP 501-2-1-01-01/99.

Słowa kluczowe: TH, hormon tarczycy; T3, trijodotyronina; TR, jądrowy receptor hormonu tarczycy; nowotworzenie; LOH, utrata heterozygotyczności; ekspresja TR; mutacje TR; dominujący negatywny mutant TR.

Summary: According to the generally accepted rules, gene and its protein product are thought to be involved in tumorigenesis when chromosomal anomalies and/or mutations of this gene as well as markedly disturbed expression and function of the encoded protein are found in tumor tissue. It seems that triiodothyronine receptors (TRs), belong to the group of such proteins. This hypothesis is supported by four facts. Firstly, physiological function of triiodothyronine (T3), exerted through TRs, is the regulation of proliferation, differentiation and apoptosis, the processes that are deeply disturbed in tumor tissue. Secondly, action of TRs is connected to the action of some protooncogenes (c-Jun, Mdm2) and tumor suppressors (p53). Thirdly, loss of heterozygosity (LOH) of chromosome fragments containing between others *TR* allele as well as disturbed expression of TR on the mRNA and protein level are observed in tumor tissues. Fourthly, TR α is a cellular homolog of v-erbA, a viral oncogene that behaves as a dominant negative mutant receptor. In addition, *TR* gene point mutations changing amino acid sequence are observed, resulting in abnormal receptor function as transcription activator. It was shown that mutants cloned from liver cancer behaved as dominant negative mutants. It seems that in liver cancer and in papillary thyroid cancer, abnormal TR function may contribute to the process of tumorigenesis. (*Advances in Cell Biology* 2001; 28: 183–196)

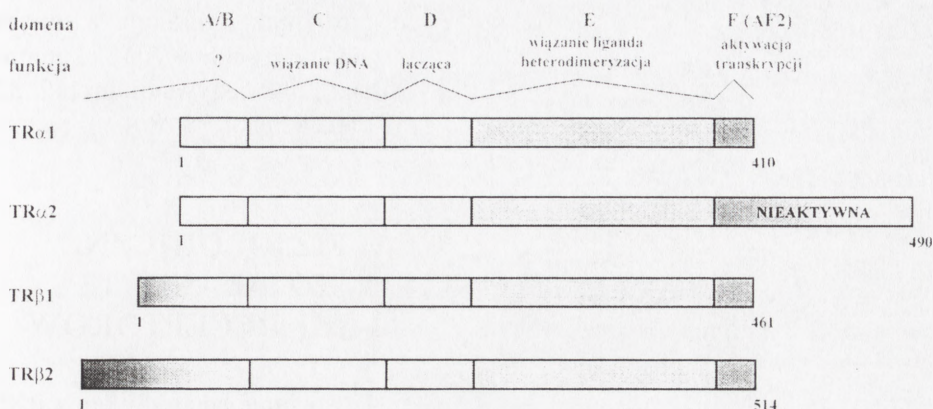
Key words: TH, thyroid hormone; T3, triiodothyronine; TR, nuclear thyroid hormone receptor; tumorigenesis; LOH, loss of heterozygosity; TR expression; TR mutations; dominant negative TR mutant.

WSTĘP

TRIJODOTYRONINA I JEJ RECEPTORY JĄDROWE

Znane są dwie fizjologiczne formy hormonu tarczycy: bardziej aktywna trijodotyronina (T3) oraz mniej aktywna tetrajodotyronina (tyroksyna, T4). T4 jest głównym produktem sekcyjnym gruczołu tarczowego i pełni rolę prohormonu dla T3. T3 powstaje głównie w tkankach obwodowych w procesie dejodynacji T4, katalizowanej przez enzymy zwane dejodynazami [38, 66]. Chociaż znane są cytoplazmatyczne białka wiążące TH [34], główne efekty działania T3 są skutkiem regulacji transkrypcji genów docelowych, która dokonuje się za pośrednictwem receptorów jądrowych [17, 69]. U człowieka poznano do tej pory dwa geny kodujące takie receptory: *TR α* znajdujący się na ramieniu długim chromosomu 17 w pozycji 17q21 [28] oraz *TR β* znajdujący się na ramieniu krótkim chromosomu 3 w pozycji 3p21-3p25 [15, 16]. Na matrycy tych genów, w procesie różnicowego składania eksonów, powstają po dwie izoformy każdego receptora: odpowiednio TR α 1 i TR α 2 oraz TR β 1 i TR β 2.

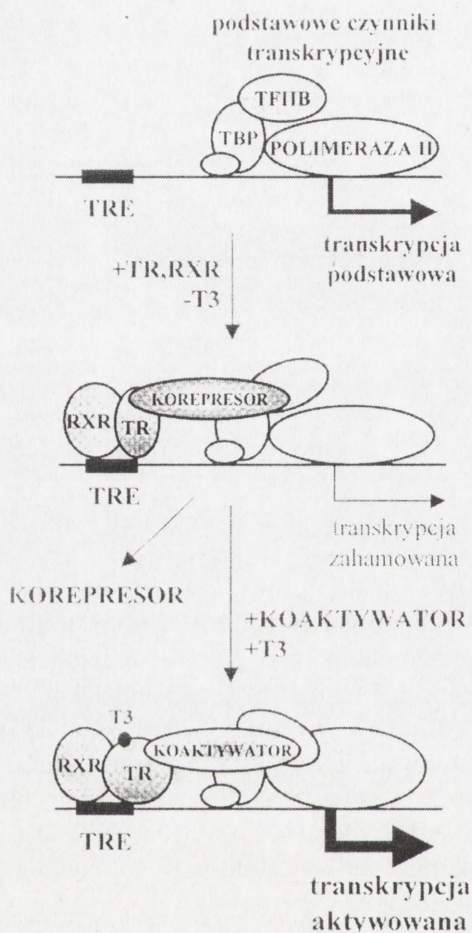
Białka TR należą do nadrodziny receptorów jądrowych, które, między innymi, charakteryzują się podobnym ogólnym schematem budowy. Na końcu aminowym mają domenę A/B, której funkcja nie jest dobrze poznana. Wydaje się, że może ona brać udział w aktywacji transkrypcji niezależnej od liganda (tutaj: T3). Następną domeną, C, odpowiada za wiązanie receptora ze specyficzną sekwencją DNA, znaj-



RYCINA 1. Izoforny jądrowych receptorów hormonu tarczycy. Izoforny TRα1 i TRα2 są kodowane przez gen *TRα*, zlokalizowany na chromosomie 17. TRα2 nie ma aktywnej domeny AF2 (zależnej od liganda domeny aktywującej transkrypcję). Izoforny TRβ1 i TRβ2 są kodowane przez gen zlokalizowany na chromosomie 3

dującą się w promotorach genów docelowych. Domena D, zwana pośrednią, zawiera sygnał lokalizacji jądrowej [17] oraz łączy w sobie cechy sąsiadujących domen [58]: poprzedzającej ją C i występującej za nią domeny E, która z kolei jest odpowiedzialna za wiązanie liganda oraz tworzenie dimerów [20, 21, 61]. Na końcu karboksylowym receptora znajduje się domena F (lub AF2), odpowiedzialna za zależną od liganda aktywację transkrypcji. Białkowe izoforny TRα różnią się od siebie budową końca karboksylowego: w izofornie TRα2 jest on znacznie dłuższy i nie ma zdolności aktywacji transkrypcji. W efekcie TRα2 jest receptorem nieaktywnym transkrypcyjnie, który zachował jednak zdolność do wiązania się z DNA. Z kolei receptory TRβ różnią się od siebie budową końca aminowego, co jednak nie wpływa w sposób istotny na ich funkcję (ryc. 1).

Regulacja transkrypcji genów docelowych przez TR jest procesem bardzo złożonym i zależy od zdolności receptorów do tworzenia homo- i heterodimerów z innymi receptorami jądrowymi, głównie z receptorami kwasu 9-cis retinowego (retinoidu X): RXRα, RXRβ lub RXRγ [11, 56, 79, 81], wiązania się z DNA w postaci monomerów, homo- i heterodimerów [20, 35, 78], rozpoznawania i wiązania się ze specyficznymi sekwencjami DNA, znajdującymi się w promotorach genów docelowych, zwanymi TRE (*thyroid response element* – miejsce odpowiedzi na hormon tarczycy) [19, 30, 44, 53]. Każdy TRE składa się z dwóch heksamerów o sekwencji AGGT(C/A)A [9] lub jej modyfikacji i tworzy tzw. TRE-DR4 (bezpośrednie powtórzenie sekwencji heksamerowej z 4 obojętnymi parami zasad pomiędzy powtórzeniami) [61, 77], TRE-IP6 (odwrócony palindrom z 6 parami zasad) lub TRE-P0 (palindrom bez rozdzielających par zasad) [62, 77, 78]. Kluczowa



RYCINA 2. Uproszczony schemat regulacji transkrypcji genów docelowych przez receptory hormonu tarczycy. W nieobecności receptora, transkrypcja genu aktywowana jest na poziomie podstawowym. Połączenie się heterodimera TR/RXR z TRE w nieobecności liganda powoduje dołączenie się białka supresorowego, w efekcie czego transkrypcja ulega zahamowaniu. Dołączenie T3 do TR powoduje zmianę konformacji receptora, odłączenie supresora i dołączenie aktywatora, wskutek czego transkrypcja genu ulega aktywacji znacznie ponad poziom podstawowy

dla aktywności transkrypcyjnej TR jest również interakcja z innymi czynnikami białkowymi – korepresorami lub koaktywatorami [12, 32, 37, 50, 52, 60, 78, 80]

FIZJOLOGICZNE DZIAŁANIE T3 I JEJ RECEPTORÓW

Utworzenie heterodimeru z RXR gwałtownie zwiększa powinowactwo TR do TRE, co sugeruje, iż właśnie heterodimery odgrywają główną rolę w regulacji transkrypcji *in vivo* i są najpowszechniej występującą i najaktywniejszą, fizjologicznie czynną formą TR [56]. Wiązanie z TRE zachodzi zarówno w nieobecności, jak i w obecności TH [72, 74]. Związanie heterodimeru z DNA w nieobecności TH powoduje zahamowanie transkrypcji podstawowej (zachodzącej w nieobecności TR) [2, 18, 56]. Przyczyną tego zjawiska jest dołączenie się białek supresorowych, np. SMRT [12] lub N-CoR [32]. Dołączenie TH do receptora powoduje jego zmiany konformacyjne, czego skutkiem jest odłączenie korepresora, dołączenie skomplikowanego, liczącego co najmniej kilka do kilkunastu białek, układu koaktywatorowego [37, 50, 52, 60, 68, 80] i w efekcie – zniesienie hamowania i aktywacja transkrypcji znacznie ponad poziom podstawowy (ryc. 2). Należy jednak pamiętać, iż istnieją geny (np. TSH), które są re-

gulowane odwrotnie: przyłączenie się TR do ich promotora w nieobecności TH powoduje aktywację, zaś w obecności TH – hamowanie ich transkrypcji.

Efekty działania TH można podzielić na trzy grupy:

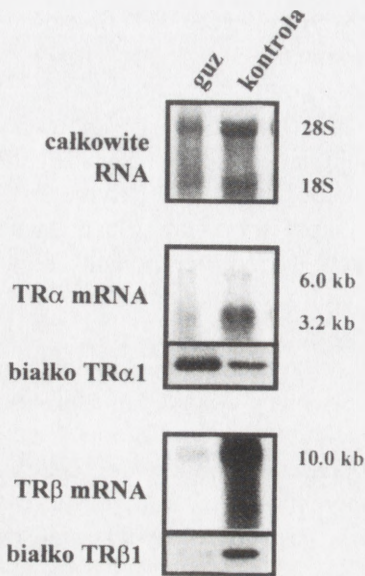
- a. regulacja aktywności metabolicznej i zużycia tlenu w drodze aktywacji transkrypcji genów kodujących enzymy oddechowe, znajdujących się w materiale genetycznym zarówno jądra komórkowego, jak i mitochondriów; TH aktywuje liczne szlaki metaboliczne, zwiększające produkcję ciepła wymaganą do utrzymania stałej temperatury w organizmach stałocieplnych; hormon ten ponadto reguluje metabolizm lipidów, węglowodanów i białek, m.in. w brunatnej tkance tłuszczowej, sercu i w mózgu oraz w innych tkankach [23, 27, 55, 63, 64];
- b. regulacja rozwoju embrionalnego i płodowego ze szczególnym uwzględnieniem różnicowania i rozwoju ośrodkowego układu nerwowego, kości i mięśni; oprócz regulowania procesu proliferacji i apoptozy tkanek płodowych, TH odpowiedzialny jest za inicjację procesu ich różnicowania i przekształcanie w dojrzałe tkanki organizmu dorosłego w drodze aktywacji ekspresji genów kodujących białka charakterystyczne dla danego typu dojrzałej tkanki, na przykład myoD w mięśniach poprzecznie prążkowanych [6, 48, 49, 51, 56];
- c. tkankowo specyficzna regulacja proliferacji, różnicowania i apoptozy w organizmie dorosłym [5, 36, 40, 45, 47, 48].

Wszystkie te procesy zależne są od stężenia i dostępności TH, ilości i aktywności TR oraz od obecności innych czynników, z którymi TR oddziałują na poziomie molekularnym.

ZABURZENIA EKSPRESJI TR W NOWOTWORACH LUDZKICH

A. Utrata heterozygotyczności

W wielu nowotworach obserwuje się utratę heterozygotyczności (LOH) części chromosomów. Brak jednego allelu powoduje, iż ekspresji ulega tylko drugi allel danego genu. W sytuacji, gdy pozostający allel jest nosicielem mutacji zmieniającej sekwencję aminokwasową, w tkance pojawia się tylko zmutowane białko, a jego nieprawidłowa funkcja nie jest kompensowana przez obecność białka prawidłowego. LOH fragmentu chromosomu 3, zawierającego m.in. gen *TRβ* obserwowano w 100% przypadków raka owianokomórkowego płuca [16, 39], w 60% czerniaków tęczówki oka [65], 64% sporadycznego raka nerki [22], w 30% raków sutka [1] oraz w raku pęcherzykowym tarczycy [29]. Delecję obydwu alleli *TR β* znaleziono w 20% raków przewodu pokarmowego [33]. Podobnie, LOH fragmentu chromosomu 17, zawierającego m.in. gen *TRα* obserwowano w wielu typach nowotworów, w



RYCINA 3. Nieprawidłowa ekspresja genów TR α i TR β na poziomie mRNA i białka w ludzkim raku jasnokomórkowym nerki; każda linia zawiera 2,5 μ g całkowitego RNA, wyizolowanego z raka (guz) i zdrowego bieguna nerki (kontrola); hybrydyzację przeprowadzono z sondami wykrywającymi wszystkie transkrypty genu TR α lub TR β ; immunobloty wykonano metodą chemiluminescencyjną z przeciwciałami na główne transkrypcyjnie aktywne formy jądrowych receptorów trijodotyroniny, TR α 1 i TR β 1 [52]

tym w 79% raków piersi [24], w raku prostaty [25] oraz raku jelita grubego i odbyticy [7].

B. Nieprawidłowa ekspresja TR na poziomie mRNA i białka

Wyniki badań dotyczących ekspresji TR na poziomie mRNA i białka w nowotworach ludzkich wskazują, że jej poziom jest różny w różnych typach nowotworów (tab. 1). Co więcej, w wielu przypadkach nie można zaobserwować korelacji pomiędzy ilością mRNA i odpowiadającego mu białka (ryc. 3), co sugeruje, że ekspresja TR jest regulowana nie tylko na poziomie transkrypcji, ale również na poziomie posttranskrypcyjnym.

MUTACJE GENÓW TR W NOWOTWORACH LUDZKICH

TR sklonowane z niektórych nowotworów poddano sekwencjonowaniu w celu poszukiwania somatycznych mutacji, które powodując zmianę sekwencji aminokwasowej receptora, mogłyby upośledzać jego funkcję. Okazało się, iż w 65% raków pierwotnych wątroby stwierdzono obecność zmutowanych TR α 1, zaś w 76% tych raków – obecność zmutowanych TR β 1 [41]. Podobnie, mutacje receptorów trijodotyroniny stwierdza się innych typach nowotworów: w 62,5% raków brodawkowatych tarczycy mutacji uległ TR α 1, podczas gdy TR β 1 – w 93,75% takich raków (Puzianowska-Kuźnicka M, obserwacje własne); w 13% niewydzielających raków przysadki zmutowany jest TR α (α 1 i α 2) [46]. Z kolei sekwencjonowanie domen wiążących ligand TR α 1 oraz TR β 1 wykazało obecność mutacji odpowiednio w 13 i 30% raków jasnokomórkowych nerki. Zaobserwowano również, iż odsetek zmutowanych TR jest tym większy, im niżej zróżnicowany jest nowotwór (Puzianowska-Kuźnicka M, obserwacje własne). Co więcej, badania nad mutantami sklonowanymi z pierwotnych raków wątroby

TABELA 1. Ekspresja TR na poziomie mRNA i białka w nowotworach ludzkich

Rodzaj nowotworu	Ekspresja TR α		Ekspresja TR β		Literatura
	mRNA	białko	mRNA	białko	
Nieczynny guz przedniego płata przysadki	↓	TR α 1 ↓	↓	TR β 1 ↓	[26, 46]
Rak jasnokomórkowy nerki	↓	TR α 1 ↑	70% ↓ 30% ↑	TR β 1 ↓	[56]
Rak brodawkowaty tarczycy	↓	TR α 1 ↑	↓	TR β 1 ↑	[10, 71, Puzianowska-Kuźnicka, obserwacje własne]
Kostniakomięsak (dobrze zróżnicowany)	?	=	?	=	[72]
Kostniakomięsak (słabo zróżnicowany)	?	TR α 1 ↓	?	TR β 1 ↓	[72]
Rak wątroby	?	TR α 1 ↓	?	TR β 1 ↑	[40, 41]

wskazują, że nie tylko nie są one w stanie prawidłowo aktywować transkrypcji, ale przeciwnie – działają jak dominujące negatywne mutanty [42].

CZY RECEPTORY TRIJODOTYRONINY BIORĄ UDZIAŁ W PROCESIE NOWOTWORZENIA?

Wiadomo, że jądrowy receptor hormonu tarczycy TR α jest komórkowym homologiem v-ErbA (białkowego produktu wirusowego genu *v-erbA*), onkogenu biorącego udział w transformacji nowotworowej prowadzącej do powstania erytroleukemii i różnych mięsaków [13, 70]. Badania wykonane na myszach transgenicznym, którym do genomu wprowadzono *v-erbA*, wykazały, iż u takich myszy rozwijają się pierwotne nowotwory wątroby oraz zmiany guzowate w tarczycy (co *in vivo* udowadnia związek pomiędzy v-ErbA a nowotworzeniem) [3]. Z badań *in vitro* wiadomo, iż v-ErbA nie jest w stanie związać T3 i aktywować transkrypcji, zaś po dołączeniu się do DNA, wiąże się z kompleksem korepresorowym, zawierającym między innymi deacetylazę histonową, wskutek czego hamowaniu ulega transkrypcja genów docelowych [73]. Tak więc v-ErbA jest typowym przykładem dominującego-negatywnego mutanta, który nie tylko nie ma fizjologicznej funkcji prawidłowego receptora, ale potrafi również antagonizować działanie prawidłowych

TR. Uważa się, że tą drogą dochodzi do powodowanej przez v-ErbA inaktywacji (hamowania aktywacji) genów, których funkcja polega na stymulacji różnicowania lub hamowaniu podziałów komórkowych i w efekcie – do transformacji nowotworowej [14].

Spójne z tymi obserwacjami są wyniki badań TR w nowotworach ludzkich, przede wszystkim w pierwotnym raku wątroby i raku brodawkowym tarczycy. Jak opisano wcześniej, w nowotworach tych bardzo często stwierdza się obecność zmutowanych TR, wykazujących ponadto cechy dominującego-negatywnego mutanta [42, Puzianowska-Kuźnicka, obserwacje własne]. Założyć można, iż mutacje te, jak również zwiększona ekspresja transkrypcyjnie nieaktywnych receptorów lub zmniejszona ekspresja TR (którą częściej obserwuje się w nowotworach z mniejszą liczbą mutacji TR), są przyczynami nieprawidłowej aktywacji genów regulowanych przez T3. Wiele z tych genów koduje czynniki niezbędne dla prawidłowego przebiegu procesów różnicowania i dojrzewania tkanek [5, 36, 48], oraz dla apoptozy [47, 67] (choć nadal dokładnie nie wiadomo, na jakie induktory apoptozy oddziałuje TH). Wskutek nieadekwatnej ekspresji tych czynników, komórki ulegają odróżnicowaniu (tracą markery zróżnicowania) i jako komórki niedojrzałe ponownie stają się podatne na sygnały pro-proliferacyjne, zaś komórki, w których doszło do uszkodzenia materiału genetycznego, nie są eliminowane w drodze apoptozy.

Zjawiska te, związane bezpośrednio z nieprawidłową regulacją ekspresji na poziomie genu, ulegają pogłębieniu na skutek zaburzenia oddziaływań TR z innymi białkami. Dotyczy to nie tylko koaktywatorów lub korepresorów (co dodatkowo zmienia poziom ekspresji genów docelowych), ale również fizjologicznych (stwierdzanych w zdrowych tkankach), niezbędnych dla prawidłowej kontroli wzrostu i różnicowania, oddziaływań z białkowymi regulatorami cyklu komórkowego, supresorami nowotworowymi i protoonkogenami.

W warunkach prawidłowych TR fizycznie wiąże się z białkiem p53, które w określonych sytuacjach (np. gdy konieczne jest naprawienie uszkodzonego DNA) hamuje cykl komórkowy poprzez zatrzymywanie go w fazie G1. Związanie się TR β 1 z p53 ma szereg istotnych konsekwencji, które, wskutek obserwowanej często nadekspresji TR w tkance nowotworowej, mogą być nadmiernie nasilone. Wiadomo bowiem, iż białko p53 po utworzeniu kompleksu z TR β 1, staje się niedostępne dla własnych szlaków oddziaływań, co może powodować brak hamowania progresji cyklu komórkowego. TR β 1 zmniejsza zależną od p53 ekspresję *bax* i *gadd45*, czego skutkiem jest hamowanie apoptozy [4]. Ponadto, pod wpływem p53 zdolność samego TR do wiązania się z DNA i do aktywowania transkrypcji własnych genów docelowych jest zahamowana [8, 76]. Wykazano również, iż TR wiąże się z c-Jun zarówno w obecności, jak i w nieobecności T3, przy czym w postaci nie związanej z hormonem zwiększa, zaś po jego dołączeniu – hamuje aktywność tego protoonkogenu [43]. Podobnie – TR niezwiązany z ligandem aktywuje ekspresję c-Fos, zaś po przyłączeniu T3 – hamuje ekspresję tego protoonkogenu zarówno na poziomie

geny, jak i białka [54]. W związku z tym można przewidywać, iż obecność zmutowanych TR w tkance nowotworowej spowoduje wzrost ilości c-Jun i c-Fos, oraz wzrost aktywności czynnika transkrypcyjnego AP-1, w skład którego wchodzi. Ponieważ produkty białkowe tych protoonkogenów hamują zależną od TH aktywację transkrypcji, odpowiedź genów docelowych na działanie T3-TR może być dodatkowo opóźniona [82].

Z drugiej jednak strony należy pamiętać, iż fizjologicznie T3 za pośrednictwem TR aktywuje transkrypcję protoonkogenu *mdm2*. Białko Mdm2 wiąże się z p53, które jest wówczas gwałtownie degradowane [31, 59]. Mdm2 aktywuje również ekspresję czynników przyspieszających cykl komórkowy, czyli E2F1 i cykliny A [59] oraz obniża ekspresję innego supresora nowotworowego – białka Rb (retinoblastoma) [75]. Jeśli w tkance nowotworowej występują zmutowane TR lub obserwuje się niską ekspresję TR, to ilość Mdm2 zmniejsza się, a wymienione powyżej efekty nie są nasilone i ten potencjalny mechanizm powstawania zaburzeń regulacji cyklu komórkowego poprzez Mdm2 staje się nieistotny. Jeśli jednak niska aktywność transkrypcyjna TR jest przynajmniej częściowo kompensowana przez nadekspresję tego białka, to zależna od T3 aktywacja transkrypcji genu *mdm2* może nasilać zaburzenia cyklu komórkowego.

Dotychczas dostępne dane nie wyjaśniają, czy u człowieka TH i TR inicjują proces nowotworzenia, czy też są odpowiedzialne za większą złośliwość nowotworu i szybszy postęp choroby. Ponieważ ekspresja TR, odsetek zmutowanych TR oraz odsetek LOH TR są różne w różnych rodzajach nowotworów, wydaje się, iż białka te nie są uniwersalnym czynnikiem indukującym proces nowotworzenia. Możliwe jest natomiast, że w wyniku zmienionej ekspresji i opóźnionej funkcji stają się odpowiedzialne za progresję nowotworu niezależnie od jego rodzaju. Nie można również wykluczyć, iż TR inicjują lub współinicjują nowotworzenie w niektórych typach nowotworów, w których nieprawidłowości dotyczą większości analizowanych przypadków (rak wątroby, rak brodawkowy tarczycy). W świetle opisanych wyników konieczne wydaje się zbadanie, czy patofizjologia (morfologia, szybkość podziałów, tworzenie warstw, itd.) nowotworowych linii komórkowych ulegnie zmianie pod wpływem ekspresji prawidłowych TR lub odwrotnie, czy ekspresja dominujących negatywnych mutantów TR wywoła transformację nowotworową komórek prawidłowych.

LITERATURA

- [1] ALI IU, LIDEREAU R, CALLAHAN R. Presence of two members of c-erbA receptor gene family (c-erbA β and c-erbA2) in smallest region of somatic homozygosity on chromosome 3p21-p25 in human breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1989; **81**: 1815–1820.

- [2] BAHNIAMAD A, TSAI SY, O'MALLEY BW, TSAI MJ. Kindred S thyroid hormone receptor is an active and constitutive silencer and a repressor for thyroid hormone and retinoid acid responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 10633–10637.
- [3] BARLOW C, MEISTER B, LARDELLI M, LENDAHL U, VENNSTROM B. Thyroid abnormalities and hepatocellular carcinoma in mice transgenic for v-erbA. *EMBO J* 1994; **13**: 4241–4250.
- [4] BARRERA-HERNANDEZ G, ZHAN Q, WONG R, CHENG S-Y. Thyroid hormone receptor is a negative regulator in p53-mediated signaling pathways. *DNA Cell Biol* 1998; **17**: 743–750.
- [5] BARTUNEK P, ZENKE M. Retinoid X receptor and c-erbA/thyroid hormone receptor regulate erythroid cell growth and differentiation. *Mol Endocrinol* 1998; **12**: 1269–1279.
- [6] BERNAL J. Iodine and brain development. *Biofactors* 1999; **10**: 271–276.
- [7] BERNEY CR, FISHER RJ, YANG J, RUSSELL PJ, CROWE PJ. Genomic alterations (LOH, MI) on chromosome 17q21-23 and prognosis of sporadic colorectal cancer. *Int J Cancer* 2000; **89**: 1–7.
- [8] BHAT MK, YU CI, YAP N, ZHAN Q, HAYASHI Y, SETH P, CHENG S. Tumor suppressor p53 is a negative regulator in thyroid hormone receptor pathways. *J Biol Chem* 1997; **272**: 28989–28993.
- [9] BRENT GA, HARNEY JW, CHEN Y, WARNE RL, MOORE DD, LARSEN PR. Mutations of the rat growth hormone promoter which increase and decrease response to thyroid hormone define a consensus thyroid hormone response element. *Mol Endocrinol* 1989; **3**: 1996–2004.
- [10] BRONNEGARD M, TORRING O, BOOS J, SYLVEN C, MARCUS C, WALLIN G. Expression of thyrotropin receptor and thyroid hormone receptor messenger ribonucleic acid in normal, hyperplastic, and neoplastic human thyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; **79**: 384–389.
- [11] BUGGE TH, POHL J, LONNOY O, STUNNENBERG GH. RXR α , a promiscuous partner of retinoic acid and thyroid hormone receptors. *EMBO J* 1992; **11**: 1409–1418.
- [12] CHEN JD, EVANS RM. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 1995; **377**: 454–457.
- [13] CIANA P, BRALIOU GG, DEMAY FG, VON LINDERN M, BARETTINO D, BEUG H, STUNNENBERG HG. Leukemic transformation by the v-ErbA oncoprotein entails constitutive binding to and repression of an erythroid enhancer *in vivo*. *EMBO J* 1998; **17**: 7382–7394.
- [14] DAMM K. ErbA: tumor suppressor turned oncogene? *FASEB J* 1993; **7**: 904–909.
- [15] DOBROVIC A, HOULE B, BELOUCHI A, BRADLEY WE. erbA-related sequence coding for DNA-binding hormone receptor localized to chromosome 3p21-3p25 and deleted in small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 1988; **48**: 682–685.
- [16] DRABKIN H, KAO FT, HARTZ J, HART I, GAZDAR A, WEINBERGER C, EVANS R, GERBER M. Localization of human ERBA2 to the 3p22---3p24.1 region of chromosome 3 and variable deletion in small cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 9258–9262.
- [17] EVANS RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988; **240**: 889–895.
- [18] FONDELL DJ, ROY AL, ROEDER RG. Unliganded thyroid hormone receptor inhibits formation of a functional preinitiation complex: implications for active repression. *Genes Dev* 1993; **7**: 1400–1410.
- [19] FORCE WR, TILLMAN JB, SPRUNG CN, SPINDLER SR. 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.
- [20] FORMAN BM, CASANOVA J, RAAKA BM, GHYSDAEL J, SAMUELS HH. Half-site spacing and orientation determines whether thyroid hormone and retinoic acid receptors and related factors bind to response elements as monomers, homodimers or heterodimers. *Mol Endocrinol* 1992; **6**: 429–442.

- [21] FORMAN BM, SAMUELS HH. Dimerization among nuclear hormone receptors. *New Biol* 1990; **2**: 587–594.
- [22] FOSTER K, CROSSEY PA, CARINS P, HETHERINGTON JW, RICHARDS FM, JONES MH, BENTLEY E, AFFARA NA, FERGUSON-SMITH MA, MAHER ER. Molecular genetic investigation of sporadic renal cell carcinoma: analysis of allele loss on chromosomes 3p, 5q, 11p, 17 and 22. *Br J Cancer* 1994; **69**: 230–234.
- [23] FREAKE HC, OPPENHEIMER JH. Thermogenesis and thyroid function. *Annu Rev Nutr* 1995; **15**: 263–291.
- [24] FUTREAL PA, SODERKVIST P, MARKS JR, IGLEHART JD, COCHRAN C, BARRETT JC, WISEMAN JW. Detection of frequent allelic loss on proximal chromosome 17q in sporadic breast carcinoma using microsatellite length polymorphisms. *Cancer Res* 1992; **52**: 2624–2627.
- [25] GAO X, ZACHAREK A, GRIGNON DJ, SAKR W, POWELL IJ, PORTER AT, HONN KV. Localization of potential tumor suppressor loci to a <2 Mb region on chromosome 17q in human prostate cancer. *Oncogene* 1995; **11**: 1241–1247.
- [26] GITTOES NJ, MCCABE CJ, VERHAEG J, SHEPPARD MC, FRANKLYN JA. Thyroid hormone and estrogen receptor expression in normal pituitary and nonfunctioning tumors of the anterior pituitary. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**: 1960–1967.
- [27] GOGLIA F, MORENO M, LANNI A. Action of thyroid hormones at the cellular level: the mitochondrial target. *FEBS Lett* 1997; **452**: 115–120.
- [28] GOSDEN JR, MIDDLETON PG, ROUT D, ANGELIS C. Chromosomal localization of the human oncogene ERBA2. *Cytogenet Cell Genet* 1986; **43**: 150–153.
- [29] GREBE SK, MCIVER B, HAY ID, WU PS, MACIEL LM, DRABKIN HA, GOELLNER JR, GRANT CS, JENKINS RB, EBERHARDT NL. Frequent loss of heterozygosity on chromosomes 3p and 17p without VHL or p53 mutations suggests involvement of unidentified tumor suppressor genes in follicular thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**: 3684–3691.
- [30] HARBERS M, WAHLSTROM GM, VENNSTROM B. Transactivation by the thyroid hormone receptor is dependent on the spacer sequence in hormone response elements containing directly repeated half-sites. *Nucleic Acids Res* 1996; **24**: 2252–2259.
- [31] HAUPTY, MAYAR, KAZAZA, OREN M. Mdm2 promotes rapid degradation of p53. *Nature* 1997; **387**: 296–299.
- [32] HORLEIN AJ, NAAR AM, HEINZEL T, TORCHIA J, GLOSS B, KUROKAWA R, RYAN A, KAMEI Y, SODERSTROM M, GLASS CK, ROSENFELD MG. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 1995; **377**: 397–404.
- [33] HUBER-GIESKE T, PERNIN A, HUBER O, BURGER AG, MEIER CA. Lack of loss of heterozygosity at the c-erb A beta locus in gastrointestinal tumors. *Oncology* 1997; **54**: 214–219.
- [34] ICHIKAWA K, HASHIZUME K. Cellular binding proteins of thyroid hormones. *Life Sci* 1991; **49**: 1513–1522.
- [35] IKEDA M, RHEE M, CHIN WW. Thyroid hormone receptor monomer, homodimer and heterodimer (with retinoid-X receptor) contact different nucleotide sequences in thyroid hormone response elements. *Endocrinology* 1994; **135**: 1628–1638.
- [36] ISHIKAWA Y, GENGE BR, WUTHIER RE, WU LN. Thyroid hormone inhibits growth and stimulates terminal differentiation of epiphyseal growth plate chondrocytes. *J Bone Miner Res* 1998; **13**: 1398–1411.
- [37] KO L, CARDONA GR, CHIN WW. Thyroid hormone receptor-binding protein, an LXXLL motif-containing protein, functions as a general coactivator. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 6212–6217.
- [38] KOHRLE J. Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. *Mol Cell Endocrinol* 1999; **151**: 103–119.

- [39] LEDUC F, BRAUCH H, HAJJ C, DOBROVIC A, KAYE F, GAZDAR A, HARBOUR JW, PETTENGILL OS, SORENSON GD, van den BERG A. et al. Loss of heterozygosity in a gene coding for a thyroid hormone receptor in lung cancers. *Am J Hum Genet* 1989; **44**: 282–287.
- [40] LIN KH, LIN YW, PARKINSON C, CHENG S-Y. Stimulation of proliferation by 3,3',5-triiodo-L-thyronine in poorly differentiated human hepatocarcinoma cells overexpressing 1 thyroid hormone receptor. *Cancer Lett* 1994; **85**: 189–194.
- [41] LIN KH, SHIEH HY, CHEN SL, HSU HC. Expression of mutant thyroid hormone nuclear receptors in human hepatocellular carcinoma cells. *Mol Carcinog* 1999; **26**: 53–61.
- [42] LIN KH, ZHU XG, SHIEH HY, HSU HC, CHEN ST, MCPHIE P, CHENG SY. Identification of naturally occurring dominant negative mutants of thyroid hormone alpha 1 and beta 1 receptors in a human hepatocellular carcinoma cell line. *Endocrinology* 1996; **137**: 4073–4081.
- [43] LOPEZ G, SCHAUFLE F, WEBB P, HOLLOWAY JM, BAXTER JD, KUSHNER PJ. Positive and negative modulation of Jun action by thyroid hormone receptor at a unique API site. *Mol Cell Biol* 1993; **13**: 3042–3049.
- [44] MARTINEZ E, GIVEL F, WAHLI W. A common ancestor DNA motif for invertebrate and vertebrate hormone response elements. *EMBO J* 1991; **10**: 263–268.
- [45] MARTINEZ MB, RUAN M, FITZPATRICK LA. Altered response to thyroid hormones by prostate and breast cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000; **45**: 93–102.
- [46] McCABE CJ, GITTOES NJ, SHEPPARD MC, FRANKLYN JA. Thyroid receptor alpha 1 and alpha 2 mutations in nonfunctioning pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; **84**: 649–653.
- [47] MIHARA S, SUZUKI N, WAKISAKA S, SUZUKI S, SEKITA N, YAMAMOTO S, SAITO N, HOSHINO T, SAKANE T. Effects of thyroid hormones on apoptotic cell death of human lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; **84**: 1378–1385.
- [48] MUSCAT GE, DOWNES M, DOWHAN DH. Regulation of vertebrate muscle differentiation by thyroid hormone: the role of the myoD gene family. *Bioessays* 1995; **17**: 211–218.
- [49] MUSCAT GE, MYNETT-JOHNSON L, DOWNHAN D, DOWNES M, GRIGGS R. Activation of myoD gene by 3,5,3'-triiodo-L-thyronine: a direct role for the thyroid hormone and retinoid X receptors. *Nucleic Acids Res* 1994; **22**: 583–591.
- [50] NAAR AM, BEAURANG PA, ZHOU S, ABRAHAM S, SOLOMON W, TJIAN R. Composite co-activator ARC mediates chromatin-directed transcriptional activation. *Nature* 1999; **398**: 828–832s.
- [51] NAGASAWA T, SUZUKI S, TAKEDA T, DEGROOT LJ. Thyroid hormone receptor beta 1 expression in developing mouse limbs and face. *Endocrinology* 1997; **138**: 1276–1281.
- [52] ONATE SA, TSAI SY, TSAI M-J, O'MALLEY BW. Sequence and characterization of coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 1995; **270**: 1354–1357.
- [53] OPPENHEIMER JH. Thyroid hormone action at the nuclear level. *Ann Intern Med*. 1985; **102**: 374–384.
- [54] PEREZ P, SCHONTHAL A, ARANDA A. Repression of *c-fos* gene by thyroid hormone and retinoic acid receptors. *J Biol Chem* 1993; **268**: 23538–235343.
- [55] PILLAR TM, SEITZ HJ. Thyroid hormone and gene expression in the regulation of mitochondrial respiratory function. *Eur J Endocrinol* 1997; **136**: 231–239.
- [56] PUZIANOWSKA-KUŹNICKA M, DAMJANOVSKI S, SHI YB. Both thyroid hormone and 9-cis retinoic acid receptors are required to efficiently mediate the effects of thyroid hormone on embryonic development and specific gene regulation in *Xenopus laevis*. *Mol Cell Biol* 1997; **17**: 4738–4749.
- [57] PUZIANOWSKA-KUŹNICKA M, NAUMAN A, MADEJ A, TANSKI Z, CHENG S-Y, NAUMAN J. Expression of thyroid hormone receptors is disturbed in human renal clear cell carcinoma. *Cancer Lett* 2000; **155**: 145–152.

- [58] PUZIANOWSKA-KUZNICKA M, WONG J, KANAMORI A, SHI Y-B. Functional characterization of a mutant thyroid hormone receptor in *Xenopus laevis*. *J Biol Chem* 1996; **271**: 33394–33403.
- [59] QI JS, YUAN Y, DESAI-YAJNIK V, SAMUELS HH. Regulation of the mdm2 oncogene by thyroid hormone receptor. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 864–872.
- [60] RACHEZ C, LEMON BD, SULDAN Z, BROMLEIGH V, GAMBLE M, NAAR AM, ERDJUMENT-BROMAGE H, TEMPST P, FREEDNAM LP. Ligand-dependent transcription activation by nuclear receptors requires the DRIP complex. *Nature* 1999; **29**: 824–828.
- [61] RASTINJEAD F, PERLMANN T, EVANS RM, SIGLER PB. Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature* 1995; **375**: 203–211.
- [62] 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.
- [63] SILVA JE. Thyroid hormone control of thermogenesis and energy balance. *Thyroid* 1995; **5**: 481–492.
- [64] SINHA AK, PICKARD MR, KIM KD, AHMED MT, AL YATAMA F, EVANS IM, ELKINS RP. Perturbation of thyroid hormone homeostasis in the adult and brain function. *Acta Med Austriaca* 1995; **21**: 35–43.
- [65] SISLEY K, CURTIS D, RENNIE IG, REES RC. Loss of heterozygosity of the thyroid hormone receptor β in posterior uveal melanoma. *Melanoma Res* 1993; **3**: 457–461.
- [66] St GERMAIN DL, GALTON VA. The deiodinase family of selenoproteins. *Thyroid* 1997; **7**: 655–668.
- [67] SU Y, SHI Y, SHI YB. Cyclosporin A but not FK506 inhibits thyroid hormone-induced apoptosis in tadpole intestinal epithelium. *FASEB J* 1997; **11**: 559–565s.
- [68] TAKESHITA A, YEN PM, MISITI S, CARDONA GR, LIU Y, CHIN WW. Molecular cloning and properties of a full-length putative thyroid hormone receptor coactivator. *Endocrinology* 1996; **137**: 3594–3597.
- [69] TENBAUM S, BAHNIAMAD A. Nuclear receptors: structure, function and involvement in disease. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; **29**: 1325–1341.
- [70] THORMEYER D, BAHNIAMAD A. The v-erbA oncogene. *Int J Mol Med* 1999; **4**: 351–358.
- [71] WALLIN G, BRÖNNEGARD M, GRIMELIUS L, MCGUIRE J, TORRING O. Expression of the thyroid hormone receptor, the oncogenes c-myc and H-ras, and the 90 kD heat shock protein in normal, hyperplastic, and neoplastic human thyroid tissue. *Thyroid* 1992; **2**: 307–313.
- [72] WILLIAMS GR, BLAND R, SHEPPARD MC. Characterization of thyroid hormone (T3) receptors in three osteosarcoma cell lines of distinct osteoblast phenotype: interactions among T3, vitamin D3, and retinoid signalling. *Endocrinology* 1994; **135**: 2375–2385.
- [73] WOLFFE AP, COLLINGWOOD TN, LI Q, YEE J, URNOV F, SHI YB. Thyroid hormone receptor, v-ErbA, and chromatin. *Vitam Horm* 2000; **58**: 449–492.
- [74] WONG J, SHI Y-B. Coordinated regulation of and transcription regulation by *Xenopus* thyroid hormone and retinoid X receptors. *J Biol Chem* 1995; **270**: 18749–18483.
- [75] XIAOZ-X, CHEN J, LEVINE AJ, MODJTAHEDIN, XING J, SELLERS WR, LIVINGSTON DM. Interaction between the retinoblastoma protein and oncoprotein mdm2. *Nature* 1995; **375**: 694–697.
- [76] YAP N, YU C-L, CHENG S-Y. Modulation of the transcriptional activity of thyroid hormone receptors by the tumor suppressor p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 4273–4277.
- [77] YEN PM, CHIN WW. New advances in understanding the molecular mechanisms of thyroid hormone action. *Trends Endocrinol Metab* 1994; **5**: 65–72.
- [78] YEN PM, SPANJAARD RA, SUGAWARA A, DARLING DS, NGUYEN VP, CHIN WW. Orientation and spacing of half-sites differentially affect T3-receptor (TR) monomer, homodimer and heterodimer binding to thyroid hormone response elements (TREs). *Endocrine J* 1993; **1**: 461–466.

- [79] YU VC, DELSERT C, ANDERSEN B, HOLLOWAY JM, DEVARY OV, NAAR AM, KIM SY, BOUTIN JM, GLASS CK, ROSENFELD MG. RXR β : a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D to their cognate response elements. *Cell* 1991; **67**: 1251–1266.
- [80] YUAN CX, ITO M, FONDELL JD, FU ZY, ROEDER RG. The TRAP220 component of a thyroid hormone-associated protein (TRAP) coactivator complex interacts directly with nuclear receptors in a ligand-dependent fashion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 7939–7944.
- [81] ZHANG X-K, HOFFMANN B, TRAN V-B, GRAUPNER G, PFAHL M. Retinoid X receptor in an auxillary protein for thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Nature* 1992; **355**: 441–446.
- [82] ZHANG X-K, WILLS KN, HUSMANN M, HERMANN T, PFAHL M. Novel pathway for thyroid hormone receptor action through interaction with jun and fos oncogene activities. *Mol Cell Biol* 1991; **11**: 6016–6025.

Redaktor prowadzący – Bożena Kamińska

Otrzymano: 22.10.2000 r.

Przyjęto: 02.01.2001 r.

