

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

POLISH
ANATOMICAL
SOCIETY

POLISH SOCIETY
FOR CELL
BIOLOGY

VOL. 29, ISSUE 1/2002
(1-178)

08.02.2002
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. Chalubińskiego 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 KUŹNICKI, 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 to the publisher for permission should be addressed to the Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

Ark. wyd. 13,5. Ark. druk. 11,25. Podpisano do druku w grudniu 2001 r. Druk ukończono w styczniu 2002 r.

W TYM ZESZYCIE POSTĘPÓW BIOLOGII KOMÓRKI

- Tegoroczni nobliści z dziedziny fizjologii i medycyny to: Leland Hartwell, Paul Nurse i Timothy Hunt. Nagrodę otrzymali za pionierskie badania molekularnych mechanizmów regulujących przebieg cyklu komórkowego (str. 157).
- W tym Zeszytcie jest kilka artykułów z zakresu cytogenetyki nowotworów:
 - Na stronie 3 Czytelnik znajdzie informacje o sposobach określania subtypów chłoniaków B-komórkowych, co ma znaczenie dla wyboru strategii leczenia,
 - Na stronie 141 jest artykuł o udziale cytogenetyki molekularnej w poszukiwaniu klonalnej proliferacji komórek białaczkowych B-komórkowych,
 - Na stronie 121 opisano w komórkach raka piersi wyciszanie transkrypcji genów: estrogenowego α i kwasu retinowego $\beta 2$ związane z hipermetylacją wysp CpG regionów promotorowych tych genów. Zmiany te mogą mieć znaczenie dla doboru skutecznej terapii.
 - Obecnie istnieje możliwość profilowania ekspresji genów przy użyciu matrycy DNA, co może zrewolucjonizować nasze podejście do badań nad rakiem (str. 81).
- Inny temat poruszają artykuły na stronach 61 i 27.
 - Na stronie 61 opisano regulację ekspresji i funkcji receptorów jądrowych rodziny Nur77 i ich udział w punktach kontrolnych produkcji hormonów steroidowych.
 - Na stronie 27 przedyskutowano dynamikę rozmieszczenia receptorów steroidowych w jajniku.

Wykaz recenzentów z tomu 28 z roku 2001* Referees of the volume 28, 2001

prof. dr hab. S. Biliński
doc. dr hab. Barbara Czartoryska
prof. dr hab. Maria Jerka-Dziadosz
prof. dr hab. B. Grzelakowska-Sztabert
doc. dr hab. Amalia Guzek
doc. dr hab. B. Kamińska
prof. dr hab. Jerzy Kawiak
prof. dr hab. W. Kilariski
prof. dr hab. Liliana Konarska
prof. dr hab. A. K. Kononowicz

dr Katarzyna Kwiatkowska
prof. dr hab. Piotr Leider
prof. dr hab. M. J. Olszewska
prof. dr hab. Zofia Osuchowska
prof. dr hab. B. Płytycz
prof. dr hab. S. Rogalska
prof. dr hab. med. D. Rożynkowa
prof. dr hab. K. Staroń
prof. dr hab. K. Szyfter



BADANIA CYTOGENETYCZNE W DIAGNOSTYCE CHŁONIAKÓW B-KOMÓRKOWYCH

THE USE OF CYTOGENETIC ANALYSIS IN B-CELL LYMPHOMA DIAGNOSIS

Barbara PIEŃKOWSKA-GRELA

Samodzielna Pracownia Cytogenetyki,
Centrum Onkologii-Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Warszawa

Streszczenie: Efektem pracy wielu zespołów badawczych było ustalenie istotnych korelacji pomiędzy specyficznymi nieprawidłowościami cytoogenetycznymi a typem histologicznym ludzkich chłoniaków złośliwych. Konkretnie zmiany kariotypowe skorelowane są z charakterystyczną morfologią, specyficznym immunofenotypem i określonymi cechami klinicznymi nowotworu. Specyficzne markery cytoogenetyczne wykryto metodami klasycznego badania kariotypu (prążki G) i fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH). Typowe aberracje cytoogenetyczne, np. translokacje: t(8;14)(q24;q32) w chłoniakach Burkitta (BL), t(14;18)(q32;q11) w chłoniaku grudkowym (FL) czy t(11;14)(q13;q32) w chłoniaku z komórek płaszczka (MCL), mogą być użyteczne w zdefiniowaniu określonego subtypu NHL, co ma istotny wpływ na ustalenie strategii leczenia pacjenta. Obecnie użyteczność badania cytoogenetycznego wzrasta. W określonych przypadkach znajomość aberracji kariotypowych pozwala, poza precyzyjniejszym ustaleniem diagnozy, na prognozowanie odpowiedzi na leczenie czy przebieg choroby. (*Postępy Biologii Komórki* 2002; 29: 3–13)

Słowa kluczowe: chłoniak, aberracja kariotypowa, translokacja.

Summary: Many studies in malignant lymphoma have discussed correlation between histologic subtypes and specific cytogenetic abnormalities. Several cytogenetic abnormalities in lymphoma cells are associated with characteristic morphology, specific immunophenotype and have distinctive clinical features. Certain chromosomal markers were detected by conventional G-banding and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) methods. Typical cytogenetic changes of Non Hodgkin's Lymphoma (NHL), eg. the translocation t(8;14)(q24;q32) in Burkitt's lymphomas (BL), t(14;18)(q32;q11) in follicular lymphomas (FL) or t(11;14)(q13;q32) in Mantle cell lymphomas (MCL) may be useful in definition of NHL subtypes and, may require different treatment strategies. Currently, the practical application occur karyotypic changes, not only for diagnostic purposes but also for predictic response to therapy and prognosis. (*Advances in Cell Biology* 2002; 29: 3–13)

Key words: lymphoma, karyotypic aberration, translocation.

WSTĘP

Chłoniaki to ogólna nazwa nowotworów rozwijających się w układzie limfaticznym, z komórek biorących udział w reakcji immunologicznej (limfocyty, ich prekursorzy lub komórki wywodzące się z limfocytów). Wyróżniamy wśród nich ziarnicę złośliwą (*Hodgkin's lymphoma* – HL) i chłoniaki nieziarnicze (*Non Hodgkin's lymphoma* – NHL). Podczas gdy choroba Hodgkina to rzadki nowotwór (ok. 1% zachorowań), to chłoniaki nieziarnicze zajmują 6 miejsce pod względem zapadalności i umieralności (wg danych amerykańskich) [23]. W ostatnich dekadach notuje się wzrost zapadalności na chłoniaki nieziarnicze w granicach 3–4% rocznie. Wyższą zachorowalność wiąże się z powszechnym oddziaływaniem czynników ryzyka, do których należą m.in. herbicydy, konserwanty żywności, benzyna i rozpuszczalniki organiczne. Ponadto ryzyko zachorowania wzrasta u ludzi starszych (po 65 roku życia), a szczególnie wysokie jest u pacjentów z AIDS.

Większość pacjentów z NHL trafia do lekarza z objawami uogólnionego powiększenia węzłów chłonnych, często w III lub IV stopniu zaawansowania klinicznego. Zmiany mogą również lokalizować się w miejscach nietypowych: w skórze, tarczycy, sutku, przewodzie pokarmowym, mózgu, jajnikach lub jądrach. Rozpoznanie NHL bazuje na badaniu węzłów chłonnych lub innych narządów zajętych przez proces nowotworowy. Niejednorodność kliniczna, współwystępująca z różnorodnością obrazu histologicznego, jest przyczyną trudności klasyfikacji chłoniaków nieziarniczych. Początkowo rozróżniano jedynie dwie grupy: lepiej rokujące chłoniaki grudkowe i chłoniaki rozlane o złym rokowaniu. Rozwój metod badawczych pozwolił na wyróżnienie nowych subtypów NHL. Obecnie w powszechnym użyciu jest klasyfikacja REAL/WHO oparta na analizie danych morfologicznych, immunofenotypowania, badań cytogenetycznych i molekularnych w kontekście obrazu klinicznego [6, 7]. Przyjmuje się, że ok. 85% diagnozowanych nowotworów układu chłonnego stanowią chłoniaki wywodzące się z komórek B, a jedynie 15% z komórek T i NK. Najczęstszymi chłoniakami z komórek B są chłoniaki grudkowe (FL) i chłoniaki rozlane z dużych komórek B (DLBCL).

Do rozpoznania większości przypadków chłoniaków złośliwych wystarczają konwencjonalne techniki histopatologiczne, w trudniejszych diagnostycznie przypadkach należy rozważyć dane uzyskane w wyniku szczegółowych badań fenotypu komórek czy badań genetycznych. W sytuacjach wątpliwych bądź gdy testy cytometryczne nie potwierdzają diagnozy histopatologicznej (H-P), komórki nowotworowe powinny zostać poddane ocenie cytogenetycznej lub/i molekularnej. Korelacja kilku metod diagnostycznych pozwala na stworzenie „złotego standardu”: wieloczynnikowego

systemu dla precyzyjnego zdefiniowania badanego nowotworu, zaś uzyskane dane mogą mieć, w niektórych przypadkach, również istotne znaczenie prognostyczne [26].