Adres autora: ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa;

e-mail: monika@amwaw.edu.pl

CYTOGENETYKA MOLEKULARNA W USTALANIU CECH GATUNKOWYCH ORAZ ICH ZMIENNOŚCI W ANALIZIE POKREWIEŃSTWA ROŚLIN OKRYTOZALĄŻKOWYCH

MOLECULAR CYTOGENETICS IN ESTABLISHMENT
OF SPECIES-SPECIFIC TRAITS AND THEIR VARIABILITY
IN ANALYSIS OF RELATIONSHIPS IN ANGIOSPERMS

Maria Joanna OLSZEWSKA¹, Jolanta MAŁUSZYŃSKA²

¹Zakład Cytogenetyki i Biologii Molekularnej Roślin, Uniwersytet Łódzki;

²Katedra Anatomii i Cytologii Roślin, Uniwersytet Śląski

Streszczenie: Dominującym składnikiem genomu roślin okrytozalążkowych są sekwencje powtarzalne, w tym retroelementy. Rozmaita zawartość tych sekwencji powoduje zmienność rozmiarów genomu w obrębie zarówno gatunku, jak i rodzaju. Każdy rodzaj sekwencji powtarzalnych może być gatunkowo- lub genomowo-specyficzny albo występować powszechnie w obrębie rodzaju lub rodzin, wykazując charakterystyczną lokalizację w chromosomach. Do cech gatunkowych zalicza się chromosomowy wzór prążkowy oraz lokalizację 18S-5, 8S-25S rDNA i 5S rDNA. U allopoliploidów, w porównaniu z genomami ancestralnymi, mogą zachodzić zmiany polegające na translokacji fragmentów chromosomów i translokacji sekwencji powtarzalnych, specyficznych dla jednego z genomów na drugi oraz redukcja liczby loci rDNA i ich ekspresji. W ustalaniu pokrewieństwa między gatunkami istotne są wyniki GISH.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28: 197–218)

Słowa kluczowe: cytogenetyka molekularna, kariotyp, FISH, GISH, sekwencje powtarzalne, retroelementy, cechy gatunkowe.

Summary: Repetitive sequences, including retroelements, are the main genome component in angiosperm plants. Variations in their content both in the same species and within the genus, cause changes in the genome size. Each kind of repetitive sequences can be either species- and genome-specific or it can be present within the genus or families and display a characteristic localisation in chromosomes. Chromosome banding pattern, location of 18S-5, 8S-25S rDNA and 5S rDNA are considered to be species-specific. Among allopoliploids, as compared to ancestral genomes, changes consisting in translocations of

chromosome fragments and translocations of repetitive sequences specific for one of the genome to another one, as well as reduction in the number of rDNA loci and their expression can occur. In establishing relationships among species the results of GISH method are important.

(*Advances in Cell Biology 2001*; 28: 197–218)

Key words: molecular cytogenetics, karyotype, FISH, GISH, repetitive sequences, retroelements, species-specific traits.

1. WSTĘP

Od kilkunastu lat rozwija się intensywnie cytogenetyka molekularna, która polega na skojarzeniu badań genomów jądrowych metodami molekularnymi z badaniami *in situ*, a głównie z zastosowaniem metody FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*), tj. hybrydyzacji do DNA chromosomów i jąder interfazowych określonych sekwencji znakowanych fluorescencyjnie lub GISH (*Genomic In Situ Hybridization*). Uzyskane dotąd wyniki rzuciły nowe światło na pokrewieństwo między gatunkami, w wyniku czego powstały nowe kierunki badań – molekularna systematyka i molekularna ewolucja (ref. [74]). W królestwie roślin wiele gatunków powstało w wyniku poliploidyzacji, tj. zwielokrotnienia bądź takiego samego genomu (autopoliploidyzacja) lub odmiennych genomów (alloploidyzacja). W tym drugim przypadku istotnym zagadnieniem jest odróżnienie poszczególnych genomów i wskazanie gatunków ancestralnych oraz zmian, jakie towarzyszyły utrwalaniu się gatunków allopoloidalnych (ref. [83]). W tym celu poszukuje się specyficznych markerów molekularnych i chromosomowych.

Za charakterystyczne cechy gatunku przyjęto: rozmiar genomu, tj. zawartość DNA w przeliczeniu na genom haploidalny (1C) lub diploidalny (2C), liczbę i morfologię chromosomów, wzór prążków C (heterochromatynowych), lokalizację genów 18S-5, 8S-25S rRNA i 5S rRNA. Rozmiary genomu haploidalnego u roślin okrytozalążkowych wahają się w znacznych granicach: od 0,1 pg do 127,5 pg, zaś liczba haploidalna chromosomów (n) – od 2 do 300. Liczba chromosomów nie jest skorelowana z rozmiarami genomu, lecz z ich całkowitą objętością podczas metafazy mitozy. Liczba genów jest oceniana na 25–60 tys., a więc skala rozpiętości nie odpowiada zakresowi wielkości genomu (ref. [47]). Od kilkunastu lat wiadomo, że rozmiary genomu u roślin (w pg) są skorelowane z zawartością sekwencji powtarzalnych (w pg) [18]. Ponieważ wyposażenie w geny jest cechą wspólną dla poszczególnych gatunków, różnorodność sekwencji powtarzalnych jest uważana za źródło zmienności rozmiarów genomów i ich organizacji, a różnorodność cech gatunkowych może być upatrywana w liczbie i cechach molekularnych sekwencji powtarzalnych.

2. SEKWENCJE POWTARZALNE

Sekwencje powtarzalne występują w układach tandemowych lub rozproszonych. Do sekwencji tandemowych kodujących zalicza się 18S-5, 8S-25S rDNA, 5S rDNA i tDNA (por. niżej – 5. Analiza chromosomów). Sekwencje tandemowe o liczbie kopii ok. 10^6 /genom haploidalny, niekodujące, zbudowane są z monomerów o długości od 59 do kilkuset pz, wchodzą zwykle w skład heterochromatyny. Ten rodzaj chromatyny charakteryzuje się wysokim stopniem kondensacji, zróżnicowanym w zależności od jej usytuowania. Między monomerami w tandemowym układzie mogą znajdować się retropozony, a bardzo rzadko – funkcjonalne geny (ref. [3]). Ważną grupą sekwencji powtarzalnych tandemowych są sekwencje mikrosatelitarne, uważane za markery genetyczne. Omówienie ich przekracza możliwości tego artykułu, tym bardziej że zostały one opisane niedawno [67].

Sekwencje powtarzalne rozproszone, ze względu na długość, należą do dwóch kategorii: LINES (*Long INterspersed Elements*), zawierające elementy o długości do kilku tys. pz i SINES (*Short INterspersed Elements*) o długości do 500 pz. W grupie sekwencji powtarzalnych rozproszonych coraz częściej są identyfikowane ruchome elementy (retroelementy), które prawdopodobnie stanowią główną frakcję sekwencji powtarzalnych ([23] i ref.). W genomach roślin występują retrotranspozony i inne retroelementy, tj. takie, których informacja genetyczna jest zapisana w RNA, zawierają odwrotną transkryptazę i integrzę; po przepisaniu RNA na DNA integrują się z genomem gospodarza. Sekwencje te należą zarówno do grupy LINES, jak i SINES. Retroelementy typu LINES są prawdopodobnie najstarszą klasą retrotranspozonów w genomach roślin. Ruchome elementy mogą zawierać charakterystyczne długie powtórzenia terminalne (LTR – *Long Terminal Repeats*) lub być ich pozbawione. LTR są obecne w retrotranspozonach typu Ty-1-gypsy, w których domena integrazy znajduje się za odwrotną transkryptazą oraz Ty-1-copia, zawierające domenę integrazy przed odwrotną transkryptazą. Retrotranspozony z LTR w zależności od długości (od 400 do 2500 pz) są typu SINES lub LINES. Retrotranspozony z grupy Ty-1-copia różnią się długością i sekwencją nukleotydów, stąd nazywane są Ty-1-copia-like. Niektóre mogą być markerami gatunkowo specyficznymi (por. niżej, 2.2. Retrotranspozony). Druga grupa retroelementów nie zawiera LTR i nazywane są retropozonami; są to m.in. *cin4* (występujące u kukurydzy), *del2* (u *Lilium speciosum*, gdzie stanowią do 4% genomu), *BNR1* (*Beta vulgaris*), *Ta11-1* (*Arabidopsis thaliana*), *S1* (*Brassicaceae* i wiele innych gatunków). Retropozony, podobnie jak retrotranspozony, ze względu na długość są zaliczane do SINES lub LINES. Retropozony, jak wykazała metoda FISH, są zwykle równomiernie rozmieszczone w chromosomach, często w postaci rozmaicie zlokalizowanych skupień. Przynależne do SINES są zakończone motywem poly(A) albo sekwencją bogatą w A lub T, zawierają pewne konserwatywne sekwencje podobne

do tRNA i mogą być obecne w intronach (ref. [68]). Sekwencje S1 z SINEs u *Brassica napus* jest wysoce zmetylowana; poziom metylacji jest dwukrotnie wyższy niż średni poziom metylacji jądrowego DNA u tego gatunku [25].

3. ZMIENNOŚĆ ROZMIARÓW GENOMU W OBRĘBIE GATUNKU

Od blisko 20 lat wiadomo, że rozmiary genomu, tj. zawartość DNA w przeliczeniu na genom haploidalny lub diploidalny wahają się w znacznych granicach u tego samego gatunku. Obserwacje te dotyczyły przedstawicieli tego samego gatunku, zebranych z rozmaitych siedlisk, różniących się np. wysokością n. p. m. i średnią temperaturą, a także odmian gatunków uprawnych (ref. [47]). Aby uniknąć artefaktów, wiele uwagi poświęca się stronie metodycznej, szczególnie w odniesieniu do cytometrii przepływowej. Dostyc powszechnie stosowane barwienie DAPI (wybiórczo wiąże się z AT) powinno być zastąpione przez jodek propidyny (PI – *propidium iodide*), który – podobnie jak metoda Feulgena stosowana w mikrospektrofotometrii – barwi całkowity DNA. Wykazano, że DAPI daje wyniki заниzone [37]. Równie ważny jest dobór odpowiedniego standardu, najlepiej zbliżonego zawartością DNA do badanego obiektu. Wyniki uzyskane po barwieniu PI i metodą Feulgena są bardzo zbliżone, a niekiedy identyczne. Przy zachowaniu poprawnej metody, po barwieniu PI wykazano, że zawartość 2C DNA u dwóch odmian pszenicy, podobnie jak u dwóch odmian żyta różni się: 31,10±1,6 pg i 33,22 dla pszenicy i 16,6±0,02 pg i 15,39±0,09 pg dla żyta [37].

Ostatnio stwierdzono, że wewnątrzgatunkową zmienność zawartości 2C DNA, zgodnie z przytoczoną wyżej koncepcją Flavella [18] można przypisać zmiennej liczbie różnego typu sekwencji powtarzalnych. Biorąc pod uwagę znaczny udział retroelementów w sekwencjach powtarzalnych oraz takie ich właściwości, jak przemieszczanie się, czego konsekwencją jest przebudowa chromosomów drogą transpozycji, insercji i wycinania, można oczekiwać, że tą właśnie drogą następują modyfikacje rozmiarów genomu [4]. U wielu gatunków liczba kopii retrotranspozonów jest dodatnio skorelowana z rozmiarami genomu (ref. [81]). Nie jest to jednak ogólna prawidłowość, ponieważ u rodzaju *Hordeum*, u którego liczba kopii retrotranspozonu *BARE1*, obliczona na podstawie hybrydyzacji z 2 sondami zawierającymi konserwatywny fragment bądź z obszaru genu kodującego odwrotną transkryptazę, bądź z LTR, nie jest skorelowana z zawartością 1C DNA ani u odmian tego samego gatunku, ani u osobników gatunku dzikiego, zebranych z rozmaitych stanowisk [81].

U *Vicia faba* rozpiętość zawartości 2C DNA wynosi od 21,8 pg do 29,4 pg u osobników zebranych z różnych stanowisk i jest skorelowana z liczbą powtórzeń

sekwencji VfB, która wynosi od $2,7 \times 10^4$ do 23×10^4 [20]. U dwóch podgatunków ryżu (*Oryza sativa*, $2n=2x=24$): *indica* i *japonica* różnice w rozmiarach genomu 2C – 0,897 pg i 0,818 pg – są spowodowane przez większą liczbę kopii 5S rDNA – $919,3 \pm 211,2$ i $751,8 \pm 153,5$ oraz sekwencji telomerowych – $1501,3 \pm 760$ i $453,3 \pm 146,9$ [60]. Wewnątrzgatunkowa zmienność rozmiarów genomu u 3 gatunków, w tym 2 podgatunków rodzaju *Alstroemeria* jest związana z polimorfizmem prążków C i skorelowana dodatnio z ich zawartością [7]. Analogiczna zależność między zawartością 2C DNA a % heterochromatyny ma miejsce u 3 podgatunków *Crepis foetida* [16]. U *Dasyphyrum villosum* stwierdzono korelację między rozmiarami genomu a całkowitą długością chromosomów mitotycznych i licznymi cechami fenotypowymi, takimi jak: masa nasion i długość liści. Cechy te były także dodatnio skorelowane z wysokością n. p. m., z jakiej zostały zebrane poszczególne osobniki [8]. Wewnątrzgatunkowa zmienność zawartości jądrowego DNA, która może być związana z adaptacją do warunków środowiska, została stwierdzona u wielu gatunków roślin, podobnie jak zależność między wewnątrzgatunkową zmiennością rozmiarów genomu a fenotypem (ref. [8, 47]).

4. GENOMOWA I GATUNKOWA SPECYFICZNOŚĆ SEKWENCJI POWTARZALNYCH

Sekwencje powtarzalne, wcześniej wykrywane metodą pomiarów szybkości re-naturacji jednoniciowego DNA, są intensywnie badane od wczesnych lat 80., tj. od wprowadzenia enzymów restrykcyjnych do analizy genomów roślinnych. W wyniku rozdziałów elektroforetycznych w żelach ujawniają się one w postaci prążków w różnych strefach długości. DNA zawarty w tych prążkach może być izolowany, klonowany, sekwencjonowany i po odpowiednim wyznakowaniu, w celu uzyskania sond, używany do hybrydyzacji typu Southern, dot-blot i slot-blot oraz do hybrydyzacji *in situ* (ref. [63]).

Istnienie gatunkowo-specyficznych sekwencji powtarzalnych świadczy o tym, że ich amplifikacja nastąpiła stosunkowo niedawno w ewolucji. Sekwencje niespecyficzne dla gatunku powstały dawno i pojawiły się u spokrewnionych gatunków w wyniku krzyżowań i allopoliploidyzacji.

4.1. Sekwencje tandemowe

4.1.1. Sekwencje telomerowe

Telomery są wyspecjalizowanymi strukturami, które stabilizują krańce chromosomów. Zawierają one tandemowo ułożone konserwatywne sekwencje TTTAGGG.

Liczba sekwencji telomerowych jest uważana za specyficzną cechę gatunkową i wynosi od 2 do 5 kpz u *Arabidopsis*, 12–15 kpz u zbóż i od 60 do 160 kpz u tytoniu. Liczba kopii może być różna w poszczególnych chromosomach tego samego gatunku i ulega redukcji w komórkach zróżnicowanych (ref. [32]). U dwóch podgatunków ryżu, *indica* i *japonica* (jak wspomniano wyżej), liczba kopii jest trzykrotnie większa u *indica*, podobnie jak ich długość; wyniki FISH wykazały, że u *indica* sekwencje telomerowe znajdują się na krańcach 6 par chromosomów, zaś u *japonica* – tylko w 2 parach chromosomów, a ponadto wielkość sygnałów hybrydacyjnych jest znacznie mniejsza niż u *indica* [60]. Brak sekwencji telomerowych stwierdzono u przedstawicieli rodzaju *Allium*, *Nothoscordum* i *Tulbagia* (*Alliaceae*) oraz u *Aloe* (*Asphodelaceae*) ([1] i ref.).

4. 1.2. Sekwencje subtelerowe

Sekwencje subtelerowe zlokalizowane przy telomerach, stanowią strefę buforową oddzielającą sekwencje telomerowe od sekwencji kodujących. O ich przejściowym charakterze świadczą także odległości między nukleosomami: w chromatynie telomerowej wynoszą one ok. 155 pz, w sekwencjach subtelerowych – 170 pz, zaś w chromatynie zawierającej geny – 180 pz ([35] i ref.). Sekwencje subtelerowe mogą być gatunkowo- lub rodzajowo-specyficzne (ref. [47]). Ostatnio wykazano, że sekwencje z rodziny Afa (340 pz), wyizolowane z pszenicy, obecne są w regionach subtelerowych u gatunków azjatyckich, również należących do trybu *Triticeae* – *Leymus racemosus* ($2n=4x=28$, genom NXXX) i *Psathyrostratus juncea* ($2n=2x=14$, genom NN) [57]. Natomiast sekwencja Tai1 (570 pz), uzyskana z DNA *L. racemosus*, zlokalizowana u tego gatunku w obszarze subtelerowym, nie dawała sygnału w hybrydacji Southern ani z *L. mollis*, ani z 2 gatunkami *Psathyrostratus*, jak również z *Triticum aestivum* [40], może zatem być uznana za gatunkowo-specyficzną dla *L. racemosus*. Jest ona jednak powszechna u *Triticeae*, ale zlokalizowana poza obszarem subtelerowym (por. niżej).

U rodzaju *Nicotiana* sklonowano sekwencje TAS49 i wyznaczono jej strukturę pierwszorzędową. Uznano ją wprawdzie za rozproszoną, ale zlokalizowana jest w strefie subtelerowej u 5 gatunków *Nicotiana* i/lub w obszarze interstycjalnym u 4 gatunków. Sekwencja ta (460 pz) nie wykazuje cech retrotranspozonów. U *N. sylvestris* liczba kopii wynosi 3300/2C, u *N. tabacum* – 22 600, u *N. tomentosiformis* – 17 400, zatem u *N. tabacum* (gatunek allotetraploidalny) liczba kopii tej sekwencji jest zbliżona do sumy liczby kopii u gatunków ancestralnych – *N. sylvestris* i *N. tomentosiformis* [35].

4. 1.3. Sekwencje zlokalizowane poza obszarem telomerów

Podobnie jak sekwencje subtelerowe, można je podzielić na sekwencje specyficzne dla gatunku, genomu, rodzaju oraz niespecyficzne. U bobu (*Vicia faba*

L.) wcześniej sklonowana sekwencja FokI (59 pz, ref. [62]) występuje wyłącznie u tego gatunku i jego odmian, przy czym liczba kopii/genom haploidalny wynosi od $5,39 \times 10^6$ do $21,51 \times 10^6$. Wyniki hybrydyzacji Southern wskazują, że u 5 innych gatunków *Vicia* sekwencja ta nie występuje [46]. Metodami FISH [21] i nick-translacji *in situ* [62] wykazano, że sekwencja ta jest zlokalizowana wyłącznie w heterochromatynie 5 par krótkich (S) chromosomów. Ostatnio [59] wykryto specyficzną gatunkowo dla *Vicia faba* i jego podgatunków tandemową sekwencję TIII15 (119 pz) bogatą w AT (53,8%) o liczbie kopii/1C 5×10^5 . Metoda FISH potwierdziła, że jest ona zlokalizowana nie tylko przy prążkach heterochromatynowych FokI(+) i FokI(-), ale także w formie rozproszonej.

U rodzaju *Avena* gatunki diploidalne zawierają genomy CC, tetraploidalne – AACC, a heksaploidalne – AACCCD. Postępując się klonem pAmI (464 pz), uzyskanym wcześniej z *A. murphyi* (genom AACC), porównano metodą FISH obecność tej sekwencji u 7 gatunków, wśród których każdy zawierał genom C. Sygnał hybrydyzacyjny był obecny we wszystkich chromosomach z genomu C, z wyjątkiem dystalnych regionów niektórych par; odpowiednie, wyznakowane segmenty znajdowały się w pobliżu krańców długich ramion 3 par chromosomów z genomu A, co świadczy o ich translokacji w allopoliploidach. Genomy C, obecne u gatunków diploidalnych ($2n=2x=14$, CC) są uważane za macierzyste dla gatunków allopoliploidalnych [19].

Sekwencja OeTaq80, sklonowana z DNA *Olea europaea* ($2n=46$) zbudowana jest z 7 tandemowo ułożonych monomerów zawierających 80 pz, w dużym stopniu homologicznych (od 74 do 91% homologii). U tego gatunku metodą FISH wykazano, że sekwencja ta jest zlokalizowana głównie na krańcach chromosomów: na jednym – w 11 parach, na obu – w 7 parach, w regionach interstycjalnych – w 3 parach; 2 pary chromosomów nie zawierały sygnału hybrydyzacyjnego. Sekwencja OeTaq80 występowała także u 5 innych gatunków *Olea*, przy czym liczba kopii/ng DNA wynosiła od $12,5 \times 10^8$ do $25,0 \times 10^8$ i była wysoce dodatnio skorelowana z rozmiarami genomu [5]. Również specyficzne dla rodzaju *Cicer* są 2 sekwencje tandemowe: CaSat1 (monomer 170 pz) i CaSat2 (monomer 100 pz), niehomologiczne, wyizolowane z *Cicer arietinum* (ciecierzyca). Obie sekwencje są bogate w AT i dawały u 9 gatunków jednorocznych, pochodzących z różnych siedlisk, pozytywny sygnał w metodzie FISH w obszarach heterochromatyny barwiącej się DAPI, tj. bogatej w AT. Sygnał ten był nieobecny u gatunku wieloletniego (por. 2.2. Retroelementy) [77].

Wspomniane wyżej sekwencje z rodziny Afa (340 pz) obecne są u wszystkich zbadanych gatunków z trybu *Triticeae*, zawierających genomy H, R, S, D, M, A, B i ich kombinacje, aczkolwiek w różnej liczbie powtórzeń: 1×10^3 (genom S), 2×10^3 (genomy A i R), 4×10^3 (genom A z *Triticum monococcum*), 7×10^3 (genom M), 1×10^4 (genomy H i D), co wskazuje, że sekwencje te ulegały wiele razy amplifikacji w ewolucji *Triticeae* [58]. Równie rozpowszechniona jest

sekwencja pSc119,2 (120 pz), sklonowana z *Secale cereale*, która była obecna u 11 zbadanych gatunków *Secale*, dając taki sam wzór hybrydyzacyjny w metodzie FISH, tj. w obszarach telomerowych i interstycjalnych [13]. Obecność tej sekwencji była stwierdzona metodą Southern u 3 diploidalnych gatunków *Hordeum*: *bulbosum* (genom I), *chilense* (genom H) i *marinum* (genom X) oraz u tetraploidalnego *H. murinum* (genom YY), natomiast brak było sygnałów u 2 diploidalnych podgatunków *H. vulgare* (genom I). Wzór hybrydyzacyjny po FISH był w postaci prążków (*H. chilense*) lub kropek przy krańcach chromosomów (*H. murinum* 4x) [78]. U rodzaju *Secale* metodą FISH zlokalizowano inne wysoce powtarzalne sekwencje: pSc74 (350–480 pz) i pSc34 (610 pz), sklonowane wcześniej z *S. cereale*. Sekwencja pSc74 była obecna również u 4 podgatunków *S. cereale* oraz u 6 innych gatunków *Secale*, z wyjątkiem *S. silvestre*. Wzór hybrydyzacyjny po FISH był taki sam u wszystkich podgatunków *S. cereale* i u *S. kuprijanovii*: sygnał był zlokalizowany głównie w obszarach telomerowych, a zbliżony – u *S. montanum*, *S. africanum*, *S. anatolicum* i *S. vavilovii*. Sonda z sekwencją pSc34 dawała pozytywne sygnały u wszystkich badanych gatunków i podgatunków z wyjątkiem *S. vavilovii*; u *S. silvestre* sygnał był śladowy. U wszystkich gatunków i podgatunków, z wyjątkiem *S. montanum*, dających pozytywne wyniki w metodzie FISH zauważono polimorfizm znakowania. Przedstawione wyniki dotyczące obecności sekwencji pSc119,2, pSc74 i pSc34 nie pozwalają na wyciągnięcie wniosków dotyczących ewolucji i filogenezy badanych gatunków [13, 78].

4.2. Sekwencje powtarzalne rozproszone

Podobnie jak sekwencje tandemowe, sekwencje rozproszone mogą być specyficzne gatunkowo i genomowo, wobec czego mogą służyć jako markery do identyfikacji genomów, chromosomów i regionów chromosomów.

4.2.1. Sekwencje rozproszone, nieidentyfikowane jako retroelementy

Nienotowane wcześniej 4 sekwencje rozproszone, specyficzne dla *Vicia faba* i jego podgatunków, zostały sklonowane z powtarzalnych frakcji (prążków) obecnych w żelach. Sekwencje te, o długości 109–233 pz, z wyjątkiem jednej, są bogate w AT, a liczba kopii/IC wynosi od 5×10^4 do 3×10^5 . Sekwencje te nie są obecne ani u zbadanych pod tym względem 12 innych gatunków *Vicia*, ani u innych 9 gatunków z *Leguminosae* [59].

Sekwencja pVuKB₂, wyodrębniona z DNA *Vigna unguiculata* (fasolnik chiński) subsp. *unguiculata* o długości 436 pz i zawartości AT=65% jest gatunkowo-specyficzna, tj. występuje tylko u 2 podgatunków *V. unguiculata*, nie jest obecna u 4 innych gatunków *Vigna* (*oblongifolia*, *ambacensis*, *luteola* i *vexillata*), jak wykazała hybrydyzacja Southern. Metodą FISH wykazano, że sekwencja ta jest zlokalizowana wokół centromerów wszystkich chromosomów. Występowała ona w tym samym

miejscu, co wcześniej sklonowana sekwencja VuKB1, również bogata w AT; udowodniono to nie tylko na całych chromosomach, ale również na rozproszonych włóknach chromosomowych. Sekwencja VuKB1 nie jest specyficzna gatunkowo, co wskazuje, że sekwencja VuKB1 jest filogenetycznie starsza od sekwencji VuKB2. Żadna z tych sekwencji nie wykazuje homologii do retroelementów [23].

Z DNA *Solanum tuberosum* sklonowano 2 sekwencje: pST3, 865 pz, liczba kopii/1C wynosi 300 oraz pST10, 121 pz, liczba kopii/1C – 400. Sekwencje te zlokalizowano metodą FISH; sygnały w postaci kropek przy krańcach chromosomów występowały tylko u *S. tuberosum*; z *S. brevidens* wynik był negatywny. Natomiast sekwencje z *S. brevidens*, niehomologiczne do sklonowanych z *S. tuberosum* – pSB1, 122 pz, liczba kopii 1500/1C i pSB7, 167 pz, liczba kopii 6750/1C, hybrydujące głównie w obszarach telomerowych, przy niektórych centromerach i w regionach interstycjalnych, są obecne w całej grupie *Eutuberosa* ([66] i ref.).

U bawełny (*Gossypium*) zidentyfikowano 64 rodziny sekwencji powtarzalnych z genomu A i 4 rodziny z genomu D. Genomy A i D różnią się rozmiarami: A – 1,86 pg, D – 1,01 pg. Sonda z genomu A nie hybryduje z DNA genomu D i F, daje bardzo silny sygnał z DNA genomu A, słabe sygnały z genomem B oraz daje sygnał z genomem AD. Analogiczne wyniki otrzymano metodą FISH w odniesieniu do allotetraploidów AD, co świadczy o migracji sekwencji z genomu A do D [84].

U *Lolium perenne* sekwencja długości 650 pz, będąca wstawką w klonie pLPB-123, jest obecna w liczbie kopii 9×10^4 /1C, podczas gdy u *L. temulentum* występuje ona tylko w liczbie 1×10^4 . Ta okoliczność pozwoliła, drogą FISH, na rozróżnienie chromosomów obu gatunków w metafazie mitozy i mejozy w mieszańcach F1 [36].

Punktem wyjścia dla zbadania pokrewieństwa między *Dasypyrum villosum* L. ($2n=2x=14$) i *D. breviaristatum* (Lindb.f) (Frederiksen) ($2n=4x=28$) były dawniejsze przypuszczenia (nieoparte na badaniach molekularnych), że *D. breviaristatum* jest autotetraploidem z genomem VVVV, pochodzącym od *D. villosum* (genom VV). Badania metodami cytogenetyki molekularnej wykazały, że pogląd ten był błędny. Sklonowano 2 sekwencje z *D. breviaristatum*: klon pDbKB49 zawiera fragment DNA długości 400 pz i 64% AT, zaś klon pDbKB45 składa się z 1096 pz i 60% AT. Żaden z klonów nie wykazywał znaczącej homologii z sekwencjami w GenBank/EMBL data base (w 1998 r.). Mimo ich rozproszonej lokalizacji, nie znaleziono homologii do retroelementów. Hybrydyzacja Southern wykazała, że fragment DNA z klonu pDbKB45, pochodzącego z *D. breviaristatum* jest obecny u tego gatunku w licznych powtórzeniach, natomiast hybrydyzacja tego fragmentu z DNA *D. villosum* dawała sygnały bardzo słabe. Klon pDbKB49 dawał silniejsze sygnały z DNA *D. villosum*. Analogiczne rezultaty uzyskano metodą FISH: sekwencja pDbKB49 była równomiernie rozproszona wzdłuż wszystkich chromosomów, z wyjątkiem regionów telomerowych; podobną lokalizację wykazywały chromosomy

D. villosum. U tego gatunku nie stwierdzono sygnałów hybrydizacyjnych po FISH z klonem pDbKB45, natomiast u *D. breviaristatum* sygnał był rozproszony i silniejszy na krańcach chromosomów. Uzupełnieniem tych wyników, wskazujących na odmiennność genomów obu gatunków, były rezultaty metody GISH (por. 5.3) [22]. Z przedstawionych danych wynika, że sekwencja pDbKB45 nie występowała u *D. villosum*, zatem *D. breviaristatum* nie może być autotetraploidem pochodzącym z *D. villosum*.

Specyficzna dla genomu H diploidalnych *Hordeum* jest sekwencja pHch2, sklonowana z pochodzących z Ameryki Południowej gatunków *Elymus (Triticeae)* [17]. Specyficzne dla genomu A u 8 gatunków *Avena* są sekwencje pAs14 (639 pz) i pAs121 (730 pz), których obecność stwierdzono u 3 gatunków diploidalnych (genom AA), 2 gatunków tetraploidalnych (genom AACC) i 4 gatunków heksaploidalnych (genom AACCCD). Sekwencja pAs14 nie była obecna u 2 gatunków diploidalnych z genomem CC. Sekwencja pAs121 występowała w genomach diploidalnych AA, tetraploidalnych AACC i heksaploidalnych AACCCD i w nieznacznych ilościach u diploidów CC. Metoda FISH wykazała, że sekwencja pAs14 jest rozproszona wzdłuż chromosomów, z wyjątkiem obszarów telomerowych długich ramion w genomach A i D, ale była obecna w obszarach telomerowych u *A. sativa* (genom AACCCD) w chromosomach z genomu C, co świadczy o translokacjach międzygenomowych [44] i wskazuje na konieczność konfrontowania wyników uzyskanych metodą Southern z metodą FISH.

Rodzina sekwencji powtarzalnych VfB (ok. 1200 pz, 60% AT), sklonowana z DNA *Vicia faba*, jest obecna u tego gatunku w zmiennej liczbie kopii, która jest skorelowana dodatkowo z rozmiarami genomu (por. wyżej, 3. Zmienność rozmiarów genomu w obrębie gatunku). Sekwencje te są zlokalizowane, jak dowodzą wyniki FISH, w sposób rozproszony i nie są obecne w heterochromatynie. Sekwencje te występują również u innych gatunków *Vicia (narbonensis i sativa)*, ale w znacznie mniejszych ilościach, co jest związane z o wiele mniejszym niż u *V. faba* genomem. Sekwencje homologiczne do VfB nie dawały sygnałów w hybrydizacji Southern u *Phaseolus coccineus* oraz u tak odległych taksonomicznie gatunków jak *Populus deltoides* i *Triticum durum*. Świadczy to, że sekwencja ta jest specyficzna dla rodzaju *Vicia* [20].

4.2.2. Retroelementy

Najbardziej rozpowszechnioną grupą w genomach roślin są retrotranspozony typu Ty-1-copia; znajdują się one również w genomach większości roślin niższych. Mogą one stanowić znaczną część genomu, jak np. u *Vicia faba* – ok. 40% (ref. [59]). Niektóre z nich przemieszczały się niedawno, są polimorficzne w obrębie gatunku i mogą być użyte jako markery do analizy sprzężeń i zmienności wewnątrzgatunkowej. Retrotranspozony, które były aktywne miliony lat temu, powinny być użyteczne w wyjaśnianiu pokrewieństwa między gatunkami (ref. [64]). Ponadto

retroelementy mogą uczestniczyć w ewolucji ze względu na ich mutagenne właściwości. Retrotranspozony mogą się integrować podczas cyklu ich powielania z określonymi miejscami, np. włączając się do genów kodujących białko u ryżu w warunkach kultury *in vitro*, podczas której następuje nawet 10-krotne zwiększenie liczby kopii. W warunkach innego stresu, jak naświetlanie promieniami UV i infekcja *Pseudomonas syringae*, w jądrach kalusa retrotranspozony integrują się z obszarami aktywnie transkrybowanymi ([24] i ref.). Liczba powtórzeń retroelementów jest rozmaita i w znacznej mierze jest związana z rozmiarami genomu: od 100/genom haploidalny u ryżu (0,59 pg) [82] do 10 tys. u *Hordeum vulgare* (ref. [24]).

Posługując się jako sondą sekwencjami uzyskanymi metodą PCR z zastosowaniem jako starterów konserwatywnych motywów z genów odwrotnej transkryptazy, z użyciem chromosomów 10 gatunków roślin okrytozalążkowych oraz sosny *Pinus alliotii*, widłaka *Selaginella apoda* i paproci *Pteris cretica*, metodą FISH stwierdzono lokalizację sekwencji z grupy Ty-1-copia. Z reguły są one rozproszone w obrębie większości chromosomów; słabsza hybrydyzacja ma miejsce głównie w obszarze centromerów, NOR i w regionach, o których wiadomo, że zawierają sekwencje tandemowe. U niektórych gatunków sygnał hybrydyzacyjny występował w formie skupień [6]. Hybrydyzacja typu Southern wykazała specyficzność dla gatunków z rodzaju *Pennisetum* sondy uzyskanej z *P. glaucum*, przy braku sygnałów z DNA *Setaria italica*, *Triticum aestivum*, *Secale cereale* i *Hordeum vulgare* [6].

Zastosowanie jako starterów w PCR sekwencji pochodzących z LTR pozwoliło na wykazanie specyficzności odmianowej i gatunkowej retrotranspozonów z grupy Ty-1-copia u *Pisum sativum* [64]. Gatunkowa specyficzność domeny z odwrotną transkryptazą u retrotranspozonów z grupy Ty-1-copia została wykazana dla 4 gatunków *Alstroemeria*. Metodą FISH wykazano pewne różnice we wzorze hybrydyzacyjnym dla poszczególnych gatunków. Przy zastosowaniu sondy z *A. inodora* do mieszańca *A. aurea* x *A. inodora*, sygnały hybrydyzacyjne z retrotranspozonów pochodzących z *A. inodora*, liczne w chromosomach tego gatunku, były nieobecne w chromosomach *A. aurea* [41]. Unikalność gatunkowa domeny genów odwrotnej transkryptazy została stwierdzona również u *Solanum tuberosum* (31 sekwencji z 4 odmian), *Allium cepa* (27 sekwencji), 3 gatunków *Vicia* (po 27 sekwencji z 3 gatunków) (ref. [41]).

Ze względu na zróżnicowanie domeny zawierającej odwrotną transkryptazę w retrotranspozonach z grupy Ty-1-copia, wyróżniono u traw 4 rodziny tych retrotranspozonów, wśród których, jak wykazały wyniki hybrydyzacji Southern, najbardziej rozpowszechniona okazała się rodzina G1, występowała bowiem u wszystkich zbadanych przedstawicieli trybu *Triticeae* (3 gatunki), *Avenaceae* (1 gatunek), *Chlorideae* (1 gatunek), *Paniceae* (2 gatunki) i *Oryzeae* (3 gatunki), zaś była nieobecna lub tylko w ilościach śladowych u *Andropogoneae*. Rodzina G2 była obecna u wszystkich *Oryzeae* i spośród 2 gatunków *Paniceae* tylko u *Echinochloa utilis*. Rodziny G3 i G4 były obecne jedynie u *Oryzeae* [50].

Sekwencja pAs17, sklonowana z genomu *Avena strigosa* (genom As), długości 646 pz, 54% AT, po przeszukaniu w banku genów (GenBank), wykazała znaczną homologię do LTR z grupy retrotranspozonów Ty-1-*copia*. Hybrydyzacja Southern do DNA diploidalnych (genom AA lub CC), tetraploidalnych (genomy AACCC) i heksaploidalnych (genomy AACCCDD) gatunków owsa wykazała brak tej sekwencji w genomie C. Zarówno diploidalne, jak i tetraploidalne gatunki zawierały $1,3 \times 10^4$ kopii, co wskazuje, że sekwencja ta jest składnikiem również genomu A, tj. nie tylko w genomie As. Natomiast u gatunków heksaploidalnych znajdowało się $2,4 \times 10^4$ kopii, zatem sekwencja ta była obecna w genomach A, jak i D. Wyniki te zostały potwierdzone metodą FISH [45].

Klon A108, o długości 260 pz, zawierający sekwencję kodującą odwrotną transkryptazę i pochodzący z bawełny, użyty jako sonda w metodzie FISH, dawał sygnały o podobnej intensywności we wszystkich chromosomach tetraploida *Gossypium hirsutum* (genom AADD); sygnały te były skupione przy krańcach chromosomów. Podobny wzór hybrydyzacyjny otrzymano u *G. arboreum* (diploid, genom AA), lecz brak było sygnału u *G. raimondii* (diploid, genom DD) [27]. Pojawienie się u tetraploida AADD sekwencji nieobecnych w genomie D u diploida może być wyjaśnione przez właściwości retrotranspozonów, zidentyfikowanych wśród licznych sekwencji powtarzalnych u *Gossypium*: ulegają one ekspresji, co może stanowić jeden z mechanizmów przemieszczania się ich do innych genomów u allopoliploidów [84].

2 kłony sekwencji powtarzalnych rozproszonych, wyizolowanych z genomu *Cicer arietinum* (ciecierzyca) – CaRep1 i CaRep2 – wykazują homologię do różnych regionów retrotranspozonów z grupy Ty3-gypsy, a więc retrotranspozony z obu klonów wydają się być zlokalizowane w heterochromatynie (por. 4.1.3) [77].

Charakterystyczne dla licznych *Brassicaceae* krótkie rozproszone sekwencje typu SINEs, bez LTR – retropozony S1, były pomnażane w wyniku wielu amplifikacji podczas ewolucji, wskutek czego następowała zmienność miejsca ich insercji. Dzięki obecności w nich końcowego fragmentu 3' poli(A), wyznacza się ich lokalizację w genomie, co posłużyło do ustalenia pokrewieństwa między 19 gatunkami *Brassica*. Stwierdzono m.in., że *B. incana*, *B. montana* i *B. hilarionis* są najbliższymi spokrewnionymi z *B. oleracea* (kapusta). Ponadto wykryto pewne introgresje potwierdzające pogląd, że te blisko spokrewnione gatunki są zdolne do genetycznej wymiany w ich naturalnym siedlisku. Wyniki tej analizy są zgodne z klasyfikacją przeprowadzoną na podstawie RFLP DNA chloroplastów, ale różnią się od klasyfikacji dokonanej na podstawie RFLP w DNA jądrowym [80].

Jak wynika z przytoczonych danych, uwzględnianie retroelementów jako podstawowych składników genomu nastąpiło zaledwie kilka lat temu. W badaniach ich specyficzności gatunkowej i genomowej uwzględniano dotąd niemal wyłącznie retrotranspozony u grupy Ty-1-*copia*; wcześniej zajmowano się ich charakterystyką molekularną i ich powszechną obecnością w genomach roślin. Mimo że znane

są retrotranspozony z grupy *Ty-3-gypsy* oraz liczne retropozony (por. WSTĘP), nie były one dotąd uwzględniane w aspekcie specyficzności genomowej i przemieszczeń w wyniku allopoliploidyzacji. Przyczynę tej sytuacji można upatrywać w fakcie, że retrotranspozony z grupy *Ty-1-copia* występują powszechnie w genomach roślin, w bardzo wielu powtórzeniach oraz że wykazują znaczną zmienność wewnątrz- i międzygatunkową.

5. ANALIZA CHROMOSOMÓW

5.1. Kariotypy i wzory prążkowe

Podstawą badań filogenetycznych z wykorzystaniem danych chromosomowych jest porównawcza analiza genomów, w tym analiza kariotypów. Kariotypy poszczególnych gatunków różnią się liczbą chromosomów, stopniem poliploidalności i morfologią chromosomów. Poznanie różnic w kariotypach poszczególnych gatunków może dostarczyć informacji o przemianach chromosomowych, które zaszły podczas ewolucji tych gatunków lub w genomach rodzicielskich (ancestralnych) mieszańców i poliploidów. Dla prawidłowego opracowania kariotypu danego gatunku i analizy porównawczej niezbędna jest identyfikacja poszczególnych chromosomów. Niektóre gatunki roślin mają nieliczne, zróżnicowane morfologicznie chromosomy, które można łatwo odróżnić stosując tradycyjne metody barwienia (np. *Crepis capillaris* $2n=6$), ale wiele gatunków ma liczne, małe i bardzo podobne chromosomy (np. gatunki rodzaju *Brassica*, *Lupinus*, *Solanum*). W tym drugim przypadku niezbędne jest poszukiwanie specyficznych markerów chromosomów. Takimi markerami mogą być obszary heterochromatynowe, które po zastosowaniu specyficznego barwienia lub kilku barwień sekwencyjnie ujawniają się jako wzór prążkowy charakterystyczny tylko dla pary chromosomów homologicznych w genomie. Innymi markerami mogą być chromosomowo-specyficzne sekwencje DNA, które zlokalizowane w drodze hybrydyzacji *in situ* (FISH) pozwalają identyfikować chromosomy w genomie.

Barwienia różnicowe chromosomów są od wielu lat standardowo stosowane w analizie kariologicznej roślin, szczególnie metoda barwienia prążków C (ref. [48]). Analiza wzoru prążków w chromosomach metafazowych roślin w obrębie różnych grup taksonomicznych pozwala potwierdzić lub zweryfikować ustalone innymi metodami pokrewieństwa [14, 38, 76]. Obserwowane u wielu organizmów regularności we wzorze prążków C doprowadziły do przedstawienia modelu ewolucji rozmieszczenia heterochromatyny i mechanizmu jej przemieszczania między chromosomami [71]. Kariotypy wielu grup roślin były opracowywane na podstawie kompleksowych badań z wykorzystaniem różnych metod barwienia: prążki C, barwienia fluorescencyjne odróżniające heterochromatynę bogatą w pary AT (DAPI)

lub GC (chromomycyna A₃) pary i srebrzenie ujawniające aktywność organizatorów jąderka (Ag-NOR) [10, 30, 53, 54, 55]. Mimo to nie wszystkie chromosomy w badanym genomie mogły być zidentyfikowane. Dla przykładu w kariotypie *Brassica napus* (2n = 38) można wyróżnić jedynie cztery typy morfologiczne chromosomów, w tym 6 par chromosomów mających specyficzne prążki. Poszczególne chromosomy *Arabidopsis thaliana* (2n=10), mimo że jest ich tylko pięć par, nie mogą być zidentyfikowane na podstawie ich morfologii i barwień różnicowych, gdyż są podobne i wszystkie mają blok heterochromatyny przycentromerowej.

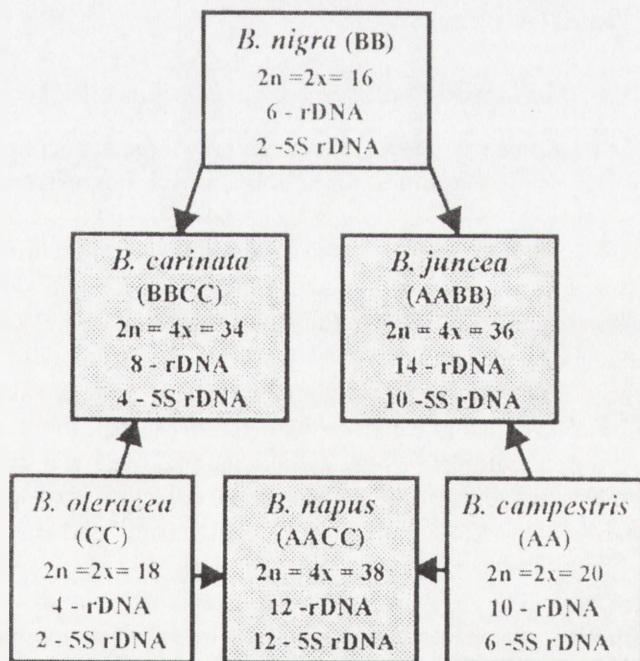
5.2. Specyficzne markery – lokalizacja rDNA

Znacznie bardziej specyficzne markery chromosomów można otrzymać w drodze hybrydizacji *in situ* z odpowiednimi sondami DNA. Stosowanie równocześnie kilku sond wykrywanych fluorochromami o różnym kolorze umożliwia wielobarwna FISH. Sekwencjami DNA, które znalazły szczególnie szerokie zastosowanie w filogenetycznych badaniach wielu gatunków, są rDNA, sekwencje telomerowe i niektóre specyficzne sekwencje DNA wysoko powtarzalnego (por. 4. Genomowa i gatunkowa specyficzność sekwencji powtarzalnych).

Geny rybosomalnego RNA, 18S-5, 8S-25S rRNA (45S rDNA) i 5S rRNA (5S rDNA), występujące w każdej komórce w kilkuset lub kilku tysiącach kopii, zlokalizowanych tandemowo w jednym lub kilku loci, są dogodnym wyznacznikiem chromosomów. Na ogół, u zbadanych gatunków liczba loci 5S rDNA była mniejsza niż 45S rDNA. Są jednak gatunki z tylko jedną parą chromosomów NOR (chromosomy jąderkotwórcze), które mają kilka loci 5S rDNA, na przykład *Secale cereale* [12] i *Vicia faba* [33, 34]. Porównanie liczby i położenia loci rDNA u gatunków spokrewnionych pozwala wnioskować o stabilności kariotypu w czasie ewolucji lub jego przemianach, co wykazano w badaniach gatunków należących do *Triticeae* [9, 79].

Stosując podwójną FISH z 45S i 5S rDNA jako sondami można między innymi zidentyfikować pięć par chromosomów *A. thaliana* [56] lub 7 par chromosomów *Hordeum vulgare* [42]. Liczba i położenie loci rDNA w chromosomach diploidalnych gatunków *Brassica* (ryc. 1) dostarcza markerów dla 12 chromosomów *B. campestris* (2n=20), 8 – *B. nigra* (2n=16) i 6 chromosomów *B. oleracea* (2n = 18). Szczegółowa analiza pozwoliła wyróżnić osiem typów chromosomów niosących geny 5S rRNA i/lub 45S rRNA charakterystycznych dla poszczególnych genomów [29]. Możliwość identyfikowania chromosomów należących do różnych genomów jest szczególnie ważna w analizie allopoliploidalnych gatunków *Brassica*, które powstały w wyniku krzyżowania wspomnianych wyżej gatunków diploidalnych (ref. [49]). Pozwala to nie tylko identyfikować chromosomy i ich pochodzenie, ale również stwierdzić zmiany, jakie zaszły w czasie ewolucji allopoliploidów w stosunku do genomów wyjściowych. Jak wynika z porównania wyników podwójnej hybrydizacji *in situ*

dwóch typów rDNA z chromosomami trzech diploidalnych i trzech allotetraploidalnych gatunków *Brassica* (ryc. 1), liczba chromosomów gatunków allotetraploidalnych jest równa sumie chromosomów odpowiednich ancestralnych diploidów, podczas gdy liczba loci rDNA nie zawsze jest równa sumie. Liczba loci 45S rDNA jest mniejsza u *B. carinata* i *B. napus*, co może wskazywać na utratę jednego locus. Interesujące jest zwiększenie liczby loci 5S rDNA u dwóch gatunków *B. juncea* i *B. napus*. Trudno na podstawie tych badań odpowiedzieć, czy zwiększenie liczby loci u gatunków allopoliploidalnych nastąpiło po ich powstaniu w drodze translokacji lub innego typu przemian, czy też współczesne gatunki diploidalne mają inną liczbę loci w porównaniu z diploidalnymi gatunkami ancestralnymi. Należy podkreślić, że liczba loci 45S rDNA aktywnych transkrypcyjnie, zlokalizowanych w przewężeniu wtórnym chromosomów NOR jest stabilna i u gatunków allotetraploidalnych odpowiada sumie takich loci u diploidów [31]. Aktywność genów 5S rRNA jest niezależna od innych genów rRNA i są one zwykle zlokalizowane na różnych chromosomach. U wielu gatunków roślin okrytozalążkowych stwierdzono jednak obecność genów 5S rRNA w chromosomach NOR, np. *Arabidopsis thaliana* [56], *Petunia hybrida*, *Crepis capillaris* [51], *Phaseolus vulgaris* [52], *Oryza officinalis* [72]. Spośród badanych gatunków *Brassica* tylko *B. campestris* (genom AA) ma chromosomy, w których dwa typy rDNA leżą blisko siebie. Podobnie



RYCINA 1. Zależności filogenetyczne pomiędzy diploidalnymi i allotetraploidalnymi gatunkami *Brassica* wg (ref. [49]), liczba loci rDNA wg [29, 30]

jest u spokrewnionych gatunków *Sinapis* i *Raphanus* [69]. Nasuwa się pytanie, czy ko-lokalizacja tych genów jest wynikiem przemian podczas ewolucji, czy też wysoce konserwatywnego zachowania. U organizmów prokariotycznych i niższych *Eukariota* (*Sacharomyces*, *Marchantia polymorpha*) 5S rDNA występuje w sąsiedztwie, odpowiednio, genów 16S-23S lub 18S-5, 8S-26S rRNA [75]. Bliskość genów 5S rRNA i jąderka w jądrze interfazowym wydaje się być korzystna w biogenezie podjednostek rybosomów, co może potwierdzać preferencyjne położenie 5S rDNA blisko jąderka wykazane u niektórych gatunków roślin [51].

Wykorzystując geny rRNA w molekularnych i cytogenetycznych badaniach ustalania pokrewieństw filogenetycznych należy jednak pamiętać, że u niektórych gatunków roślin opisano polimorfizm we wzorze rozmieszczenia tych genów nie tylko między gatunkami, ale również w obrębie gatunku między odmianami lub ekotypami [28, 52, 72]. U różnych odmian rzepaku (*B. napus*) obserwowano 12 lub 14 chromosomów z 45S rDNA i opisano od 6 do 8 loci 5S rDNA [29]. W celu wyjaśnienia tego zjawiska proponowano różne mechanizmy, takie jak np. przemiany strukturalne chromosomów, niesymetryczny crossing-over, konwersję i transpozycję genów [26, 42, 70]. Oczywiście w każdym przypadku mogły mieć miejsce jeden lub więcej typów zdarzeń. Molekularne badania syntetycznych gatunków *Brassica* wykazały występowanie intensywnych i szybkich przemian w genomach poliploidalnych mieszańców, może to również tłumaczyć polimorfizm loci 5S i 45S rDNA u allotraploidalnych gatunków *Brassica* [73].

5.3. Genomowa hybrydyzacja *in situ* (GISH)

GISH odgrywa istotną rolę w badaniach pokrewieństw między gatunkami, a szczególnie w wykrywaniu gatunków allopoliploidalnych i określaniu ich form wyjściowych (ancestralnych). Metoda polega na stosowaniu jako sondy całkowitego, znakowanego DNA jednego gatunku do hybrydyzacji *in situ* z chromosomami lub jądrami interfazowymi gatunków pokrewnych lub mieszańców. Sonda, hybrydując z sekwencjami homologicznymi, powoduje fluorescencję chromosomów lub chromatyny, która pochodzi od gatunku – dawcy DNA. Tą metodą odróżniano gatunki autoploidalne od allopoliploidalnych oraz określano rodzicielskie genomy naturalnych amfidiploidów. Możliwe jest równoczesne stosowanie całkowitego genomowego DNA obu gatunków rodzicielskich, znakowanych różnymi fluorochromami, ale zróżnicowanie chromosomów może nastąpić tylko w przypadku gatunków niezbyt blisko spokrewnionych, jak to przedstawiono dla genomu *Musa* [15].

GISH znalazła szerokie zastosowanie w identyfikacji genomów u mieszańców roślin uprawnych, chromosomów w liniach addycyjnych i substytucyjnych, ale szczególnie ważna jest przydatność tej metody dla sprawdzenia hipotez o pokrewieństwach gatunków. Jest wiele przykładów wykorzystania genomowej hybrydyzacji *in situ*

w badaniach filogenetycznych i cytotaksonomii. W pierwszej tego typu pracy potwierdzono, że jednym z gatunków acestralnych allopoliploidalnej trawy *Milium montanum* jest *M. vernale* [2]. W poszukiwaniach rodzicielskich genomów triploidalnej formy *Allium cepa* var. *viviparum* analizowano hybrydyzację genomowego DNA z sześciu diploidalnych gatunków *Allium*. Zidentyfikowano dwa genomy rodzicielskie, a trzeci pozostaje nieznan [65]. Poza identyfikacją chromosomów należących do różnych genomów acestralnych amfidiploidalnych gatunków możliwe jest również wykrycie przemian chromosomowych, jakie zaszły w czasie ewolucji. Badając allotetraploidalny genom *Nicotiana tabacum* określono genomy acestralne: *N. silvestris* (genom S) i *N. tomentosiformis* (genom T) oraz wykryto kilka translokacji pomiędzy tymi genomami [39].

W przypadkach kontrowersyjnych bardzo pomocne może być zastosowanie metody GISH z chromosomami mejoetycznymi. „Malując” chromosomy jednego genomu można określić genom konjugujących i niekonjugujących chromosomów. W ten sposób np. potwierdzono autotetraploidalność *Dasypyrum breviaristatum* wykluczając jednocześnie bezpośrednie pochodzenie z *D. villosum* [22].

Znakomitym przykładem równoczesnego wykorzystania GISH i FISH w filogenetycznych badaniach gatunków może być praca Lim i wsp. [43] na *Nicotiana*. Całkowite genomowe DNA *Nicotiana silvestris* i *N. tomentosiformis* zastosowano do odróżnienia chromosomów pochodzących od różnych genomów acestralnych *N. tabacum* i dziesięć różnych, kodujących i niekodujących sekwencji DNA do określenia przemian chromosomowych. Badania te pozwoliły uzupełnić „ewolucyjną historię” gatunku *N. tabacum* oraz zaproponować schemat ewolucji innych gatunków należących do sekcji *Tomentosae*.

6. PODSUMOWANIE

Przytoczone wyżej dane wskazują, że omówione w nich niektóre cechy gatunkowe – u gatunków zarówno diploidalnych, jak i allopoliploidalnych – wskazują pewien zakres zmienności. Gatunkowo specyficzne sekwencje powtarzalne są ewolucyjnie młode, natomiast sekwencje charakterystyczne dla rodzaju i wyższych jednostek taksonomicznych są ewolucyjnie starsze i mogą świadczyć o pokrewieństwie gatunków w obrębie danej grupy. Allopoliploidy z towarzyszący szereg zmian cyto-genetycznych dotyczących przemieszczania sekwencji powtarzalnych, charakterystycznych dla wchodzących w ich skład genomów oraz lokalizacji i ekspresji genów rRNA. Dzikie i uprawne allopoliploidy są stabilne, w przeciwieństwie do allopoliploidów uzyskiwanych w wyniku zabiegów hodowlanych (ref. [11]). Niestabilność wyraża się różnymi modyfikacjami strukturalnymi chromosomów oraz zmianami liczby i rozmieszczenia powtarzalnych sekwencji, szczególnie w obrębie

heterochromatyny, co może mieć skutki letalne. Znaczne wydłużanie chromosomów u allopoliploidów powstałych w wyniku działalności człowieka może być spowodowane przez aktywację retroelementów. Temu mechanizmowi przypisuje się zmiany w regulacji ekspresji genów, w tym także genów nieaktywnych, w uzyskanych doświadczalnie allotetraploidach *Arabidopsis*, co może być związane m.in. z niezgodnością genomów składowych (ref. [11]). Niestabilności mogą być eliminowane przez mechanizmy epigenetyczne, jak np. metylacja DNA, modyfikująca ekspresję genów (ref. [61]) lub wspomnianą aktywację retroelementów. Eliminacja niestabilności może dać początek ustabilizowanym, nowym gatunkom allopoliploidalnym (ref. [11]).

LITERATURA

- [1] ADAMS SP, LEITCH IJ, BENNETT MD, LEITCH AR. *Aloe* L. – a second plant family without (TTTAGGG)_n telomeres. *Chromosoma* 2000; **109**: 201–205.
- [2] BENNETT ST, BENNETT MD. Spatial separation of ancestral genomes in the wild grass *Milium montianum* Parl. *Ann Bot* 1992; **70**: 111–118.
- [3] BENNETZEN JL. The many hues of plant heterochromatin. *Genome Biol* 2000; **1**: 1–4.
- [4] BENNETZEN JL. Transposable elements contribution to plant gene and genome evolution. *Plant Mol Biol* 2000; **42**: 251–261.
- [5] BITONTI MB, COZZA R, CHIAPETTA A, CONTENUTO A, MINELLI S, CECCARELLI M, GELATIS MT, MAGGINI F, BALDONI L, CIONINI PG. Amount and organization of the heterochromatin in *Olea europaea* and related species. *Heredity* 1999; **83**: 188–195.
- [6] BRANDES A, HESLOP-HARRISON JS, KAMM A, KUBIS S, DOUDRICK RL, SCHMIDT T. Comparative analysis of the chromosomal organization of Ty-1-copia like retrotransposons in pteridophytes, gymnosperms and angiosperms. *Plant Mol Biol* 1997; **33**: 11–21.
- [7] BUITENDIJK JH, PETERS A, QUENÉ R-J, RAMANA MS. Genome size variation and C-band polymorphism in *Alstroemeria aurea*, *A. lightu* and *A. magnifica* (*Alstroemeriaceae*). *Pl Syst Evol* 1998; **212**: 87–106.
- [8] CACERES ME, DE PACE C, SCARASCIA MUGNOZZA GT, KOTSONIS P, CECCARELLI M, CIONINI PG. Genome size variations within *Dasyphyrum villosum*: correlations with chromosomal traits, environmental factors and plant phenotypic characteristics and behavior in reproduction. *Theor Appl Genet* 1998; **96**: 559–657.
- [9] CASTILHO A, HESLOP-HARRISON JS. Physical mapping of 5S and 18S-25S rDNA and repetitive DNA sequences in *Aegilops umbellulata*. *Genome* 1995; **38**: 91–96.
- [10] CEULLAR T, BELHASSEN E, FERNANDEZ-CALVIN B, ORELLANA J, BELLA JL. Chromosomal differentiation in *Helianthus annuus* var. *Macrocarpus*: heterochromatin characterization and rDNA location. *Heredity* 1996; **76**: 586–591.
- [11] COMAI L. Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants. *Plant Mol Biol* 2000; **43**: 387–399.
- [12] CUADRADO A, CEOLONI C, JOUVE N. Variation in highly repetitive DNA composition of heterochromatin in rye studied by fluorescence *in situ* hybridization. *Genome* 1995; **38**: 1061–1069.
- [13] CUADRADO A, JOUVE N. Distribution of highly repeated DNA sequences in species of the genus *Secale*. *Genome* 1997; **40**: 309–317.

- [14] DEMERICO S, GRUNANGER P, SCRUGLI A, PIGNONE D. Karyomorphological parameters and C-band distribution suggest phyletic relationships within the subtribe *Limodorinae* (*Orchidaceae*). *Pl Syst Evol* 1999; **217**: 147–161.
- [15] DHONT A, PAGET-GOY A, ESCOUTE J, CARREEL F. Interspecific genome structure of cultivated banana, *Musa* spp. revealed by genomic DNA *in situ* hybridization. *Theor Appl Genet* 2000; **100**: 177–183.
- [16] DIMITROVA D, EBERT J, GREILHUBER J, KOZHUHAROV S. Karyotype constancy and genomic size variation in Bulgarian *Crepis foetida* s.l. (*Asteraceae*). *Pl Syst Evol* 1999; **217**: 245–257.
- [17] DUBCOVSKY J, SCHLATTER AR, ECHAIDE M. Genome analysis of South American *Elymus* (*Triticeae*) and *Leymus* (*Triticeae*) species based on variation in repeated nucleotide sequences. *Genome* 1997; **40**: 505–520.
- [18] FLAVELL RB. Repetitive DNA and chromosomes evolution in plants. *Philos Trans R Soc London Ser. B* 1986; **312**: 227–242.
- [19] FOMINAYA A, HUEROS G, LOARCE Y, FERRER E. Chromosomal distribution of a repeated sequence from C-genome heterochromatin and identification of a new ribosomal DNA locus in the *Avena* genus. *Genome* 1995; **38**: 548–557.
- [20] FREDIANI M, GELATI MT, MAGGINI F, CALASSO I, MINELLI S, CECCARELLI M, CIONINI PG. A family of dispersed repeats in the genome of *Vicia faba*: structure, chromosomal organization, redundancy modulation, and evolution. *Chromosoma* 1999; **108**: 317–324.
- [21] FUCHS J, PICH U, MEISTER A, SCHUBERT I. Differentiation of field bean heterochromatin by *in situ* hybridization with a repeated FokI sequence. *Chrom Res* 1994; **2**: 25–28.
- [22] GALASSO I, BLANCO A, KATSIOTIS A, PIGNONE D, HESLOP-HARRISON JS. Genomic organization and phylogenetic relationships in the genus *Dasypyrum* analysed by Southern and *in situ* hybridization of total genomic and cloned DNA probes. *Chromosoma* 1997; **106**: 53–61.
- [23] GALASSO I, HARRISON GE, SCHMIDT T, PIGNONE D, HESLOP-HARRISON JS. Location of two repeated sequences of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. on chromosomes and extended DNA fibers by FISH. *J Genet Breed* 1999; **53**: 215–221.
- [24] GARBER K, BILIC I, PUSH O, BACHMAIR A, SCHWEITZER D, JONTSCH V. The TpV2 family of retrotransposons of *Phaseolus vulgaris*: structure, integration characteristics, and use for genotype classification. *Plant Mol Biol* 1999; **39**: 797–807.
- [25] GOUBELY C, ARNAUD P, TATOUT C, HESLOP-HARRISON JS, DERAGON J-M. S1 SINE retrotransposons are methylated at symmetrical and non-symmetrical positions in *Brassica napus*: identification of a preferred target site for asymmetrical methylation. *Plant Mol Biol* 1999; **39**: 243–255.
- [26] HALL MJ, PARKER JS. Stable chromosome fission associated with rDNA mobility. *Chrom Res* 1995; **3**: 417–422.
- [27] HANSON RE, ISLAM-FARIDI MN, CRANE CF, ZWICK MS, CZESCHIN DG, WENDEL JF, MCKNIGHT TD, PRICE HJ, STELLY DM. Ty-1-*copia* retrotransposon behavior in a polyploid cotton. *Chrom Res* 1999; **8**: 73–76.
- [28] HANSON RE, ISLAM-FARIDI MN, PERCIVAL EA, CRANE CF, JI Y, MCKNIGHT TD, STELLY DM, PRICE HJ. Distribution of 5S and 18S-25S rDNA loci in a tetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and its putative diploid ancestors. *Chromosoma* 1996; **105**: 55–61.
- [29] HASTEROK R, JENKINS, G, LANGDON T, JONES N, MALUSZYNSKA J. Ribosomal DNA is an effective marker of *Brassica* chromosomes. *Theor Appl Genet* in press.
- [30] HASTEROK R, MALUSZYNSKA J. Cytogenetic markers of *Brassica napus* chromosomes. *J App Genet* 2000; **41**: 1–9.
- [31] HASTEROK R, MALUSZYNSKA J. Nucleolar dominance does not occur in root tip cells of allotetraploid *Brassica* species. *Genome* 2000; **43**: 574–579.

- [32] HESLOP-HARRISON JS. Comparative genome organization in plants: from sequence and markers to chromatin and chromosome. *Plant Cell* 2000; **12**: 617–635.
- [33] HIZUME M. Chromosomal localization of 5S rRNA genes in *Vicia faba* and *Crepis capillaris*. *Cytologia* 1993; **58**: 417–421.
- [34] HIZUME M. Exact location of rRNA genes in *Vicia faba* chromosomes. *Cytologia* 1992; **57**: 471–475.
- [35] HORAKOVÁ M, FAJKUS J. TAS49 – a dispersed repetitive sequence isolated from subtelomeric regions of *Nicotiana tomentosiformis* chromosomes. *Genome* 2000; **43**: 273–284.
- [36] JENKINS G, HEAD J, FORSTER JW. Probing meiosis in hybrids of *Lolium* (*Poaceae*) with a discriminating repetitive genomic sequences. *Chromosoma* 2000; **109**: 280–286.
- [37] JOHNSTON JS, BENNETT MD, RAYBURN LR, GALBRAITH DW, PRICE HJ. Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. *Am J Bot* 1999; **86**: 609–613.
- [38] KENTON A. Giemsa C-banding in *Gibasis* (*Commelinaceae*). *Chromosoma* 1978; **65**: 309–324.
- [39] KENTON A, PAROKONNY AS, GLEBA YY, BENNETT MD. Characterization of the *Nicotiana tabacum* L. genome by molecular cytogenetics. *Mol Gen Genet* 1993; **240**: 159–169.
- [40] KISHII M, NAGAKI K, TSUIMOTO H, SASAKUMA T. Tandem repetitive sequences in subtelomeric heterochromatin regions of *Leymus racemosus* (*Poaceae, Triticeae*). *Chrom Res* 1999; **7**: 519–529.
- [41] KUIPERS AGJ, HESLOP-HARRISON JS, JACOBSEN E. Characterisation and physical localisation of Ty-1-copia-like retrotransposons in four *Alstroemeria* species. *Genome* 1998; **41**: 357–367.
- [42] LEITCH IJ, HESLOP-HARRISON JS. Physical mapping for four sites of 5S rDNA sequences and one side of the alfa-amylase gene in barley (*Hordeum vulgare*). *Genome* 1993; **36**: 517–523.
- [43] LIM KY, MATYASEK R, LICHTENSTEIN CP, LEITCH AR. Molecular cytogenetic analyses and phylogenetic studies in the *Nicotiana* section *Tomentosae*. *Chromosoma* 2000; **109**: 245–258.
- [44] LINARES C, IRIGOYEN ML, FOMINAYA A. Identification of C-genome chromosomes in intergenomic translocations in *Avena sativa* L., using cloned repetitive sequences. *Theor Appl Genet* 2000; **100**: 353–360.
- [45] LINARES C, SERNA A, FOMINAYA A. Chromosomal organization of a sequence related to LTR-like elements of Ty-1-copia retrotransposons in *Avena* species. *Genome* 1999; **42**: 706–713.
- [46] MAGGINI F, DOVIDIO R, GELATI MT, FREDIANI M, CREMONINI R, CECCARELLI M, MINELLI S, CIONINI PG. FokI DNA repeats in the genome of *Vicia faba*: species-specificity, structure, redundancy modulation, and nuclear organization. *Genome* 1995; **38**: 1255–1261.
- [47] MAŁUSZYŃSKA J. Porównawcze badania organizacji genomu roślinnego. *Post Biol Kom* 1999; **26**: 507–522.
- [48] MAŁUSZYŃSKA J, OLSZEWSKA MJ. Wybrane metody w badaniach cytogenetycznych. [w] Olszewska MJ [red.] Podstawy Cytogenetyki Roślin. PWN Warszawa 1999; 223–225.
- [49] MAŁUSZYŃSKA J, ROGALSKA S, OLSZEWSKA MJ. Struktura chromosomów mitotycznych. [w] Olszewska MJ [red.] Podstawy cytogenetyki roślin. PWN, Warszawa 1999; 47–82.
- [50] MATSUOKA Y, TSUNEWAKI K. Evolutionary dynamics of Ty-1-copia group retrotransposons in grass shown by reverse transcriptase domain analysis. *Mol Biol Evol* 1999; **16**: 208–217.
- [51] MONTIJN MB, HOUTSMULLER AB, TEN HOOPEN R, OUD JL, NANNING N. The 5S rRNA gene cluster has a defined orientation toward the nucleolus in *Petunia hybrida* and *Crepis capillaris*. *Chrom Res* 1999; **7**: 387–399.
- [52] MOSCONE EA, KLEIN F, LAMBRU M, FUCHS J, SCHWEIZER D. Quantitative karyotyping and dual-color FISH mapping of 5S and 18S-25S rDNA probes in the cultivated *Phaseolus species* (*Leguminosae*). *Genome* 1999; **42**: 1224–1233.

- [53] MOSCONE EA, LAMBROU M, EHRENDORFER F. Fluorescent chromosome banding in the cultivated species of *Capsicum* (*Solanaceae*). *Pl Syst Evol* 1996; **202**: 37–63.
- [54] MOSCONE EA, LAMBROU M, HUNZIKER AT, EHRENDORFER F. Giemsa C-banded karyotypes in *Capsicum* (*Solanaceae*). *Pl Syst Evol* 1993; **186**: 213–229.
- [55] MOSCONE EA, LOIDL J, EHRENDORFER F, HUNZIKER AT. Analysis of active nucleolus organizing regions in *Capsicum* (*Solanaceae*) by silver staining. *Am J Bot* 1995; **82**: 276–287.
- [56] MURATA M, HESLOP-HARRISON JS, MOTOYOSHI F. Physical mapping of the 5S ribosomal RNA genes in *Arabidopsis thaliana* by multi-color fluorescence *in situ* hybridization with cosmid clones. *Plant J* 1997; **12**: 31–37.
- [57] NAGAKI K, KISHII M, TSUJIMOTO H, SASAKUMA T. Tandem repetitive Afa-family sequences from *Leymus racemosus* and *Psathyrostachys juncea* (*Poaceae*). *Genome* 1999; **42**: 1258–1260.
- [58] NAGAKI K, TSUJIMOTO H, SASAKUMA T. Dynamics of tandem repetitive Afa-family sequences in *Triticeae*, wheat related species. *J Mol Evol* 1998; **47**: 183–189.
- [59] NOUZOVÁ M, KUBALÁKOVÁ M, GOLEŽELOVA M, KOBLIŽKOVA A, NEUMANN P, DOLEŽEL J, MACAS J. Cloning and characterization of new repetitive sequences in field bean (*Vicia faba* L.). *Ann Bot* 1999; **83**: 535–541.
- [60] OHMIDO N, KIJIMA K, AKIYAMA Y, DE JONG JH, FUKUI K. Quantification of total genomic DNA and selected sequences reveals concurrent changes in different DNA families in *indica* and *japonica* rice. *Mol Gen Genet* 2000; **263**: 388–394.
- [61] OLSZEWSKA MJ. Zmiany metylacji cytozyny podczas różnicowania komórek u roślin. *Post Biol Kom* 1999; **26**: Suplem. 13: 83–93.
- [62] OLSZEWSKA MJ, GERNAND D, SAKOWICZ T. Methylation-sensitive restriction endonuclease digestion patterns revealed in *Vicia faba* L. chromosomes by *in situ* nick-translation. *Folia Histochem Cytobiol* 1999; **37**: 267–274.
- [63] OLSZEWSKA MJ, MALUSZYŃSKA J. Budowa genomu jądrowego. [w] Olszewska MJ [red.] Podstawy cytogenetyki roślin. PWN Warszawa 1999: 11–46.
- [64] PEARCE SR, STUART-ROGERS C, KNOX MR, KUMAR A, ELLIS THN, FLAVELL AJ. Rapid isolation of plant Ty-1-*copia* group retrotransposon LTR sequences for molecular marker studies. *Plant J* 1999; **19**: 711–717.
- [65] PUIZINA J, JAVORNIK B, BOHANEC B, SCHWEIZER D, MALUSZYŃSKA J, PAPES D. Random amplified polymorphic DNA analysis, genome size, and genomic *in situ* hybridization of triploid viviparous onions. *Genome* 1998; **42**: 1206–1216.
- [66] ROKKA V-M, CLARK MS, KNUDSON DL, PEHU E, LAPITAN NLV. Cytological and molecular characterization of repetitive DNA sequences of *Solanum brevicens* and *Solanum tuberosum*. *Genome* 1998; **41**: 487–494.
- [67] SAKOWICZ T. Sekwencje mikrosatelitarne w genomach roślin. *Post Biol Kom* 1997; **24**: 81–92.
- [68] SCHMIDT T. LINEs, SINEs and repetitive DNA: non LTR retrotransposons in plant genomes. *Plant Mol Biol* 1999; **40**: 903–910.
- [69] SCHRADER O, BUDAHN H, AHNE R. Detection of 5S and 25S rRNA genes in *Sinapis alba*, *Raphanus sativus* and *Brassica napus* by double fluorescence *in situ* hybridization. *Theor Appl Genet* 2000; **100**: 665–669.
- [70] SCHUBERT I, WOBUS U. *In situ* hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. *Chromosoma* 1995; **92**: 143–148.
- [71] SCHWEIZER D, LOIDL J. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. *Chrom Today* 1987; **9**: 61–74.
- [72] SHISHIDO R, SANO Y, FUKUI K. Ribosomal DNAs: an exception to the conservation of gene order in rice genomes. *Mol Gen Genet* 2000; **263**: 586–591.
- [73] SOLTIS ED, SOLTIS PS. Contribution of plant molecular systematics to studies of molecular evolution. *Plant Mol Biol* 2000; **42**: 45–75.

- [74] SOLTIS DE, SOLTIS PS. The dynamic nature of polyploid genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 8089–8091.
- [75] SONE T, FUJISAWA M, TAKANAKA M, NAKAGAWA S, YAMAOKA S, SAKAIDA M, NISHIYAMA R, YAMATO KT, OHMIDO N, FUKUI K, FUKUZAWA H, OHYAMA K. Bryophyte 5S was inserted into 45S rDNA repeat units after the divergence from higher land plants. *Plant Mol Biol* 1999; **41**: 679–685.
- [76] STACE AC. Taksonomia roślin i biosystematyka. PWN Warszawa 1993.
- [77] STAGINNUS C, WINTER P, DESEL C, SCHMIDT T, KAHL G. Molecular structure and chromosomal localization of major repetitive DNA families in the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome. *Plant Mol Biol* 1999; **39**: 1037–1050.
- [78] TAKETA S, ANDOH, TAKEDA K, HARRISON GE, HESLOP-HARRISON JS. The distribution, organization and evolution of two abundant and widespread repetitive DNA sequences in the genus *Hordeum*. *Theor Appl Genet* 2000; **100**: 169–176.
- [79] TAKETA S, HARRISON GE, HESLOP-HARRISON JS. Comparative physical mapping of the 5S and 18S-25S rDNA in nine wild *Hordeum* species and cytotypes. *Theor Appl Genet* 1999; **98**: 1–9.
- [80] TATUT C, WARWICK S, LENOIR A, DERAGON J-M. SINE insertions as clade markers for wild crucifer species. *Mol Biol Evol* 1999; **16**: 1614–1621.
- [81] VICIENT CM, SUONEMI A, ANAMTHAWAT-JÓNSON K, TRANSKANEN J, BEHARRAV A, NEVO E, SCHULMAN AH. Retrotransposon *bare1* and its role in genome evolution in the genus *Hordeum*. *Plant Cell* 1999; **11**: 1769–1784.
- [82] WANG S, LIU N, PENG K, ZHANG Q. The distribution and copy number of *copia*-like retrotransposons in rice (*Oryza sativa* L.) and their implications in the organization and evolution of the rice genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 6823–6828.
- [83] WENDEL JF. Genome evolution in polyploids. *Plant Mol Biol* 2000; **42**: 255–269.
- [84] ZHAO X, SI Y, HANSON RE, CRANE CF, PRICE HJ, STELLY DM, WENDEL JF, PATERSON AH. Dispersed repetitive DNA has spread to new genomes since polyploid formation in cotton. *Genome Res* 1998; **8**: 479–492.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 22.01.2001 r.

Przyjęto: 02.02. 2001 r.

Banacha 12/16, 90-237 Łódź,

e-mail: olszewsk@biol.uni.lodz.pl lub maluszyn@us.edu.pl

KOMÓRKI MACIERZYSTE SSAKÓW: POTENCJALNE ŹRÓDŁO ZRÓŻNICOWANYCH KOMÓREK DO TRANSPLANTACJI

MAMMALIAN STEM CELLS: PRESUMED SOURCE OF DIFFERENTIATED CELLS FOR TRANSPLANTATION

Jolanta KARASIEWICZ, Jacek A. MODLIŃSKI

Zakład Embriologii Doświadczalnej Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN,
Jastrzębiec

Streszczenie: Pierwotne komórki zarodkowe człowieka otrzymano z węzłów zarodkowych blastocyst i z kilkutygodniowych płodów. Potwierdzono możliwość utrzymywania ich ponad rok w hodowli *in vitro* w stanie niezróżnicowanym. Wykazano też, że *in vivo* – po przeszczepieniu myszom – i *in vitro* mogą się one różnicować w tkanki pochodzące ze wszystkich trzech listków zarodkowych. Dzięki tym własnościom ludzkich komórek pierwotnych wiąże się z nimi nadzieje na zastosowania terapeutyczne. W badaniach pierwotnych komórek zarodkowych myszy potwierdzono, że możliwe jest otrzymywanie z nich zróżnicowanych, funkcjonalnych komórek (np. neurony, oligodendrocyty), które po przeszczepieniu do biorców integrują się z odpowiednią tkanką. Zainteresowanie komórkami macierzystymi z zarodków wkrótce rozszerzyło się na komórki macierzyste dorosłych tkanek. Opracowano metody izolowania lub zagęszczania tych komórek z różnych tkanek. W przypadku komórek macierzystych krwi, tkanki łącznej, mięśni, tkanki nerwowej i spermatogoniów wykazano ich zdolność do różnicowania w odpowiednie tkanki niedługo po przeszczepieniu do biorcy. Okazało się, że komórki macierzyste są zdolne do transdiferencjacji *in vivo*: u biorców występowały także w tkankach innych od wyjściowej. Np. komórki macierzyste tkanki nerwowej tworzyły komórki krwi, mięśni, nabłonka jelita i hepatocyty. (*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28: 219–242)

Słowa kluczowe: pierwotne komórki zarodkowe, komórki macierzyste

Summary: Human embryonic stem cells have been derived from inner cell masses of blastocysts and from few-week-old fetuses. They have been confirmed to persist *in vitro* in undifferentiated state for more than one year. It has been also proved that these cells differentiate *in vivo* – after transfer to recipient mice – and *in vitro*, into tissues originating from all three germ layers. The hopes have been raised that due to their properties human embryonic stem cells can be used for therapeutic purposes. Studies on mouse embryonic stem cells have confirmed that it is possible to obtain differentiated, functional cells

(e.g. neurons, oligodendrocytes) from them, which integrate with the proper tissue upon transfer to recipients. Interest in embryonic stem cells soon expanded to stem cells from adult tissues. Methods of isolation or enrichment of stem cells have been developed. In case of blood stem cells, muscle stem cells, and also stem cells of mesenchymal tissue, neural tissue and spermatogonia, their presence in the proper tissue have been proved after transfer to recipients. Stem cells from some tissues are able to transdifferentiate *in vivo*: in the recipients they can be found in tissues other than their tissue of origin. For example, neural stem cells formed blood cells, muscle cells, gut epidermal cells and hepatocytes. (*Advances in Cell Biology 2001*; 28: 219–242)

Key words: embryonic stem cells, stem cells from adult tissues

WSTĘP

Wyhodowanie, w 1998 roku, pierwotnych komórek zarodkowych człowieka [48,55] otworzyło perspektywę stosowania komórkowych terapii zastępczych i skutkiem tego zogniskowało uwagę badaczy na komórkach macierzystych.

Pierwotne komórki zarodkowe, czyli komórki macierzyste z zarodków (ang. *embryonic stem cells*, ES), wyhodowano po raz pierwszy z bardzo wczesnych zarodków myszy [14,35], a następnie – chomika [12] i małp nieczłokształtnych: rezusa i uistiti białouchej [56,57]. Odkąd udało się otrzymać takie komórki u człowieka, opisane wcześniej własności mysich komórek pierwotnych, tzn. znaczny potencjał proliferacyjny i zdolności do różnicowania się w wiele różnych typów tkanek, w określonych warunkach hodowli *in vitro* (przegląd w [27,41]), na nowo stały się interesujące.

Zainteresowanie objęło również **komórki macierzyste tkanek**, w sposób naturalny uzupełniające braki powstałe w dorosłych tkankach, dzięki czemu odkryto nowe możliwości ich laboratoryjnego izolowania, hodowania i namnażania oraz wytwarzania przez nie tkanek innych od wyjściowego typu, z którego pochodzą (transdyferencjacji).

KOMÓRKI MACIERZYTE Z ZARODKÓW

Pierwotne komórki zarodkowe człowieka

Otrzymywanie komórek pierwotnych z blastocyst i z płodów

Pierwsze pierwotne komórki myszy otrzymano hodując *in vitro* bardzo wczesne zarodki, będące w stadium blastocysty [14,35]. Blastocysty to pęcherzyki średnicy ok. 0,1 milimetra, zawierające wewnątrz grupkę komórek nazywaną węzłem zarodkowym. Zarodki w tym stadium są zawieszane w płynie wypełniającym macię

i mogą być stamtąd wypłukane. W normalnym przebiegu rozwoju blastocysty implantują się, wchodząc ścianką pęcherzyka w kontakt ze śluzówką macicy. Komórki ścianki (trofoblastu) uczestniczą w tworzeniu łożyska, a komórki wężła zarodkowego mnożą się i układają w warstwy zwane listkami zarodkowymi. Komórki trzech listków zarodkowych: ektodermy, endodermy i mezodermy są zdolne do utworzenia wszystkich typów tkanek zarodka, a potem – zwierzęcia.

Umieszczenie blastocysty w szalce hodowlanej, w pożywce i na warstwie podścielających komórek odżywczych powoduje, że trofoblast rozpląszcza się, następują podziały komórek wężła i widoczne stają się wywodzące się z niego drobne komórki zarodkowe. Przeniesienie tych ostatnich na następną szalkę pokrytą warstwą odżywczą powoduje ich namnażanie. Pasaże kolonii na coraz większe szalki prowadzą do uzyskania milionów komórek, wystarczających do zamrożenia i – w razie potrzeby – dalszej hodowli. Na tym etapie mówi się o „wyprowadzeniu linii komórkowej”¹.

Linie pierwotnych komórek zarodkowych człowieka wyprowadzono z izolowanych immunochirurgicznie węzłów zarodkowych blastocyst [55]. Blastocysty wyhodowano przedtem z bruzdkujących zarodków ofiarowanych przez osoby poddające się procedurze zapłodnienia *in vitro*. Zmiana metodyki w porównaniu z zastosowaną u myszy czynią ją, być może, mniej inwazyjną: blastocysty nie są pozyskiwane od dawczyń, a uzyskiwane w laboratorium. Hodowlę izolowanych węzłów zarodkowych człowieka prowadzono w pożywce na warstwie odżywczej złożonej z inaktywowanych mysich fibroblastów płodowych. Komórki te otrzymuje się rutynowo, do wielu celów, z fragmentów tkanek pobranych z płodu i poddanych rozdrobieniu. Inaktywacja fibroblastów – w tym przypadku działaniem promieni gamma – przed rozpoczęciem hodowli węzłów zarodkowych powoduje, że komórki te nie mogą się dzielić. W stosunku do węzłów pełnią więc one rolę podściółki mechanicznej i źródła czynników wzrostowych.

Drugim sposobem uzyskania pierwotnych komórek zarodkowych myszy jest wykorzystanie wczesnych płodów, z których eksplantuje się tylny fragment, zawierający pierwotne komórki płciowe – prekursorki gamet [36,46]. Rozdrobnioną na komórki tkankę umieszcza się również na warstwie odżywczej, lecz w tym przypadku konieczne jest dodanie do pożywki czynników wzrostowych. Namnażające się pierwotne komórki płciowe tworzą kolonie, których dalsze przenoszenie i namnażanie prowadzi do uzyskania linii pierwotnych komórek zarodkowych (ang. *embryonic germ cells*, EG).

¹W tym miejscu konieczne jest wspomnienie o jeszcze jednym typie komórek, których wyhodowanie poprzedzało omówione tu otrzymanie pierwotnych komórek zarodkowych myszy. Chodzi o linie komórek raka zarodkowego (ang. *embryonal carcinoma*, EC) wyprowadzone ze złośliwych potworków zarodkowych (teratokarcinoma) myszy i człowieka. Komórki te można nazwać macierzystymi, ale są to komórki macierzyste nowotworów. Dlatego nie będą one przedmiotem rozważań w tym artykule.

Również ludzkie pierwotne komórki zarodkowe uzyskano z tylnych fragmentów 5–9-tygodniowych płodów, usuniętych ze względu na wskazania zdrowotne, a dokładniej z listew płciowych i krezki grzbietowej jelita, to znaczy z rejonu, w którym znajdują się pierwotne komórki płciowe [48]. Pożywkę wzbogacono w ludzki rekombinowany zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF) i forskolinę, a warstwę odżywczą stanowiły inaktywowane mysie fibroblasty STO. Te komórki to ustabilizowana linia komórkowa wyprowadzona z płodów myszy. Uzyskano zarówno męskie, jak żeńskie linie pierwotnych komórek zarodkowych człowieka. Utrzymywano je w stanie niezróżnicowanym przez kilka miesięcy. Analiza kariologiczna komórek wykazała prawidłową zarówno liczbę, jak i strukturę chromosomów.

Ludzkie komórki pierwotne wywodzące się z blastocyst wykazują wysoką aktywność telomerazy (w komórkach wywodzących się z płodów aktywności tej nie sprawdzano). Sugeruje to, że komórki pierwotne mogą zachować zdolność do replikacji DNA i podziałów *in vitro* przez znacznie dłuższy czas niż inne komórki.

Ludzkie komórki pierwotne wyprowadzone z obu źródeł wykazują silną aktywność fosfatazy zasadowej, co jest charakterystyczną cechą wszystkich znanych wcześniej komórek pierwotnych. Komórki pierwotne wyprowadzone z płodów wykazują ekspresję antygeny SSEA-1, podobnie jak oba typy mysich komórek pierwotnych. Jednak ludzkie komórki pierwotne wyprowadzone z blastocyst nie wykazują ekspresji tego antygeny. Pojawia się ona dopiero, gdy dochodzi do różnicowania. Znaczenie tej różnicy nie jest zrozumiałe. Być może odzwierciedla ona inną budowę kolonii obu typów komórek: kolonie ludzkich komórek z płodów i pierwotnych komórek myszy są ciasno upakowane i wielowarstwowe, a kolonie ludzkich komórek z blastocyst – płaskie i stosunkowo luźno upakowane.

Po ponad roku hodowli *in vitro* opisano własności pierwotnych komórek zarodkowych człowieka, wyhodowanych z blastocyst [3]. Okazało się, że efektywność tworzenia przez nie kolonii rośnie po zastąpieniu surowicy bydłowej w pożywce „surowicą zastępczą” o składzie chronionym patentem, sprzedawaną przez jedną z firm komercyjnych. W obecności tej surowicy oraz zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów (bFGF, 4 ng/ml) liczba kolonii po posianiu 10^5 komórek wzrasta z 240 do 826. Dodatek bFGF jest konieczny dlatego, że przy braku tego czynnika wzrostowego komórki pierwotne różnicują się w komórki nabłonkopodobne.

Po sześciu miesiącach hodowli posiano 384 indywidualne komórki pierwotne H9, do pojedynczej studzienki każdą, otrzymując dwa kłony H9.1 i H9.2, które hodowano przez następne 8 miesięcy. Zbadano czas podwojenia populacji H9 oraz H9.1 i H9.2, który wyniósł średnio 35,3 godziny. Kariotyp linii wyjściowej i obu linii klonalnych był 46, XX i utrzymywał się bez zmian przez 12,5 miesiąca, z pojedynczym odstępstwem od normy w H9, w 7 miesiącu (4 płytki metafazowe z aberracjami na 20 badanych).

Aktywność telomerazy wynosiła 52–196% poziomu występującego w linii komórek raka płuc. Komórki pierwotne oddzielano, metodą mikrokulek magnety-

cznych, od warstwy odżywczej. Jednak aktywność telomerazy w mysich fibroblastach zarodkowych (tworzących warstwę) i tak była dużo niższa od tej w linii H9, więc jej wpływ na uzyskany wynik nie przekraczał 10%. Długość telomerów w H9, H9.1 i H9.2 wynosiła pomiędzy 8 i 12 kb i, podobnie jak w wielu innych populacjach komórek, zmiany długości telomerów nie były skorelowane z poziomem aktywności telomerazy. W H9.1 i H9.2 długość telomerów wzrosła, a w H9 – spadła w badanym okresie hodowli.

Po sześciu miesiącach hodowli *in vitro* wstrzyknięto ponad milion komórek H9.1 i H9.2 do mięśni myszy z ciężkim złożonym niedoborem odporności. Sekcja po 3–4 miesiącach wykazała obecność potworniaków zarodkowych zawierających tkanki pochodzące z trzech listków zarodkowych (np. nabłonek jelita – endoderma; nerka zarodkowa, mięśnie gładkie i poprzecznie prążkowane, chrząstka, kość – mezoderma; tkanka nerwowa – ektoderma). Opisane badania potwierdzają, że pierwotne komórki zarodkowe człowieka otrzymane z blastocyst zachowują zdolność proliferacji i różnicowania w różne tkanki przez rok hodowli *in vitro*.

Komentatorzy ujawniają więcej informacji niż zamieszczone w pracach źródłowych. Stąd wiadomo, że linie pierwotnych komórek zarodkowych człowieka uzyskane przez Thomsona i Shamblotha są własnością Geron Corp. z Menlo Park, Kalifornia, a także – że kilka innych linii uzyskano gdzie indziej i są one obecnie badane w Australii (komentarz: [38]).