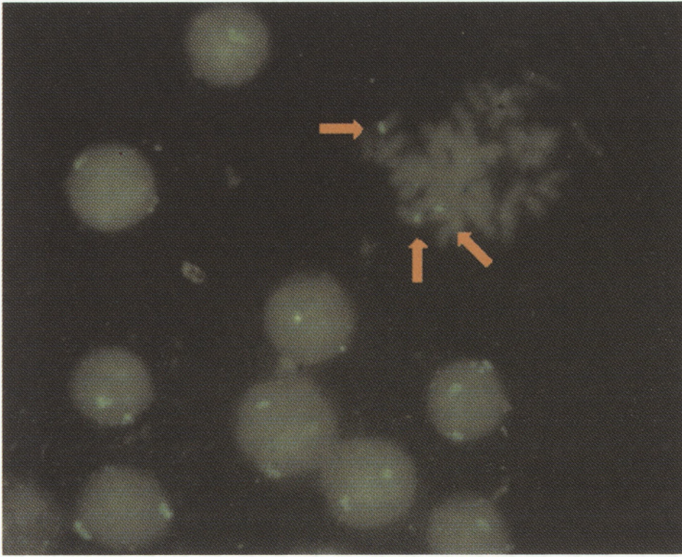
METODYKA BADAŃ CYTOGENETYCZNYCH

Istotą badania cytogenetycznego jest określenie odstępstw od prawidłowego kariotypu w komórkach badanego nowotworu. Materiał do analizy stanowią komórki pobrane w trakcie biopsji diagnostycznych zmienionych nowotworowo węzłów chłonnych (*fine needle aspiration biopsies* – FNAB), biopsji szpiku bądź, w przypadku obrazu białaczkowego, z krwi obwodowej. Komórki poddawane są krótkotrwałej hodowli *in vitro* w standardowych warunkach (5%CO₂, 37°C, medium hodowlane z dodatkiem 15% surowicy cielęcej, L-glutaminy i antybiotyków). Zawiesina komórek utrwalana jest po 48 lub 72 godzinach hodowli niestymulowanej lub prowadzonej z dodatkiem mitogenu. Powszechnie stosuje się TPA (*Phorbol 12-myristate-13-acetate*) dla chłoniaków B-komórkowych i LF 7 (ekstrakt fasoli *Phaseolus vulgaris*) dla chłoniaków T-komórkowych. Preparaty cytogenetyczne zawierające metafazy barwione są różnicowo dla uzyskania prążków G (*G-banding*, GTG) [28] bądź poddawane fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH – *fluorescent in situ hybridization*) [24]. Opis aberracji kariotypowych wykonuje się zgodnie z obowiązującą klasyfikacją *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN) 1995 [13].

Badanie kariotypu prążkowego (prążki G, GTG) pozwala na ocenę ploidii komórki, obecności odmiennych cytogenetycznie klonów w badanej populacji komórek, zakresu i rodzaju zmian liczby chromosomów oraz występowania zaburzeń morfologii chromosomów spowodowanych aberracjami, takimi jak: translokacje chromosomów, delecje fragmentów czy duplikacje określonych obszarów chromosomów.

Zastosowanie techniki FISH, przy użyciu zróżnicowanych sond, pozwala m.in. na ocenę liczby kopii poszczególnych chromosomów (sondy centromerowe (ryc. 1), określenie partnerów translokacji (sondy malujące) czy stwierdzenie obecności określonych zaburzeń (sondy translokacyjne, np. sonda BCR/ABL w badaniu chromosomu Philadelphia).

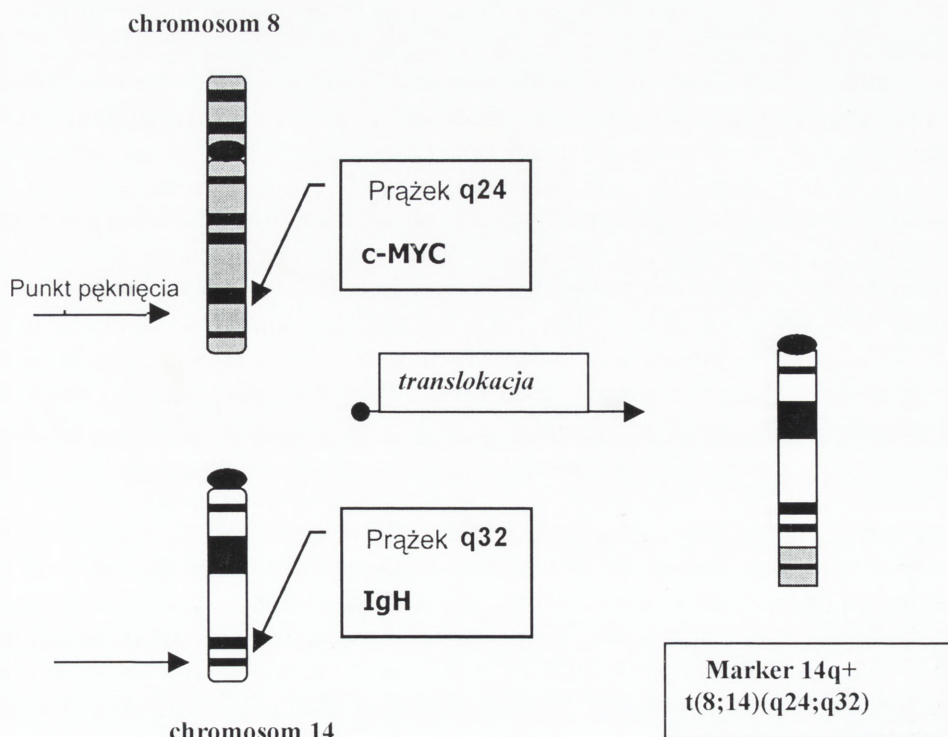
Aberracje strukturalne występujące w komórkach chłoniaków B, to przede wszystkim translokacje [18]. W wyniku pęknięcia chromosomu i przeniesienia jego fragmentu następuje zaburzenie funkcjonowania określonego genu np. przez jego aktywację obcymi sekwencjami regulatorowymi. I tak kluczowym zdarzeniem w onkogenezie chłoniaków Burkitta jest aktywacja onkogenu c-MYC przez wysoce aktywny promotor genu immunoglobulin [8, 14]. Zmiana ta jest widoczna w badaniu kariotypu jako translokacja obejmująca chromosomy 8 i 14 w postaci markera



RYCINA 1. Wynik FISH przy zastosowaniu sondy centromerowej dla chromosomu 12 – chłoniak limfocytarny: widoczne komórki z trisomią 12 (trzy sygnały) oraz z dwoma kopiami chromosomu 12 (dwa sygnały)

t(14;18) określanego również 14q+ (ryc. 2). Podobne anomalie, specyficzne dla określonych typów B-NHL, prowadzą do zaburzonej ekspresji takich onkogenów, jak: BCL-2 w translokacji t(14;18), BCL-1 w translokacji t(11;14) czy BCL-6 w translokacji t(3;14).

Planując badanie cytogenetyczne należy zdać sobie sprawę zarówno z możliwości, jak i ograniczeń stosowanych metod. Morfologiczne różnice między chromosomami ujawniają się w trakcie metafazy, jednak w utrwalonym preparacie jedynie kilka procent komórek badanych populacji znajduje się w stanie mitozy. Tak więc klasyczne badanie kariotypu, choć szczegółowo określa liczbę i rodzaj cytogenetycznie uchwytnych aberracji, obejmuje jedynie część komórek znajdujących się w próbce. Badanie przy użyciu technik fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* rozszerza możliwość detekcji zmian na komórki interfazowe, jednak ukierunkowuje analizę na określony, znakowany obszar chromosomu. Przyjmuje się więc, że pierwotna analiza przypadku powinna obejmować ustalenie pełnego kariotypu (metoda prążkowa, GTG), w uzasadnionych przypadkach uzupełnionego badaniem FISH. Natomiast w trakcie monitorowania przebiegu choroby wystarczy na ogół określenie obecności bądź braku specyficznego markera, a więc pozwala ograniczyć się do dającego szybką odpowiedź badania FISH. W przypadku badania wznowy zalecane jest jednak zastosowanie obu tych technik dla stwierdzenia pojawienia się ewentualnych zmian wtórnych.



RYCINA 2. Schemat translokacji t(8;14) w chłoniaku Burkitta

PRZEGLĄD PODTYPÓW HISTOLOGICZNYCH

Chłoniak limfocytarny (*small lymphocytic lymphoma SLL/CLL*) stanowi ok. 5% chłoniaków nieziarniczych u dorosłych. Jego przebieg jest zazwyczaj powolny, w 20–30% daje obraz białaczkowy. Analiza immunofenotypu pozwala stwierdzić koekspresję antygenów Pan-B+; CD5+; CD23+ oraz słabą ekspresję sIgM+, podczas gdy wartości CD10 są ujemne. Aberracje cyto-genetyczne stosunkowo często dotyczą chromosomów 6, 12 i 13. W 20–30% przypadków stwierdza się ubytki fragmentów długiego ramienia chromosomu 6 opisywane jako del(6)(q21-23), co zdaje się mieć korelację z obrazem białaczkowym. W chromosomie 13 stwierdza się często delecje interstycjalne w regionie q14, gdzie podejrzewana jest obecność nieznanego genu supresorowego. Chromosom 12 w około 1/3 przypadków wykazuje obecność dodatkowej kopii [5]. Inne trisomie, występujące w ok. 10% przypadków, to dodatkowe kopie chromosomów 3 lub 18. Trisomia 12 w przypadkach SLL/CLL, szczególnie

w kontekście atypowego obrazu klinicznego, jest czynnikiem niekorzystnym rokowniczo [16, 25].