Hodowla *in vitro* i tworzenie tkanek

Dopóki pierwotne komórki zarodkowe człowieka hodowane są na warstwie odżywczej, namnażają się tylko, nie zmieniając morfologii: pozostają komórkami pierwotnymi. Przy braku warstwy odżywczej, mimo obecności zastępującego ją czynnika wzrostowego (czynnik przeciwbiałaczkowy), tworzą się głównie płaskie rozrosty komórek nabłonkopodobnych, które w stosunku do wyjściowych komórek są zróżnicowane, ale tracą zdolność do dalszego różnicowania, czyli wytwarzania wielu różnych tkanek.

Pamiętać należy, że podobnie jak inne komórki hodowane *in vitro*, także komórki pierwotne wymagają przeniesienia do nowych, większych szalek po tym, jak wypełnią już dostępną powierzchnię szalki wyjściowej. Jeżeli pozostawi się je w zgęszczeniu, to mimo obecności warstwy odżywczej, która przedtem stabilizuje ich stan niezróżnicowania, komórki pierwotne różnicują się w typowe dla wczesnych zarodków komórki endodermalne, rozpoznawalne po obecności w pożywce α -fetoproteiny i w komórki trofoblastu identyfikowane na podstawie obecności gonadotropiny kosmówkowej.

Dalej analizowano różnicowanie się *in vitro* ludzkich komórek pierwotnych, wykorzystując – uzyskaną w wyniku wcześniejszych badań u myszy – wiedzę na temat tworzenia i różnicowania się kul zarodkowych. Przeniesione z szalki wyszczelonej komórkami odżywczymi do szalki bez warstwy odżywczej i o nieprzy-

czepnym podłożu pierwotne komórki zarodkowe myszy tworzą proste kule zarodkowe: zawieszona w pożywce bryłka zagregowanych komórek. Komórki zewnętrzne kul zarodkowych spontanicznie różnicują się w endodermę pozazarodkową. Wnętrze pozostaje niezróżnicowane, ale w trakcie dalszej hodowli pomiędzy komórkami pojawia się jamka. W ten sposób z prostych powstają kule zarodkowe złożone. W kulach złożonych warstwa wewnętrzna różnicuje się w ektodermę zarodkową, a pomiędzy ekto- i endodermą pojawia się trzeci listek zarodkowy – mezoderma.

W kulach zarodkowych powstających z ludzkich pierwotnych komórek wyprawdanych z płodów [48] stwierdzono występowanie pochodnych wszystkich trzech listków zarodkowych. Znalaziono tam komórki podobne do komórek nabłonka neuroektodermalnego oraz komórki zawierające neurofilamenty. Występowały także komórki endodermalne oraz pochodzące z mezodermy: miocyty i komórki zawierające desminę – cytoszkieletowe białko typowe dla mięśni poprzecznie prążkowanych.

Ludzkie pierwotne komórki zarodkowe z blastocyst użyto do wyhodowania złożonych kul zarodkowych [24]. Uzyskano, między innymi, kulę zarodkową, w której obserwowano skurcze i stwierdzono obecność aktyny typowej dla mięśnia sercowego. Warstwy komórek kul zarodkowych zawierały markery specyficzne dla trzech listków zarodkowych: globinę mezodermy, białko neurofilamentowe 68 Kd ektodermy nerwowej i α -fetoproteinę endodermy. Po dezagregacji kul na komórki i posianiu komórek na szalki, w płasko rosnących hodowlach stwierdzono obecność wielu różnych tkanek, w tym tkankę przypominającą nerwową i zawierającą białko neurofilamentowe 68 Kd. Opisane doświadczenie, w którym najpierw utworzono kule zarodkowe, żeby uzyskać wstępne różnicowanie – w listki zarodkowe, a potem przez posianie rozdzielonych na komórki kul uzyskano dalsze etapy różnicowania, przypomina już podejścia stosowane wcześniej u myszy i skutecznie dostarczające wybranych, określonych tkanek (patrz dalej: Tkanki z pierwotnych komórek myszy).

W doświadczeniu mającym na celu określenie, jak czynniki wzrostowe kierują różnicowaniem ludzkich pierwotnych komórek zarodkowych z blastocyst, komórki te hodowano 5 dni na nieprzyczepnych szalkach w celu uzyskania prostych kul zarodkowych. Następnie kule zarodkowe rozdzielano na komórki i te hodowano 10 dni w obecności czynników wzrostowych [47]. W żadnym przypadku nie uzyskano różnicowania w jedną określoną tkankę. Niektóre czynniki (czynnik wzrostu nerwów – NGF i czynnik wzrostu hepatocytów – HGF) umożliwiały różnicowanie we wszystkie trzy listki zarodkowe, co następuje także w hodowlach kontrolnych. Inne (naskórkowy czynnik wzrostu – EGF, zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów – bFGF oraz kwas retinowy i białko BMP-4) ograniczały różnicowanie do ektodermy i mezodermy. Największe zawężenie możliwości różnicowania – do mezodermy

– uzyskano przy zastosowaniu czynnika martwicy nowotworów TGF β 1 lub aktywiny A.

Tkanki powstające *in vivo*

Podstawowym sposobem sprawdzenia możliwości różnicowania mysich pierwotnych komórek zarodkowych *in vivo* było umieszczanie ich „z powrotem” w blastocystach i sprawdzanie, czy ich pochodne występują w tkankach urodzonych myszy. Wykazano po wielokroć, że komórki pierwotne myszy mogą wytwarzać wszystkie typy tkanek, w tym także gamety. Fakt ten jest podstawą wykorzystywania pierwotnych komórek zarodkowych do tworzenia zmutowanych szczepów myszy.

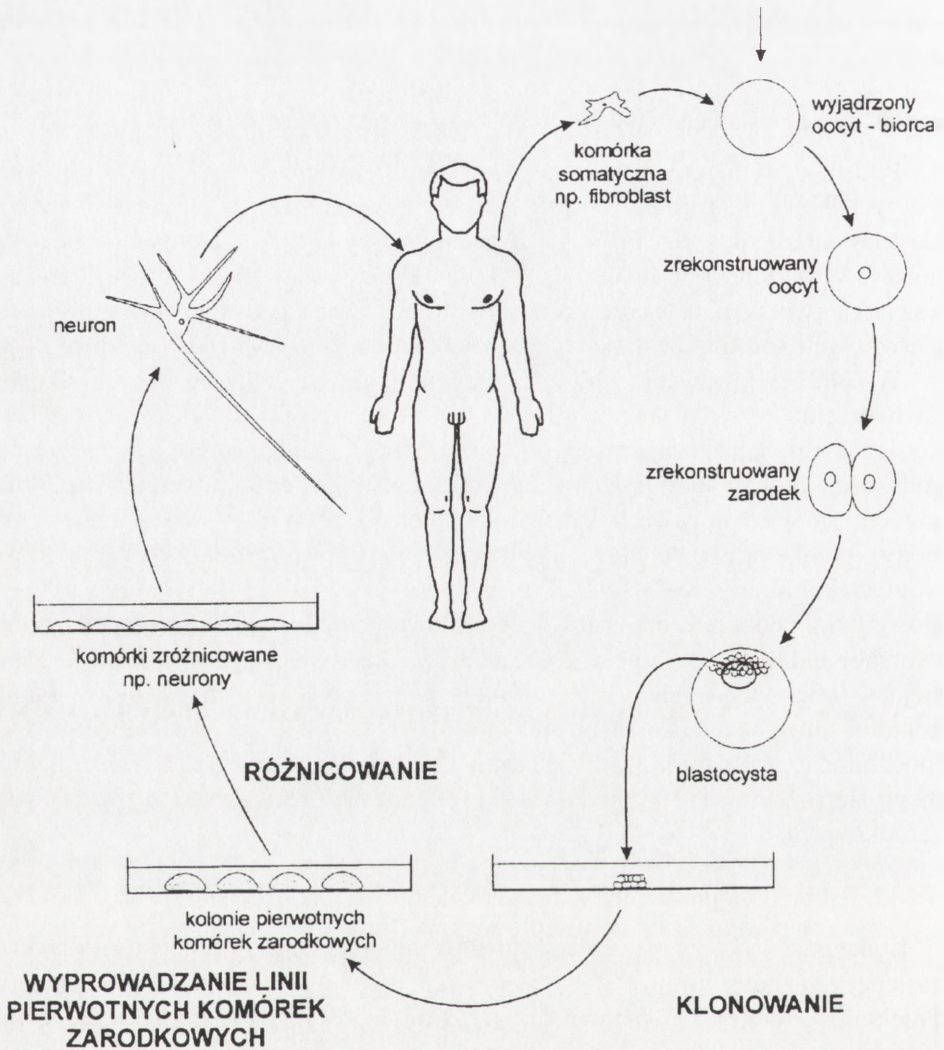
W celu przetestowania zdolności ludzkich pierwotnych komórek zarodkowych do tworzenia różnych tkanek wykorzystano inny sposób również znany z badań mysich komórek pierwotnych. Pierwotne komórki zarodkowe myszy, przeszczepione podskórnie biorecipientom pozbawionym odporności, tworzą potworniaki zarodkowe, zawierające wiele dorosłych tkanek, np. nabłonki (keratynowy, wydzielniczy i urzęsiony), tkankę nerwową, chrzęstną, kostną i mięśniową. Po iniekcji ludzkich pierwotnych komórek zarodkowych wyprowadzonych z blastocyst – do myszy z ciężkim złożonym niedoborem odporności – powstawały potworniaki zawierające komórki tworzące m.in. nabłonek neuroektodermalny i nabłonek wielowarstwowy rogowaciejący (pochodne ektodermy), nabłonek jelita (pochodna endodermy), skupiska komórek chrzęstnych i kostnych oraz mięśnie gładkie i poprzecznie prążkowane (pochodne mezodermy) [55]. Wykazano więc, że *in vivo* ludzkie pierwotne komórki mogą się różnicować w dorosłe tkanki, pochodzące ze wszystkich trzech listków zarodkowych.

Linie komórek pierwotnych na zamówienie? (Klonowanie terapeutyczne)

Koncepcja wykorzystania pierwotnych komórek zarodkowych jako źródła tkanek zastępczych istnieje prawie 20 lat, od czasu uzyskania pierwotnych komórek myszy. Przełomowe odkrycia ostatnich lat: możliwość klonowania ssaków przez przeszczepianie jąder komórek somatycznych do wyjądrzonych oocytów i uzyskanie ludzkich pierwotnych komórek zarodkowych, uaktualniły dawne oczekiwania i urealnili możliwość wyprowadzania na zamówienie linii komórek pierwotnych identycznych genetycznie z komórkami pacjenta.

Procedura musiałaby przebiegać następująco (patrz także ryc. 1):

- 1) jądro komórki somatycznej dawcy wprowadzane jest mikrochirurgicznie do wyjądrzonego oocytu biorcy,
- 2) tak zrekonstruowany zarodek hodowany jest *in vitro* do stadium blastocysty,
- 3) blastocysta lub izolowany z niej węzeł zarodkowy hodowane są dalej na warstwie odżywczej, w warunkach zapewniających wyodrębnienie i namnażanie pierwotnych komórek.



RYCINA 1. Schematycznie przedstawiono możliwość dokonywania autoprzeszczepów potrzebnych komórek uzyskanych przez namnażanie i różnicowanie pierwotnych komórek zarodkowych z linii wyprowadzonej na zamówienie metodą klonowania terapeutycznego

Komentatorzy analizujący ten schemat postępowania [9] wskazują, jakie problemy trzeba rozwiązać, żeby wyprowadzić ludzką linię pierwotnych komórek zarodkowych na zamówienie. Po pierwsze, skąd wziąć oocyty – biorców jąder komórkowych. Technika pozyskiwania ludzkich oocytów, jaką stosuje się w klinikach zapłodnienia *in vitro*, pozwala na uzyskanie jedynie ograniczonej ich liczby, a na te, które pozostają niewykorzystane przez dawczynię, czekają już pary, w których kobieta nie może dostarczyć własnych oocytów. Po drugie, trudno przewidzieć, jaka będzie wydajność

rozwoju do stadium blastocysty oocytów z wprowadzonym jądrem. Gdyby mierzyć potencję wprowadzonych jąder komórek somatycznych wydajnością rozwoju do urodzenia, to jądra komórek sutka owcy zapewniają wydajność 0,23% (owca Dolly), jądra komórek pęcherzykowych myszy – od 1,2 do 1,6% (mysz Cumulina), komórek nabłonka jajowodu krowy – 2%, a komórek pęcherzykowych krowy – 5%. Po trzecie, ludzkie komórki pierwotne uzyskano z wydajnością 5 linii z 36 użytych blastocyst, tj. ok. 14%.

Można oczekiwać, że blastocysty z rekonstruowanych oocytów będą mniej kompetentne rozwojowo niż powstałe po zapłodnieniu *in vitro*, a wydajność wyprawadzania linii będzie mniejsza. Jednak nawet przyjmując wydajność wyprawadzania linii pierwotnych komórek zarodkowych jako 14% wyliczono, że na wyprawadzenie jednej linii na zamówienie trzeba użyć 280 oocytów – biorców jąder do transplantacji jąder komórek somatycznych dawcy. Wyliczenie przeprowadzono mnożąc wydajność klonowania zwierząt (liczba żywych urodzeń na liczbę zużytych oocytów) – 1/20, stopień aneuploidii, czyli jednego z typów zaburzeń chromosomowych w zarodkach ludzkich hodowanych *in vitro* – 1/2 i wydajność wyprawadzania linii u ludzi – 5/36.

Dopóki więc nie znajdzie się źródła znacznej liczby oocytów ludzkich, mała jest szansa na klonowanie terapeutyczne jako procedurę kliniczną. Rozwiązanie tego problemu zależy od postępów metod hodowli niedojrzałych oocytów ludzkich, takich jakie występują w jajniku.

Alternatywnym źródłem oocytów mogłyby być zwierzęta, najprawdopodobniej zwierzęta gospodarskie. Podstawą tej spekulacji są doświadczenia, w których jądra komórek somatycznych różnych gatunków ssaków (owca, świnia, mała) transplantowano do oocytów bydłęcych. Uzyskano rozwój tak rekonstruowanych zarodków międzygatunkowych do stadium blastocysty, a po przeszczepieniu jądra komórki somatycznej szczura uzyskano nawet transgeniczne neurony bydłce [64]. Niewiedza na temat interakcji między jądrem komórkowym i obcą cytoplazmą jest jednak obecnie zbyt głęboka, żeby przeszczepianie jąder ludzkich komórek somatycznych do oocytów innych gatunków traktować jako realną drogę otrzymania linii pierwotnych komórek zarodkowych na zamówienie.

Tkanki z pierwotnych komórek zarodkowych myszy

Ukierunkowanie powstawania tkanek

Różnicowanie w endodermę pozazarodkową jest pierwszym, jakie następuje przy powstawaniu kul zarodkowych oraz w hodowli płaskiej bez warstwy odżywczej i czynnika przeciwbiałaczkowego. Dalsze różnicowanie pierwotnych komórek myszy *in vitro* prowadzi do powstania mieszaniny różnych tkanek, nawet jeżeli warunki hodowli faworyzują określone kierunki różnicowania, np. komórki nerwowe, ko-

mórki mięśnia sercowego czy komórki krwiotwórcze. Pierwszy sposób ujednolicania powstających hodowli komórkowych to wykorzystanie określonej morfologii pożądanego typu tkanki w mieszanej hodowli, co umożliwia nie tylko obserwacje, ale również mechaniczną jej izolację. Drugi – to ujednolicenie kierunku różnicowania pierwotnych komórek zarodkowych przez zastosowanie manipulacji genetycznych. Prześledzimy te podejścia na przykładzie różnicowania w komórki mięśnia sercowego – kardiomiocyty i w komórki nerwowe.

Kule zarodkowe hodowane siedem dni, a następnie umieszczane na przyczepnym podłożu, gdzie rozplaszczają się i różnicują w wiele typów tkanek, po siedmiu i więcej dniach zawierają spontanicznie kurczące się grupy kardiomiocytów. Grupy te stopniowo rosną i mogą być analizowane *in situ* lub izolowane i rozpraszane na komórki. Badania wykazały, że wyizolowane kardiomiocyty mają receptory dla dwóch neuroprzekazników (adrenaliny i acetylocholino) oraz prawidłowe szlaki przekazywania sygnału, wykazują ekspresję genu puszki homeotycznej *Csx* specyficznego dla serca (przegląd w [27,41]), a także mają własności elektrofizjologiczne i główne kanały jonowe typowe dla komórek mięśnia sercowego (przegląd w [22]). Badanie różnicowania pierwotnych komórek zarodkowych w kardiomiocyty pogłębiono, wykorzystując linię pierwotnych komórek zmodyfikowaną genetycznie przez wprowadzenie genu białka zielono fluoryzującego pod kontrolą promotora α -aktyny komórek mięśnia sercowego. Zieloną fluorescencją, wskazującą na różnicowanie w kardiomiocyty, udało się wykryć w obrębie kul zarodkowych już dwa dni przed wystąpieniem skurczów, co umożliwiło charakterystykę elementów przekazywania sygnału w pre-morfologicznej fazie różnicowania [30]. Wprowadzenie do innej linii pierwotnych komórek zarodkowych myszy promotora specyficznego tkankowo sprzężonego z genem selekcyjnym pozwoliło na selekcję wybranej linii różnicowania. Tą metodą uzyskano kardiomiocyty z promotorem ciężkiego łańcucha miozyny sprzężonego z genem *neo* [29]. *In vitro* kardiomiocyty takie wykazywały skurcze, a po przeszczepieniu do myszy z dystrofią mięśniową znajdowano je w mięśniu sercowym przez co najmniej 7 tygodni.

Kule zarodkowe traktowane kwasem retinowym, po przyczepieniu do podłoża różnicują się między innymi w komórki nerwowe. Neurony są jednak przemieszane z innymi typami komórek. Zwiększenie udziału neuronów do 50% osiągnięto przez zmianę warunków fizyko-chemicznych hodowli: dezagregację kul zarodkowych na komórki, posianie ich na podłoża pokryte substancją poprawiającą przyleganie (poli-L-lizyna) i zmniejszenie lepkości pożywki. Do izolacji czystych komórek nerwowych wykorzystano następnie gen β *geo* jako gen selekcyjny. Gen ten wprowadzono do innego genu pierwotnych komórek zarodkowych – *Sox2*. Gen *Sox2* koduje czynnik transkrypcyjny typowy dla komórek neuroepitelium, czyli komórek prekursorowych dla neuronów. Pod wpływem czynnika selekcyjnego G418 komórki *Sox2*-negatywne, czyli nie-nerwowe, były eliminowane [34].

W czasie spontanicznego różnicowania kul zarodkowych powstają wysepki krwiotwórcze, skupienia komórek występujące normalnie w rozwoju m.in. ssaków, dające początek komórkom krwi i śródbłonkowi naczyń krwionośnych. W hodowanych kulach zarodkowych komórki krwiotwórcze wysepek wytwarzają czynniki wzrostowe związane z hematopoezą (referencje w [41]). W dalej hodowanych w zawieszynie kulach wysepki stopniowo tworzą kanały naczyniowe wypełnione komórkami krwiotwórczymi; komórki śródbłonka kanałów zawierają markery typowe dla naczyń [60] i geny charakterystyczne dla śródbłonka [7]. Inny sposób otrzymywania komórek krwiotwórczych, bez tworzenia kul zarodkowych, polega na hodowli pierwotnych komórek zarodkowych na płasko, na warstwie komórek zrębu szpiku. Komórki zrębu szpiku są tymi, które normalnie, *in vivo* dostarczają czynników wzrostowych do hematopoezy. W omawianym doświadczeniu komórki te otrzymano z myszy ze zinktywowanym genem kodującym czynnik stymulujący kolonie makrofagów, M-CSF. Aktywność tego genu, czyli obecność czynnika stymulującego wzrost kolonii, hamuje różnicowanie wszystkich komórek krwi oprócz makrofagów. Inaktywacja genu pozwoliła więc uzyskać wiele różnych typów komórek krwi: eryocyty, ich komórki prekursorowe i komórki prekursorowe limfocytów B [40]. Wykazano także, że różnicowanie pierwotnych komórek zarodkowych myszy w progenitorowe komórki naczyń, zdolne do tworzenia śródbłonka, perycytów oraz mięśni gładkich naczyń, można osiągnąć przez hodowlę na warstwie kolagenu i sortowanie w cytometrze przepływowym pod kątem obecności receptora czynnika wzrostu naczyń, Flk1. Uzyskane komórki progenitorowe przeszczepione do zarodków kury uczestniczą w tworzeniu naczyń *in vivo* [63].

Różnicowanie może być kierowane przez nadekspresję głównego genu regulatorowego, np. uzyskanie mięśni szkieletowych przez ekspresję MyoD, czynnika transkrypcyjnego specyficznego dla mięśni, którego gen wprowadzono do pierwotnych komórek zarodkowych [11].

Podobne techniki będą prawdopodobnie potrzebne, żeby ukierunkować różnicowanie ludzkich pierwotnych komórek zarodkowych w wybrane tkanki.

Integracja po przeszczepieniu do biorców

W ostatnich latach wśród badań nastawionych na poznawanie mechanizmów różnicowania pierwotnych komórek zarodkowych myszy pojawiła się orientacja bardziej praktyczna. Z pierwotnych komórek myszy uzyskano dwa typy zróżnicowanych komórek, normalnie występujących w układzie nerwowym i mających szansę stać się modelowym materiałem do transplantacji w terapii zastępczej dwóch chorób neurodegeneracyjnych.

Pierwszymi komórkami są neurony produkujące dopaminę – neuroprzekaźnik, którego niedobór jest przyczyną choroby Parkinsona [32]. Drugi typ komórek to oligodendrocyty, komórki wytwarzające mielinę – substancję tworzącą osłonki wypustek nerwowych, której brak występuje w stwardnieniu rozsianym [6]. Prze-

szczepienie szczurom (stanowiącym model ludzkiej choroby demielinizacyjnej) oligodendrocytów myszy, wyhodowanych z komórek pierwotnych, spowodowało interakcję wprowadzonych komórek z neuronami biorcy i skuteczną mielinizację wypustek nerwowych – aksonów, w mózgu i rdzeniu kręgowym. W tym przypadku wykazano jednoznacznie, że tkanki powstałe przez różnicowanie pierwotnych komórek zarodkowych mogą się integrować z dorosłymi tkankami biorcy.

KOMÓRKI MACIERZYZTE TKANEK

Przedstawiony poniżej przegląd w żadnym przypadku nie obejmuje wiedzy zgromadzonej przez pokolenia histologów i dostępnej w podręcznikach. Celem przeglądu jest wskazanie, jakie problemy związane z potencjalnym wykorzystaniem komórek macierzystych w praktyce zajmują obecnie uwagę badaczy i komentatorów.

„Dorosłe” komórki macierzyste, czyli komórki macierzyste tkanek występują wśród komórek tkanki, którą odnawiają. Komórki macierzyste jelita występują w nabłonku jelita, komórki macierzyste naskórka (keratynocytów) znajdują się w cebulce włosowej, a komórki macierzyste tkanki nerwowej (neuronów i gleju) – w niektórych częściach mózgu. Nieco inaczej jest z komórkami macierzystymi krwi: występują one we krwi, ale również – i w większej liczbie – w szpiku kostnym. Komórki macierzyste mogą być uni(mono)potentne, jak komórki macierzyste spermatogoniów, które odpowiadają za ciągłą produkcję plemników, lub multipotentne, jak komórki macierzyste komórek nerwowych lub krwi, które dają początek, odpowiednio, neuronom i dwóm typom komórek glejowych oraz wszystkim komórkom krwi i układu odpornościowego (wg komentarza [38]).

Istnieją wprawdzie w tej chwili wskazówki, że stanie się możliwa charakterystyka komórek macierzystych na poziomie morfologicznym lub molekularnym (obecni kandydaci to gen odporności na wiele leków – ang. *multidrug resistance* – oraz określone zestawy ekspresji integryn), jednak na razie definicja tych komórek może być tylko funkcjonalna.

Debata na temat, czym są właściwie komórki macierzyste, trwa od trzydziestu lat, ale przeważa pogląd, że są to komórki zdolne do nieograniczonego lub długotrwałego samoodnawiania, mogące wytwarzać przynajmniej jeden typ mocno zróżnicowanej komórki potomnej. Zazwyczaj pomiędzy komórką macierzystą a jej wysoko zróżnicowanym potomstwem występuje populacja pośrednia, zdeterminowanych (ang. *committed*) komórek progenitorowych o ograniczonej zdolności proliferacyjnej i zawężonym potencjale różnicowania, czasami określanymi jako przejściowe komórki zwielokrotniające (*transit amplifying cells*) (wg komentarza [61]). Należy więc ograniczyć definicję do pojedynczych komórek: macierzystą jest taka, która raz powstawszy, samoodnawia się przez całe życie organizmu. Po-

zwala to odróżnić komórkę macierzystą od całej gamy komórek progenitorowych, które mają ograniczony okres samoodnawiania. Do dwóch pierwszych elementów definicji komórek macierzystych (prolifercacja przez cały czas życia organizmu i różnicowanie) niektórzy dodają trzeci: komórki macierzyste powinny być widocznie niezróżnicowane. Jednak włączenie tego wymogu wyklucza spomiędzy komórek macierzystych opisywane często jako takie: komórki warstwy podstawnej naskórka czy przewodów trzustki (komentarz [51]). Niektórzy uważają, że komórki macierzyste nie tylko nie są niezróżnicowane, lecz wręcz są odpowiednio zróżnicowane (dostosowane) do swoich nisz tkankowych (przegląd [61]). Koncepcja nisz tkankowych dobrze wyjaśnia zjawisko transdiferencjacji komórek macierzystych zmianą ich otoczenia tkankowego (komentarz [59]).

W okresie perinatalnym i późniejszych fazach życia rośnie liczba komórek macierzystych krwi i układu nerwowego. Sugeruje to, że (wbrew naszym intuicyjnym oczekiwaniom) komórki macierzyste powstają (także) po zakończeniu rozwoju zarodkowego (komentarz [59]). We wczesnym rozwoju zarodkowym samoodnawianie jest mniej ważne niż tworzenie listków zarodkowych i tkanek pierwotnych, więc komórki macierzyste dorosłych tkanek powstają, paradoksalnie, przez różnicowanie komórek zarodkowych (komentarz [61]).

Identyfikacja i izolacja

Komórki macierzyste nabłonków zajmują określoną pozycję w tkance różną od położenia komórek zróżnicowanych. Na przykład w krypcie jelitowej komórki macierzyste leżą u podstawy, przejściowe komórki amplifikujące zajmują około dwóch trzecich wysokości krypty, a zróżnicowane komórki postmitotyczne leżą w części górnej krypty i w kosmkach (przegląd [51]). Komórki macierzyste naskórka (keratynocytów) leżą w nabłonku podstawy cebulki włosowej. Jednak nawet tak dokładnie określone położenie nie umożliwia wyizolowania czystej populacji komórek. Dopiero połączenie hodowli całej tkanki *in vitro* z technikami znakowania radioaktywnymi prekursorami lub przeciwciałami pozwala wyizolować lub przynajmniej zagęścić komórki macierzyste. Komórki macierzyste naskórka udało się zagęścić przez sortowanie w cytometrze przepływowym na podstawie wiązania przez nie przeciwciał na $\alpha(6)$ -integrynę i braku receptorów transferyny [53].

Komórki macierzyste krwinek leżą w szpiku kostnym, gdzie są również obecne liczne postacie białych i czerwonych krwinek na różnych stadiach powstawania. Jedna komórka macierzysta przypada na dziesięć tysięcy, a nawet na sto tysięcy komórek szpiku. Jeszcze mniej komórek macierzystych można spotkać we krwi: jedna przypada tam na milion komórek. Ponieważ komórki macierzyste krwi nie są odróżnialne od innych występujących tu komórek na podstawie morfologii, identyfikuje się je przy użyciu testów czynnościowych *in vitro* i *in vivo*. W pierwszym przypadku o ich obecności świadczy zdolność do tworzenia kolonii komórek w

półpłynnym agarze, w drugim – podjęcie hematopoezy przez organizm pozbawiony wcześniej własnych komórek krwiotwórczych. Do odtworzenia krwinek i układu krwiotwórczego takiego zwierzęcia wystarczy przeszczepienie zaledwie stu komórek macierzystych [15]. Przeszczepy szpiku kostnego wykonywane są między innymi w leczeniu białaczek (szerzej o przeszczepach szpiku [17]). Obecne w szpiku komórki macierzyste krwi wykorzystuje się do prowadzenia hematopoezy biorcy po uprzednim wyłączeniu jego własnych komórek macierzystych z defektem. Komórki macierzyste można zagęszczać we krwi na podstawie ich własności antygenowych: wiążą one przeciwciała na białko CD34. Zagęszczenie tych komórek we krwi, w dostatecznej ilości do transfuzji, jest jednak czasochłonne i wymaga dziesięciu sześciogodzinnych sesji.

W badaniach doświadczalnych stosuje się różne metody izolowania komórek macierzystych krwi. U myszy komórki te można izolować metodą rozcieńczeń granicznych, użycia tocyjanianu, czy sortowania komórek wiążących przeciwciała na wybrane antygeny powierzchniowe. Szczególnie skuteczna okazała się metoda izolowania komórek przez immuno-usunięcie innych komórek. W tym przypadku usunięto komórki z późniejszych stadiów hematopoezy, przez osadzenie ich na pokrytych przeciwciałami kulkach lateksowych; następnie zebrano pozostałe w zawieszynie komórki macierzyste [31]. Mysie komórki macierzyste krwi izolowane metodą sortowania w cytometrze przepływowym na podstawie wiązania określonego zestawu przeciwciał, zostały użyte do badania ich zdolności różnicowania się w komórki mięśniowe (patrz Możliwości transdyferencjacji komórek macierzystych). Niezwykle ciekawym aspektem tych badań było wykorzystanie tej samej procedury do izolacji komórek z mięśni. Wyzolowane z mięśni komórki – mające wspólny z komórkami macierzystymi krwi zestaw antygenów powierzchniowych – przeszczepiono myszom z dystrofią mięśniową Duchenne'a. W chorobie tej białko wiążące elementy kurczliwe mięśnia z błoną, dystrofina, jest nieobecne lub upośledzone. Wprowadzone komórki odtwarzały mięśnie o normalnej budowie, zawierające dystrofinę typu dzikiego. Oznacza to, że wyizolowane z mięśni komórki o własnościach (przynajmniej częściowo) takich, jakie mają komórki macierzyste krwi, są komórkami macierzystymi mięśni [21].

Mezenchymatyczne komórki macierzyste (przegląd [10]), które są komórkami macierzystymi różnych rodzajów tkanki łącznej, znajdują się w szpiku kostnym jako jeden z typów komórek zrębu szpiku. Mają one zdolność samoodnawiania oraz dawno wykazane zdolności różnicowania w komórki kościotwórcze i komórki zrębu. Odkąd wykazano, że klonalne potomstwo jednej takiej komórki może wytworzyć *in vitro* liczne typy tkanki mezenchymatycznej (komórki kości, chrząstki, tłuszczowe) [45], można omawiane komórki macierzyste traktować jako multipotentne. Po przeszczepieniu transgenicznym myszom z niewłaściwym kostnieniem (*osteogenesis imperfecta*), znajdowano DNA komórek dawcy w tkance kostnej, chrzęstnej i w płucach biorcy [42].

W centralnym układzie nerwowym dorosłych ssaków zarówno rejony, w których normalnie zachodzi tworzenie nowych neuronów (np. strefa podkomorowa lub hipokamp), jak rejony nie neurogeniczne (np. rdzeń kręgowy) zawierają komórki macierzyste układu nerwowego (przegląd [18]). Standardowa metoda ich izolacji polega na hodowli *in vitro* rozproszonego na komórki wycinka tkanki nerwowej przy dużym stężeniu czynnika wzrostu fibroblastów FGF-2 lub czynnika wzrostu naskórka (EGF). Otrzymaną w wyniku hodowli tkankę testuje się na obecność antygenów specyficznych dla neuronów, astrocytów i oligodendrocytów. Bardziej szczegółowo badano indywidualne komórki w trakcie wczesnej hodowli znakowane retrowirusem. Po zakończeniu hodowli *in vitro* kolonie komórek poddano analizie hybrydyzacyjnej, potwierdzającej ich klonalne pochodzenie. Obecnie główne badania komórek macierzystych układu nerwowego dotyczą warunków ich różnicowania w określony typ neuronów czy gleju. Udało się na przykład opracować warunki hodowli komórek macierzystych układu nerwowego myszy tak, że komórki namnażają się *in vitro* i produkują neuroprzekaznik dopaminę [52]. Są wobec tego dwa sposoby otrzymywania mysich neuronów produkujących dopaminę: z pierwotnych komórek zarodkowych (patrz wcześniej: Integracja po przeszczepieniu do biorców) i z dorosłych komórek macierzystych.

Chociaż większość badań przeprowadzono na gryzoniach, są doniesienia, że również tkanka nerwowa z ludzkich płodów jest źródłem komórek macierzystych układu nerwowego [16].

Identyfikacji komórek macierzystych siatkówki (u myszy [58] i szczura [1]) dokonano na podstawie zdolności tych komórek do tworzenia kolonii *in vitro*, bez konieczności stosowania czynników wzrostowych (przegląd [43]).

Komórki macierzyste spermatogoniów, czyli komórek, z których powstają plemniki, wyizolowano (zagęszczono) na podstawie testu funkcjonalnego polegającego na transplatacji do jąder biorców. Wyizolowane komórki wiązały przeciwciała na $\alpha(6)$ - i $\beta(1)$ -integryny [49]. Podjęto następnie próby ich zagęszczania przez sortowanie w cytometrze przepływowym na podstawie rozpraszania światła i obecności integryn [50]. Okazało się, że dziesięciokrotne zagęszczenie komórek macierzystych owocuje podobnym zwielokrotnieniem liczby kolonii powstających w jądrach biorców po transplatacji (przegląd w [26]).

Coraz częściej są prowadzone poszukiwania komórek macierzystych w narządach szczególnie interesujących ze względów medycznych. Stosując analizę klonalną komórek nabłonkowych ludzkiej prostaty *in vitro*, wyodrębniono populację o wysokim wskaźniku proliferacji i zdolności różnicowania [23]. Komórki te można wstępnie uznać za komórki macierzyste, odnawiające nabłonek gruczołu krokowego. Doniesiono także o pluripotentnych komórkach trzustki. Po hodowli komórek kanalików ludzkiej, zdrowej trzustki *in vitro* stwierdzono, że są one zdolne do ekspresji czynnika transkrypcyjnego IPF-1 (ang. *insulin promoter factor 1*). Ten pierwszy dowód na to, że komórki z tkanki egzokrynowej mogą wykazywać *in vitro* ekspresję

IPF-1, uznano za sugerujący, że mają one własności komórek prekursorowych/macierzystych [20].

Możliwości transdyferencji komórek macierzystych

Niespodziewanie dla badaczy w ostatnich latach okazało się, że komórki macierzyste tkanek – kiedy uda się je zagęścić i przeszczepić do biorców – mogą się różnicować nie tylko w tkankę, z której pochodzą, ale także w inne tkanki, nawet pochodzące z innego listka zarodkowego. Taki proces zmiany kierunku różnicowania nazywa się transdyferencją.

Komórki szpiku noworodków myszy po wyznakowaniu genetycznym wprowadzono do biorczyń. Już trzy dni później znakowane komórki znajdowano w mózgu. Po kilku tygodniach ich liczba osiągała 14 tysięcy komórek na mysz. Część tych komórek reagowała z przeciwciałami na białka znacznikowe astrocytów i mikrogleju [13]. W podobnym doświadczeniu, wykorzystując chromosom Y jako marker przeszczepionych komórek szpiku, wykazano ich zdolność do różnicowania w neurony [39]. W innej pracy wykorzystano komórki szpiku dorosłych myszy znakowane białkiem zielono fluoryzującym. W kilka miesięcy po ich przeszczepieniu napromienionym biorcom wyizolowano z mózgu komórki pozytywne, stosując metodę sortowania w cytometrze przepływowym. Reakcje z przeciwciałami wykazały, że komórki te zawierały trzy białka typowe dla neuronów i czynnik transkrypcyjny CREB [5].

Komórki macierzyste krwi ze szpiku przygotowane metodą immuno-usunięcia (patrz wcześniej: Identyfikacja i izolacja) przeszczepiano do bocznej komory mózgu noworodków myszy. Celem doświadczenia było sprawdzenie zdolności tych komórek do różnicowania się w tkankę nerwową. W ciągu dwunastu dni po wstrzyknięciu

TABELA 1. Transdyferencja komórek macierzystych dorosłych tkanek ssaków

Komórki macierzyste	Transdyferencja w komórki	Gatunek	Ref.
Mięśniowe	krwi	mysz	[25]
Krwii	nerwowe	mysz	[13, 31]
	mięśniowe	mysz	[21]
	hepatocyty	mysz	[54]
		szczur	[44]
	hepatocyty	człowiek	[2]
Tkanki łącznej	nerwowe	szczur, człowiek	[62]
Nerwowe	krwi	mysz	[4, 8]
	mięśniowe, jelita, hepatocyty	mysz	[8]

komórki migrowały przez przodomózgowie i mózdzek, nie naruszając architektury tkanek. W niektórych strukturach mózgu (prążkowie i hipokamp) komórki macierzyste ujawniały obecność znacznika komórek glejowych – astrocytów, którym jest kwaśne włókienkowe białko glejowe (GFAP). Oznacza to, że wprowadzone komórki zróżnicowały się w normalnie obecne w tkance nerwowej komórki glejowe. W innych rejonach mózgu niektóre wprowadzone komórki zawierały neurofilamenty, tzn. zróżnicowały się w neurony [31].

Komórki macierzyste mięśni i krwi mogą wzajemnie dawać obie tkanki [21,25], co udokumentowano już dość gruntownie.

Fragmety mięśni szkieletowych myszy, po trawieniu enzymatycznym, posianiu na szalki i 5-dniowej hodowli *in vitro* mieszano z komórkami szpiku i przeszczepiano napromieniowanym biorczyniom. Po sześciu tygodniach transplantowane komórki mięśniowe utworzyły średnio 56% komórek krwi obwodowej. W przeszczepianej mieszance było ok. 10x więcej komórek szpiku niż mięśni. Uzyskany wynik oznacza więc, że aktywność krwiotwórcza komórek z mięśni była co najmniej 10x wyższa niż komórek szpiku [25].

Komórki macierzyste krwi, oczyszczone metodą sortowania i przeszczepione do żyły ogonowej myszy z dystrofią mięśniową po 12 tygodniach wytwarzają nie tylko komórki krwi, ale także ok. 4% włókien mięśniowych, rozpoznawalnych dzięki temu, że zawierają dystrofinę typu dzikiego [21]. Jest to przykład doświadczałnej terapii zastępczej.

Wykazano, że u szczurze [44] i mysie [54] komórki krwiotwórcze mogą różnicować się także w hepatocyty. Doniesiono ostatnio o badaniach na ludzkim materiale sekcijnym, potwierdzających i rozszerzających wiedzę o możliwościach transdyferencjacji komórek macierzystych krwi. Odtworzono historię przypadków, w których pacjentkom przeszczepiano szpik od dawców płci męskiej. W materiale sekcijnym stwierdzono, wykorzystując chromosom Y jako marker wprowadzonych komórek szpikowych, że liczne komórki wątroby: hepatocyty i cholangiocyty pochodzą z przeszczepionych komórek. Oznacza to, że komórki macierzyste krwi ze szpiku uczestniczyły w regeneracji wątroby [2].

Komórki macierzyste tkanki łącznej szczura i człowieka, wyizolowane ze zrzębu szpiku, skierowano *in vitro* na drogę różnicowania w neurony, wykazujące receptory czynnika wzrostu neuronów [62].

Mysie komórki macierzyste układu nerwowego mogą się różnicować w mięśnie, krew, jelito, wątrobę [4,8].

Komórki macierzyste układu nerwowego z przodomózgowia dorosłych myszy znakowanych genetycznie przeszczepiano napromienionym biorcom. Komórki szpiku biorców badano na obecność komórek dawców trzema metodami: tworzeniem kolonii komórek w półpłynnym agarze, immunocytochemicznie i analizą cytometryczną. Wszystkie wykazały, że powstałe komórki krwi pochodzą z wszczepionych komórek macierzystych układu nerwowego [4].

Badania wykazujące możliwości różnicowania w wiele tkanek są szczególnie interesujące z powodu metodyki, jaką się posłużono [8]. Grupy komórek macierzystych układu nerwowego („neurosferę”) dorosłych myszy wprowadzano do zarodków. Były to zarodki kury, w stadiach rozwojowych odpowiadających okresowi płodowemu ssaków, a także zarodki myszy w bardzo wczesnym stadium rozwoju, stadium blastocysty. W obu przypadkach dorosłe komórki macierzyste włączyły się do rozwoju, wytwarzając w chimerowych zarodkach różne tkanki. W zarodkach kury komórki te znajdowano głównie w układzie nerwowym, ale także wśród narządów pochodzących z mezodermy, jak śródnercze i struna grzbietowa oraz z endodermy, jak nabłonek wątroby lub jelita. Po wstrzyknięciu macierzystych komórek nerwowych do blastocyst myszy chimery otrzymano w nieznacznym procencie. Jednak badane płody chimerowe zawierały pochodne wprowadzonych komórek w tkankach ze wszystkich trzech listków zarodkowych, najwięcej w mięśniach sercowym [8]. Te niezwykle doświadczenia wykazały, że transdyferencjacja dorosłych komórek macierzystych może odbywać się także w środowisku komórek zarodkowych.

Wyjaśnienie zjawiska transdyferencjacji może być związane ze środowiskiem, w jakim znajdują się komórki macierzyste, zgodnie z teorią niszy, w jakich funkcjonują. Nie do przecenienia jest różnica pomiędzy sytuacją fizjologiczną a warunkami spowodowanymi chorobą lub uszkodzeniem, jak to miało miejsce w doświadczeniach, gdzie wykazano możliwość różnicowania w nietypowe tkanki. Także długotrwała hodowla *in vitro* może zmieniać kierunek różnicowania komórek macierzystych. Czy to oznacza, że różnicowanie można sprowadzić do spisu genów, które podlegają ekspresji w danej komórce, w danym czasie? Raczej nie, bo należy włączyć do rozważań parametr czasu, czyli historię rozważanych komórek *in vivo* (komentarz [59]).

TEORETYCZNE MOŻLIWOŚCI LECZENIA KOMÓRKAMI

Tkanki powstałe z pierwotnych komórek zarodkowych

Kiedy w 1998 roku opublikowano doniesienia naukowe o uzyskaniu pierwotnych komórek zarodkowych człowieka, towarzyszyły im komentarze na temat możliwości badawczych i klinicznych związanych z tymi komórkami [19,28]. Pierwszy taki futurystyczny kalendarz wymieniał:

- badania normalnego rozwoju zarodkowego (embriogenezy) człowieka,
- badania nienormalnego rozwoju (przez tworzenie linii komórkowych noszących mutacje kierunkowe lub modyfikowane chromosomy),
- badanie działania genów ludzkich,

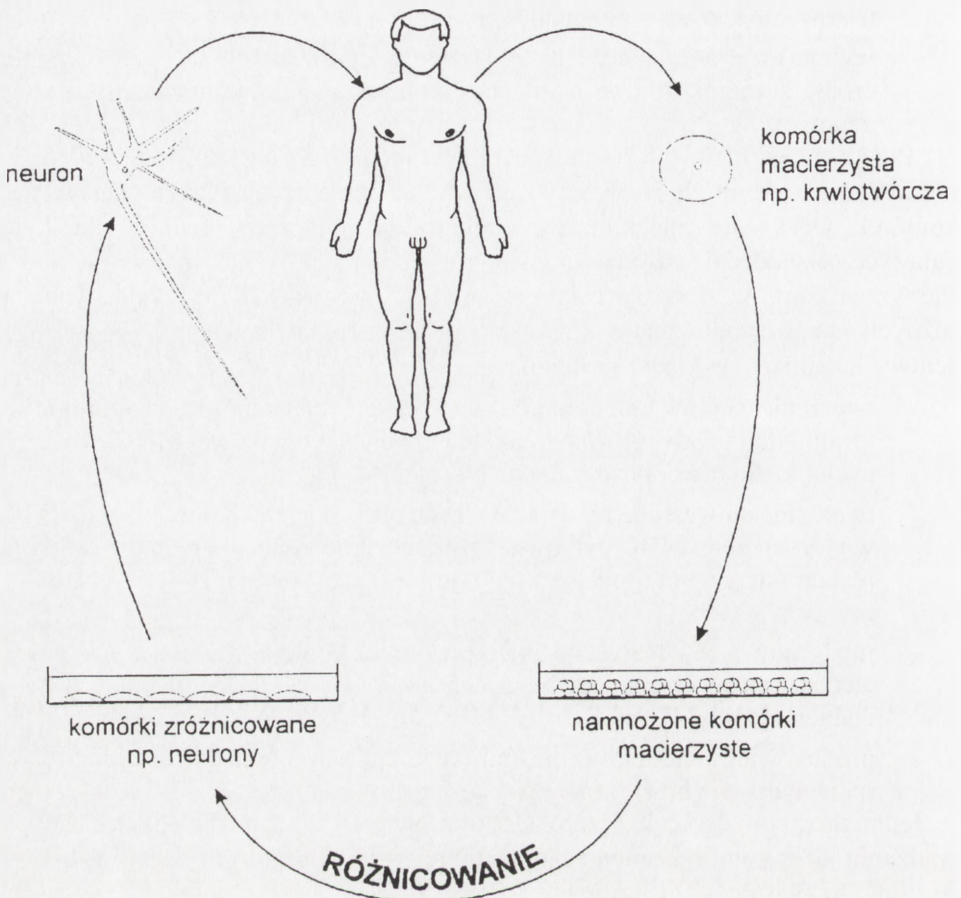
- testowanie leków i teratogenów,
- wykorzystywanie pierwotnych komórek zarodkowych jako odnawialnego źródła komórek do transplantacji w komórkowej terapii zastępczej i terapii genowej.