Chłoniak limfoplazmacytoidalny (makroglobulinemia Waldenströma, *lymphoplasmacytic lymphoma – LPL*) jest chłoniakiem o przebiegu powolnym, występującym głównie u ludzi starszych. Początkowo klasyfikowany był wspólnie z chłoniakiem limfocytarnym. Obecnie wiadomo, że w odróżnieniu od SLL/CLL jest CD5– oraz CD23 ujemny, wykazując ponadto wartości Pan-B+; CD10– oraz cyIgM+. Cytogenetycznie, z chłoniakiem tym związana jest charakterystyczna translokacja t(9;14)(p13;q32), prowadząca do fuzji genu *BASP (B-cell specific activator protein)* zwanego też AX5 z IgH [12]. Zmiana ta, mimo iż występująca w ok. 50% opisanych przypadków, nie jest wyłączna dla LPL. Opisano ją również w rzadkich przypadkach chłoniaka strefy brzeżnej oraz chłoniaka z dużych rozlanych komórek B.

Chłoniak z ośrodków rozmnażania (*follicle centre cell lymphoma – FL*) jest jednym z częściej występujących chłoniaków nieziarnicznych u dorosłych (ok. 35% przypadków). Guzy te o fenotypie Pan-B+; CD10+/-; CD5-; sIg+ wywodzą się zwykle z węzłów chłonnych. Występująca tu zwiększona ekspresja białka BCL-2 związana jest na ogół z typową dla FL translokacją t(14;18)(q32;q21) występującą aż w 70–80% przypadków [9]. W wyniku tej translokacji dochodzi do deregulacji inhibitora apoptozy – genu BCL-2 (18q21) przez przeniesienie go w region promotora genu dla IgH (14q32). Zmiana promotora stymuluje nadmierną ekspresję BCL-2, opóźniając w rezultacie programowaną śmierć komórek. Opisywane są również rzadko występujące translokacje wariantowe, obejmujące region 18q21, takie jak: t(2;18)(p11;q21) oraz t(18;22)(q21;q11). W ok. 15% przypadków stwierdza się pęknięcia chromosomu 3 w obszarze q27: w połowie z nich partnerem translokacji jest chromosom 14, dając marker t(3;14)(q27;q11).

Translokacja t(14;18) uważana jest za zmianę pierwotną w FL. Towarzyszą jej często pojedyncze bądź liczne zmiany wtórne, takie jak: +7, del(6q), +12, +X, +18, +5, +8, der(18), +21 (w 10–25% przypadków). Na ogół przebieg choroby jest powolny, jednak w ok. 50% przypadków notuje się przejście w chłoniaka rozlanego z dużych komórek B. Powielenie fragmentów ramion 2q, 6p, 7p, 12q, 17q oraz ubytki w regionach 5p i 8q mogą mieć istotne znaczenie dla takiej transformacji [11]. W przeciwieństwie do przypadków przewlekłych z dodatkowymi kopiami chromosomu X oraz del(6), dodatkowe kopie chromosomów 7, 8, der(18) oraz t(8;14) wydają się wskazywać na ostrzejszy przebieg [10].

Chłoniak rozlany z dużych komórek B (*DLBCL – diffuse large B-cell lymphoma*) występuje u 25–30% pacjentów z NHL. Jest on chłoniakiem bardziej agresywnym niż chłoniak grudkowy, z którego często się wywodzi. Jego komórki wykazują immunofenotyp: CD10+/-; CD19+; CD22+; Ig+. Większość przypadków DLBCL wykazuje obecność nielosowych aberracji kariotypu. Zmianami pierwotnymi są najczęściej translokacje obejmujące chromosom 14 oraz chromosom 3. W 30–40%

przypadków stwierdza się aberrację $t(14;18)(q32;q21)$ z rearanżacją BCL-2. Zmiana ta nie jest specyficzna dla chłoniaka rozlanego: aberrację $t(14;18)$ opisano w wielu subtypach NHL. W ok. 20% towarzyszą jej mutacje p53, wskazujące na gorsze rokowanie [21]. Rearanżacja w regionie c-MYC, w obrazie cytogenetycznym widoczna jako translokacja $t(8;14)(q24;q32)$, występuje w 7–10% przypadków.