Przedstawiano równocześnie spekulacje, w jaki sposób ludzkie pierwotne komórki zarodkowe mogłyby być używane w terapiach polegających na transplantacji komórek. Oczywiście cele kliniczne obejmowałyby choroby neurodegeneracyjne, cukrzycę, uszkodzenia rdzenia kręgowego i repopulację komórek krwiotwórczych. Pierwotne komórki zarodkowe zamierzano także zastosować do wypracowywania różnych metod zapobiegania odrzucaniu przeszczepionych tkanek. Ten przyszłościowy kalendarz wyglądał następująco:

- tworzenie banków linii komórek pierwotnych, reprezentujących szerokie spektrum alleli genów głównego układu zgodności tkankowej MHC, stwarzających możliwość dopasowania do biorcy;
- tworzenie uniwersalnych linii dawczych pierwotnych komórek zarodkowych, w których geny MHC byłyby genetycznie zmienione tak, by nie wywoływać reakcji odrzucenia (podejścia tego próbowano, z ograniczonym sukcesem, u myszy);
- modyfikowanie genetyczne linii pierwotnych komórek zarodkowych, polegające na wprowadzeniu genów głównego układu zgodności tkankowej potencjalnego biorcy;
- produkowanie na zamówienie linii zawierających genom potencjalnego biorcy (personalizacja linii).

Jedną drogą do tego celu byłoby klonowanie terapeutyczne, polegające na wprowadzaniu jąder komórek somatycznych biorcy do wyjądrzonych oocytów, hodowli *in vitro* do blastocyst, a następnie wyprowadzeniu linii komórek pierwotnych z blastocyst (patrz wcześniej: Linie komórek pierwotnych na zamówienie? i ryc. 1). Drugim sposobem mogłoby być wprowadzanie jąder komórek biorcy do wyjądrzonych pierwotnych komórek zarodkowych (istniejącej już linii), a następnie namnażanie komórek, do których skutecznie wprowadzono jądro komórkowe biorcy.

Od czasu przedstawienia, w 1998 roku, listy możliwych zastosowań ludzkich komórek pierwotnych nie przybyło wiele informacji o tych komórkach, czego przyczyną są prawa własności (komercjalizacja) pierwotnych komórek zarodkowych człowieka oraz wątpliwości etyczne i prawne hamujące badania. Dlatego lista jest wciąż aktualna [37] i tak samo hipotetyczna, jak dwa lata temu. Samo sformułowanie listy miało jednak niewątpliwie wpływ na błyskawiczny rozwój badań dotyczących ukierunkowywania różnicowania mysich pierwotnych komórek zarodkowych. Informacje przekazane w podrozdziale: Integracja po przeszczepieniu do biorców, opublikowano w ciągu dwóch ostatnich lat.



RYCINA 2. Schematycznie przedstawiono możliwość dokonywania autoprzeszczepów komórek powstałych przez namnożenie i transdyferencjację komórek macierzystych, pobranych z własnej tkanki

Koncepcja autoprzeszczepów hodowanych komórek macierzystych

Komentarze towarzyszące publikacjom naukowym wykazującym możliwość izolowania, hodowli, transdyferencjacji i integracji po przeszczepieniu *in vivo* dorosłych komórek macierzystych [9,33,37], przedstawiają następujące proponowane zastosowania medyczne:

- wykorzystanie komórek macierzystych i otrzymanych z nich *in vitro* tkanek do transplantacji i komórkowych terapii zastępczych;
- manipulacje macierzystymi komórkami krwi występującymi w szpiku, którego przeszczepy wykonuje się między innymi pacjentom z białaczkami;
- hodowla skóry i przeszczepy pacjentom z oparzeniami;

- otrzymywanie komórek produkujących insulinę i przeszczepianie ich pacjentom;
 - przeszczepianie komórek macierzystych układu nerwowego pacjentom ze schorzeniami mózgu;
 - produkcja nowych neuronów do traktowania pacjentów z chorobą Parkinsona.
- Na schematycznej rycinie (ryc. 2) przedstawiono możliwość dokonywania autoprzeszczepów komórek powstałych przez namnożenie i transdiferencjację komórek macierzystych, pobranych z własnej tkanki.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AHMAD I., TANG L., PHAM, H. Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. *Biochem Biophys Res Comm* 2000; **270**: 517–521.
- [2] ALISON MR, POULSOM R, JEFFERY R, DHILLON AP, QUAGLIA A, JACOB J, NOVELLI M, PRENTICE G, WILLIAMSON J, WRIGHT NA. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000; **406**: 257.
- [3] AMIT M, CARPENTER MK, INOKUMA MS, CHIU CP, HARRIS CP, WAKNITZ MA, ITSKOVITZ-ELDOR J, THOMSON JA. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 2000; **227**: 271–278.
- [4] BJORNSON CRR, RIETZE RL, REYNOLDS BA, MAGLI MC, VESCOVI AL. Turning brain into blood: A hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo*. *Science* 1999; **283**: 534–537.
- [5] BRAZELTON TR, ROSSI FMV, KESHET GI, BLAU HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000; **290**: 1775–1779.
- [6] BRÜSTLE O, JONES KN, LEARISH RD, KARRAM K, CHOUDHARY K, WIESTLER OD, DUNCAN ID, MCKAY RDG. Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science* 1999; **285**: 754–756.
- [7] CHOI K, KENNEDY M, KAZAROV A, PAPADIMITRIOU JC, KELLER G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 1998; **125**: 725–732.
- [8] CLARKE DL, JOHANSSON CB, WILBERTZ J, VERESS B, NILSSON E, KARLSTRÖM H, LENDAHL U, FRISÉN J. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 2000; **288**: 1660–1663.
- [9] COLMAN A, KIND A. Therapeutic cloning: concepts and practicalities. *Trends in Biotechnol* 2000; **18**: 192–196.
- [10] DEANS RJ, MOSELEY AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000; **28**: 875–884.
- [11] DINSMORE J, RATLIFF J, DEACON T, PAKZABAN P, JACOBY D, GALPERN W, ISACSON O. Embryonic stem cells differentiated *in vitro* as a novel source of cells for transplantation. *Cell Transpl.* 1996; **5**:131–144.
- [12] DOETSCHMAN T, WILLIAMS P, MAEDA N. Establishment of hamster, blastocyst derived embryonic stem (ES) cells. *Dev Biol* 1988; **127**: 224–227.
- [13] EGLITIS MA, MEZEY E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 4080–4085.
- [14] EVANS M J, KAUFMAN, MH. Isolation and culture of pluripotential cells from early mouse embryos. *Nature* 1981; **292**: 154–156.

- [15] FELESZKO W. Dojrzewanie limfocytów. [w] JAKÓBISIAK W [red.] Immunologia. Warszawa: PWN 1998: 124.
- [16] FLAX JD, AURORA S, YANG C, SIMONIN C, WILLS AM, BILLINGHUSRT LL, JENDOUBI N, SIDMAN RL, WOLFE JH, KIM SU, SNYDER EY. Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons and express foreign genes. *Nature Biotechnol* 1998; **16**: 1033–1039.
- [17] GACIONG Z. Immunologia transplantacyjna. [w] JAKÓBISIAK W [red.] Immunologia. Warszawa: PWN 1998:609.
- [18] GAGE FH. Mammalian neural stem cells. *Science* 2000; **287**: 1433–1438.
- [19] GEARHART J. New potential for human embryonic stem cells. *Science* 1998; **282**: 1061–1062.
- [20] GMYR V, KERRCONTE J, BELAICH S, VANDEVALLE B, LETEURTRE MC, LECOMTEHOUCHE M, PROYE C, LEFEBRE J, PATTOU F. Adult human cytokeratin 19-positive cells reexpress insulin promoter factor 1 *in vitro* – Further evidence for pluripotent pancreatic stem cells in humans. *Diabetes* 2000; **49**: 1671–1680.
- [21] GUSSONI E, SONEOKA Y, STRICKLAND CD, BUZNEY EA, KHAN MK, FLINT AF, KUNKEL LM, MULLIGAN RC. Dystrophin expression in the *mdx* mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999; **401**: 390–394.
- [22] HESCHELER J, FLEISCHMANN BK, LENTINI S, MALTSEV VA, ROHWEDDEL J, WOBUS AM, ADDICKS K. Embryonic stem cells: model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovas Res* 1997; **36**: 149–162.
- [23] HUDSON DL, OHARE M, WATT FM, MASTERS JRW. Proliferative heterogeneity in the human prostate: Evidence for epithelial stem cells. *Lab Invest* 2000; **80**: 1243–1250.
- [24] ITSKOVITZ-ELDOR J, SCHULDINER M, KARSENTI D, EDEN A, YANUKA O, AMIT M, SOREQ H, BENVENISTY N. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers. *Molec Med* 2000; **6**: 88–95.
- [25] JACKSON KA, MI T, GOODELL MA. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 14482–14486.
- [26] JOHNSTON DS, RUSSELL LD, GRISWOLD MD. Advances in spermatogonial stem cell transplantation. *Rev Reprod* 2000; **5**: 183–183.
- [27] KELLER GM. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells. *Curr Op Cell Biol* 1995; **7**: 862–869.
- [28] KELLER G, SNODGRASS HR. Human embryonic stem cells: The future is now. *Nature Med* 1999; **5**: 151–152.
- [29] KLUG MG, SOONPAA MH, KOH GY, FIELD LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 1996; **98**: 216–224.
- [30] KOLOSSOV E, FLEISCHMANN BK, LIU Q, BLOCH W, VIATCHENKO- KARPINSKI S, MANZKE O, JI GJ, BOHLEN H, ADDICKS K, HESCHELER J. Functional characteristics of ES cell-derived cardiac precursor cells identified by tissue-specific expression of the green fluorescent protein. *J Cell Biol* 1998; **143**: 2045–2056.
- [31] KOPEN GC, PROCKOP D, PHINNEY DG. Marrow cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 10711–10716.
- [32] LEE SH, LUMELSKY N, STUDER L, AUERBACH JM, MCKAY RD. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from embryonic stem cells. *Nature Biotechnol* 2000; **18**: 675–679.
- [33] LEMISCHKA I. The power of stem cells reconsidered? *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 14193–14195.
- [34] LI M, PEVNY L, LOVELL-BADGE R, SMITH A. Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection. *Curr Biol* 1998; **8**: 971–974.

- [35] MARTIN GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **78**: 7634–7638.
- [36] MATSUI Y, ZSEBO K, HOGAN BLM. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 1992; **70**: 841–847.
- [37] MCKAY R. Stem cells – hype and hope. *Nature* 2000; **406**: 361–364.
- [38] MCLAREN A. Stem cells: golden opportunities with ethical baggage. *Science* 2000; **288**: 1778.
- [39] MEZEY E, CHANDROSS KJ, HARTA G, MAKI RA, MCKERCHER SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated *in vivo* from bone marrow. *Science* 2000; **290**: 1779–1782.
- [40] NAKANO T, KODAMA H, HONJO T. Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* 1994; **265**: 1098–1101.
- [41] PEDERSEN RA. Studies of *in vitro* differentiation with embryonic stem cells. *Reprod Fert Dev* 1994; **6**: 543–552.
- [42] PEREIRA RF, OHARA MD, LAPTEV AF, HALFORD KW, POLLARD MD, CLASS R, SIMON D, LIVEZEY K, PROCKOP DJ. Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 1142–1147.
- [43] PERRON M, HARRIS WA. Retinal stem cells in vertebrates. *BioEssays* 2000; **22**: 685–688.
- [44] PETERSEN BE, BOWEN WC, PATRENE KD, MARS WM, SULLIVAN AK, MURASE N, BOGGS SS, GREENBERGER JS, GOFF JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; **284**: 1168–1170.
- [45] PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, JAISWAL RK, DOUGLAS R, MOSCA JD, MOORMAN RA, SIMONETTI DW, CRAIG S, MARSHAK DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; **284**: 143–147.
- [46] RESNICK JL, BIXLER LS, CHENG L, DONOVAN PJ. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 1992; **359**: 550–551.
- [47] SCHLUDINGER M, YANUKA O, ITSKOVITZ-ELDOR J, MELTON DA, BENVENISTY N. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 11307–11312.
- [48] SHAMBLOTT MJ, AXELMAN J, WANG S, BUGG E, LITTLEFIELD J, DONOVAN PJ, BLUMENTHAL PD, HUGGINS RG, GEARHART JD. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 13726–13731.
- [49] SHINOHARA T, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. $\beta 1$ and $\alpha 6$ -integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 5504–5509.
- [50] SHINOHARA T, ORWIG KE, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 8346–8424.
- [51] SLACK JMW. Stem cells in epithelial tissues. *Science* 2000; **287**: 1431–1433.
- [52] STUDER L, TABAR V, MCKAY RDG. Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nature Neurosci* 1998; **1**: 290–295.
- [53] TANI H, MORRIS RJ, KAUR P. Enrichment for murine keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 10960–10965.
- [54] THEISE ND, BADVE S, SAXENA R, HENEGARIN O, SELL S, CRAWFORD JM, KRAUSE DS. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after irradiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000; **31**: 235–240.
- [55] THOMSON JA, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO SS, WAKNITZ MA, SWIERGIEL JJ, MARSHALL VS, JONES JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; **282**: 1145–1147.

- [56] THOMSON JA, KALISHMAN J, GOLOS G, DURNING M, HARRIS CHP, HEARN JP. Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol Reprod* 1996; **55**: 254–259.
- [57] THOMSON JA, KALISHMAN J, GOLOS TG, DURNING M, HARRIS CHP, BECKER RA, HEARN JP. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 7844–7848.
- [58] TROPEPE V, COLES BL, CHIASSON BJ, HORSFORD DJ, ELIA J, MCINNES RR, VAN DER KOOY D. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* 2000; **287**: 2032–2036.
- [59] VAN DER KOOY D, WEISS S. Why stem cells? *Science* 2000; **287**: 1439–1441.
- [60] WANG R, CLARK R, BAUTCH VL. Embryonic stem cell-derived cystic embryoid bodies form vascular channels: an *in vitro* model of blood vessel development. *Development* 1992; **114**: 303–316.
- [61] WATT FM, HOGAN BLM. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 2000; **287**: 1427–1430.
- [62] WOODBURY D, SCHWARZ EJ, PROCKOP DJ, BLACK IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000; **61**: 364–370.
- [63] YAMASHITA J, ITOH H, HIRASHIMA M, OGAWA M, NISHIKAWA S, YURUGI T, NAITO M, NAKAO K, NISHIKAWA S-I. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 2000; **408**: 92–96.
- [64] ZAWADA WM, CIBELLI JB, CHOI PK, CLARKSON ED, GOLUEKE PJ, WITTA SE, BELL KP, KANE J, DELEON FAP, JERRY DJ ET EL. Somatic cell cloned transgenic bovine neurons for transplantation in parkinsonian rats. *Nature Med.* 1998; **4**: 569–574.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 29.01.2001 r.

Przyjęto: 05.03.2001 r.

Adres autora: Jastrzębiec, 05-552 Wólka Kosowska

e-mail: panighz@atos.warman.com.pl

ROLA TELOMERÓW I TELOMERAZY W PROGRESJI NOWOTWORÓW. PERSPEKTYWY DIAGNOSTYCZNE I TERAPEUTYCZNE

THE ROLE OF TELOMERES AND TELOMERASE
IN TUMOR PROGRESSION.
DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC PERSPECTIVES

Dominika NOWIS, Jakub GOŁĄB

Zakład Immunologii Centrum Biostruktury Akademii Medycznej w Warszawie

Streszczenie: W relatywnie krótkim okresie zagadnienia dotyczące replikacji chromosomów znalazły się w centrum zainteresowania onkologów. Na końcu każdego chromosomu znajdują się powtarzalne sześcionukleotydowe sekwencje określane jako telomery. W związku z pewnymi ograniczeniami replikacji chromosomów, z każdym podziałem komórki dochodzi do stopniowego skracania się telomerów. Proces ten porównywany bywa do zegara mitotycznego odmierzającego czas życia komórek. Zbyt krótkie telomery są sygnałem informującym o starzeniu się i są rozpoznawane przez wyrafinowane mechanizmy jako moment sygnalizujący konieczność wstrzymania dalszych podziałów. Komórki nowotworowe, które potrafią ominąć ten etap, przekraczają próg nieśmiertelności. W artykule tym opisano mechanizmy odpowiedzialne za replikację telomerów, umożliwiające nieograniczoną proliferację komórek nowotworowych oraz perspektywy diagnostyczne i terapeutyczne z tym związane.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28: 243–261)

Słowa kluczowe: telomery, telomeraza, nowotwory

Summary: In a relatively short term the problem of chromosome replication has focused a wide attention within oncologists. The ends of chromosomes are capped by a hexanucleotide repeat sequences of nucleotides, referred to as telomeres. Due to the polarity of conventional DNA synthesis, a loss of telomeric sequences occurs at each cell division. This telomeric erosion is frequently compared to a mitotic clock that elicits a signal for the onset of cellular senescence. Tumor cells have acquired the capacity to proliferate beyond the senescence checkpoint. This article describes the mechanisms responsible for telomere replication that enables indefinite proliferation of tumor cells and discuss the potential use of telomerase in diagnosis and treatment.

(*Advances in Cell Biology* 2001; 28: 243–261)

Key words: telomeres, telomerase, tumors

1. PARĘ SŁÓW O HISTORII

Jeszcze do 1961 roku cały świat naukowy podpisywał się pod stwierdzeniem wybitnego francuskiego chirurga Alexisa Carrela, że komórki hodowane *in vitro* są nieśmiertelne, a tylko ignorancja i brak wiedzy o optymalnych warunkach ich hodowli prowadzi do wyginięcia kultur. Dopiero Leonard Hayflick w pracy opublikowanej w 1961 roku w *Experimental Cell Research* (po kilkukrotnym odrzuceniu przez inne pisma) dowiódł, że ludzkie fibroblasty dzielą się skończoną ilość razy, a liczbę tę w 1974 roku MacFarlane Burnett nazwał „limitem Hayflicka”. Do wyjaśnienia pozostał jednak mechanizm odliczania wieku komórki. W 1972 roku James Watson – jeden z odkrywców struktury DNA – zwrócił uwagę na tzw. problem replikacji końców. W tym samym czasie Aleksiej Ołownikow podczas podróży moskiewskim metrem wpadł na pomysł, że to właśnie skracanie telomerów (odkrytych w latach trzydziestych dwudziestego wieku przez Barbarę McClintock i Hermanna J. Mullera) jest przyczyną starzenia się komórek. Od tego czasu zaczęła się „złota era” biologii molekularnej. Dla naszych dalszych rozważań istotne jest także opisanie w 1978 roku przez Elizabeth Blackburn dokładnej struktury telomerów orzęsków i odkrycie przez nią i Carol Greider enzymu wydłużającego końce chromosomów – telomerazy [27].

2. PROBLEM REPLIKACJI KOŃCÓW

W każdej komórce somatycznej człowieka znajduje się 46 liniowych chromosomów. Wiadomo, że liniowe chromosomy są znacznie mniej stabilne niż koliste, spotykane choćby w postaci plazmidów. Dlaczego zatem taka mniej stabilna struktura zachowała się w toku ewolucji przez miliony lat? Okazuje się, że właśnie dzięki tej „słabszej” stabilności możliwe jest częste (oczywiście tylko w perspektywie ewolucji) zachodzenie rekombinacji oraz przypadkowych translokacji międzychromosomalnych, warunkujących występowanie różnorodności genetycznej żyjących organizmów. Ceną, jaką płacą za to chromosomy liniowe, jest ich niestabilność, wynikająca z podatności końców 3' oraz 5' na nukleolityczne działanie szeregu enzymów degradujących DNA. Drugim, kto wie czy nie ważniejszym, problemem związanym z istnieniem liniowych chromosomów jest możliwość ich fuzji. Ta pozorna słabość chromosomów liniowych rekompensowana jest wykształceniem niezwykle wyrafinowanych struktur zlokalizowanych na ich końcach, składających się z DNA oraz szeregu białek strukturalnych i enzymów. Owe końce

chromosomów, czyli telomery są zbudowane z powtarzających się sekwencji niekodującego DNA. Ich struktura i długość są w niewielkim stopniu zróżnicowane gatunkowo (tab. 1).

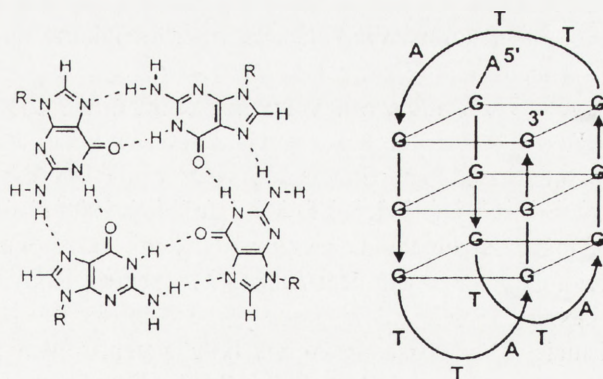
Ludzkie telomery mają długość do 25000 bp [11] i są zbudowane z powtarzających się heksanukleotydów TTAGGG. Liczba powtórzeń różni się pomiędzy chromosomami tej samej komórki, w obrębie populacji jednak zawsze pozostaje w ściśle określonym przedziale [30]. Oprócz ochrony chromosomu przed degradacją, zmianą struktury i fuzją z innymi chromosomami, telomery biorą także udział w przestrzennej organizacji jądra komórkowego, segregacji chromosomów podczas podziału komórki i regulacji transkrypcji genów zlokalizowanych w ich pobliżu [30]. Coraz częściej podkreśla się rolę telomerów jako magazynów białek uczestniczących w naprawie DNA. Z telomerami ssaków wiążą się białka Ku oraz (poprzez TRF2 – patrz niżej) kompleks uczestniczący w usuwaniu uszkodzeń DNA – RAD50/MRE11/NBS1 [23, 33].

Większość telomerowego DNA jest dwuniciowa, ale istnieją także fragmenty jednoniciowe. W komórkach ssaków mają one długość od ok. 50 do ok. 150 nukleotydów [8] i tworzą nietypowe połączenia zasad guaninowych – czteroniciowe formy przestrzenne zwane kwartetami G [22] (ryc. 1).

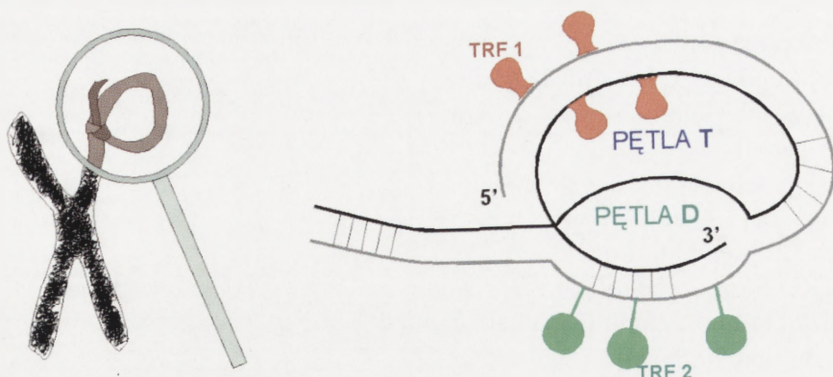
Stabilizacja chromosomu zależy od niekowalencyjnego wiązania szeregu białek do jedno- i dwuniciowych fragmentów telomeru. Nie znamy jeszcze białek ssaków powiązanych z jednoniciowym DNA (ich identyfikację przeprowadzono u drożdży

TABELA 1. Zestawienie różnic w budowie telomerów u przedstawicieli różnych gatunków [29]

	Organizm	Podstawowa sekwencja
Orzęski	<i>Tetrahymena</i>	TTGGGG
Plazińce	–	TTAGG
Nicieńie	<i>Ascaris lumbricoides</i>	TTAGGC
Grzyby	<i>Neurospora</i>	TTAGGG
Kregowce	mysz człowiek	TTAGGG TTAGGG



RYCINA 1. Struktura G-kwartetu – cztery guaniny tworzą czworoboczną płaską strukturę – są zarówno donorem i akceptorem wiązania wodorowego Hoogsteen [22]

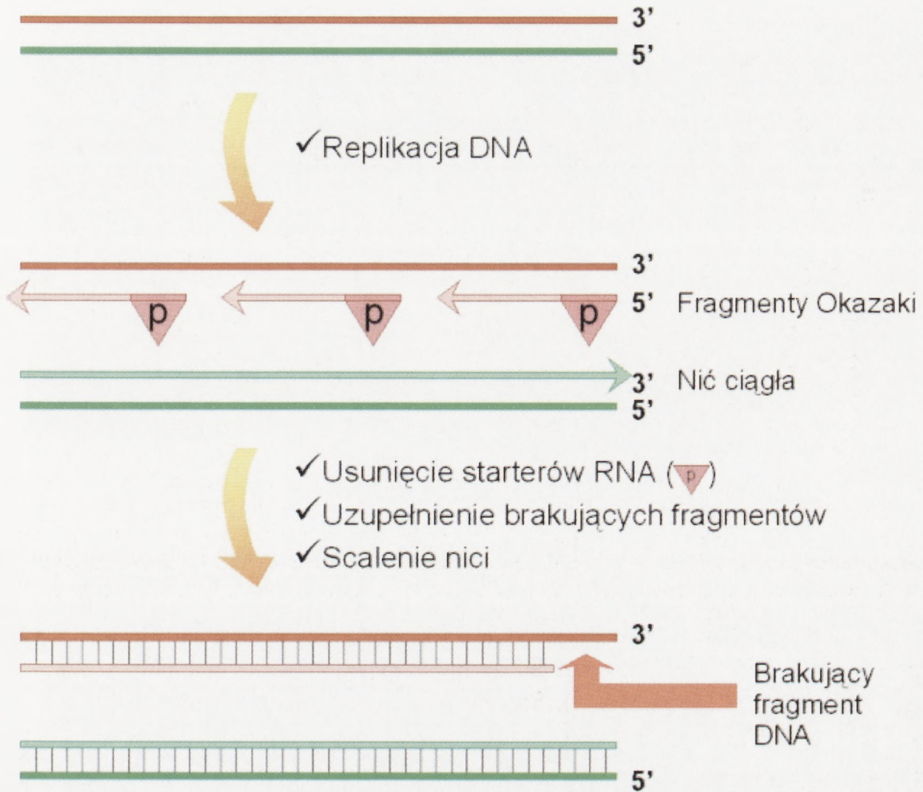


RYCINA 2. Struktura przestrzenna telomeru – tworzenie pętli [8]: Po lewej stronie pokazano schematycznie tworzenie przez telomerowe DNA struktury o budowie lassa – pętli T. Pętla ta spełnia funkcję ochronną w stosunku do końców chromosomów. Po stronie prawej przedstawiono tworzenie przez końce telomerów podwójnej pętli. Wolny koniec 3' zawija się i wchodzi w interakcję z fragmentem podwójnej nici DNA. Powstaje w ten sposób tzw. pętla D; TRF1, TRF2 – białka towarzyszące telomerom

Saccharomyces). Z dwuniciowym DNA łączą się zaś białka TRF1 i TRF2 (ang. *TTAGGG repeat binding factors*). Są one negatywnymi regulatorami długości telomerów [28]. Białko TRF1 ma strukturę podobną do białka Myb, ale najprawdopodobniej nie odgrywa żadnej roli w onkogenezie. TRF2, białko o podobnej strukturze, chroni chromosomy przed fuzją poprzez zachowanie jednoniciowej struktury końców telomerów. Oba czynniki nie wpływają na poziom ekspresji telomerazy. W okolicy porów jądrowych i centrosomu odkryto także obecność tankyrazy (ang. *TRF1-interacting, AKNyrin-related ADP-ribose polymerase*), która może uczestniczyć w przekazywaniu sygnałów do telomerów [8]. Z telomerami wchodzi w interakcję również heterodimer Ku (podjednostka kinazy białkowej zależnej od DNA) i TIN2 (ang. *TRF1-interacting nuclear protein*) [8]. Jednoniciowe DNA telomerów tworzy pętlę T, która zaburzając strukturę dwuniciową, daje w rezultacie pętlę D (ang. *displacement*) – (patrz: ryc. 2).

Podczas każdego cyklu replikacyjnego komórka traci od 50 do 200 nukleotydów z telomerowego DNA. Przyczyna tego zjawiska leży w samej zasadzie działania eukariotycznej polimerazy DNA. Enzym ten syntetyzuje DNA tylko w kierunku $5' \rightarrow 3'$ nowej nici (jest spolaryzowany) i w odróżnieniu od polimeraz RNA potrzebuje primera także na końcu 3' nici macierzystej. Jak pokazano na rycinie 3, do każdej nici matczynego DNA przyłącza się primer RNA zsyntetyzowany przez prymazę DNA.

Do replikacji nici wiodącej jest potrzebny tylko jeden primer, podczas gdy dla nici opóźnionej, syntetyzowanej z około 200-nukleotydowych fragmentów Okazaki potrzeba ich znacznie więcej. Synteza fragmentu DNA zachodzi do momentu, gdy

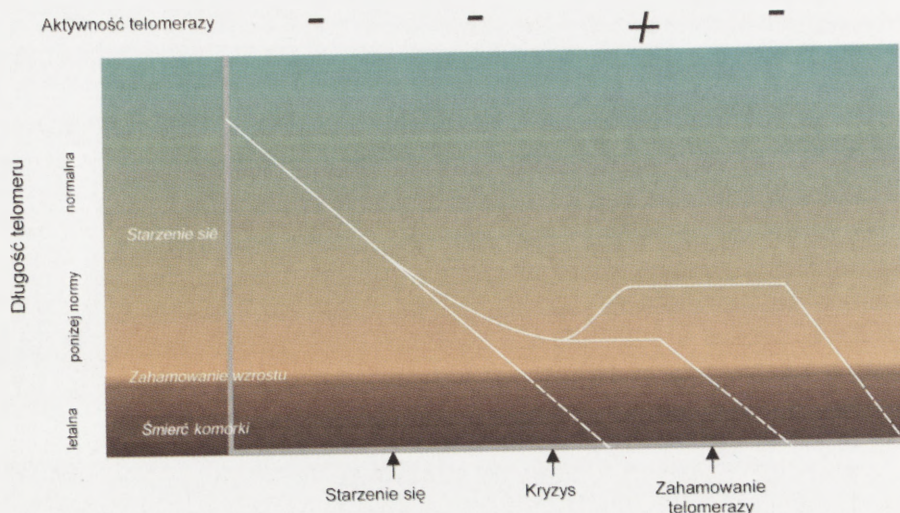


RYCINA 3. Problem replikacji końców: Nici rodzicielskie zostały przedstawione w kolorze ciemniejszym, nici potomne – w jaśniejszym. Wiele primerów RNA jest potrzebnych do zainicjowania syntezy nici opóźnionej. Jest ona tworzona z tzw. fragmentów Okazaki o długości kilkuset par zasad. Usunięcie primerów prowadzi do wytworzenia ubytków, które są uzupełniane przez mechanizmy komórkowe. Na końcu 5' jednej z nowo powstałych nici proces uzupełnienia ubytku nie może zajść. Wynika to z właściwości polimerazy DNA

enzym rozpoznaje koniec 5' poprzedniego primera. Ciągłość nici jest zachowana dzięki mechanizmom usuwającym primery i zastępującym je DNA. Proces ten zawodzi na końcu 5' i w ten sposób powstają naddatki na końcach 3' nowych nici zbudowane z jednoniciowego DNA bogatego w zasady guaninowe.

Stopniowa utrata telomerowego DNA wydaje się być jednym z kluczowych mechanizmów odliczających wiek komórki. Gdy telomery osiągną krytyczną długość, komórka wchodzi w etap zwany starzeniem. Uważa się, że skracanie telomerów może być ściśle powiązane z zahamowaniem cyklu komórkowego zależnym od białka p53 [26].

Każda komórka somatyczna podczas hodowli *in vitro* dzieli się skończoną liczbę razy (ludzkie fibroblasty średnio 50), po czym wchodzi w etap życia zwany starzeniem



RYCINA 4. Główne etapy życia komórki [6]: Schemat przedstawia model życia ludzkiej komórki. Telomery skracają się podczas podziałów komórki. Kiedy osiągną odpowiednią długość, komórka wchodzi w etap zwany starzeniem. Gdy proces skracania telomerów postępuje nadal i ich długość staje się letalna, dochodzi do zaburzenia struktury chromosomów i śmierci komórki. Opisane w tekście mechanizmy mogą ingerować w przedstawiony scenariusz.

lub stadium M1 (ryc. 4). Traci ona zdolność proliferacyjną, ale zachowuje cechy biochemiczne i żywotność. Bariere starzenia można pokonać przy pomocy mutagenów, genów wirusowych (adenowirus E1A, duży antygen T wirusa SV) lub poprzez zmianę ekspresji takich własnych genów komórki, jak *c-Myc* lub *p21*. Wymienione procesy nie zapewniają jednak komórce nieśmiertelności, ale tylko wydłużają jej życie. Po pewnym czasie komórka zmienia morfologię, jej chromosomy tracą stabilność i zaczyna się okres określany jako kryzys (stadium M2). Jej los nie jest jednak do końca przesądzony. Gdy do opisanych zmian genomowych dołączy się także uaktywnienie telomerazy, komórka przekracza próg nieśmiertelności [6].

3. BUDOWA KOMPLEKSU TELOMERAZY

Ludzka telomeraza jest holoenzymem zbudowanym z białkowej podjednostki katalitycznej – polimerazy DNA zależnej od RNA (odwrotnej transkryptazy – hTERT), która używa własnej matrycy RNA (hTR) do wydłużania końca 3' jednoniciowego fragmentu telomeru przez syntezę powtórzeń telomerowych *de novo* [30].

3.1. Składnik RNA ludzkiej telomerazy – hTR (hTERC)

Analiza genu kodującego matrycę RNA (dłuższe ramię chromosomu 3, obszar 3q26.3) wykazała, że zawiera ona sekwencję 3'-CAAUCCCAAUC-5' [8]. Jest to sekwencja komplementarna do jednego heksanukleotydu (powtórzenia) i fragmentu następnego, który umożliwia „umocowanie” matrycy w kompleksie enzymatycznym [30]. Choć opisana sekwencja jest ściśle konserwatywna w świecie zwierząt, budowa całej podjednostki RNA znacznie różni się między gatunkami [4].

Ekspresja genu dla hTR jest regulowana prawdopodobnie za pomocą metylacji DNA, gdyż stwierdzono obecność wysp CpG w jego regionie promotorowym [8].

Ludzka podjednostka RNA jest transkryptem polimerazy II [6]. Ma długość ok. 450 nukleotydów, jednak po odjęciu domeny snRNA (*small nucleolar RNA*) pozostaje zaledwie 210 nukleotydów [6]. Podjednostka ta ma dwie domeny funkcjonalne: domenę 5' – matrycę dla elongacji i domenę 3' – wiążącą substrat reakcji [2]. Funkcją podjednostki RNA, oprócz oczywistej – jest ona matrycą dla syntezy brakujących fragmentów telomerów – może być udział w wiązaniu innych składowych kompleksu (np. u *S. cerevisiae* łączy ona białka Sm uczestniczące w obróbce potranskrypcyjnej RNA) – brak jeszcze dowodów na potwierdzenie tej hipotezy [6].

3.2. Podjednostka katalityczna – TERT (odwrotna transkryptaza)

TERT tworzy nową klasę odwrotnych transkryptaz o odmiennej strukturze i pochodzeniu od retrowirusowych. Dowodem prawdziwości tej hipotezy są dyskretnie różnice w sekwencji aminokwasowej enzymów. W porównaniu z innymi odwrotnymi transkryptazami, TERT jest najbardziej zbliżony do fragmentów DNA mitochondrialnego i retrotranspozonów typu non-LTR. Postuluje się, że historia tego enzymu jest tak długa jak eukariontów [6].

Ludzka odwrotna transkryptaza (hTERT) jest zbudowana z tak zwanej domeny T i siedmiu sekwencji konserwatywnych dla innych odwrotnych transkryptaz [8] (ryc. 5).



RYCINA 5. Sekwencja peptydowa hTERT: T – motyw specyficzny dla telomerazy 1,2, A-E – motywy wspólne dla odwrotnych transkryptaz

TABELA 2. Regulacja ekspresji genu dla podjednostki katalitycznej ludzkiej telomerazy

Regulacja ekspresji genu dla hTERT	
Tlenek azotu	
Fosforylacja	
Alternatywne cięcie i składanie pierwotnego transkryptu	
Regulacja pozytywna	Regulacja negatywna
Białko c-myc	Metylacja promotora
Estrogeny	Wzrost stężenia wapnia w komórce

Czynniki regulujące ekspresję genu dla podjednostki katalitycznej ludzkiej telomerazy pokrótce przedstawiono w tabeli 2.

3.3. Białka towarzyszące TERT

W komórkach pierwotniaków (*Tetrahymena*) opisano dwa białka towarzyszące TERT – 80 kD i 95 kD. U drożdży znaleziono białka Est1p i Est 3p [8]. W komórkach ssaków, myszy i szczurów zidentyfikowano TP1/TLP1 (hTEP-1 nazwa zarezerwowana dla białka ludzkiego) – homolog białka o masie 80 kD występującego u orzęsków. Podobnie jak w przypadku hTERT, ekspresja tego białka nie koreluje dodatnio z aktywnością telomerazową [13]. Ostatnio ustalono, że TLP1 jest identyczne z *vaults* – 240-kD podjednostką dużego kompleksu rybonukleoproteinowego o nieznanym celu [17].

4. REGULACJA AKTYWNOŚCI TELOMERAZY

Choć telomeraza wydaje się być niezbędna do progresywnego wzrostu i nieustannej proliferacji komórek nowotworowych, to egzogenna ekspresja tego enzymu w komórkach prawidłowych wydłuża ich życie, ale nie promuje zmian typowych dla transformacji nowotworowej. Telomeraza nie jest jednak onkogenem. Jej obecność umożliwia proliferację, ale jej nie powoduje [30]. Większość prawidłowych komórek pozbawionych aktywności telomerazowej nie ma także hTERT, chociaż wykrywa się w nich ekspresję hTR lub białek związanych z telomerazą [30]. Sugeruje to, że czynnikiem odpowiedzialnym za aktywność telomerazy jest jej podjednostka katalityczna i właśnie regulacja ekspresji hTERT jest kluczowa dla wydłużenia potencjału proliferacyjnego komórki [30].

Wiele komórek ma aktywność telomerazową w stadium embrionalnym i traci ją podczas różnicowania tkankowego. Istnieją jednak komórki, które zachowują

TABELA 3. Zestawienie substancji zmniejszających aktywność telomerazy

Substancje zmniejszające aktywność telomerazy		
Substancje indukujące różnicowanie	Chemioterapeutyki przeciwnowotworowe	Inne
25-dihydroksy witamina D3 Kwas all-trans retinowy Estry forbolu (TPA) Dwumetylosulfotlenek (DMSO)	Cisplatyna Duże dawki cyklofosfamidu Duże dawki dokсорubicyny Tamoksyfen	Inhibitory odwrotnej transkryptazy (AZT) Androgeny Antagoniści GHRH Wolne rodniki tlenowe Transfekcja chromosomu 3 Amifostyna Heparyna

aktywność enzymu do końca życia osobniczego. Należą do nich między innymi aktywowane limfocyty oraz komórki macierzyste [32].

Mechanizmy regulacji aktywności telomerazy pozostają dotychczas nie do końca wyjaśnione. Sugeruje się udział bliżej niesprecyzowanych genów represorowych, zlokalizowanych na krótkim ramieniu chromosomu 3 [7].

Wzrost aktywności enzymu na poziomie transkrypcji jest zależny m.in. od bezpośredniej interakcji produktu onkogenu c-Myc z regionem promotorowym genu dla telomerazy [34]. Ważną rolę odgrywa także alternatywne cięcie i składanie pierwotnego transkryptu. W regulacji posttranslacyjnej telomerazy kluczową rolę pełnią kinazy białkowe serynowo-treoninowe. Fosforylacja hTERT jest niezbędna dla prawidłowej aktywności enzymu [30].

W związku z intensyfikacją w ostatnich latach badań nad tlenkiem azotu, zbadano wpływ tej substancji na aktywność telomerazy. Okazało się, że jednym z mechanizmów opóźnienia starzenia się komórek śródbłonna przez tlenek azotu jest właśnie aktywacja telomerazy [31].

Istnieją doniesienia o możliwości zahamowania ekspresji telomerazy przez wpływ na receptor estrogenowy beta. Skuteczne pod tym względem okazały się również liczne inne substancje (tab. 3), z których część to środki stosowane w leczeniu nowotworów (niektóre cytostatyki, substancje indukujące różnicowanie komórek) [21]. Ponadto, poznano wiele substancji mających właściwości zwiększania aktywności telomerazy (tab. 4). Niektóre spośród

TABELA 4. Zestawienie substancji zwiększających aktywność telomerazy

Substancje zwiększające aktywność telomerazy
Antygeny aktywujące limfocyty T
Karcynogeny chemiczne
Mutacje w obrębie genu kodującego telomerazę
Promieniowanie γ
Zwiększona ekspresja myc
Kinaza białkowa c
Tankyraza
Estrogeny
Czynnik wzrostu naskórka (EGF)

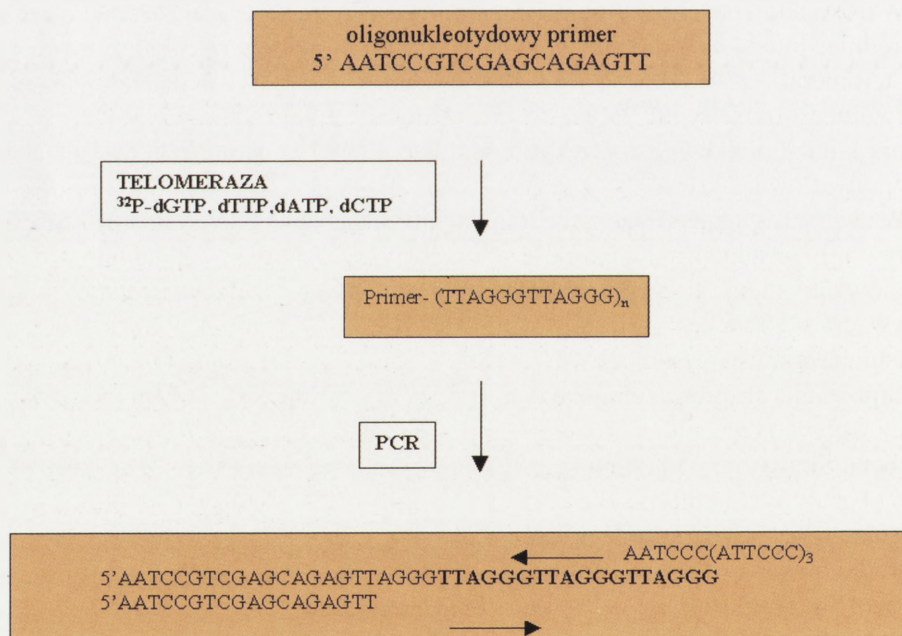
nich odgrywają ważną rolę w procesach transformacji nowotworowej (karcynogeny chemiczne, EGF, estrogeny).

5. OZNACZANIE AKTYWNOŚCI TELOMERAZY

Na przestrzeni ostatnich lat wprowadzono do powszechnego użycia wiele testów określających długość telomerów, aktywność telomerazy i wykrywających składniki kompleksu enzymatycznego (hTR, hTERT).