Obecne w 6–30% przypadków aberracje obejmujące region BCL-6 na chromosomie 3, cytogenetycznie ujawniają się w postaci translokacji wariantowych z udziałem chromosomu 3: $t(3;V)(q27;V)$ [2, 20]. Partnerem tej translokacji bywa najczęściej chromosom 14 z punktem pęknięcia w prążku q32 oraz chromosomy 2p11, 22q11, 6p21 lub 11q23. Przypadki takie wydają się wiązać z lokalizacją pozawęzłową i lepszym rokowaniem.

Zmiany wtórne obejmują na ogół chromosomy 3, 5, 7, 11, 12, 18 i X. Kariotyp z licznymi zmianami wtórnymi (*complex karyotype*) związany jest z krótszym okresem przeżycia.

Chłoniak Burkitta (*Burkitt's lymphoma – BL*) oraz **chłoniak typu Burkitta** (*Burkitt-like lymphoma – BL-L*) w fazie białaczkowej określane jako ostra białaczka limfoblastyczna L3 (FAB) z komórek B (*lymphoblastic leukemia ALL L3*), występuje najczęściej u dzieci (1/3 przypadków). U dorosłych jest znacznie rzadszy (ok. 3%). Kryteria diagnostyczne różnicowania chłoniaków BL, BL-L i DLBCL nie zawsze są w pełni rozstrzygające [17]. Rozpoznanie powinno być więc oparte na połączonej ocenie obrazu morfologicznego, fenotypu komórek i kariotypu [27]. Komórki chłoniaka Burkitta wykazują fenotyp dojrzałego limfocyta B z obecnością monoklonalnej immunoglobuliny powierzchniowej (sIg) najczęściej klasy IgM oraz antygenów CD19+, CD20+, CD22+, CD10+; antygeny TdT, CD5 i CD23 na ogół nie występują.

Zasadniczym czynnikiem patogenezy chłoniaków Burkitta jest deregulacja ekspresji genu c-MYC (locus 8q24). Przyczyną nieprawidłowej ekspresji tego genu jest jego przeniesienie w rejon aktywnego promotora genów immunoglobulin. Pierwotną, najczęściej występującą zmianą kariotypową jest translokacja $t(8;14)(q24;q32)$ stwierdzana w 70–80% przypadków [29]. Biorący udział w tej translokacji chromosom 14 zawiera w prążku q32 gen dla ciężkiego łańcucha immunoglobulin IgH, którego promotor aktywuje gen c-MYC. Zmiany wariantowe, obejmujące typowy punkt pęknięcia 8q24 występują w postaci translokacji $t(2;8)(p11;q24)$ oraz $t(8;22)(q24;q11)$. W pierwszej z nich zaangażowany jest gen łańcucha lekkiego κ (chromosom 2, punkt pęknięcia p11) – 12% przypadków, w drugiej zaś – gen łańcucha lekkiego λ (chromosom 22, q11) – 8% przypadków [15]. Niewielki odsetek przypadków BL może wykazywać duplikację fragmentu chromosomu 1 (1q21-25) jako jedyną widoczną zmianę kariotypu.

W formach BL-L obok typowych aberracji obejmujących rejon c-MYC spotykane są formy z równoczesną obecnością pęknięcia w 8q24 oraz translokacji obejmujących region 18q21 (gen BCL-6). Przypadki z licznymi aberracjami, w szczególności zawierające zarówno $t(8;14)$, jak i $t(14;18)$, wskazują na bardziej agresywny przebieg.

Inne aberracje wtórne to duplikacja 1q21-25, delecja 6q11-14, delecje w obszarze 17p oraz trisomie 12, 7, 8 i 18.

Chłoniak z komórek płaszcz (*Mantle cell lymphoma* – MCL) stanowi ok. 5% chłoniaków nieziarnicznych u dorosłych. Występuje na ogół u ludzi starszych; charakteryzuje się agresywnym przebiegiem i gorszym rokowaniem. Jego komórki wykazują immunofenotyp Pan-B+; CD5+; CD23–; CD10-/+; sIgM+/- oraz podwyższony poziom cykliny D1.

Udział tego białka regulatorowego cyklu komórkowego zwykle związany jest z obecnością translokacji t(11;14)(q13;q32), opisywanej w 50–70% przypadków MCL [1]. Punkt pęknięcia w chromosomie 11 obejmuje region BCL-1 (11q13 – gen dla cykliny D1), zaś w chromosomie 14 przebiega w prążku q32 (IgH). Przeniesienie BCL-1 w rejon IgH powoduje stymulację ekspresji BCL-1 przez promotor immunoglobuliny. Zmiana ta jest charakterystyczna dla MCL, jednak znajdująca bywa (rzadko) i w nowotworach innych typów.

Najczęściej notowane wtórne zmiany kariotypowe dotyczą delecji fragmentów 1p, 6q, 9p, 11q (szczególnie obszaru q22-q23) oraz 13q, a także duplikacji rejonów 3q, 8q oraz 15q [19]. Obecność komórek tetraploidalnych z podwojonym markerem t(11;14) jest specyficzna dla subtymu blastoidalnego o bardziej agresywnym przebiegu [22].

Chłoniak z komórek strefy brzeżnej (*Marginal zone B-cell lymphoma* – MZBCL) to określenie zróżnicowanej grupy chłoniaków o powolnym przebiegu. Wywodzą się one z komórek tkanki limfatycznej błon śluzowych (*mucosa-associated lymphoid tissue* – MALT), komórek strefy brzeżnej śledziony (*splenic form*) oraz węzłów chłonnych. Te trzy formy wykazują podobne cechy histologiczne i immunologiczne (pan-B+; CD5-/+; CD10–; CD23–; CD11c+/-; cyIg+; sIgM+; sIgD–) [30].

Gen API2 (inhibitor apoptozy) oraz gen MLT ulegają fuzji, w wyniku specyficznej dla pozawęzłowej formy MALT translokacji t(11;18)(q21;q21). Inny regulator apoptozy – gen BCL10 jest zaangażowany w translokację t(1;14)(p21;q32) [4]. Delecja del(7)(q22-31) jest typowa dla postaci śledzionowej. Najczęściej spotykane, inne aberracje kariotypowe, takie jak: częściowa trisomia chromosomów 3, 18 i X, zmiany strukturalne obejmujące obszary chromosomów 1q21 i 1q32 oraz częściowe lub całkowite delecje krótkich ramion chromosomów 17 i 9 są na ogół wspólne dla chłoniaków strefy brzeżnej, niezależne od ich pierwotnej lokalizacji [3].

PODSUMOWANIE

Klasyfikacja chłoniaków B-komórkowych jest wciąż niedoskonała, mimo iż w ciągu ostatniego półwiecza zaproponowano ponad 20 systemów klasyfikacyjnych

tych nowotworów. Przedstawiona ostatnio przez Światową Organizację Zdrowia propozycja nowej klasyfikacji REAL/WHO uwzględnia wyniki badania histologicznego, fenotypowania komórek, zmian cytogenetycznych i molekularnych w kontekście przebiegu klinicznego [6]. Wart podkreślenia jest fakt, że zalecane jest obecnie szersze stosowanie badań cytogenetycznych, które mogą przyczynić się do precyzyjnego ustalenia diagnozy, a w wielu wypadkach posłużyć do określenia rokowania. Należy przypuszczać, że zaawansowane, interdyscyplinarne badania prowadzone zarówno przez klinicystów, jak i patologów, immunologów i cytogenetyków, uzupełnione badaniami molekularnymi pozwolą na bliższe poznanie biologii nowotworów układu chłonnego u człowieka. Wiedza taka przyczyni się niewątpliwie do ustalenia doskonalszego i użytecznego systemu klasyfikacji chłoniaków, opartego na głębszym zrozumieniu mechanizmów etiopatogenezy i progresji tych nowotworów.

LITERATURA

- [1] ARGATOFF LH, CONNORS JM, KLASA RJ, HORSMAN DE, GASCOYNE. Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases. *Blood* 1997; **89**(6):2067–2078.
- [2] CHAGANTI SR, CHEN W, PARSAN NZ, OFFITT K, LOUIE DC, DALLA FAVERA R, CHAGANTI RSK. Involvement of BCL6 in chromosomal aberrations affecting band 3q27 in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Genes Chromosom Cancer* 1998; **23**: 323–327.
- [3] CUNEO A, BIGONIR R, ROBERTI MG, MILANI R, AGOSTINI P, CAVAZZINI F, MINOTTO C, DE ANGELI C, BARDI A, TAMMISO E, NEGRINI M, CAVAZZINI P, CASTOLDI G. Molecular cytogenetic characterization of marginal zone B-cell lymphoma: correlation with clinicopathologic findings in 14 cases. *Haematologica* 2001; **86**(1): 64–70.
- [4] DIERLAMM J, WŁODARSKA I, MICHAUX L, STEFANOVA M, HINZ K, VAN DEN BERGHE H, HAGEMEIJER A, HOSSFELD DK. Genetic abnormalities in marginal zone B-cell lymphoma. *Hematol Oncol* 2000; **18**(1): 1–13. Review.
- [5] GARTHON G. Nonrandom chromosomal aberrations in chronic lymphocytic leukemia revealed by polyclonal B-cell mitogen stimulation. *Blood* 1980; **56**: 640.
- [6] HARRIS NL, JAFFE ES, DIEBOLD J, FLANDRIN G, MULLER-HERMELINK HK, VARDIMAN J, LISTER TA, BLOOMFIELD CD. World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting. *J Clin Oncol* 1999; **17**: 3835–3849.
- [7] HARRIS NL, JAFFE ES, STEIN H, BAKS PM, CHAN JKC, DESOL G, DE WOLF-PEETERS CH, FALINI B, GATTER KC, GORAN THM, ISAACSON PG, KNOWLES DM, MASON DY, MULLER-HERMELINK HK, PILERI S.A., PIRIS MA, RALFKIAER E, WARENKE A. A revised European – American classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the international lymphoma study group. *Blood* 1994; **84**: 1361–1392.
- [8] HECHT J.L., ASTER J.C. Molecular biology of Burkitt's lymphoma. *J Clin Oncol* 2000; **18**: 3707–3721.
- [9] HEIM S, MITELMAN F. Cancer Cytogenetic. Second ed. 1995, Wiley-Liss, Inc. 287–292.
- [10] HORSMAN DE, CONNORS JM, PANTZAR T, GASCOYNE RD. Analysis of secondary chromosomal alterations in 165 cases of follicular lymphoma with t(14;18). *Genes Chromosomes Cancer* 2001; **30**(4): 375–382.