5.1. Badanie aktywności telomerazy

Oryginalna metoda oznaczania aktywności telomerazy opiera się na zasadzie wydłużania primerów. Polega ona na dodawaniu przez telomerazę sekwencji (5'-TTAGGG)_n do primerów oligonukleotydydowych. Jest wystarczająca dla oceny aktywności enzymu w hodowlach komórkowych, niestety, nie jest dostatecznie czuła dla małej liczby komórek z próbek materiału klinicznego [22]. Niedogodność ta



RYCINA 6. Zasada oznaczania aktywności telomerazowej metodą TRAP: Telomeraza syntetyzuje nowy odcinek DNA, dołączając znakowane izotopem fosforu nukleotydy do oligonukleotydydowego primera. Powstały produkt jest następnie amplifikowany przy pomocy PCR. Zastosowanie reakcji łańcuchowej polimeryzacji ułatwia wykrycie produktu, a tym samym potwierdza aktywność enzymu

została wyeliminowana w metodzie TRAP (*telomeric repeat amplification protocol*), wykorzystującej reakcję PCR dla namnożenia produktu działania telomerazy. Do oznaczenia aktywności telomerazy potrzeba tylko od 100 do 1000 komórek w badanym materiale. Skrótowy schemat procesu przedstawiono na rysunku 6.

Modyfikacją opisanej metody jest test TRAP-eze™ (Oncor Inc.), wykorzystujący primer TS i odwrotny primer CX, zakończony elektroforezą na żelu poliakrylamidowym (PAGE). Inne odmiany wprowadzają fragmenty wewnętrzne o długości 150 bp zapewniające linijność próbki i wykrycie inhibitorów polimerazy *Taq*. Istnieją także testy o primerach znakowanych fluorescencyjnie, umożliwiające detekcję aktywności telomerazowej *in situ* [22], która wydaje się być skutecznym prognostykiem pojawienia się guza *de novo* [9].

5.2. Oznaczanie długości telomerów

Większość testów wykorzystuje technikę Southern blot do określania liczby i długości powtarzających się fragmentów końcowych (TRF). Fragmenty rozpoznające telomery są znakowane radioaktywnym izotopem fosforu, a genomowe DNA jest trawione odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi. Istnieje także możliwość znakowania telomerów za pomocą techniki FISH [30].

6. IMPLIKACJE DIAGNOSTYCZNE

Dzięki „popularności” telomerazy w ostatnich latach opublikowano szereg prac opisujących poziom ekspresji tego enzymu w rozmaitych liniach komórek prawidłowych i stransformowanych. Okazało się, że telomeraza nie może być bezwzględnym wyznacznikiem transformacji złośliwej, mimo iż dość ściśle koreluje z nowotworzeniem. Wiadomo nie od dziś, że szereg prawidłowych tkanek wykazuje pewien poziom aktywności telomerazy. Często pozostają one w bliskim kontakcie z ogniskami nowotworzenia, co przy zastosowaniu niezwykle czułych metod oznaczania aktywności telomerazy (TRAP) może nastęrczać dość poważnych trudności interpretacyjnych. A waga orzeczenia o przemianie złośliwej jest przecież ogromna. W tabeli 5 zestawiono ostatnie dane dotyczące występowania aktywności telomerazowej w szeregu tkanek prawidłowych i nowotworowych.

Lokalizacja niektórych nowotworów (np. nowotwory układu rozrodczego) utrudnia wykorzystanie telomerazy jako markera diagnostycznego. Dotyczy to tkanek odnawialnych, posiadających komórki pnia i wyżej wymienionych komórek rozrodczych. Także istnienie mechanizmów wydłużania telomerów alternatywnych dla telomerazy stawia pod znakiem zapytania stuprocentową skuteczność rozpoznania procesu nowotworowego za pomocą oznaczania aktywności enzymu.

TABELA 5. Obecność aktywności telomerazowej w wybranych tkankach i nowotworach [8]

Tkanki prawidłowe	% obecności telomerazy		Patologia	% obecności telomerazy	
Blona śluzowa jamy ustnej	0/14	0	Gruczolak przysadki	0/36	0
Próbka żółci	1/19	0	Szpiczak	0/6	0
Wątroba	0/6	0	Włókniakogruczolak sutka	23/51	45
Mózg	0/10	0	Rak kolczystokomórkowy skóry	9/18	50
Prawidłowy melanocyt	0/10	0	Rak okrężnicy	395/473	58
Jajnik	0/8	0	<i>Glioblastoma multiforme</i>	146/227	64
Nerka	0/114	0	Rak prostaty	170/207	82
Nadnercze	0/43	0	Rak żołądka	133/153	87
Tarczycza	2/64	3	Rak sutka	363/417	87
Tkanka płucna	7/190	4	Rak z kom. wątroby	221/248	89
Prostata	2/38	5	Rak endometrium	93/104	89
Urothelium	9/183	5	Rak trzustki	23/31	91
Sutek	4/36	11	Rak szyjki macicy	198/213	93
Naskórek	30/115	26	Rak drobnokomórkowy płuca	3/3	100
Endometrium-faza wydzielnicza	24/73	33	Choriocarcinoma	7/7	100
Endometrium - faza proliferacyjna	77/85	91	Złośliwy guz nadnerczy	9/9	100

Postuluje się wprowadzenie oznaczania telomerazy do badań przesiewowych materiału biopsji cienkoigłowych. Na przykład, istnieją doniesienia o znaczącym wzroście ekspresji hTR w komórkach błony śluzowej żołądka przy zakażeniu *Helicobacter pylori*. Wskazywałoby to na udział bakterii w procesie nowotworzenia [15]. Droga do doskonałości jest tu jeszcze daleka. Przy zastosowaniu metody TRAP wystarczy zaledwie 0,01% komórek wykazujących ekspresję telomerazy (patrz wyżej). Nietrudno wyobrazić sobie tak niewielkie zanieczyszczenie próbki na przykład komórkami macierzystymi lub nawet aktywowanymi limfocytami.

7. ALTERNATYWNE METODY WYDŁUŻANIA TELOMERÓW (ALT)

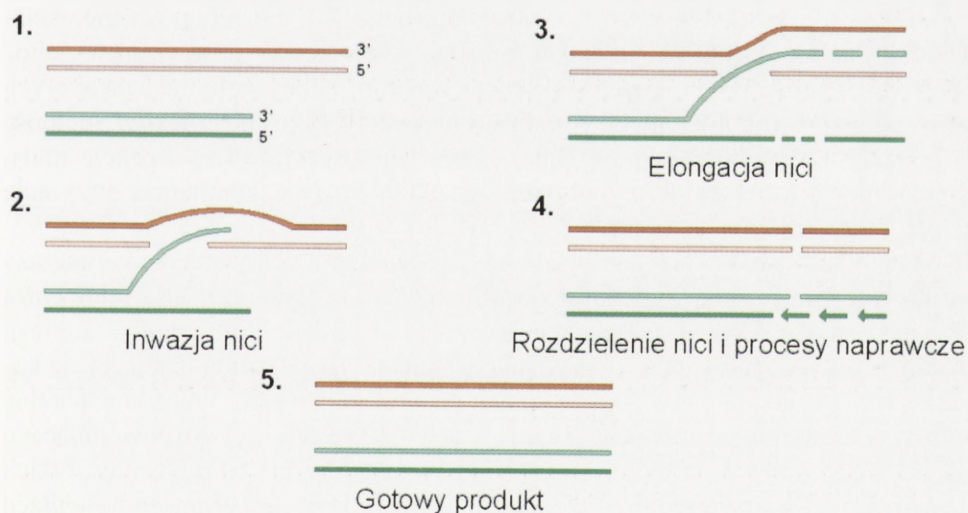
Nie od dzisiaj wiemy, że obecność telomerazy nie jest jedynym mechanizmem chroniącym telomery przed skracaniem. Istnieje co najmniej kilka sposobów na wybrnięcie z problemu replikacji końców liniowego DNA. Wystarczy wymienić dla przykładu priming białkowy, strukturę spinki do włosów, konwersję genową i rekombinację [36]. Istnieją wyniki eksperymentów, potwierdzające występowanie

TABELA 6. Występowanie telomerazy i mechanizmów ALT w ludzkich nowotworach [9]

Występowanie telomerazy i mechanizmów ALT w nowotworach				
Typ nowotworu	Liczba próbek	Liczba próbek telomerozo-ujemnych (%)	Liczba próbek o nadzwyczaj długich fragmentach TRF	
			Telomeraza (+)	Telomeraza (-)
Czerniak	9	1(11)	0	1
Kostniakomięsak	6	5(83)	1	0
Rak sutka	14	4(29)	1	0
Rak jajnika	15	2(13)	0	2
Rak płuc	7	1(14)	0	0
Rak kory nadnerczy	6	5(83)	2	0
Ogółem	57	18(31)	4	3

opisanych mechanizmów [3] (tab. 6). Komórki nieśmiertelne pozbawione genu dla telomerazy mają, jak wykazały badania, wybitnie długie i heterogenne telomery.

Istnieje co najmniej kilka sposobów rekombinacji telomerów, na razie potwierdzonych badaniami na drożdżach. Jednym z nich jest rekombinacja fragmentów homologicznych i konwersja genowa, przedstawione schematycznie na rycinie 7. Mechanizmy te są zależne od ekspresji grupy genów RAD52. Istnieją dwa typy rekombinacji – typ pierwszy polegający na konwersji genowej elementów sąsia-



RYCINA 7. Konwersja genów jako jeden z mechanizmów wydłużania telomerów bez udziału telomerazy: Sekwencje końców chromosomów są wysoce powtarzalne, a nawet niekiedy identyczne. Koniec 3' jednego chromosomu może dokonać ataku na drugi chromosom (2) i użyć jego sekwencji jako matrycy dla komórkowej polimerazy DNA (3). Synteza brakującego końca 3' zachodzi podobnie do syntezy nici opóźnionej (4). Uzupełnienie brakujących fragmentów nici odbywa się przy udziale typowych mechanizmów naprawczych (5)

dujących z telomerami (seq Y'); typ drugi dotyczy powtarzających się sekwencji samych telomerów [4]. U ssaków zjawiska te zbadano w komórkach ALT nie mających telomerazy, o wyjątkowo długich i wysoce zmiennych telomerach. Komórki te mają tzw. ciała PML (*promyelocytic leukemia*), struktury o kształcie donuta zawierające telomerowe DNA, białka TRF1, TRF2, czynnik replikacji A i ludzkie formy RAD51 i RAD 52. Wykazano także, że u osób z zespołem Li-Fraumeni (heterozygoty dla zmutowanego p53) po mutacji lub utracie drugiego p53 dochodzi do spontanicznego unieśmiertelnienia komórek [35].

Problem alternatywnych mechanizmów wydłużania telomerów może odgrywać kluczową rolę w niepowodzeniach terapii przeciwnowotworowej wymierzonej w telomerazę.

8. W JAKI SPOSÓB TELOMERAZA UMOŻLIWIA WZROST NOWOTWOROM?

Telomeraza jest obecna w większości nowotworów człowieka. Charakterystyczne dla komórek nowotworowych są jednak bardzo krótkie telomery. Wydaje się, że większość nowotworów powstaje ze zmian, w których aktywność telomerazy jest znikoma, jeśli w ogóle wykrywalna.

Jak wspomniano, telomeraza nie jest onkogenem. Nie można jej również sklasyfikować jako typowy anty-onkogen (czynnik supresorowy nowotworów), choć pełni szereg funkcji ochronnych względem genomu. Klony komórek, do których wprowadzono gen dla telomerazy, mają co najmniej trzykrotnie większą zdolność do podziałów, a jednocześnie są nadal całkowicie prawidłowe w aspekcie transformacji nowotworowej. W wyniku zachowania telomerów, telomeraza utrzymuje stabilność genetyczną komórki.

Wiele obserwacji wskazuje również na to, że moment uaktywnienia telomerazy jest krytycznie ważnym czynnikiem determinującym los komórki. Jeśli telomeraza aktywna jest przed aktywacją onkogeny, to rzeczywiście pełni rolę czynnika supresji nowotworów głównie poprzez utrzymanie stabilności genetycznej dzielącej się komórki. Jeśli jednak najpierw dojdzie do uaktywnienia onkogeny (mutacja w obrębie genu *ras*, pojawienie się onkogenów wirusowych – HPV E6/E7, SV40) powodującego transformację, podziały komórek i skracanie się telomerów do ich krytycznie krótkich długości, to telomeraza może „nie zdążyć” ochronić końców chromosomów przed nagłą niestabilnością genetyczną. Jeśli jednak rozpocznie w tym momencie wydłużanie chromosomów i doprowadzi do odtworzenia telomerów, to może utrwalić zaburzenia już powstałe w genomie. Zaburzenia te nie muszą być na tyle nasilone, aby uniemożliwić przeżycie komórki, ale na tyle katastrofalne w skutkach, że będą

sprzyjać pełnej transformacji nowotworowej (na przykład translokacje i amplifikacje protoonkogenów).

A zatem w procesie progresji nowotworowej, gdy w wyniku podziałów komórek dochodzi do stopniowego skracania się telomerów, nadchodzi moment, gdy stają się one krytycznie krótkie. W większości wypadków doprowadza to do uaktywnienia p53 lub pRb, powodując zahamowanie proliferacji komórek i uniemożliwiając dalszą progresję nowotworu. Brak w tym momencie (w wyniku mutacji lub zahamowania aktywności) p53 lub pRb umożliwia nie tylko dalsze podziały komórek, ale również szereg zaburzeń genetycznych wynikających z niechronionych telomerami końców chromosomów [1]. Większość powstających translokacji i fuzji chromosomów jest letalna dla komórek, ale w niektórych spośród nich dochodzi do powstania poważnych uszkodzeń mechanizmów chroniących przed progresją nowotworową. Jeśli w części spośród tych komórek dojdzie (za pomocą jakiegokolwiek mechanizmu) do uaktywnienia telomerazy, to możliwe jest zabezpieczenie telomerów na tyle, że nie powstają kolejne, coraz bardziej letalne mutacje, a możliwa jest proliferacja i dalsza progresja guza. A zatem w trakcie powstawania nowotworu, w dość wczesnym etapie dochodzi do poważnej niestabilności genetycznej, po której następuje utrwalenie sprzyjających progresji nowotworowej zmian.

Co ciekawe, u myszy transgenicznych, nie mających genu dla telomerazy ($mTR^{-/-}$), obserwuje się częstsze powstawanie spontanicznych nowotworów [20]. Podobnie, brak telomerazy na tle niedoboru p53 znacznie zwiększa częstość powstawania nowotworów u myszy [5]. Obserwacje te wydają się zatem potwierdzać hipotezę zakładającą protekcyjny wpływ telomerazy na proces transformacji nowotworowej, przynajmniej we wczesnych etapach tego procesu. Z drugiej strony u podwójnie transgenicznych myszy nie mających ani telomerazy, ani INK4a (jeden z czynników supresji nowotworów) znacznie rzadziej powstają nowotwory niż u myszy mających tylko delecję INK4a [10].

Okazuje się, że ludzkie fibroblasty lub komórki nabłonkowe można przekształcić w komórki nowotworowe *in vitro* wprowadzając do nich zaledwie trzy geny zaburzające co najmniej 4 niezależne procesy. Do transformacji *in vitro* potrzebne są geny kodujące: protoonkogen *H-ras*, wielki antygen T wirusa SV40 (hamujący aktywność p53 oraz pRb) oraz telomerazę. Do transformacji mysich komórek wystarczają tylko dwa pierwsze geny. Wynika to z co najmniej 5-krotnie dłuższych telomerów mysich.

9. STRATEGIE W HAMOWANIU TELOMERAZY

Telomeraza jest obecna i aktywna w większości nowotworów człowieka. Jednocześnie jest praktycznie niewykrywalna w prawidłowych komórkach (z nieli-

cznymi opisanymi powyżej wyjątkami). Mało tego, wiele obserwacji wskazuje, że telomeraza nie jest jedynie zwykłym markerem komórek nowotworowych. Jest aktywna i wydaje się niezbędna do progresywnego wzrostu guzów. Trudno zatem wyobrazić sobie bardziej idealny cel terapii przeciwnowotworowej. Co więcej, jeśli okazałoby się, iż rzeczywiście hamując telomerazę można zahamować wzrost nowotworów, strategia ta byłaby uniwersalna – umożliwiłaby leczenie niemal każdego (!) nowotworu.

Pojawienie się telomerazy w komórkach nowotworowych jest najprawdopodobniej niezbędnym etapem przeżycia tych komórek w momencie osiągnięcia fazy M2. Wydaje się bowiem, że nawet obecność mutacji w obrębie genów kodujących kilka protoonkogenów (ras, myc) oraz genów supresji nowotworów (p53, Rb) nie wystarcza do immortalizacji. Przy zbyt krótkich telomerach dochodzi do stopniowej kumulacji coraz większej liczby defektów genetycznych (fuzji chromosomów, translokacji itp.) uniemożliwiających przeżycie nawet „najbardziej stransformowanych” komórek nowotworowych.

Pojawienie się telomerazy w komórkach nowotworowych jest dość późnym etapem w rozwoju guzów. Świadczy o tym fakt, iż dopiero w większości zaawansowanych nowotworów telomery są relatywnie krótkie. Najprawdopodobniej więc w wyniku selekcji w rozwijającym się guzie dochodzi do wybiórczego przeżycia tych komórek, które niejako „nauczyły się” utrzymywać ekspresję telomerazy i dzięki temu potrafią przejść przez fazę M2 procesu starzenia się komórek. Obecność krótkich telomerów w komórkach nowotworowych jest cechą dość ważną i korzystną dla potencjalnej terapii antytelomerazowej. Gdyby bowiem telomery miały długość porównywalną do prawidłowych komórek somatycznych, to nawet przy zahamowaniu telomerazy, do momentu krytycznego skrócenia się telomerów mogłoby dojść nawet do kilkudziesięciu podziałów komórkowych. Wystarczyłoby to, aby z jednej komórki powstał twór o wielkości porównywalnej do dorosłego człowieka.

Proces wydłużania telomerów próbowano zahamować na wiele różnych sposobów. Wydaje się jednak, że najskuteczniejsze będą strategie opierające się o niskocząsteczkowe inhibitory telomerazy jako odwrotnej transkryptazy.

Pierwsze obserwacje wskazujące na potencjalną użyteczność inhibitorów telomerazy w leczeniu nowotworów opierały się na próbach zahamowania wydłużania telomerów oligonukleotydami antysensownymi bądź też poprzez transfekcję komórek nowotworowych genami kodującymi dominujące-nieaktywne telomerazy. Oligonukleotydy antysensowne wobec hTR wprowadzone do komórek glejaka wywołały dwa odmienne efekty: apoptozę lub różnicowanie się komórek nowotworowych po około 30 podwojeniach populacji [18]. Transfekcja komórek nowotworowych plazmidami kodującymi dominujące-nieaktywne pochodne telomerazy indukowały apoptozę komórek nowotworowych. Efekt ten był obserwowany tym wcześniej, im krótsze były telomery poddawanych terapii komórek [12]. Wydłużanie telomerów próbowano również zahamować innymi metodami. Wydaje

się, że największe szanse na zastosowanie w klinice mają niskocząsteczkowe inhibitory telomerazy [16, 19]. Tego typu leki sprawdziły się już jako inhibitory odwrotnej transkryptazy stosowanej w leczeniu HIV.

Te wstępne obserwacje z pewnością utwierdzają badaczy w przekonaniu, iż zahamowanie telomerazy może okazać się skuteczną metodą leczenia nowotworów, szczególnie tych z krótkimi telomerami. Istnieją również wstępne dane sugerujące efektywne profilaktyczne zastosowanie terapii polegającej na blokowaniu telomerazy, przynajmniej u chorych z wrodzonymi predyspozycjami genetycznymi do powstawania niektórych nowotworów [14]. Pojawia się oczywiście zapotrzebowanie na proste i niezawodne metody oceny długości telomerów w nowotworach. Godne uwagi jest również to, iż u pacjentów z nawrotem chłoniaka, komórki nowotworowe mają krótsze telomery [24]. Czyżby zatem terapia antytelomerazowa okazała się nawet skuteczniejsza u tych chorych, u których zawiodły dotychczas stosowane metody leczenia? Czy udało się znaleźć piętę achillesową nowotworów, czy rzeczywiście mamy do czynienia z panaceum na nowotwory? Czy komórki nowotworowe mogą rozwinąć oporność na nowe leki, czy alternatywne mechanizmy replikacji telomerów są w stanie pokrzyżować plany onkologów? Na te pytania na razie trudno odpowiedzieć. Z pewnością należy poczekać jeszcze wiele lat, aby upewnić się, czy nasze nadzieje nie okażą się kolejnym rozczarowaniem związanym z terapią choroby powodującej cierpienie, lęk i nieuchronną śmierć większości dotkniętych nią osób.

Podziękowania

Autorzy pragną serdecznie podziękować p. Maciejowi Ciołkowskiemu za pomoc w opracowaniu rycin.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ARTANDI SE, CHANG S, LEE S-L, ALSON S, GOTTLIEB GJ, CHIN L, DePINHO RA. Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature* 2000; **406**: 641–645.
- [2] BŁASIAK J. Telomeraza i rak. *Post Biochem* 1999; **45**: 228–238.
- [3] BRYAN TM, ENGLEZOU A, DALLA-POZA L, DUNHAM E, REDDEL RR. Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumours and tumour-derived cell lines. *Nature Med* 1997; **3**: 1271–1274.
- [4] CECH RT. Life at the end of the chromosome: telomeres and telomerase. *Angew Chem* 2000; **39**: 34–43.
- [5] CHIN L, ARTANDI SE, SHEN Q, TAM A, LEE SL, GOTTLIEB GJ, GREIDER CW, DEPINHO RA. p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell* 1999; **97**: 527–538.

- [6] COUNTER CM. The roles of telomeres and telomerase in cell life span. *Mutation Res* 1996; **366**: 45–63.
- [7] CUTHBERT AP, BOND J, TROTT DA, GILL S, BRONI J, MARRIOTT A, KHOUDOLI G, PARKINSON EK, COOPER CS, NEWBOLD RF. Telomerase repressor sequences on chromosome 3 and induction of permanent growth arrest in human breast cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 1999; **91**: 37–45.
- [8] DHAENE K., VAN MARCK E., PARWARESCH R. Telomeres, telomerase and cancer: an up-date. *Virchows Arch* 2000; **437**: 1–16.
- [9] FLACHETTI ML, PALLINI R, DAMBROSIO E, PIERCONTI F, MARTINI M, CIMINO-REALE G, VERNA R, MAIRA G, LARocca LM. *In situ* detection of telomerase catalytic subunit mRNA in glioblastoma multiforme. *Int J Cancer* 2000; **88**: 895–901.
- [10] GREENBERG R, CHIN L, FEMINO A, LEE KH, GOTTLIEB GJ, SINGER RH, GREIDER CW, DEPINHO RA. Short dysfunctional telomeres impair tumorigenesis in the INK4a(Δ lta2/3) cancer-prone mice. *Cell* 1999; **97**: 515–525.
- [11] GREIDER CW. Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem* 1996; **65**: 337–365.
- [12] HAHN WC, STEWART S.A., BROOKS MW, YORK SG, EATON E, KURACHI A, BEIJERSBERGEN RL, KNOLL JH, MEYERSON M, WEINBERG RA. Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nature Med* 1999; **5**: 1164–1170.
- [13] HARRINGTON L, MCPHAIL T, MAR V, ZHOU W, OULTON R, BASS MB, ARRUDA I, ROBINSON MO. A mammalian telomerase-associated protein. *Science* 1997; **275**: 973–977.
- [14] HERBERT B-S, WRIGHT AC, PASSONS CM, WRIGHT WE, ALI IU, KOPELOVICH L, SHAY JW. Effects of chemopreventive and antitelomerase agents on the spontaneous immortalization of breast epithelial cells. *J Natl Cancer Inst* 2001; **93**: 39–45.
- [15] HUR K,GAZDAR AF, RATHI A, JANG JJ, CHOI JH, KIM DY. Overexpression of Human Telomerase RNA in *Helicobacter pylori*-infected Human Gastric Mucosa. *Jpn J Cancer Res* 2000; **91**: 1148–1153.
- [16] KELLAND LR: Telomerase inhibitors: targeting the vulnerable end of cancer? *Anti-Cancer Drugs* 2000; **11** 503–513.
- [17] KICKHOEFER VA, STEPHEN AG, HARRINGTON L, ROBINSON MO, ROMELH. Vaults and telomerase share a common subunit, TEP1. *J Biol Chem* 1999; **274**: 32712–32717.
- [18] KONDO S, TANAKA Y, KONDO Y, HITOMI M, BARNETT GH, ISHIZAKA Y, LIU J, HAQQI T, NISHIYAMA A, VILLEPONTEAU B, COWELL JK, BARNA BP. Antisense telomerase treatment: induction of two distinct pathways, apoptosis and differentiation. *FASEB J* 1998; **12**: 801–811.
- [19] LAVELLE F, RIOU J-F, LAOUI A, MAILLIET P: Telomerase: a therapeutic target for the third millenium? *Crit Rev Oncol/Hematol* 2000; **34**: 111–126.
- [20] LINGNER J, HUGHES TR, SHEVCHENKO A, MANN M, LUNDBLAD V, CECH TR. Reverse Transcriptase Motifs in the Catalytic Subunit of Telomerase. *Science* 1997; **276**: 561–567.
- [21] NAKAYAMA Y, SAKAMOTO H, SATOH K, YAMAMOTO T. Tamoxifen and gonadal steroids inhibit colon cancer growth in association with inhibition of thymidylate synthase, survivin and telomerase expression through estrogen receptor beta mediated system. *Cancer Lett* 2000; **161**: 63–71.
- [22] PERRY PJ., KELLAND LR. Telomers and telomerase: targets for cancer chemotherapy? *Exp Opin Ther Patents* 1998; **8**: 1567–1586.
- [23] PETERSON SE, STELLWAGEN AE, DIEDE SJ, SINGER MS, HAIMBERGER ZW, JOHNSON CO, TZONEVA M, GOTTSCHLING DE. The function of a stem-loop in telomerase RNA is linked to the DNA repair protein Ku. *Nature Genet* 2001; **27**: 64–67.
- [24] REMES K, NORRBACK KF, ROSENQUIST R, MEHLE C, LINDH J, ROOS G. Telomere length and telomerase activity in malignant lymphomas at diagnosis and relapse. *Brit J Cancer* 2000; **82**: 601–607.

- [25] RUNDOLPH KL, CHANG S, LEE HW, BLASCO M, GOTTLIEB GJ, GREIDER C, DEPINHO RA. Longevity, stress response, and cancer in ageing telomerase-deficient mice. *Cell* 1999; **96**: 701–712.
- [26] SARETZKI G, SITTE N, MERKEL U, WURM RE, VON ZGLINICKI T. Telomere shortening triggers a p53-dependent cell cycle arrest via accumulation of G-rich single stranded DNA fragments. *Oncogene* 1999; **18**: 5148–5158.
- [27] SHAY JW, WRIGHT WE. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nature Rev (Mol Cell Biol)* 2000; **1**: 72–76.
- [28] SMOGORZEWSKA A, VAN STEENSEL B, BIANCHI A, OELMANN S, SCHAEFER MR, SCHNAPP G, DE LANGE T. Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 1659–1668.
- [29] SZALATA M, SIOMSKI R. Zakończenia chromosomów: telomery, telomeraza i białka współdziałające. *Post Biol Kom* 2000; **27** (supl. 14): 95–117.
- [30] URQUIDI V, TARIN D, GOODISON S. Role of telomerase in cell senescence and oncogenesis. *Annu Rev Med* 2000; **51**: 65–79.
- [31] VASA M, BREITSCHOPF K, ZEIHNER AM, DIMMELER S. Nitric oxide activates telomerase and delays endothelial cell senescence. *Circ Res* 2000; **87**: 540–542.
- [32] WENG NP, PALMER LD, LEVINE BL, LANE HC, JUNE CH, HODES RJ. Tales of tails: regulation of telomere length and telomerase activity during lymphocyte development, differentiation, activation and ageing. *Immunol Rev* 1997; **160**: 43–54.
- [33] WU G, LEE WH, CHEN PL. NBS1 and TRF1 colocalize at promyelocytic leukemia bodies during late S/G2 phases in immortalized telomerase-negative cells. Implication of nbs1 in alternative lengthening of telomeres. *J Biol Chem* 2000; **275**: 30618–30622.
- [34] WU KJ, GRANDORI C, AMACKER M, SIMON-VERMOT N, POLACK A, LINGNER J, DALLA-FAVERA R. Direct activation of TERT transcription by c-Myc. *Nature Genet* 1999; **21**: 220–224.
- [35] YEAGER TR, NEUMANN AA, ENGLEZOU A, HUSCHTSCHA LI, NOBLE JR, REDDEL RR. Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. *Cancer Res* 1999; **59**: 4175–4179.
- [36] ZAKIAN V. Life and Cancer Without Telomerase. *Cell* 1997; **91**: 1–3.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 20.01.2001 r.

Przyjęto: 22.02.2001 r.

Adres autora: ul. Chalubińskiego 5, 02-004 Warszawa

e-mail: jgolab@ib.amwaw.edu.pl

HAMOWANIE POTRANSLACYJNEJ MODYFIKACJI BIAŁEK RAS JAKO NOWA METODA TERAPII NOWOTWORÓW

INHIBITION OF POSTTRANSLATIONAL RAS MODIFICATION AS A NEW METHOD OF CANCER TREATMENT

Daria NURZYŃSKA, Andrzej DEPTAŁA

Klinika Hematologii i Onkologii Akademii Medycznej w Warszawie

Streszczenie: Białka RAS odgrywają kluczową rolę w regulacji wzrostu i różnicowania się komórek, biorąc udział w aktywacji łańcucha przekaźników wewnątrzkomórkowych. Mutacje genów *Ras*, stwierdzone w około 30% nowotworów u ludzi, prowadzą do produkcji zmutowanych białek RAS, które przekazują do komórek sygnały niepodlegające regulacji przez zewnątrzkomórkowe cytokiny. Stwierdzenie, że dla funkcjonowania białek RAS niezbędne jest ich połączenie z błoną komórkową, które zależy od reakcji farnesylicacji przebiegającej z udziałem transferazy farnesylowej, doprowadziło do zsyntetyzowania związków hamujących ten enzym. W artykule przedstawiono rolę białek RAS w przekazywaniu sygnałów do komórek, ich potranslacyjną modyfikację i mechanizmy aktywacji białek RAS prowadzące do zmiany fenotypu komórek. Następnie scharakteryzowano różne grupy inhibitorów transferazy farnesylowej i podsumowano wyniki badań dotychczas przeprowadzonych z ich użyciem.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28: 263–276)

Słowa kluczowe: białka RAS, transferaza farnesylowa, inhibitory transferazy farnesylowej.

Summary: RAS proteins play pivotal role in the control of cell growth and differentiation due to their ability to activate several downstream effectors. Mutations of *Ras* genes, occurring in approximately 30% of human cancers, result in a production of mutated RAS proteins that continue to provide uncontrolled proliferative signals. The observation, that addition of a farnesyl moiety in a reaction catalyzed by farnesyltransferase is essential for the RAS proteins cell membrane association and their activity, has led to the development of farnesyltransferase inhibitors. This review aims to outline the role of RAS proteins in the signal transduction, their posttranslational modification and the ways in which deregulated RAS function may be involved in cancerogenesis. Subsequently, different types of farnesyltransferase inhibitors and their effectiveness in biological studies are reviewed.

(*Advances in Cell Biology* 2001; 28: 263–276)

Key words: RAS proteins, farnesyltransferase, farnesyltransferase inhibitors.

Wykaz stosowanych skrótów: **EGF** (*epidermal growth factor*) – czynnik wzrostu naskórka, **IGF** (*Insulin-like growth factor*) – insulinopodobny czynnik wzrostu, **GTPaza** – hydrolaza guanozynotrójfosforanu, **GTP** – guanozynotrójfosforan, **GDP** – guanozynodwufosforan, **PDGF** (*platelet-delivered growth factor*) – płytkopochodny czynnik wzrostu, **FGF** (*fibroblasts growth factor*) – czynnik wzrostu fibroblastów, **NGF** (*nerves growth factor*) – czynnik wzrostu nerwów, **GM-CSF** (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) – czynnik pobudzający tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów, **INF** – interferon, **TGF- β** – (*transforming growth factor*) – transformujący czynnik wzrostu, **GRB** (*growth factor receptor-binding protein*) – białko wiążące się z receptorem dla czynnika wzrostu, **GEF** (*guanine nucleotide exchange factors*) – czynniki biorące udział w wymianie nukleotydów guaninowych, **GAP** (*GTPase accelerator protein*) – białko przyspieszające działanie hydrolazy guanozynotrójfosforanu, **NF** – neurofibromina, **MAPKK** (*mitogen activated protein kinase kinase*) – kinaza kinazy białkowej aktywowanej mitogenem, **MAPK** (*mitogen activated kinase*) – kinaza aktywowana mitogenem, **ERK** (*extracellular signal-regulated kinases*) – kinazy regulowane przez sygnał pozakomórkowy, **PI-3K** (*phosphatidylinositol-3-OH-kinase*) – kinaza fosfatydyloinozytolu, **FAB** – międzynarodowa klasyfikacja ostrych białaczek szpikowych, **PDGF-R** (*platelet-delivered growth factor*) – receptor dla płytkopochodnego czynnika wzrostu, **FTaza** – transferaza farnezylowa, **GGTaza** – transferaza geranylogeranylowa, **FDP** – farnezylodwufosforan, **GGDP** – geranylogeranylodwufosforan, **SAM** – S-adenozyl-L-metionona, **FTI** (*farnesyltransferase inhibitor*) – inhibitor transferazy farnezylowej.

WSTĘP

Za nowotworową transformację komórek odpowiedzialne są zmiany w ich genomie, polegające na aktywacji onkogenów, ew. z towarzyszącą inaktywacją anty-onkogenów. Znajomość tych zmian i ich identyfikacja na poziomie molekularnym daje szansę na terapię celowaną w chorobach nowotworowych. Opisana w artykule rodzina białek RAS bierze udział w procesie fosforylacji cytoplazmatycznych białek przekąźnikowych i w efekcie wpływa na proces proliferacji i różnicowania się komórek. Mutacje w obrębie kodujących je genów, a także zmiany dotyczące innych białek tworzących ten sam łańcuch przekąźników, prowadzą do aktywacji białek RAS niezależnej od zewnątrzkomórkowych czynników wzrostu. Skutkiem tego jest nadmierna proliferacja komórek (niepodlegająca hamowaniu kontaktowemu) i zahamowanie ich apoptozy. Zablockowanie tego procesu umożliwiają inhibitory transferazy farnezylowej – enzymu uczestniczącego w potranslacyjnej modyfikacji białek RAS. W artykule przedstawiono związki z tej grupy oraz ich działanie na komórki nowotworowe w testach *in vitro* i badaniach przeprowadzonych na zwierzętach.

GENY RAS I ICH PRODUKTY

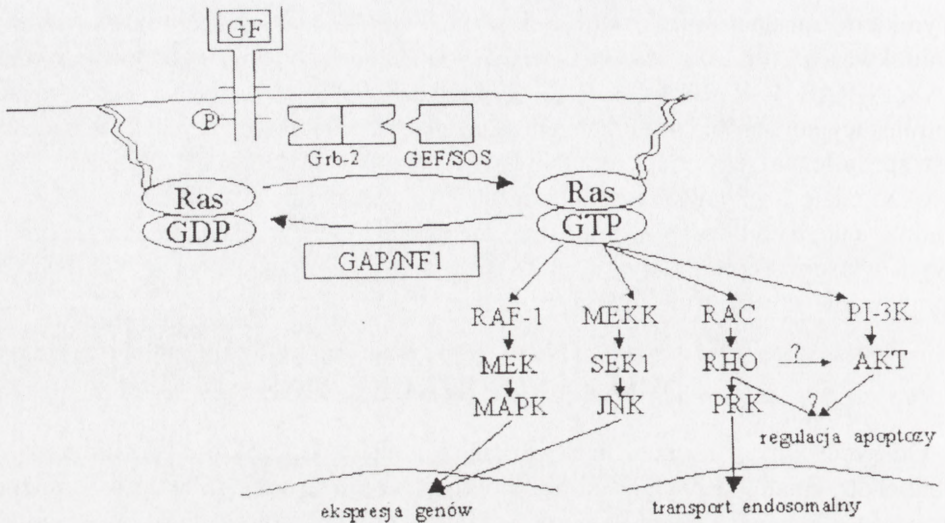
Protoonkogeny z grupy *Ras* biorą udział w regulacji procesów związanych ze wzrostem i różnicowaniem się komórek. Zidentyfikowano dotychczas trzy geny należące do tej grupy: *H-Ras* (o budowie homologicznej z onkogenem mysiego wirusa mięsaka Harvey), *K-Ras* (homologiczny z onkogenem mysiego wirusa mięsaka Kirsten) i *N-Ras* (nie wykazujący homologii z żadnym onkogenem retrowirusowym i wyizolowany po raz pierwszy z linii komórek nerwiaka zarodkowego).

Wynikiem translacji onkogenów *Ras* są białka RAS zbudowane ze 188 lub 189 aminokwasów, o masie cząsteczkowej 21 kD (p21ras), nazywane odpowiednio H-RAS, N-RAS, K-RAS4A i K-RAS4B (białka K-RAS powstają na skutek różnej potranslacyjnej obróbki produktu genu *K-Ras*). Charakterystyczną cechą ich budowy jest specyficzna sekwencja aminokwasów na C-końcu łańcucha, określana jako CAAX, gdzie C odpowiada cysteinie, A1 i A2 to aminokwasy alifatyczne (zwykle walina, leucyna lub izoleucyna), a X to metionina lub seryna [27]. Białka te, dzięki swym właściwościom, stały się obiektem intensywnych badań mających na celu opracowanie nowej grupy leków przeciwnowotworowych.

DZIAŁANIE BIAŁEK RAS

Odkrycie funkcji i mechanizmów działania białek G (za które A. Gilman i M. Rodbel otrzymali w 1994 r. Nagrodę Nobla) pozwoliło na dokładniejsze zrozumienie procesów odpowiedzialnych za wzrost i różnicowanie się komórek. Białka te stanowią rodzaj pomostu pomiędzy receptorami znajdującymi się na powierzchni komórek a efektorami zlokalizowanymi w obrębie jądra komórkowego lub poszczególnych kompartmentów cytosolu. Posiadają one aktywność hydrolazy guanozynotrójfosforanu (GTPazy), a ich zdolność do aktywacji kolejnych białek przekaźnikowych (kinaz białkowych) związana jest ze zmianą ich konformacji wynikającej z wiązania GTP i jego hydrolizy do GDP [4]. Właściwości takie ma produkt protoonkogenu *Ras* – białko p21ras (białko RAS), a także m.in. białka RAPI, RAP2, RAL, RHEB, TC21. Występują one we wszystkich komórkach eukariotycznych odpowiadając za ich wzrost i różnicowanie kontrolowane przez zewnątrzkomórkowe cytokiny, takie jak: czynnik wzrostu naskórka (EGF), insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF), płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF), czynnik wzrostu fibroblastów (FGF), czynnik wzrostu nerwów (NGF), interleukiny, czynnik pobudzający kolonie granulocytów i makrofagów (GM-CSF), interferon (INF) α , β i γ , transformujący czynnik wzrostu (TGF- β), a także hormony (insulina) i neurotransmitery.

Przyłączenie czynnika wzrostu prowadzi do fosforylacji receptorów, a proces ten zachodzi (w zależności od typu receptora) dzięki dimeryzacji i wewnętrznej aktywności kinazy tyrozynowej (receptory dla EGF, IGF-1, PDGF, FGF, NGF), cytoplazmatycznym kinazom tyrozynowym (receptory dla erytropoetyny, GM-CSF, IL-2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 12 i 15, INF α , β i γ) lub własnej kinazie serynowo-treoninowej (TGF- β) (ryc. 1). Fosforylacja receptora dla cytokin prowadzi z kolei do aktywacji białka GRB-2 (*growth factor receptor-binding protein*), którego rola polega na rekrutacji białek (np. Sos – *son of sevenless*) określanych jako GEF (*guanine nucleotide exchange factors*), które przyspieszając odłączenie cząsteczki GDP od białek RAS, umożliwiają im połączenie się z nową cząsteczką GTP i przejście w postać aktywną. Z kolei inne białka, GAP (*GTPase accelerator proteine*) oraz neurofibromina (NF1), przyspieszają hydrolizę GTP i inaktywację białek RAS [21]. Obecnie



RYCINA 1. Schemat łańcucha białek przekąźnikowych. Połączenie się czynnika wzrostu (GF) z receptorem prowadzi do aktywacji szeregu cytoplazmatycznych kinaz białkowych. Aktywność białek Ras regulują białka GEF/SOS (przyspieszają odłączenie cząsteczki GDP od RAS i przyłączenie GTP) i białka GAP/NF1 (przyspieszają hydrolizę GTP związanego z RAS)

wiadomo, że zmutowana postać białek RAS wykazuje zmniejszoną zdolność do interakcji z GAP, przez co pozostają one dłużej w swej postaci aktywnej i powodują przedłużoną aktywację białek efektorowych tworzących kolejne ogniwa łańcucha przekąźników.

Wydaje się, że dla dalszego przekąźnictwa sygnałów najistotniejsze jest pośrednictwo białek RAF-1. Ich aktywacja przez RAS prowadzi do fosforylacji MAPKK (*mitogen activated protein kinase kinase*), a ta powoduje fosforylację MAPK (*mitogen activated kinase*), czyli ERK (*extracellular signal-regulated kinases*). Kinazy te aktywują szereg substratów znajdujących się na obszarze jądra komórkowego, w tym jądrowy czynnik transkrypcyjny Elk1, czego ostatecznym wynikiem staje się transkrypcja genów związanych z proliferacją komórek. Białka RAS aktywowane po związaniu z GTP wpływają także na funkcje innych białek o podobnych właściwościach, białek Rac i Rho. Ich aktywacja związana jest przede wszystkim z wpływem na cytoskielet komórki i regulacją takich procesów, jak: śródkomórkowy transport endosomalny, adhezja komórek i tworzenie wypustek błony komórkowej [35]. Najnowsze opracowania wskazują na istotny udział białek Rho w apoptozie komórki [32]. Spośród szeregu innych kinaz, które aktywowane są przez RAS-GTP, na uwagę zasługuje także PI-3K (*phosphatidylinositol-3-OH-kinase*) związana z regulacją działania aktyny i integrzyn, transportem endosomalnym w obrębie komórki i hamowaniem apoptozy. Do białek, których funkcja regulowana jest przez PI-3K, należy p70s6k [7], odpowiedzialne za fosforylację i aktywację

białka S6 wchodzącego w skład podjednostki 40S rybosomów i niezbędnego dla przejścia komórki z fazy G1 do fazy S [24] oraz kinaza białkowa AKT, której aktywacja odgrywa rolę w regulacji apoptozy [10].

AKTYWACJA BIAŁEK RAS

Nadmierna aktywacja białek RAS może być spowodowana nie tylko mutacją kodującego je genu, ale także zmianami w obrębie receptorów dla czynników wzrostu lub aktywacją innych kinaz białkowych, za których pośrednictwem dochodzi do pobudzenia białek RAS. Powstanie nowej odmiany łańcucha polipeptydowego jest wynikiem punktowej mutacji protoonkogeny *Ras* (najczęściej w pozycji 12, 13 lub 61), stwierdzanej w komórkach około 30% nowotworów [4]. W raku gruczołowym trzustki zmutowany protoonkogen *Ras* stwierdzany jest w 90% przypadków, w raku jelita grubego w 50%, w raku płuc w 30%, a w raku tarczycy w 50%. Przyczyną powstawania zmutowanych RAS są najczęściej mutacje protoonkogeny *N-Ras*, rzadziej *K-Ras*, a mutacje *H-Ras* stwierdza się tylko sporadycznie. Najczęściej identyfikowaną mutacją białek RAS jest zamiana glicyny w pozycji 12 na serynę, cysteinę, argininę, asparaginę, alaninę lub walinę [34].

Wśród chorób rozrostowych układu krwiotwórczego wzmożoną aktywację białek RAS stwierdzano w zespołach mielodysplastycznych i ostrej białaczce szpikowej, a także w szpiczaku mnogim. Wiadomo obecnie, że zaburzenie aktywności białek

TABELA 1. Częstość mutacji związanych ze zmianą aktywności RAS w komórkach nowotworowych; zmodyfikowano na podstawie prac: Rowińskiego [36] i Reutera [34]

Typ nowotworu	Typ aktywacji	% nowotworów
Rak sutka	<i>H, K-Ras</i>	0–2
Rak jajnika	<i>K-Ras</i>	15–23
Rak jelita grubego	<i>K-Ras</i>	36–50
Rak trzustki	<i>K-Ras</i>	78–95
Nasieniak	<i>K, N-Ras</i>	40–43
Czerniak	<i>K-Ras</i>	16–20
Rak tarczycy pęcherzykowy	<i>H, K, N-Ras</i>	53
Rak tarczycy brodawkowy	?	25
Rak tarczycy nieodróżnicowany	<i>H, K, N-Ras</i>	58
Rak płuc gruczołowy	<i>K-Ras</i>	22–30
Ostra białaczka szpikowa	<i>N, K-Ras t(12, 19) Tel-Ab1</i>	20–30
Przewlekła białaczka mielomonocytoza	<i>N, K-Ras t(5, 12) Tel-PDGFRβ</i>	50–70
Przewlekła białaczka szpikowa	<i>t(9, 22) BCR-Ab1</i>	95
Przewlekła białaczka szpikowa typu dziecięcego	<i>N-Ras inaktywacja NF-1</i>	30
Ostra białaczka limfatyczna	<i>N, K-Ras</i>	20
Szpiczak mnogi	<i>N, K-Ras</i>	30–40

RAS prowadzi do proliferacji krwiotwórczych komórek progenitorowych oraz ich kumulacji będącej skutkiem zahamowania apoptozy, jednak dokładny mechanizm zmian prowadzących do powstania klonu komórek białaczkowych pozostaje nieznanym. Mutacje *Ras* powodujące powstanie onkogennych białek RAS u osób z ostrą białaczką szpikową zidentyfikowano po raz pierwszy w 1983 roku [6]. Nie stwierdzono dotychczas, aby obecność zmutowanych RAS była związana z konkretnym typem ostrej białaczki szpikowej wg FAB. Dotychczasowe badania oceniające wpływ obecności mutacji na rokowanie doprowadzają do sprzecznych wniosków [33].

W przewlekłej białaczce szpikowej z obecnością chromosomu Philadelphia mutacje białek RAS stwierdza się niezmiernie rzadko. Mimo to, w komórkach białaczkowych z translokacją pomiędzy chromosomem 9 i 22 prowadzącą do fuzji genów kodujących białka BCR i Abl, stwierdza się zwiększone stężenie białek RAS związanych z GTP. Fuzyjne białko BCR-ABL wykazuje aktywność kinazy tyrozynowej i jest zdolne fosforylować kompleks Sos/Grb-2, przy pomocy którego białka RAS przyłączają nową cząsteczkę GTP. Ekspresja białka BCR-ABL w komórkach krwiotwórczych prowadzi do transformacji komórek polegającej na ich proliferacji niezależnej od czynników wzrostu, zablokowaniu różnicowania i zahamowaniu apoptozy [14].

W przewlekłej białaczce szpikowej typu dziecięcego nie stwierdza się chromosomu Philadelphia, ale badania molekularne również wskazują na istotny udział białek RAS w jej patogenezie. U osób z nerwiakowłókniością typu I (defekt genetyczny zlokalizowany na chromosomie 17), u których ten rodzaj białaczki występuje znacząco częściej niż u innych osób w tej samej grupie wiekowej, stwierdzono delecję genu kodującego neurofibrominę-1 (NF-1), białko odpowiadające za hydrolizę GTP związanego z cząsteczką RAS i inaktywację białek RAS [3]. Powstanie tego typu białaczki u osób bez neurofibromatozy wydaje się zależeć od często stwierdzanej obecności mutacji genu *Ras*.

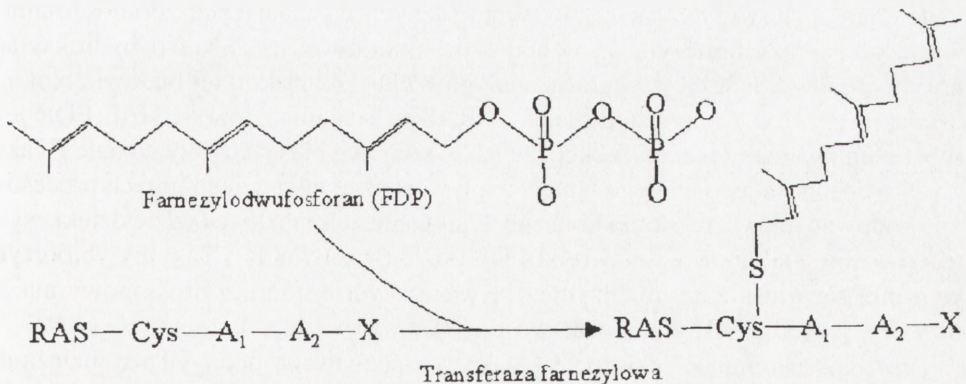
Inna mutacja, nie dotycząca bezpośrednio białek RAS, ale prowadząca do jego aktywacji, występuje w przewlekłej białaczce mielomonocytovej. Translokacja pomiędzy chromosomami 5 i 12 powoduje fuzję genu kodującego białko Tel (nazwa od pierwszych liter słów *translocation*, *Ets*, *leukemia*), będącego czynnikiem transkrypcyjnym z rodziny *Ets*, z genem dla receptora beta płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGF-R β). Powstające białko ulega dimeryzacji bez obecności zewnątrzkomórkowego czynnika wzrostu, a następująca autofosforylacja receptora prowadzi do aktywacji białek RAS [17].

Niezależnie od mechanizmu, aktywacja białek RAS prowadzi do rekrutacji białek efektorowych niepodlegającej regulacji przez zewnątrzkomórkowe czynniki wzrostu. Sposób na zatrzymanie tego procesu stanowi ingerencja w potranslacyjną modyfikację białek RAS, która w prawidłowych warunkach, poprzez zwiększanie hy-

drofobowości i umożliwianie im kontaktu z błoną komórkową, jest niezbędna dla ich funkcjonowania.

MODYFIKACJA BIAŁEK PRZEKAŹNIKOWYCH

Produktem genu *Ras* jest propeptyd (pro-Ras). Aby białka RAS mogły pełnić funkcje białek przekaźnikowych, muszą one przyłączyć się do wewnętrznej powierzchni błony komórkowej. Pierwszym etapem modyfikacji ich właściwości jest prenylacja (ryc. 2). Odbywa się ona przy udziale enzymów transferazy farnezylowej (FTaza) lub geranylogeranylowej (GGTaza I i II) [8]. Pierwszy z nich katalizuje reakcję farnezylacji, czyli kowalencyjnego przyłączenia 15-węglowej lipidowej grupy farnezylowej pochodzącej z farnezylodwufosforanu (FDP) do cysteiny wchodzącej w skład charakterystycznej dla białek RAS sekwencji CAAX. Drugi, bierze udział w przyłączeniu jednej lub dwóch 20-węglowych grup geranylogeranylowych, pochodzących z geranylogeranylodwufosforanu (GGDP) [15]. Enzymy te nie mają ścisłej specyficzności substratowej. Wiadomo, że FTaza ssaków prenyluje białka mające sekwencję CAAX oraz sam tetrapeptyd CAAX, w których X odpowiada metioninie (K-RAS4B, laminina B), serynie lub glicynie (H-RAS), wykazując duże powinowactwo do substratów z metioniną. FTaza ponadto może brać udział w reakcji przenoszenia grupy geranylogeranylowej (wiąże się ona z FDP tylko 30 razy silniej niż z GGDP, w porównaniu z 300 razy silniejszym wiązaniem się GGTazy z GGDP niż z FDP). GGTaza preferencyjnie modyfikuje substraty, w których aminokwasem X jest leucyna, ale reakcji z jej udziałem mogą podlegać także K-RAS4B i inne białka, które typowo przyłączają grupę farnezylową oraz białko Rho B [8,9,25]. Prawidłowe białka znajdujące się w komórce podlegają



RYCINA 2. Reakcja prenylacji białek RAS przy udziale transferazy farnezylowej 15-węglowa grupa farnezylowa zostaje przeniesiona na cysteinę wchodzącą w skład charakterystycznej dla białek RAS sekwencji CAAX

przeważnie geranylogeranyłacji, podczas gdy białka będące produktem zmutowanego genu przyłączają grupę farnezyłową [12]. Prenylowane białka cechuje większa hydrofobowość, a w związku z tym zdolność do łączenia się z lipidową warstwą błony komórkowej.

Kolejnym etapem modyfikacji białek RAS jest katalizowane przez proteazę usunięcie fragmentu AAX z łańcucha polipeptydowego, a następnie metylacja nowopowstałej grupy karboksylowej przy udziale transferazy karboksymetylowej (dawcą grupy metylowej jest S-adenozyno L-metionina, SAM). Dodatkowo wszystkie białka RAS, oprócz K-RAS4B, przyłączają przy udziale transferazy palmitynianowej resztę kwasu palmitynianowego do cząsteczki cysteiny znajdującej się najbliżej aminokwasu farnezyłowanego. Reakcje te powodują dalsze zwiększanie hydrofobowości cząsteczek RAS, jednak już sama prenylacja zapewnia im zdolność do integracji z błoną komórkową [36]. Wydaje się zatem, że zablokowanie aktywności transferazy farnezyłowej zahamuje nadmierną aktywację zmutowanych białek RAS.

INHIBITORY TRANSFERAZY FARNEZYŁOWEJ

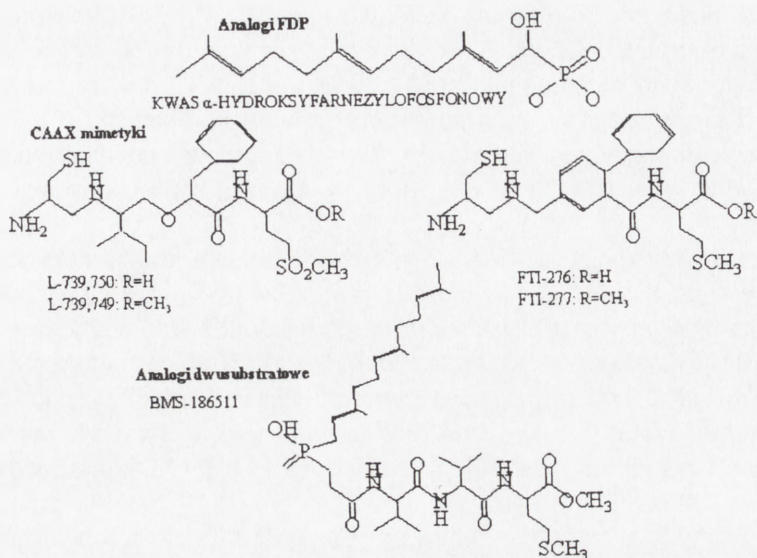
Inhibitorami FTazy mogą być:

- analogi FDP, które konkurują z farnezyłodwufosforanem o miejsce wiązania z transferazą farnezyłową,
- tetrapeptydy lub peptydy zawierające zmodyfikowaną sekwencję CAAX i wiążące się konkurencyjnie z enzymem w miejscu rozpoznającym tę sekwencję,
- analogi zawierające w swej cząsteczce obydwa substraty dla FTazy.

Badania przedkliniczne

Jednym z pierwszych związków syntetycznych posiadających zdolność hamowania transferazy farnezyłowej w hodowli komórkowej jest kwas α -hydroksyfarnezyłfosfonowy, należący do grupy analogów FDP. Związki o tej budowie blokują działanie enzymu i aktywację białek H-RAS w stężeniu 1 μ mol/l [16]. FDP jest substratem dla wielu reakcji zachodzących w komórce nie tylko przy udziale FTazy, dlatego obecność jego analogów może wpływać także na przebieg innych procesów i powodować toksyczne skutki uboczne. Uniknięcie ich możliwe będzie dzięki zsyntetyzowaniu analogu o wyższym od FDP powinowactwie do FTazy i wybiórczym wiązaniu się właśnie z tym enzymem. Kwas α -hydroksyfarnezyłfosfonowy ma 10 razy wyższe od FDP powinowactwo do FTazy.

Peptydy zawierające sekwencję CAAX, rozpoznawaną przez FTazę, należą do drugiej grupy inhibitorów enzymu. Wykorzystanie ich potencjalnych właściwości w komórkach jest utrudnione ze względu na specyficzną budowę cząsteczki. Związki te są anionami (mają bowiem wolną grupę karboksylową), co ogranicza ich prze-



RYCINA 3. Budowa chemiczna wybranych inhibitorów transferazy farnesylowej

chodzenie przez błonę komórkową. Zsyntetyzowanie proleków, będących estrami lub laktonami, umożliwi ich transport do wnętrza komórki, gdzie muszą ulec hydrolizie w celu aktywacji. Niestety, poza podatnością na hydrolizę przez enzymy wewnątrzkomórkowe, są one także wrażliwe na działanie esteraz i innych hydrolaz osoczowych i wewnątrzkomórkowych [36]. Wysiłek chemików skupia się więc na syntezie związków, które będą odporne na działanie esteraz osoczowych oraz proteaz, ale będą podlegać przemianom komórkowym umożliwiającym ich przejście z postaci proleku do formy aktywnej.

Związek L-731,735, który różni się od peptydu CAAX brakiem wiązań amidowych i obecnością homoseryny zamiast metioniny, jest stabilnym i wybiórczym inhibitorem FTazy *in vitro*, powodującym zahamowanie wzrostu komórek o 50% (IC₅₀) w stężeniu 18 nmol/l. Prolek L-731,734 w większym stopniu dociera do wnętrza komórki, ale hamuje aktywność RAS w komórkach zawierających zmutowany gen *v-Ras* słabiej niż związek wyjściowy [23].

L-738,750 oraz jego estrowa pochodna L-739,749, w których wiązanie amidowe pomiędzy dwoma aminokwasami zastąpiono mostkiem oksyeterowym, powodują zablokowanie niepodlegającego hamowaniu kontaktowemu wzrostu komórek linii Rat-1 transfekowanych genem *H-Ras* oraz komórek ludzkiego raka gruczołowego trzustki zawierających zmutowany gen *K-Ras*, *myc* i *p35*. W hodowli tych komórek, po inkubacji z L-739,749, zaobserwowano degradację DNA i apoptozę. L-739,749 zmniejsza ponadto o 66% wzrost guza u nagich myszy transfekowanych zmutowanym genem *H-Ras* (w porównaniu z 33% zmniejszeniem wzrostu guza w tych samych warunkach przez doksorubicynę) [22]. Działanie tych inhibitorów FTazy może być

związane z pośrednim wpływem na białka tworzące cytoszkielet komórki [31]. Pojedyncza ekspozycja fibroblastów zawierających zmutowane *Ras* na L-739,749 powodowała odwracalne zmiany morfologiczne, natomiast powtarzany wpływ inhibitora FTazy wyrażał się zahamowaniem wzrostu komórek.

Inny przedstawiciel tej grupy leków, L-744,832, został poddany badaniom na mysim modelu białaczki szpikowej, która związana jest z inaktywacją genu *Nf1* (należącego do genów hamujących transformację nowotworową) i związanym z tym brakiem inaktywacji białek RAS. Stwierdzono, że hamuje on farnezylację H-RAS (nie wpływając na N-RAS) i pobudzany przez GM-CSF wzrost komórek prekursorowych szpiku *in vitro* [28]. Podawanie podskórne L-744,832 transgenicznym myszom MMTV-*v-H-ras*, u których rozwijają się nowotwory sutków i ślinianek, powodowało zależne od dawki i odwracalne zmniejszenie masy guza, który odrastał po przerwaniu terapii. Doskonałym inhibitorem wzrostu komórek zawierających zmutowane H-ras i K-ras okazał się także związek L-778,123, który poddany został następnie badaniom klinicznym [12].

Analogi CAAX to nie tylko związki wypierające właściwe peptydy z połączeń z FTazą. Ostatnio zsyntetyzowano związki, które uniemożliwiają połączenie się białek zawierających sekwencję CAAX z enzymem, jednocześnie nie będąc wcale substratem dla tego enzymu. Pseudopeptydomimetyki zamiast kompletnej sekwencji CAAX zawierają hydrofobowe komponenty w miejscu dwóch środkowych aminokwasów. Należący do tej grupy FTI-276 i prolek FTI-277 zastosowany w komórkach linii NIH3T3 zawierających onkogen *H-Ras* powodował zahamowanie aktywacji kinazy serynowo-treoninowej c-Raf-1. FTI-277 powodował nagromadzenie w komórkach białek H-RAS, które nie ulegając reakcji farnezytacji tworzyło nieaktywne kompleksy z kinazą Raf. W stężeniach sto razy wyższych dochodziło także do zahamowania funkcji zmutowanych K-RAS4B i braku aktywacji MAPK [26]. W badaniach przeprowadzonych na transgenicznym mysz, FTI-276 blokował wzrost ludzkich komórek raka płuc zawierających dwie najczęściej występujące w nowotworach u ludzi anomalie genetyczne (mutację *K-Ras* i delecję antyonkogenu p53), nie wpływając na wzrost komórek bez zmutowanego *Ras* [38].

Właściwości hamowania FTazy *in vitro* wykazują także związki zawierające w swej budowie zarówno FDP, jak i motyw CAAX. BMS-186511 już w mikromolarnych stężeniach blokował wzrost komórek linii NIH3T3 zawierających zmutowane geny *H-Ras* i *K-Ras* (choć komórki z onkogenem *K-Ras* wydawały się być mniej wrażliwe na działanie inhibitora). Analog ten 2000 razy silniej blokuje FTazę niż GGTazę i nie wpływa na prawidłowe komórki. Skutkiem zahamowania aktywności FTazy i nagromadzenia się niefarnezylowanych białek RAS są zmiany morfologiczne komórek [29].

Inhibitorów FTazy poszukiwano także wśród związków będących naturalnymi produktami komórek roślinnych i grzybiczych. Do tej grupy potencjalnych leków należy m.in. manumycyna, fusidienol, gliotoxin, cylindrol A. Manumycyna (pro-

dukowana przez *Streptomyces*) hamowała wzrost kilku linii ludzkich komórek raka trzustki, a IC50 było niższe w komórkach zawierających zmutowany gen *K-Ras* niż w komórkach z dziką odmianą genu [20]. Związki o właściwościach hamujących FTazę znaleziono także wśród antagonistów receptorów histaminowych, nie będących peptydami i nie zawierających wiązania sulfhydrylowego. Prototypowy w tej grupie trójcykliczny związek SCH 44342 konkuruje z CAAX w reakcji farnesylicacji [30]. Pentapeptyd PD083176 różni się od innych inhibitorów FTazy brakiem cysteiny i konkuruje z FDP. Jego skuteczność udowodniono w badaniach na oocytach *Xenopus*, w których hamował on zależne od aktywacji RAS dojrzewanie komórek pod wpływem insuliny, nie wpływając na niezależne od RAS dojrzewanie w odpowiedzi na progesteron.

R115777 jest analogiem heterocyklicznego związku zawierającego grupę imidazolową o właściwościach przeciwrzeczybicznych. *In vitro* hamuje on farnesylicację lamininy B (IC50 0,08 nmol/l) i K-RAS4B (IC50 7,9 nmol/l) oraz wzrost fibroblastów zawierających zmutowane H-RAS [11,36].

Badania kliniczne I fazy

Badaniom klinicznym nie poddany został żaden z inhibitorów transferazy farnesylowej należący do grupy analogów FDP, a wyniki badania analogów dwusubstratowych nie zostały dotychczas opublikowane. Znane są natomiast wyniki I fazy badania klinicznego z zastosowaniem CAAX peptydomimetyku L-778,123, który podawany dożylnie powodował zależne od dawki działania niepożądane pod postacią neutropenii i małopłytkowości oraz ogólne osłabienie i bezobjawowe wydłużenie odstępu QT [5].

W badaniach klinicznych oceniano także związek SCH 66336, nie należący do grupy analogów substratów transferazy farnesylowej. Związek ten podawany doustnie w różnych schematach (przez 7 dni co 3 tygodnie, przez 14 dni co 4 tygodnie, stosowanie ciągłe) [19] powodował ograniczające dalsze zwiększanie dawki osłabienie, nudności, wymioty i biegunkę przy dawce 400 mg dwa razy dziennie [1,2]. W badaniach przedklinicznych największy wpływ na ograniczanie wzrostu nowotworu zaobserwowano podczas ciągłego stosowania leku, dlatego ten sposób terapii zalecany jest w kolejnych etapach badań [12,13].

Związek R115777 w pierwszej fazie badań klinicznych podawano pacjentom z guzami nowotworowymi doustnie przez 5 kolejnych dni co 2 tygodnie. W dawce 1300 mg dwa razy dziennie powodował on neuropatię (przemijającą w ciągu doby od odstawienia leku), osłabienie, nudności i wymioty, odwracalne uszkodzenie nerek. W innym badaniu, polegającym na ciągłym doustnym podawaniu leku, działania niepożądane pod postacią neutropenii i małopłytkowości oraz neuropatii obwodowej wystąpiły przy dawce 500 mg dwa razy dziennie [18,39].

Jak widać, toksyczność związków w I fazie badań klinicznych była porównywalna, a działania niepożądane łagodne i krótkotrwałe. Dawki zalecane w kolejnych etapach badań pozwalają na uzyskanie w osoczu pacjentów stężeń leków przekraczających IC50 w badaniach *in vitro* [37].

Dalsze badania kliniczne

Inhibitory transferazy farnezylowej okazały się w dotychczas przeprowadzonych badaniach związkami głównie cytostatycznymi, a nie cytotoksycznymi (obserwowane w badaniach *in vitro* zmniejszanie masy guza należy przypisać apoptozie). Bezpośrednia ocena efektów ich działania w II fazie badań klinicznych jest więc utrudniona, ponieważ punktem końcowym nie może być stwierdzenie w badaniach obrazowych zmniejszanie się guza. Dlatego w projektach badań II fazy uwzględnić należy ocenę czasu progresji nowotworu, roczne przeżycie pacjentów lub stężenie markerów nowotworowych we krwi [12]. Skuteczność leków w hamowaniu farnezytacji oceniana jest pośrednio, poprzez pomiar stężenia białka znacznikowego, jakim jest laminina A (powstająca z prelaminy A w reakcji farnezytacji), w komórkach błony śluzowej policzka i jednojądrowych komórkach krwi obwodowej [36]. W trakcie realizacji jest obecnie II faza badania klinicznego związku R115777 (tipifornib), który stosowany będzie doustnie w dawce 600 mg dziennie u pacjentów z oporną na leczenie lub nawracającą ostrą białaczką szpikową.

PODSUMOWANIE

Mutacje dotyczące protoonkogenów *Ras*, stwierdzone w wielu nowotworach u ludzi, prowadzą do powstania białek RAS, które wykazują zdolność do pobudzania wzrostu i proliferacji komórek niezależnie od zewnątrzkomórkowych czynników wzrostu. Cząsteczki białek Ras podlegają potranslacyjnej modyfikacji, w czasie której proces farnezytacji z udziałem transferazy farnezylowej jest jednym z etapów warunkujących ich funkcjonowanie. Zablockowanie aktywności tego enzymu powoduje zahamowanie wzrostu komórek nowotworowych *in vitro* i *in vivo*. Wyniki przeprowadzonych dotychczas badań sugerują, że cytostatyczne działanie inhibitorów transferazy farnezylowej stworzy możliwość zahamowania progresji, a być może uzyskania remisji nowotworów opornych na chemioterapię i tych, które tą oporność nabyły w czasie trwania leczenia. Dzięki odmiennemu od innych leków mechanizmowi działania na komórki, należy oczekiwać, że wykażą one większą skuteczność i mniejszą toksyczność niż dotychczas stosowane chemioterapeutyki.

Przeprowadzone badania kliniczne I fazy pozwoliły na ustalenie sposobu podawania leku, który zapewnia stężenie we krwi wywołujące zahamowanie aktywności transferazy farnezylowej przy niewielkich i tolerowanych działaniach niepożądanych. II faza badań wybranych związków właśnie się rozpoczyna.

LITERATURA

- [1] ADJEI AA, ERLICHMAN CH, DAVIS JN. A phase I and pharmacologic study of the farnesyl protein transferase (FPT) inhibitor SCH 66336 in patients with locally advanced or metastatic cancers. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1999; **18**: 156a (abstract).
- [2] AWADA A, ESKENS F, PICCART MJ. A clinical, pharmacodynamic and pharmacokinetic phase I study of SCH 66336 (SCH), an oral inhibitor of the enzyme farnesyl transferase, given once daily in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res* 1999; **5** (Suppl.): 3733s.
- [3] BOLLAG G. Loss of NF1 results in activation of the Ras signalling pathway and leads to aberrant growth in haemopoietic cells. *Nature Genetics* 1996; **12**: 144–148.
- [4] BOS JL. Ras oncogenes in human cancer. A review. *Cancer Res* 1989; **49**: 4682–4689.
- [5] BRITTEN CD, ROWINSKY E, YAO S-L. The farnesyl protein transferase (FPTase) inhibitor L-778,123 in patients with solid cancers. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1999; **18**: 155a.
- [6] BYRNE JL, MARSHALL CJ. The molecular pathophysiology of myeloid leukemias: Ras revisited. *Br J Haematol* 1998; **100**(2): 256–264.
- [7] CARPENTER CL, CANTLEY LC. Phosphoinositide kinases. *Curr Opin Cell Biol* 1996; **8**: 153–158.
- [8] CASEY PJ, SEABRA MC. Protein prenyltransferases. *J Biol Chem* 1995; **266**: 5289–5292.
- [9] DU W, LEBOWITZ PF, PRENDERGAST GC. Cell growth inhibition by farnesyltransferase inhibitors is mediated by gain of geranylgeranylated RhoB. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 1831–1840.
- [10] DU W, LIU A, PRENDERGAST GC. Activation of the IGF-PI3K pathway masks the proapoptotic effects of farnesyltransferase inhibitors. *Cancer Res* 1999; **59**: 4208–4212.
- [11] END D, SKRZAT S, DEVINE A. R115777, a novel imidazole farnesyl transferase inhibitor (FTI); biochemical and cellular effects in H-ras and K-ras dominant systems. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1998; **39**: 270 (abstract).
- [12] ESKENS F. Farnesyltransferase inhibitors: current developments and future perspectives. *Cancer Treat. Rev* 2000; **26**: 319–332.
- [13] ESKENS F, AWADA A, VERWEIJ J. Phase I and pharmacologic study of continuous daily oral SCH 66336, a novel farnesyl inhibitor, in patients with solid tumors. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1999; **18**: 156a.
- [14] FADERI S, TALPATZ M, ESTROV Z, O'BRIEN S, KURZROCK R, KANTARJIAN HM. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999; **341**: 164–172.
- [15] FU HW, CASEY PJ. Enzymology and biology of CAAX protein prenylation. *Recent Prog Horm Res.* 1999; **54**: 315–342.
- [16] GIBBS JB, OLIFF A, KOHL NE. Farnesyltransferase inhibitors: Ras research yields a potential cancer therapeutic. *Cell* 1994; **77**: 175–178.
- [17] GOLUB T, BARKER G, LOVETT M, GILLILAND D. Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell* 1994; **77**: 307–316.
- [18] HUDES G, SCHOL J, BAAB A. Phase I clinical and pharmacokinetic trial on the farnesyl transferase inhibitor R115777 on a 21-day dosing schedule. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1999; **18**: 156a (abstract).
- [19] HURWITZ HI, COLVIN OM, PETROS WP. Phase I and pharmacokinetic study of SCH 66336, a novel FTPI, using a s-week on, 2-week off schedule. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1999; **18**: 156a (abstract).
- [20] KAINUMA O, ASANO T, HASEGAWA M, KENMOCHI T, NAGAGOHRI T, TOKORO Y, ISONO K. Inhibition of growth and invasive activity of human pancreatic cancer cells by a farnesyltransferase inhibitor, manumycin. *Pancreas* 1997; **15** (4): 379–383.
- [21] KHOSRAVI-FAR R, DER CJ. The Ras signal transduction pathway. *Cancer Metastasis Rev* 1994; **13**: 67–89.

- [22] KOHL NE, WILSON FR, MOSSER SD. Protein farnesyltransferase inhibitors block the growth of ras-dependent tumors in nude mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 9141–9145.
- [23] KOHL NE, MOSSER SD, DeSOLMS SJ. Selective inhibition of ras-dependent transformation by a farnesyltransferase inhibitor. *Science* 1993; **260**: 1934–1937.
- [24] LANE HA. p70s6k function is essential for G1 progression. *Nature* 1993; **363**: 170–172.
- [25] LEBOWITZ PF, DAVIDE JP, PRENDERGAST GC. Evidence that farnesyltransferase inhibitors suppress Ras transformation by interfering with Rho activity. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 6613–6622.
- [26] LERNER EC, QIAN Y, BLASKOWICH MA. Ras CAAX peptidomimetic FTI-277 selectively blocks oncogenic Ras signaling by inducing cytoplasmic accumulation of inactive Ras-Raf complexes. *J Biol Chem* 1995; **270**: 26802–26806
- [27] LOWY DR, WILLUMSEN BM. Function and regulation of Ras. *Ann Rev Biochem* 1993; **62**: 851–891.
- [28] MAHGOUB N, TAYLOR BR, GRATIOT M, KOHL NE, GIBBS JB, JACKS T, SHANNON KM. In vitro and in vivo effects of a farnesyltransferase inhibitor on Nf1-deficient hematopoietic cells. *Blood* 1999; **94**: 2469–2476
- [29] MANNE V, YAN N, CARBONI JM. Bisubstrate inhibitors of farnesyltransferase. a novel class of specific inhibitors of ras transformed cells. *Oncogene* 1995; **10**: 1763–1779.
- [30] NJOROGE FG, DOLL RJ, VIBULBHAN B. Discovery of novel nonpeptidic, tricyclic inhibitors of Ras farnesyl protein transferase. *Bioorg Med Chem* 1997; **5**: 101–113.
- [31] PRENDERGAST GC, DAVIDE JP, DeSOLMS JS. Farnesyltransferase inhibition causes morphological reversion of ras-transformed cells by a complex mechanism that involves regulation of the actin cytoskeleton. *Mol Cell Biol*. 1994; **14**: 4193–4202.
- [32] PRENDERGAST GC. Farnesyltransferase inhibitors; antineoplastic mechanism and clinical prospect. *Curr Opin Cell Biol* 2000; **12**: 166–173.
- [33] RADICH J, KOPECKY KJ, WILLMAN CL, WEICK J, HEAD D, APPELBAUM F, SMITH C. N-ras mutations in adult de novo acute myeloid leukemia. prevalence and clinical significance. *Blood* 1999; **76**: 801–807.
- [34] REUTER CWM, MORGAN MA, BERGMANN L. Targeting the Ras signaling pathway. a rational, mechanism based treatment for hematologic malignancies? *Blood* 2000; **96**: 1655–1669.
- [35] RIDLEY AJ. The small GTP-binding protein Rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 1992; **70**: 389–399.
- [36] ROWINSKY EK, WINDLE JJ, Von HOFF DD. Ras protein farnesyltransferase: a strategic target for anticancer therapeutic development. *J Clin Oncol* 1999; **17**: 3631–3652.
- [37] SCHELLENS J, DE KLERK G, SWART M. Phase I and pharmacologic study with the novel transferase inhibitor (FTI) R115777. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2000; **19**: 184a (abstract).
- [38] SUN J, QIAN Y, HAMILTON AD, SEBTI SM. Ras CAAX peptidomimetic FTI 276 selectively blocks tumor growth in nude mice of a human lung carcinoma with K-Ras mutation and p53 deletion. *Cancer Res* 1995; **55**: 4243–4247.
- [39] ZUJEWSKI J, HORAK ID, BOL C. Phase I and pharmacokinetic study of farnesyl transferase inhibitor R115777 in advanced cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1999; **18**: 192 (abstract).

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 28.02.2001 r.

Przyjęto: 14.03.2001 r.

02-097 Warszawa, ul. Banacha 1a

e-mail: adeptala@amwaw.edu.pl

POŁĄCZENIA GAP I ICH UDZIAŁ W APOPTOZIE I KANCEROGENEZIE*

GAP-JUNCTIONS AND IT'S ROLE IN APOPTOSIS AND CARCINOGENESIS

Adrian CHABOWSKI, Mariola SULKOWSKA¹, Anna CHRZANOWSKA¹,
Elżbieta CHYCZEWSKA², Waldemar FAMULSKI¹, Irena KASACKA⁴,
Stanisław SULKOWSKI¹, Lech CHYCZEWSKI³

Zakład Fizjologii, Zakład Anatomii Patologicznej¹,
Klinika Chorób Płuc i Gruźlicy², Zakład Klinicznej Biologii Molekularnej³,
Zakład Histologii i Embriologii⁴ Akademii Medycznej w Białymstoku

Streszczenie: Połączenia międzykomórkowe typu gap są w organizmach wielokomórkowych niezbędnym elementem utrzymującym homeostatyczną kontrolę wzrostu i różnicowania się komórek. Istnienie takiej drogi przekazywania informacji pomiędzy komórkami pozostającymi w ścisłym kontakcie jest warunkiem prawidłowego funkcjonowania organizmu. Upośledzenie komunikacji (utrata połączeń gap) pomiędzy komórkami narusza homeostazę tych komórek. Cechami charakterystycznymi komórek nowotworowych są zaburzenia dotyczące kontroli wzrostu i/lub różnicowania się tych komórek. Apoptoza zaś jest genetycznie uwarunkowaną śmiercią komórek, których homeostaza została nieodwracalnie zakłócona. W pracy omówiono udział połączeń międzykomórkowych typu gap w procesach kancerogenezy oraz w procesie apoptozy komórek nowotworowych.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28: 277–292)

Słowa kluczowe: Połączenia gap, apoptoza, koneksyny, kancerogeneza

Summary: Gap junctions in multicellular organisms are indispensable in the process of holding homeostatic control of growth and differentiation of the cells. Such ways of delivering information among cells staying in strict contact are necessary for normal working of all organism. Loss of gap junction communication disturbs homeostasis of these cells. Cancer cells are characterized by disorders of growth and/or differentiation. Apoptosis is genetically determined death of cells, which homeostasis became irreversibly disturbed. In this study we try to explain the participation of gap junctions communication in cancerogenesis and in apoptosis.

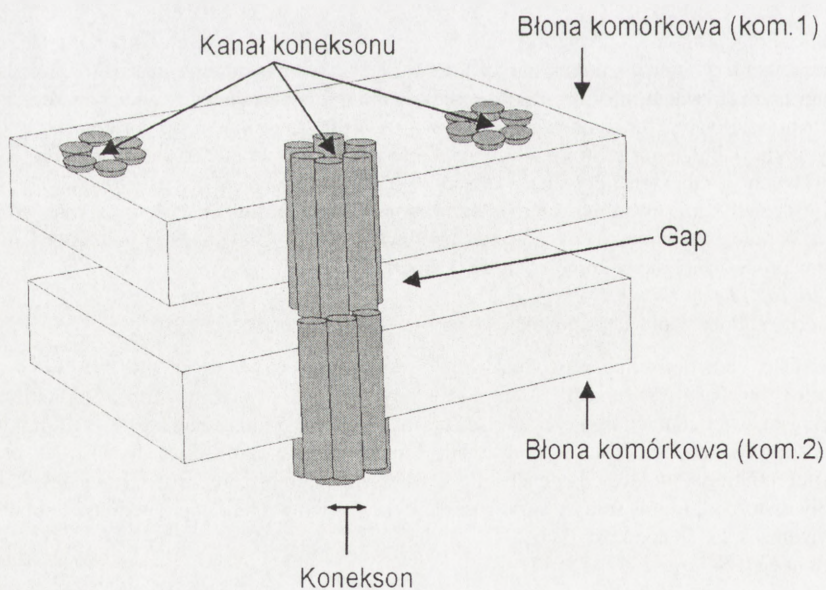
(*Advances in Cell Biology* 2001; 28: 277–292)

*Praca wykonana w ramach projektu badawczego Nr 4P05C04015 finansowanego przez KBN

Key words: Gap junctions, connexins, apoptosis, cancerogenesis

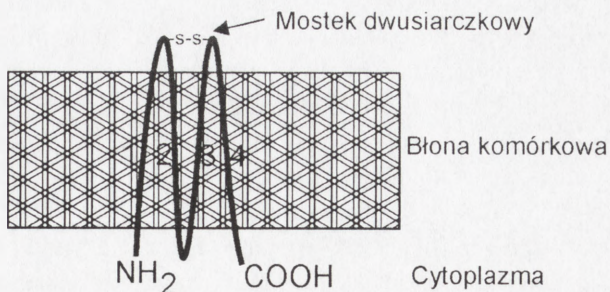
POŁĄCZENIA GAP – FIZJOLOGIA

Połączenia gap po raz pierwszy obserwowano w mikroskopie elektronowym w latach sześćdziesiątych opisując je jako przerwę – *gap* o szerokości około 2 nm. Przerwa ta opisywana była jako miejsce, gdzie dwie błony przylegających do siebie komórek były oddzielone przez jednolitą wąską przestrzeń szerokości 2–4 nm [54,55]. Połączenia gap opisywano we wszystkich typach komórek dorosłych ssaków z wyjątkiem włókien mięśni szkieletowych i krwinek czerwonych [2,45]. Połączenia gap zbudowane są z białek międzybłonowych (koneksyn), które formują strukturę nazywaną koneksonem. Koneksyny, obecne na powierzchni obu błon cytoplazmatycznych komórek pozostających w kontakcie, łączą się ze sobą tworząc kanał, który łączy wnętrza obu komórek. Koneksyny wystają z powierzchni każdej komórki, utrzymując pozostające w interakcji błony cytoplazmatyczne w określonym dystansie jedna od drugiej – stąd określenie *gap junction* – „połączenie z przerwą” (ryc. 1). Każdy konekson złożony jest z pierścienia zbudowanego z 6 identycznych transbłonowych białkowych molekuł nazywanych koneksynami, z których każda zawiera 4 rozciągające się przez błony komórkowe alfa-helisy [37]. Koneksyny mają cztery rozpięte między błonami domeny współtworzone przez dwie zewną-



RYCINA 1. Schemat połączenia gap

trzkomórkowe i jedną wewnątrzkomórkową pętlę i dwa wewnątrzkomórkowe zakończenia. Dwie pętle zewnętrzkomórkowe łączą się mostkiem dwusiarczkowym tworząc strukturę, która może służyć do rozpoznawania koneksyny położonej w obrębie przeciwległej błony komórkowej. Trzecie przejście łańcucha koneksyny przez błonę komórkową tworzy ścianę kanału koneksonu. Schematycznie



RYCINA 2. Schemat białka koneksyny i jego umiejscowienie w błonie komórkowej

nie koneksyny mogą być przedstawione w kształcie litery W [75,76,77] (ryc. 2). Obecnie znanych jest 15 różnych koneksyn ssaków [15,41]. Jednak niektóre komórki mają więcej niż jeden typ koneksyn. Najważniejsza i najlepiej poznana jest koneksyna 32 (32 kD) występująca w dużych ilościach w wątrobie. Stosunkowo dobrze poznane są także koneksyna 26 (26 kD) występująca głównie w skórze, nerkach, wątrobie i szyszynce oraz koneksyna 43 (43 kD) występująca w macicy i sercu. Mają one specyficzne sekwencje, masę cząsteczkową, cechy biochemiczne, ale wszystkie one odznaczają się podobnym przestrzennym rozmieszczeniem w poprzek błony komórkowej [15]. Koneksyny są syntetyzowane w siateczce śródplazmatycznej szorstkiej, często obserwowanej w pobliżu połączeń gap. W szorstkiej siateczce odbywa się również oligomeryzacja koneksonów i tworzenie mostków dwusiarczkowych. Oligomery ulegają egzocytozie przez aparat Golgiego i dopiero w obrębie błony komórkowej agregują pod wpływem bliżej nie znanych czynników tworząc połączenie.

Do powstania i utrzymania się połączeń gap wydają się być niezbędne ściśle fizyczne interakcje błon plazmatycznych połączonych komórek w wyniku działania molekuł adhezyjnych, takich jak: ICAM i kadheryny [37,77]. Prawdopodobne jest bowiem, że interakcja konekson-konekson nie jest wystarczająco silna, aby utrzymać błony plazmatyczne w ścisłym kontakcie, tak by formowały połączenie gap. Wykazano ostatnio, że zniesienie funkcji adhezyjnej komórek przez bezpośrednią mutację miejscową N-kadheryn zakłóca dobrze już wykształcone połączenie gap [21]. Przeniesienie zaś genów kadherynowych do pozbawionych komunikacji komórek guzowych przywracało im połączenia gap [28]. Ważnym elementem regulacji liczby połączeń gap jest również ich degradacja. Czas połowicznego rozpadu dla koneksyny 32 wynosi bowiem zaledwie kilka godzin [12,57]. Degradacja koneksonu zachodzi w następstwie jego internalizacji i bezpośredniego rozkładu w systemie lizosomów bądź po uprzednim związaniu z ubikwityną. Wykazano także, że degradacja połączeń

gap złożonych głównie z koneksyny 32 może zachodzić przy współdziałaniu aktywnych proteaz cytozolowych – kalpain [10,11]. Innym mechanizmem regulującym liczbę połączeń gap jest regulacja ekspresji genów koneksynowych bądź genów regulujących ekspresję genów koneksynowych [1,5,8,17,20,33,66]. Istnieje liczna grupa czynników fizjologicznych i farmakologicznych (np. glikokortykoidy, cAMP), które zwiększają ekspresję genów koneksynowych [47,56]. Gwałtownie rośnie liczba wykrytych substancji chemicznych, które są w stanie zwiększać lub zmniejszać liczbę połączeń gap [69,77]. Wykazano także, że czynniki hamujące wzrost i różnicowanie się komórek, takie jak retinoidy, mogą wpływać na zwiększenie liczby połączeń gap [24,77]. Udowodniono redukcję liczby połączeń gap i jednoczesny spadek ekspresji genów koneksynowych podczas ekspozycji komórek na czynniki wzrostowe lub podczas nasilonej proliferacji jak na przykład podczas regeneracji komórek wątroby po częściowej hepatektomii.

Połączenie gap stanowi przestrzeń utworzoną przez białkowe cząstki (na kształt tunelu), przez którą nieorganiczne jony, wtórne przekaźniki (cAMP, IP_3 , DAG, wapń) i inne małe molekuly rozpuszczalne w wodzie (oligonukleotydy, różne metabolity, substancje odżywcze) mogą bezpośrednio przechodzić z cytoplazmy jednej komórki do cytoplazmy drugiej komórki. Łączy to obie komórki zarówno elektrycznie, jak i metabolicznie [59]. Mechanizmy kontrolujące przepuszczalność połączeń typu gap są nadal słabo poznane. Przepuszczalność połączeń gap może być odzwierciedleniem różnic w budowie strukturalnej koneksyn, które formują dane połączenie. Niektóre typy komórek mają więcej niż jeden typ koneksyn, ale nie jest jasne, czy różne białka koneksynowe są w stanie sformować prawidłowy konekson i połączenie gap [53,72]. Zamknięcie koneksonu następuje przy spadku pH poniżej 6,5 oraz przy podwyższonym stężeniu wewnątrzkomórkowego Ca^{+2} i Mg^{+2} [16]. Obserwowane często w sąsiedztwie połączeń mitochondria mają regulować stężenie jonów Ca^{+2} i w ten sposób wpływać na czynność połączenia. Przepuszczalność utworzonego połączenia typu gap jest „bramkowana” przez różne mechanizmy. Jednym z nich jest fosforylacja koneksyn tworzących konekson przez kinazy białkowe. Ufosforylowane koneksyny zmieniają strukturę przestrzenną połączeń gap, co zmienia przepuszczalność tego połączenia [3,58]. Interesujący wydaje się być fakt, że fosforylacja koneksyny 43 pod wpływem kinazy białkowej A zwiększa przepuszczalność połączenia gap, podczas gdy fosforylacja tej samej koneksyny przez kinazę białkową C zmniejsza przepuszczalność połączenia [57]. Wykazano także wpływ stężenia jonów wapniowych i wolnych rodników tlenowych na przepuszczalność połączeń gap [58]. Połączenia gap uczestniczą w przewodzeniu bodźców elektrycznych pomiędzy pobudzonymi komórkami oraz odgrywają rolę w przekazywaniu bodźców hormonalnych. Poprzez te połączenia następuje synchronizacja funkcji komórek w zespole, komórki przekazują sobie nawzajem substancje sygnałowe i czynniki biologiczne niezbędne do prawidłowego przebiegu różnicowania w rozwoju embrionalnym. Są niezbędne do utrzymania homeosta-

tycznej kontroli wzrostu i różnicowania się organizmów wielokomórkowych. Jak wykazano w badaniach doświadczalnych, u myszy upośledzenie przewodzenia w połączeniach gap prowadzi do poważnych anomalii rozwojowych [36]. Stwierdzono także udział połączeń gap w przebiegu gojenia się ran. Pomimo że mechanizm reparacyjny uszkodzeń nabłonka nie jest dokładnie znany, sugeruje się udział połączeń gap w koordynowaniu migracji i proliferacji komórek [23].

Połączenia gap są jednym z elementów systemu warunkującego komunikowanie się pomiędzy komórkami. Zasadniczą funkcją połączeń gap jest utrzymanie homeostazy w tkankach. Dzięki tym połączeniom odbywa się międzykomórkowa wymiana jonów, metabolitów, cAMP i substancji odżywczych. W tkankach pozbawionych naczyń krwionośnych (np. w rogówce) są one jedyną drogą odżywiania komórek [19]. Należy więc domniemywać, że zaburzenia w jakości, jak również w liczbie połączeń międzykomórkowych typu gap mogą prowadzić do śmierci komórek. Wszystkie wielokomórkowe organizmy mają genetyczne mechanizmy służące do usuwania własnych komórek, których homeostaza została zakłócona. Takim mechanizmem genetycznie uwarunkowanej śmierci komórki jest apoptoza. Zaburzenia połączeń typu gap mogą prowadzić do wzmożonej apoptozy tych komórek [68]. Niewiele jest jednak opracowań dotyczących związku zmian zachodzących w połączeniach międzykomórkowych gap a apoptozą zarówno w warunkach fizjologicznych, jak również w stanach patologicznych.

APOPTOZA

Zgodnie z klasyczną definicją zaproponowaną przez Kerr i wsp. [32] apoptoza jest to zespół określonych zmian biochemicznych i morfologicznych zachodzących w umierającej komórce. Apoptoza jest procesem aktywnym wymagającym ekspresji odpowiednich genów, syntezy mRNA, białek oraz aktywacji kaskady enzymów proteolitycznych. Zjawisko apoptozy jest procesem przeciwnym do mitozy, biorącym udział w regulacji liczby komórek, usuwaniu komórek genetycznie uszkodzonych bądź zainfekowanych. Zjawisko apoptozy, podobnie jak proces proliferacji jest niezbędne dla prawidłowej embriogenezy i morfogenezy. Ponad 90% komórek ulega apoptozie w trakcie dojrzewania limfocytów T w grasicy i komórek krwiotwórczych w szpiku kostnym [63]. Podobnie większość komórek nowotworowych ulega apoptozie samoistnie lub pod wpływem promieniowania jonizującego i cytostatyków [63,65].

Genetycznie uwarunkowana śmierć komórki jako zjawisko fizjologiczne była rozpatrywana od momentu, gdy dostępne stało się barwienie skrawków tkankowych obserwowanych w mikroskopie świetlnym. Jednakże dopiero lata siedemdziesiąte przyniosły ponowny wzrost zainteresowania zjawiskiem samodzielnego obumierania

komórek organizmu. W opublikowanej w 1971 r. pracy Kerr i wsp. [32] opisywali zmniejszające się komórki wątrobowe jako następstwo podwiązania odgałęzienia żyły wrotnej. Indukowany w ten sposób zanik wątroby u szczura charakteryzował się obkurczaniem się hepatocytów, początkowo wiązanym ze zmianami martwiczymi, a rok później określony jako zjawisko apoptozy. W tym samym czasie zostały przeprowadzone kolejne ważne badania dotyczące procesu apoptozy w układzie limfatycznym. W 1976 i 1981 r. niezależne trzy grupy badaczy obserwując chromatynę z naświetlonych promieniami Roentgena tkanek limfatycznych opisały rozpad jąder limfocytów na fragmenty tworzące ściśle określone wzory na żelu agarazowym (ang. *ladder-like* – wzór drabiny) [78]. Następnie w 1984 r. Wyllie i wsp. [74] połączyli ten „wzór drabiny” ze zjawiskiem apoptozy i skutkiem tego dołączyli specyficzny biochemiczny marker do morfologicznych zmian w komórkach określanych jako apoptoza. To odkrycie wyzwoliło ogromny wzrost badań na polu koncentrującym się wokół aspektów wciągniętych w samobójczą śmierć komórek i możliwość wykorzystania procesu apoptozy jako drogi do diagnostyki i terapii wielu schorzeń.

Apoptoza – czynniki indukujące

Apoptozę może indukować wiele różnorodnych czynników, zarówno fizycznych (promieniowanie, szok zimny i ciepły), chemicznych (cytostatyki czy wolne rodniki tlenowe) oraz biologicznych (glukokortykoidy, czynnik martwicy nowotworu TNF-alfa, przeciwciała anty Fas/APO-1 czy niedobór czynników wzrostowych) [63]. O tym: czy komórka ulegnie przypadkowej śmierci, czy uruchomi program apoptozy decyduje rodzaj czynnika indukującego śmierć (np. TNF-alfa wywołuje zarówno apoptozę, jak i nekrozę), długość ekspozycji komórek i dawka czynnika stymulującego śmierć, jak to ma miejsce w przypadku różnych cytostatyków lub w końcu typ komórek stymulowanych do śmierci [63]. Niestety, ciągle niewiele jeszcze wiadomo na temat dróg przekazywania sygnałów prowadzących do uruchomienia programu samobójczej śmierci komórki (apoptozy). Komórki, można indukować doświadczalnie do samobójczej śmierci poprzez aktywację receptorów błonowych, takich jak TCR czy Fas/APO-1 [63]. Pobudzenie receptora FAS/Apo-1 lub receptora dla TNF-alfa w większości przypadków przekazywane jest za pośrednictwem tzw. „białek śmierci” wiążących się z cytoplazmatyczną domeną receptora TNF-alfa i FAS/APO-1. „Białkami śmierci” są: w przypadku receptora FAS/APO-1 – białka FADD/Mort1 oraz RIP, natomiast dla receptora TNF-alfa (p55) są to białka TNF/TRADD [63]. Za pośrednictwem tych białek dochodzi do aktywacji sфингомielinazy katalizującej hydrolizę sфингомieliny i wytwarzanie ceramidu, który pełni w ścieżce przekazywania sygnału TNF-alfa/FAS/APO-1 rolę wtórnego przekaźnika [73]. Ceramid w nieznanym bliżej sposób prowadzi do aktywacji proteaz cysteinowych zwanych kaspazami. Warto podkreślić, że ceramid jest także me-

diatorem apoptozy wywołanej przez promieniowanie jonizujące, glikokortykoidy, IL-1, chemioterapeutyki i prawdopodobnie także przez HIV [63,73].

Apoptoza – zmiany morfologiczne

Morfologicznie pierwszą zauważalną zmianą zachodzącą podczas apoptozy jest oddzielenie się komórki ulegającej apoptozie od pozostałych komórek i pofałdowanie błony komórkowej z wytworzeniem na jej powierzchni wielu drobnych uwypukleń zwanych zeiosis [6]. Jest to wynikiem obkurczenia komórki na skutek utraty wody w drodze izoosmozy [6,13]. Chromatyna jądrowa ulega kondensacji, tworząc zbite grudki pod błoną jądrową. Zanikają pory w błonie jądrowej, a jąderka ulegają rozpadowi [18]. Następnie dochodzi do fragmentacji jądra komórkowego i powstawania ciał apoptotycznych, czyli fragmentów komórki obumierającej otoczonych błoną cytoplazmatyczną z zachowanymi, niezmiennymi morfologicznie organelami komórkowymi. Proces usuwania ciał apoptotycznych jest bardzo intensywny, co powoduje, że w obrazie mikroskopowym widuje się je prawie wyłącznie w obrębie komórek żernych [62]. Ta szybka fagocytoza wyprzedzająca w czasie utratę integralności błon przez ciała apoptotyczne zapobiega wylaniu się ich zawartości, co z kolei zapobiega indukcji procesu zapalnego w tym miejscu [62,64].

Apoptoza – zmiany biochemiczne

Decyzję uruchomienia programu genetycznej śmierci apoptotycznej w odpowiedzi na szereg adekwatnych bodźców podejmują odpowiednie geny, których białkowe produkty stymulują program apoptozy. Genami wyzwalającymi apoptozę są między innymi geny kodujące odpowiednie kaspazy, Apaf-1 (*apoptosis activating factor-1*) oraz protoonkogen bcl-2 [71]. Produkty białkowe genów wyzwalających apoptozę jak również produkty białkowe pobudzonych receptorów dla TNF-alfa wydają się skupiać w centralnym punkcie, którym są cysteinowe proteazy zwane kaspazami [53]. Ostatnie prace wskazują, że aktywacja kaspaz, np. kaspazy-3 może zachodzić w obecności tzw. czynników aktywujących apoptozę (*Apafs-apoptosis activating factors*), do których należą Apaf-1 (cytochrom c), Apaf-3 bądź pod wpływem ceramidu [71]. Aktywne kaspazy prawdopodobnie inicjują rozkład poli-(ADP-rybozo)-polimerazy (PARP) zaangażowanej w procesy naprawcze DNA [10]. Aktywne kaspazy prowadzą do rozszczepienia szeregu białek jądrowych (Rb; laminy A, B; topoizomerazy I i II) oraz cytoplazmatycznych (PKC-gamma, beta-aktyna, fodryna) [31]. Proteoliza topoizomeraz stabilizujących strukturę chromatyny prawdopodobnie prowadzi do wstępnej fragmentacji DNA na odcinki zawierające 300 tys. par zasad [50]. W dalszym przebiegu degradacji DNA dochodzi do powstawania fragmentów zawierających 50 tys. par zasad, które są rozszczepiane na odcinki 180 par zasad i na odcinki o wielokrotności tej liczby [7]. Reakcje te katalizowane

są przez endonukleazy NUC-18, DNaza I i DNaza II [52]. Fragmentacja DNA stanowi prawdopodobnie pierwszy nieodwracalny etap apoptozy, choć obserwowany nie we wszystkich komórkach wykazujących morfologiczne cechy tego procesu [63]. Z drugiej strony obecność pofragmentowanego DNA stanowi podstawę jednej z najprostszych i najczęściej stosowanych metod stosowanych do identyfikacji komórek umierających poprzez apoptozę, tj. elektroforezy DNA w żelu agarozowym [7]. Fragmenty o wielokrotności 180 par nukleosomów dają w żelu obraz charakterystycznej „drabinki” [63,64,78]. Uważa się, iż proteoliza pod wpływem kaspaz białek cytoplazmatycznych (lamin) wchodzących w skład między innymi błon jądrowych jest procesem niezbędnym w powstawaniu ciałek apoptotycznych. Proteoliza pozwala na fragmentację jądra oraz upakowanie zagęszczonej chromatyny we fragmenty komórki, nazywane ciałkami apoptycznymi. W procesie powstawania ciał apoptycznych uczestniczy transglutaminaza, enzym warunkujący tworzenie dodatkowej sieci wiązań pomiędzy białkami błonowymi. Wytworzony zostaje w ten sposób ochronny „płaszcz”, odpowiadający za brak kontaktu środowiska wewnętrznego umierającej komórki ze środowiskiem pozakomórkowym [14].

POŁĄCZENIA GAP A PROCES NOWOTWOROWY

Dane z piśmiennictwa sugerują, że jedną z najważniejszych cech komórek nowotworowych jest brak kontroli wzrostu bądź różnicowania się tych komórek [68]. Pierwsze badania, przeprowadzone w 1966 roku *in vitro*, wykazały, że komórki nowotworowe mają bardzo małą zdolność do komunikowania się między sobą (zaburzone połączenia homologiczne gap) [44]. Później udowodniono brak połączeń gap pomiędzy komórkami nowotworowymi a otaczającymi je komórkami zdrowymi (zaburzone połączenia heterologiczne gap). Ta izolacja komórek nowotworowych od otaczających zdrowych komórek pozwala prawdopodobnie na ucieczkę komórek nowotworowych od sygnałów utrzymujących proliferację w normalnych tkankach pod kontrolą organizmu [76]. Dotychczas przeprowadzone badania dowodzą, że większość litych guzów nowotworowych ma zaburzone połączenia homologiczne i heterologiczne typu gap i/lub zmniejszoną ich liczbę [9,29,44,48]. Tomai i wsp. sugerują nawet, że ocena liczby połączeń gap w komórkach raka płuc może mieć wartość prognostyczną [67]. Upośledzona komunikacja między komórkami nowotworowymi w wyniku utraty połączeń gap może być skutkiem obniżenia ekspresji genów koneksynowych [43] lub zmienionej wewnątrzkomórkowej lokalizacji koneksyn [38]. W niektórych guzach nowotworowych wykazano bezpośrednią mutację typu zmiany sensu w genach koneksynowych prowadzącą do zmian strukturalnych w budowie koneksyn [60]. Przeniesienie genów koneksynowych do komórek nowotworowych, wykazujących brak połączeń gap, powodowało syntezę *de novo*

koneksyn i odbudowę połączeń między komórkami, co z kolei hamowało wzrost tych komórek [35,75]. Rośnie także liczba genów, których przeniesienie do nie komunikujących się ze sobą komórek nowotworowych przywraca połączenia typu gap, przywracając częściowo kontrolę nad wzrostem tych komórek [46]. Badania powyższe sugerują możliwość zaliczenia genów koneksynowych do rodziny genów supresorowych hamujących rozwój nowotworów. Jednakże dotychczas nie odnaleziono mutacji w obrębie tych genów w ludzkich nowotworach. Zidentyfikowano natomiast mutacje dwóch genów koneksynowych w chemicznie indukowanych guzach szczurów. Ostatnio przeprowadzone badania sugerują, że geny koneksynowe mogą być inaktywowane poprzez hypermetylację ich regionów promotorowych. Jednakże w wielu guzach obserwuje się prawidłowe nasilenie ekspresji koneksyn, ale o zmienionej lokalizacji wewnątrzkomórkowej. Wykazano także, że zmieniona wewnątrzkomórkowa lokalizacja koneksyn zaburza tworzenie się połączeń gap i komunikację pomiędzy komórkami [40]. Mechanizm zmiany umiejscowienia koneksyn wewnątrz komórki nie jest znany, przypuszcza się, że zasadnicze znaczenie ma nieprawidłowa fosforylacja koneksyn bądź brak zdolności rozpoznawania komórek, które mają się połączyć. Istnieją także doniesienia literaturowe negujące rolę połączeń gap w procesie karcinogenezy [4].

PROCES NOWOTWOROWY – KONEKSYNY 26, 32, 43

Rolę koneksyn w procesie nowotworowym badano na podstawie modeli doświadczalnych, jak też w pooperacyjnym materiale ludzkich guzów nowotworowych, w jednym z eksperymentów dokonano przeniesienia genu kodującego koneksynę 43 (Cx43) do nowotworowych linii komórek nabłonkowych nerki psa (TRMP – *transformed dog kidney epithelium cells*). Po przeniesieniu genu stwierdzono, że koneksyna 43 nie tylko odbudowuje połączenia gap, ale także normalizuje wzrost komórek nowotworowych [40]. Przeprowadzone badania ludzkich linii komórek nowotworowych nerki również wykazały obniżoną ekspresję koneksyny 43 i upośledzenie transportu międzykomórkowego [49]. Jedną z najlepiej poznanych koneksyn odgrywającą jak się wydaje zasadniczą rolę w procesach nowotworowych jest koneksyna 43. Dotychczas przeprowadzone badania immunohistochemiczne wykazały obecność koneksyny 43 w wielu prawidłowych tkankach ssaków oraz obniżoną jej ekspresję w tkankach zmienionych nowotworowo [22]. Huang i wsp. stwierdzili obniżoną ekspresję koneksyny 43 w III i IV stopniu zaawansowania wg WHO glejaka mózgu w porównaniu ze zdrową tkanką mózgową i mniej zaawansowanymi glejakami. Zredukowana liczba połączeń międzykomórkowych gap, według autorów tego badania, wiąże się z progresją choroby nowotworowej wyznaczając pośrednio bardziej agresywny charakter nowotworu [25]. Badania immuno-

histochemiczne ujawniły wysoką ekspresję koneksyny 43 w normalnej, zdrowej tkance gruczołu sutkowego i obniżenie ekspresji tej koneksyny w większości guzów pierwotnych sutka i brak ekspresji w przerzutach odległych [22]. Laird i wsp. [42] sugerują, że ekspresja koneksyny 43 może być niezależnym markerem procesu nowotworowego w raku sutka. Podobne wyniki otrzymano badając gruczoł krokowy, gdzie obserwowano zmniejszającą się ekspresję koneksyny 43 w miarę wzrostu stopnia zaawansowania guza nowotworowego [70]. Obserwowano także obniżenie poziomu mRNA koneksyny 43 w większości przypadków raka wątroby w porównaniu do zdrowej tkanki wątrobowej. W raku wątroby obserwowano także odwróconą lokalizację koneksyny 43 i 32, które zamiast umiejscawiać się w pobliżu błony komórkowej zlokalizowane były w cytoplazmie komórek [39,40]. Z kolei Jinn i wsp. [27] obserwowali obniżoną ekspresję koneksyny 43 w nisko zróżnicowanych gruczolakorakach i rakach płaskonabłonkowych płuc w porównaniu do raków bardziej zróżnicowanych. Wyżej wymienieni autorzy stwierdzili jednocześnie brak ekspresji koneksyny 32 w komórkach raka płuc.

Kamibayashi i wsp. [34] w przeprowadzonych badaniach płaskonabłonkowego raka skóry u myszy stwierdzili znamienne statystycznie obniżoną ekspresję koneksyny 43 i 26 w porównaniu do brodawczaków płaskonabłonkowych i do przyległej tkanki nie zmienionej nowotworowo. Autorzy ci obserwowali także tendencję do wzrostu ekspresji koneksyny 26 w miarę obniżania się stopnia zróżnicowania komórek rakowych skóry, przy braku takiej zależności w stosunku do ekspresji koneksyny 43. Ci sami autorzy wykazali spadek ekspresji koneksyny 32 w fazie inicjacji i wczesnej promocji podczas indukowanej kancerogenezy w komórkach szczurzej wątroby. Obserwowali jednocześnie obniżanie się ekspresji koneksyny 26 w kolejnych etapach kancerogenezy hepatocytów [34,61]. Krutovskikh i wsp. [38] zauważyli natomiast zmienioną lokalizację koneksyny 32 w guzach wątroby, koneksyna 32 zamiast lokalizacji wewnątrz błony komórkowej hepatocytów umiejscowiona była głównie w cytoplazmie komórek. Przeprowadzone następnie badania genetyczne nie wykazały żadnych zmian strukturalnych w genie kodującym koneksynę 32 [38,39]. Inna grupa badaczy japońskich stwierdziła brak lub jedynie śladową ekspresję koneksyn 26, 32 i 43 w liniach ludzkich raków przelyku w porównaniu do zdrowych tkanek [51]. Z kolei Jamieson i wsp. [26] stwierdzili natomiast podwyższoną ekspresję koneksyny 26 i 43 w komórkach raka sutka w porównaniu do tkanki nie zmienionej nowotworowo. Zauważyli również dominującą cytoplazmatyczną lokalizację ekspresji koneksyny 26 i 43 wewnątrz komórek rakowych.

Podsumowując, należy podkreślić, że prowadzone obecnie badania koneksyn obejmują zarówno jakościowe, jak i ilościowe zaburzenia tych białek. Zaburzenia jakościowe dotyczą głównie zmian składu aminokwasowego, natomiast badania zmian ilościowych koncentrują się na ocenie stopnia ekspresji tych białek. Istotne wydają się także badania lokalizacji wewnątrzkomórkowej koneksyn w komórkach

zmienionych nowotworowo, aczkolwiek w chwili obecnej są one zawężone do oceny koneksyn 26, 32, 43 w najczęściej występujących nowotworach u ludzi (rak płuc, rak sutka).

APOPTOZA – POŁĄCZENIA MIĘDZYKOMÓRKOWE GAP

Wszystkie wielokomórkowe organizmy mają genetyczne mechanizmy służące do usuwania własnych komórek, których homeostaza została zakłócona. Takim mechanizmem genetycznie uwarunkowanej śmierci komórki jest apoptoza. Połączenia gap są zaś niezbędne do utrzymania homeostatycznej kontroli wzrostu i różnicowania się komórek. Komórka nowotworowa charakteryzuje się zaburzeniami mechanizmów kontrolujących jej wzrost i/lub różnicowanie. Należy więc domniemywać, że zaburzenia w jakości jak również w liczbie połączeń międzykomórkowych typu gap występujące w guzach nowotworowych powinny prowadzić do wzmożonej apoptozy komórek nowotworowych [68]. Sugerowany jest również inny model współzależności pomiędzy istnieniem połączeń międzykomórkowych typu gap a procesem apoptozy. Wydaje się, że komunikacja gap między komórkami warunkuje przekazanie sygnału odpowiedzialnego za uruchomienie procesu apoptozy w komórkach nowotworowych. Zaburzenia połączeń gap powinny hamować rozwój procesu apoptozy w niepołączonych komórkach, nasilając rozwój guza nowotworowego [68]. Brak jest jednak szerszych opracowań dotyczących związku zaburzeń w połączeniach gap, a apoptozą w przebiegu procesu nowotworowego. Większość badań poświęconych apoptozie dotyczy pojedynczych, izolowanych linii komórek nowotworowych (np. HL-60), w których nie stwierdzono połączeń międzykomórkowych gap. Dotychczas przeprowadzone badania wydają się sugerować, że utrata połączeń typu gap może odgrywać rolę w promowaniu rozwoju nowotworów poprzez hamowanie apoptozy komórek nowotworowych [68]. Dostrzeżono związek pomiędzy znanymi promotorami guzów, takimi jak: fenobarbital czy peroksyzowe proliferatory, które mogą hamować apoptozę i ograniczać w tym samym czasie liczbę połączeń gap [68]. Zauważono także, że niektóre substancje chemiczne promujące guzy (np. fenobarbital), jak również część związków chemicznych hamujących rozwój guzów (np. retinoidy czy deksametazon), które są znane z hamowania zjawiska apoptozy, mogą jednocześnie hamować połączenia międzykomórkowe gap. Z drugiej strony, niektóre leki, substancje chemiczne i czynniki wzrostu znane jako podwyższające liczbę połączeń gap (np. retinoidy, deksametazon, cAMP i TGF-beta) nasilają zjawisko apoptozy [68].

Stwierdzono także związek pomiędzy jednym z genów hamujących rozwój nowotworów a regulacją genu kodującego koneksynę 26 odpowiedzialną za powstawanie połączeń typu gap [68]. Jednakże ustalenia wymaga, czy inne geny supresorowe

guzów, takie jak p53 czy Rb, których udział w procesie apoptozy jest znany, są w stanie regulować ekspresję genów koneksynowych. Z drugiej strony w dotychczas przeprowadzonych badaniach wykazano, że onkogeny, takie jak ras czy raf, są związane zarówno z obniżeniem komunikacji międzykomórkowej typu gap, jak również z hamowaniem procesu apoptozy [68].

Szczególnie istotne staje się ustalenie drogi patogenetycznej łączącej procesy apoptozy komórek nowotworowych i zaburzeń w połączeniach typu gap. Utrata połączeń pomiędzy komórkami nowotworowymi, jak też pomiędzy komórkami nowotworowymi a komórkami nie zmienionymi nowotworowo, może odgrywać rolę w progresji nowotworów poprzez hamowanie apoptozy komórek nowotworowych. Wydaje się, że połączenia międzykomórkowe gap i ich rola w procesie apoptozy może stanowić nowy, interesujący kierunek badań prowadzący do głębszego poznania biologii nowotworów.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BAI S, SPRAY DC, BURK RD. Identification of proximal and distal regulatory elements of the rat connexin32 gene. *Biochim Biophys Acta Gene Struct Expression* 1993; **1216**: 197–204.
- [2] BENNETT MVL, BARRIO LC, BARGIELLO TA, SPRAY DC, HERTZBERG E, SAEZ JC. Gap Junctions: new tools, new answers, new questions. *Neuron* 1991; **6**: 305–320.
- [3] BRINK PR. Gap junction channel gating and permselectivity: Their roles in co-ordinated tissue function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1996; **23**: 1041–1046.
- [4] BUDUNOVA IV, WILLIAMS GM. Cell culture assays for chemicals with tumor-promoting or tumor-inhibiting activity based on the modulation of intercellular communication. *Cell Biol Toxicol* 1994; **10**: 71–116.
- [5] CHEN Z-Q, LEFEBVRE D, BAI X-H, REAUME A, ROSSANT J, LYE SJ. Identification of two regulatory elements within the promoter region of the mouse connexin 43 gene. *J Biol Chem* 1995; **270**: 3863–3868.
- [6] COHEN JJ. Apoptosis. *Immunology Today* 1993; **14**: 126–130.
- [7] COMPTON MM. A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. *Cancer Methas Revs* 1992; **11**: 105–119.
- [8] De LEON JR, BUTTRICK PM, FISHMAN GI. Functional analysis of the connexin43 gene promoter *in vivo* and *in vitro*. *J Mol Cell Cardiol* 1994; **26**: 379–389.
- [9] EGHABALI B, KESSLER JA, REID LM, ROY C, SPRAY DC. Involvement of gap junctions in tumorigenesis: transfection of tumor cells in connexin32 cDNA retards growth *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 10701–10705.
- [10] ELVIRA M, DIEZ JA, WANG KKW, VILLALOBO A. Phosphorylation of connexin-32 by protein kinase C prevents its proteolysis by n-calpain and m-calpain. *J Biol Chem* 1993; **268**: 14294–14300.
- [11] ELVIRA M, WANG KKW, VILLALOBO A. Phosphorylated and non-phosphorylated connexin-32 molecules in gap junction plaques are protected against calpain proteolysis after phosphorylation by protein kinase C. *Biochem Soc Trans* 1994; **22**: 793–796.
- [12] FALLON RF, GOODENOUGH DA. Five-hour half-life of mouse liver gap-junction protein. *J Cell Biol* 1981; **90**: 521–526.

- [13] FAWTHROP DJ, BOOBIS AR, DAVIES DS. Mechanisms of cell death. *Arch Toxicol* 1991; **65**: 437–444.
- [14] FESUS L, THOMAZY V, FALUS A. Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. *FEBS Lett* 1987; **284**: 104–108.
- [15] FISHMAN GI, EDDY RL, SHOWS TB, ROSENTHAL L, LEINWANDT LA. The human connexin gene family of gap junction proteins: distinct chromosomal locations but similar structures. *Genomics* 1991; **10**: 250–256.
- [16] GAINER H, MURRAY A. Diacylglycerol inhibits gap junctional communication in cultured epidermal cells: evidence for a role of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; **126**: 1109–1113.
- [17] GEIMONEN E, JIANG W, ALI M, FISHMAN GI, GARFIELD RE, ANDERSEN J. Activation of protein kinase C in human uterine smooth muscle induces connexin-43 gene transcription through an AP-1 site in the promoter sequence. *J Biol Chem* 1996; **271**: 23667–23674.
- [18] GÓRA-TYBOR J, ROBAK T. Apoptoza – zaprogramowana śmierć komórki. *Post Hig Med Dośw* 1994; **48**: 209–225.
- [19] HAYASHI T, NOMATA K, CHANG CC, RUCH RJ, TROSKO JE: Cooperative effects of v-myc and c-Ha-ras oncogenes on gap junctional intercellular communication and tumorigenicity in rat liver epithelial cells. *Cancer Lett* 1998; **128**: 145–154.
- [20] HENNEMANN H, KOZJEK G, DAHL E, NICHOLSON B, WILLECKE K. Molecular cloning of mouse connexins-26 and -32: Similar genomic organization but distinct promoter sequences of two gap junction genes. *Eur J Cell Biol* 1992; **58**: 81–89.
- [21] HERTIG CM, EPPENBERGER-EBERHARDT M, KOCH S, EPPENBERGER HM. N-cadherin in adult rat cardiomyocytes in culture. Functional role of N-cadherin and impairment of cell-cell contact by a truncated N-cadherin mutant. *J Cell Sci* 1996; **109**: 1–10.
- [22] HIRSCH KK, XU CE, TSUKAMOTO T. Gap junction gene cx26 and cx43 individually suppress the cancer phenotype of human mammary carcinoma cells and restore differentiation potential. *Cell Growth Differ* 1996; **7**: 861–870.
- [23] HOLDEN PR, MCGUIRE B, STOLER A, BALMAIN A, PITTS JD: Changes in gap junctional intercellular communication in mouse skin carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1997; **18**: 15–21.
- [24] HOSSAIN MZ, WILKENS LR, MEHTA PP, LOEWENSTEIN WR, BERTRAM JS. Enhancement of gap junctional communication by retinoids correlates with their ability to inhibit neoplastic transformation. *Carcinogenesis* 1989; **10**: 1743–1748.
- [25] HUANG RP, HOSSAIN MZ, SEHGAL A, BOYNTON AL. Reduced connexin 43 expression in high-grade brain human glioma cells. *J Surg Oncol* 1999; **70**: 21–24.
- [26] JAMIESON S, GOING JJ, D'ARCY R, GEORGE D. Expression of gap junction proteins connexin 26 and connexin 43 in normal human breast and in breast tumours. *J Pathol* 1998; **184**(1): 37–43.
- [27] JINN Y, ICHIOKA M, MARUMO F. Expression of connexin 32 and connexin 43 gap junction proteins and E-cadherin in human lung cancer. *Cancer Lett* 1998; **127**: 161–1697.
- [28] JONGEN WFM, FITZGERALD M, ASAMOTO M, PICCOLI C, SLAGA TJ, GROS D., TAKEICHI M, YAMASAKI H. Regulation of connexin43-mediated gap junctional intercellular communication by Ca^{++} in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin. *J Cell Biol* 1991; **114**: 545–555.
- [29] KANNO Y, MATSUI Y. Cellular uncoupling in cancerous stomach epithelium. *Nature* 1968; **218**: 7775–7776.
- [30] KANNO Y. Modulation of cell communication and carcinogenesis. *Jpn J Physiol* 1985; **35**: 693–707.
- [31] KAUFMANN SH. Proteolytic cleavage during chemotherapy-induced apoptosis. *Mol Med Today* 1996; **6**: 298–303.
- [32] KERR JF, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; **26**: 239–257.

- [33] KIANG DT, JIN N, TU ZJ, LIN HH. Upstream genomic sequence of the human connexin26 gene. *Gene* 1997; **199**: 165–171.
- [34] KAMIBAYASHI Y, OYAMADA Y, MORI M, OYAMADA M. Aberrant expression of gap junction proteins (connexins) is associated with tumor progression during multistage mouse skin carcinogenesis *in vivo*. *Carcinogenesis* 1995; **16**(6): 1287–1297.
- [35] KLAUNIG JE, RUCH RJ. Role of inhibition of intercellular communication in carcinogenesis. *Lab Invest* 1990; **62**: 135–144.
- [36] KOJIMA T, MITAKA T, MIZUGUCHI T, MOCHIZUKI Y. Effects of oxygen radical scavengers on connexins 32 and 26 expression in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Carcinogenesis* 1996; **17**: 537–544.
- [37] KRUTOVSKIKH VA, YAMASAKI H. The role of gap junctional intercellular communication (GJIC) disorders in experimental and human carcinogenesis. *Histol Histopathol* 1997; **12**: 761–768.
- [38] KRUTOVSKIKH VA, MAZZOLENI G, MIRONOV N, OMORI Y, AGUELON AM, MESNIL M, BERGER F, PARTENSKY C, YAMASKI H. Altered homologous and heterologous gap-junctional intercellular communication in primary human liver tumors associated with aberrant protein localization but not gene mutation of connexin 32. *Int J Cancer* 1994; **56**: 87–94.
- [39] KRUTOVSKIKH VA, OYAMADA M, YAMASAKI H. Sequential changes of gap junctional intercellular communications during multistage rat liver carcinogenesis: direct measurement of communication *in vivo*. *Carcinogenesis* 1991; **12**: 1701–1706.
- [40] KRUTOVSKIKH VA, TROYANOVSKY SM, PICCOLI C, TSUDA H, ASAMOTO M, YAMASAKI H. Differential effect of subcellular localization of communication impairing gap junction protein connexin 43 on tumor cell growth *in vivo*. *Oncogene* 2000; **19**(4): 505–513.
- [41] KUMAR NM, GILULA NB. The gap junction communication channel. *Cell* 1996; **84**: 381–388.
- [42] LAIRD DW, FISTOURIS P, BATIST G, ALPERT L, HUYNH HT, CARYSTINOS GD, ALAOUI-JAMALI MA. Deficiency of Connexin43 gap junctions is an independent marker for breast tumors. *Cancer Res* 1999; **59**(16): 4104–4110.
- [43] LEE SW, TOMASETTO C, SAGER R. Positive selection of candidate tumor-suppressor genes by subtractive hybridization. *Proc Natl Acad Sci* 1991; **88**: 2825–2829.
- [44] LOEWENSTEIN WR, KANNO Y. Intercellular communication and the control of tissue growth: lack of communication between cancer cells. *Nature* 1966; **209**: 1248–1249.
- [45] LOEWENSTEIN WR. Junctional intercellular communication: the cell-cell membrane channel. *Physiol Rev* 1981; **61**: 829–913.
- [46] MEHTA PP, HOTZ-WAGENBLATT A, ROSE B, SHALLOWAY D, LOEWENSTEIN WR. Incorporation of the gene for a cell – cell channel protein in to transformed cells leads to normalization of growth. *J Membr Biol* 1991; **124**: 207–225.
- [47] MEHTA PP, YAMAMOTO M, ROSE B. Transcription of the gene for the gap junctional protein connexin 43 and expression of functional cell-to cell channels are regulated by cAMP. *Mol Biol Cell* 1992; **3**: 839–850.
- [48] MESNIL M, MONTESANO R, YAMASAKI H. Intercellular communication of transformed and non-transformed rat liver epithelia cells. *Exp Cell Res* 1986; **165**: 391–402.
- [49] NOGUCHI M, NOMATA K, WATANABE JI, SATO H, KANETAKE H, SAITO Y. Disruption of gap junctional intercellular communication in human renal cancer cell lines. *Urology* 1999; **53**(1): 218–222.
- [50] OBERHAMMER F, WILSON JW, DIVE C, MORRIS ID, HICKMAN JA, WAKELING AE, WALKER PR, SIKORSKA M. Apoptotic death in epithelial cells: Cleavage of DNA to 300 nm and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J* 1994; **13**: 3679–3684.

- [51] OYAMADA Y, OYAMADA M, FUSCO A, YAMASAKI H. Aberrant expression, function and localization of connexins in human esophageal carcinoma cell lines with different degrees of tumorigenicity. *J Cancer Res Clin Oncol* 1994; **120**: 445–453.
- [52] PEITSCH MC, MANNHERZ HG, TSCHOPP J. Overexpression of deoxyribonuclease (Dnase I) transfected into COS – cells: its dystrubution during apoptic cell death. *Eur J Cell Biol* 1993; **62**: 397–405.
- [53] RAO L, WHITE E. Bcl-2 and the ICE-family of apoptotic regulators: making a connection. *Current Opinion in Genetics and Development* 1997; **7**: 52–58.
- [54] REVEL JP, KARNOVSKY MJ. Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J Cell Biol* 1967; **33**: C7–C12.
- [55] ROBERTSON JD. The occurrence of subunit pattern in the unit membranes of club endings in Mauthner cell synapses in Goldfish brains. *J Cell Biol* 1963; **19**: 201–221.
- [56] RUCH RJ, KLAUNING JE. Enhancement of rodent hepatocyte gap junctional intercellular communication by dexamethasone. *In Vitro Toxicol* 1995; **5**: 103–111.
- [57] RUCH RJ. The role of gap junctional intercellular communication in neoplasia. *Ann Clin Lab Sci* 1994; **24**(3): 216–231.
- [58] SAEZ JC, BERTHOUD VM, MORENO AP, SPRAY DC. Gap junctions: Multiplicity of controls in differentiated and undifferentiated cells and possible functional implications. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 1993; **27**: 163–198.
- [59] SAEZ JC, CONNOR JA, SPRAY DC, BANNETT MVL. Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger, inositol 1,4,5-triphosphate, and calcium ions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 2708–2712.
- [60] SAITO T, BARBIN A, OMORI Y, YAMASAKI H. Connexin 37 mutations in rat hepatic angiosarcomas induced by vinyl chloride. *Cancer Res* 1997; **57**:376–377.
- [61] SAKAMOTO H, OYAMADA M, ENOMOTO K, MORI M. Differential changes in expression of gap junction proteins connexin 26 and 32 during hepatocarcinogenesis in rats. *Jpn J Cancer Res* 1992; **83**: 1210–1215.
- [62] SAVILL J, FADOK V, HENSON P, HASLETT C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunology Today* 1994; **87**: 131–136.
- [63] SIKORA E. Mechanizmy śmierci programowanej komórek (apoptozy). *Post Biochemii* 1994; **40**(3): 150–160.
- [64] SŁOWIŃSKI J, HARBIN-SŁOWIŃSKA M, KAŁUŻA J. Zjawisko apoptozy w układzie nerwowym. *Post Biol Kom* 1996; **23**: 299–312.
- [65] SMETS LA. Programmed cell death (apoptosis) and response to anti- drugs. *Anti-Cancer Drugs* 1994; **5**: 3–9.
- [66] SULLIVAN R, RUANGVORAVAT C, JOO D, MORGAN J, WANG BL, WANG XK, LO CW. Structure, sequence and expression of the mouse Cx43 gene encoding connexin 43. *Gene* 1993; **130**: 191–199.
- [67] TOMAI E, BROWNELL HL, TUFESCU TV, REID K, CAMPLING BG, RAPTIS L. Gap junctional communication in cultured human lung carcinoma cells. *Lung Cancer* 1999; **23**(3): 223–231.
- [68] TROSKO JE, GOODMAN JI. Intercellular communication may facilitate apoptosis: implications for tumor promotion. *Mol Carcinogen* 1994; **11**: 8–12.
- [69] TROSKO JE, MADHUKAR BV, CHANG CC. Endogenous and exogenous modulation of gap junctional intercellular communication: toxicologicals and pharmacological implications. *Life Sci* 1993; **53**: 1–19.
- [70] TSAI H, WERBER L, DAVIA MO. Reduced connexin 43 expression in high grade, human prostatic adenocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **227**: 64–69.
- [71] VAUX DL. Ced-4 – third horseman of apoptosis. *Cell* 1997; **90**: 389–390.
- [72] WERNER R, LEVINE E, RABADAN-DIEHL C, DAHL G. Formation of hybrid cell-cell channels. *Proc Natl Acad Sci* 1989; **86**: 5380–5384.

- [73] WILLIAMS GT, SMITH CA. Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. *Cell* 1993; **74**: 777–779.
- [74] WYLLIE AM, MORRIS RG, SMITH AL, DUNLOP D. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 1984; **142**: 67–77.
- [75] YAMASAKI H, MESNIL M, OMORI Y, MIRONOV M, KRUTOVSKIKH V. Intercellular communication and carcinogenesis. *Mutat Res* 1995; **333**: 181–188.
- [76] YAMASAKI H. Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1990; **7**: 1051–1058.
- [77] YAMASAKI H. Role of disrupted gap junctional intercellular communication in detection and characterization of carcinogens. *Mutation Res* 1996; **365**: 91–105.
- [78] ZHIVOTOVSKY BD, ZVONAREVA NB, HANSON KP. Characteristics of rat thymus chromatin degradation products after whole-body x-radiation. *Int J Radiat Biol* 1981; **39**: 437–440.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 10.01.2001 r.

Przyjęto: 14.03.2001 r.

Adres autora: ul. Zachodnia 34 m 3, 15-345, Białystok,

e-mail: adrian@amb.ac.bialystok.pl

Wskazówki przygotowania rycin i streszczeń do publikacji w PBK

Dostarczane na dyskietkach teksty powinny być napisane w Wordzie, wersja 6,0 lub wcześniejsza. Jeśli w tekst zostały wstawione ryciny, powinny one zostać umieszczone osobno na dyskietce. Powinny to być albo mapy bitowe (.TIF, .PCX), albo pliki z Corela, wersja 5.0 lub wcześniejsza. Każda wersja Worda lub Corela pozwala na zachowanie pracy w formacie wersji wcześniejszej. Rysunki, schematy zdjęcia i wykresy w podpisach i w powołaniach w tekście powinny nosić nazwę rycina (ryc.) i być numerowane kolejno.

Streszczenie ma mieć następującą strukturę:

j. polski

Podstawy zagadnienia: jedno zdanie
Podtytuły: do każdego podtytułu 3–5 zdań
Wnioski: 2 zdania
Słowa kluczowe: do 8 słów

j. angielski

Background:
Subtitles:
Conclusions:
Key words:

Takie streszczenia standardowe mogą być ważne, gdyż obecnie czyta się je komputerowo. Treść streszczenia zachęca bądź nie zachęca do przeczytania całego artykułu.

Prosimy również Autorów o podawanie adresów e-mail, o ile je mają.

Cennik odbitek prac dla Autorów w 2001 r.

Liczba odbitek	50	100	200	400
Cena zł	40,00	60,00	80,00	100,00

Zamówienie na odbitki musi być złożone wraz z przesłaną korektą pracy.

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, niepublikowane 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 (adresy na 2 str. okładki), a do Redakcji w Warszawie tylko te artykuły, które nie odpowiadają żadnej z wymienionych specjalności.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

1) artykuły przeglądowe nie przekraczające 15 stron maszynopisu i do 100 pozycji bibliograficznych konieczne z ostatnich 5 lat (natomiast wcześniejsze prace mogą być pracami przeglądowymi);

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. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 w układzie normalnym 1800 znaków na stronie. Ostateczna wersja tekstu i rysunki (wskazówki s. 160) powinna być przysyłana na dyskietce 3,5" jako plik (file) Windows lub ASCII. Pierwsza strona nienumerowana przeznaczona dla redakcji winna zawierać: imiona, nazwiska, tytuły naukowe autorów i adresy: w pracy, domowy wraz z telefonem i e-mail, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rycin. 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, informacje o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następną stroną powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 1 str.) 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 rycin, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, ryc. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane podrozdziały 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 zestawić alfabetycznie według następującego wzoru:

[1] HNILICA 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 rycin 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. **Barwne ryciny i zdjęcia są płatne.** Wymiary poszczególnych rycin, 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, np. wykaz skrótów, muszą mieć na odwrocie nazwisko I. autora i oznaczeniem góry i dołu ilustracji. 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 doby. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 1 egz. zeszytu PBK z opublikowaną pracą oraz mogą zamówić odbitki odpłatnie odsyłając korektę. 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. Poprawioną po recenzji wersję pracy należy zwrócić do redakcji koniecznie w ciągu 30 dni. Redakcja zrezygnuje z publikacji maszynopisu, którego autorzy do 30 dni nie odpowiedzą na list redaktora.

Redakcja prosi także o dołączenie do maszynopisu tytułu artykułu i podpisanej odpowiedzi na następujące pytania:

Dołączono 2 kopie maszynopisu, tabel i rycin.	tak	nie	Treść pracy nie była uprzednio publikowana nie została wysłana do innej redakcji	tak	nie
Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę.	tak	nie	Dołączono kopię pracy wraz z rycinami na dyskietce z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego z komputera IBM	tak	nie
Jest zgoda osób, których informacje niepublikowane są zamieszczone w tekście artykułu	tak	nie	Odpowiadam za całość pracy opisaną w zał. maszyn.	tak	nie

Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w "Postępie Biologii Komórki" przechodzi na własność Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji.

podpisy wszystkich autorów

TREŚĆ – CONTENTS

W tym Zeszyście PBK	161
KOSMACZEWSKA A., FRYDECKA I., CISZAK L., BOĆKO D.: Struktura i biologia kompleksu receptora limfocytów T (TCR/CD3) The structure and biology of t cell receptor complex TCR/CD3	163
PUZIANOWSKA-KUŹNICKA M., MADEJ A., KRYSZYŃSKI A., STACHLEWSKA-NASFETER E., NAUMAN A., NAUMAN J.: Triiodotyronina i jej receptory jądrowe w procesie nowotworzenia – Triiodothyronine and its nuclear receptors in tumorigenesis	183
OLSZEWSKA M. J., MAŁUSZYŃSKA J.: Cytogenetyka molekularna w ustalaniu cech gatunkowych oraz ich zmienności w analizie pokrewieństwa roślin okrytozalążkowych Molecular cytogenetics in establishment of species-specific traits and their variability in analysis of relationships in angiosperms	197
KARASIEWICZ J., MODLIŃSKI J. A.: Komórki macierzyste ssaków: potencjalne źródło zróżnicowanych komórek do transplantacji Mammalian stem cells: presumed source of differentiated cells for transplantation	219
NOWIS D., GOŁĄB J.: Rola telomerów i telomerazy w progresji nowotworów. Perspektywy diagnostyczne i terapeutyczne The role of telomeres and telomerase in tumor progression. Diagnostic and therapeutic perspectives	243
NURZYŃSKA D., DEPTAŁA A.: Hamowanie potranslacyjnej modyfikacji białek RAS jako nowa metoda terapii nowotworów Inhibition of posttranslational RAS modification as a new method of cancer treatment	263
CHABOWSKI A., SULKOWSKA M., CHRZANOWSKA A., CHYCZEWSKA E., FAMULSKI W., KASACKA I., SULKOWSKI S., CHYCZEWSKI L.: Połączenia gap i ich udział w apoptozie i kancerogenezie – Gap-junctions and it's role in apoptosis and carcinogenesis	277
Wskazówki przygotowania rycin i streszczeń do publikacji w PBK	293

Warunki prenumeraty kwartalnika PBK

Prenumerata na rok 2001

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 2001 pod adresem:
FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; tel. 8340 344, fax. 8340 470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl
na konto: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,
ul. Marymoncka 99, 01-813 W-wa;
Bank Polska Kasa Opieki SA, IV O/Warszawa 12401053-40006576-2700-401112-001.
Cena prenumeraty rocznika na rok 2001: dla instytucji (bibliotek) wynosi 68 zł, a dla odbiorców indywidualnych 25 zł.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 2001 should be placed at local press distributors or directly at Editorial Board of POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland, tel. 8340 344, fax. 8340 470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl:

On account: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa;
Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa, No 12401053-40006576-2700-401112-001.
Price per year 20 dollars USA.