- [11] HOUGH RE, GOEPEL JR, ALCOCK HE, HANCOCK BW, LORIGAN PC, HAMMOND DW. Copy number gain at 12q12-14 may be important in the transformation from follicular lymphoma to diffuse large B cell lymphoma. *Br J Cancer* 2001 Feb; **84**(4): 499–503.
- [12] IIDA S, RAO PH, UEDA R, CHAGANTI RS, DALLA-FAVERA R. Chromosomal rearrangement of the PAX-5 locus in lymphoplasmacytic lymphoma with t(9;14)(p13;q32). *Leuk Lymphoma* 1999; **34**: 25–33.
- [13] ISCN An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Mittelman F. (ed.) 1995.
- [14] KLEIN G. Multiple phenotypic consequences of IG/myc translocation in B-cell-derived tumors. *Genes Chrom Cancer* 1989; **1**: 3–8.
- [15] KORNBLAU SM, GOODACRE A, CABANILLAS F. Chromosomal abnormalities in adult non-endemic Burkitt's lymphoma and leukemia: 22 new reports and a review of 148 cases from the literature. *Hematol Oncol* 1991; **9**: 63–78.
- [16] MATUTES E et al. Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. *Br J Hematol* 1996; **92**: 382–388.
- [17] MIODUSZEWSKA O. Patologia chłoniaków i ziarnicy złośliwej. Chłoniak Burkitta. *Pol J Pathol* 1998; **49**: 59–60.
- [18] MITELMAN F. Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer (ed 5). New York, NY, Wiley-Liss, 1994.
- [19] MONNI O, OINONEN R, ELONEN E, FRANSSILA K, TEERENHOVI L, JOENSUU H, KNUUTILA S. Gain of 3q and deletion of 11q22 are frequent aberrations in mantle cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; **21**(4): 298–307.
- [20] OFFITT K, LO COCO F, LOUIE DC, PARSA NZ, LEUNG D, PORTLOCK C, YE BH, LISTA F, FILIPPA DA, ROSENBAUM A, LANDANYI M, JHANWAR S, OFFITT K, LO COCO F, LOUIE DC, PARSA NZ, LEUNG D, PORTLOCK C, YE BH, LISTA F, FILIPPA DA, ROSENBAUM A, LANDANYI M, JHANWAR S, DALLA-FAVERA R, CHAGANTI RSK. Rearrangement of BCL-6 gene as a prognostic marker in diffuse large-cell lymphoma. *New Engl J Med* 1994; **331**: 74–80.
- [21] OFFITT K, WONG G, PHILIPPA DA, TAO Y, CHAGANTI RSK. Cytogenetic analysis of 434 consecutively ascertained specimens of non-Hodgkin's lymphoma: clinical correlations. *Blood* 1991; **77**: 1508–1515.
- [22] OTT G, KALLA J, OTT MM, SCHRYEN B, KATZENBERGER T, MULLER JG, MULLER-HERMELINK HK. Blastoid variants of mantle cell lymphoma: frequent bcl-1 rearrangements at the major translocation cluster region and tetraploid chromosome clones. *Blood* 1997; **89**(4): 1421–1429.
- [23] PARKER SL, TONG T, BOLDEN S. Cancer Statistics 1997. *CA-A Cancer J Clin* 1997; **47**: 5–27.
- [24] PINKEL D, STRAUME T, GRAY JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 2934–2938.
- [25] POPLAWSKA-SZCZYGŁOWSKA L, WALEWSKI J, PIENKOWSKA-GRELA B, RYM-KIEWICZ G, MIODUSZEWSKA O. Chronic lymphocytic leukemia with central nervous system involvement. *Med Oncol* 1999; **16**: 65–68.
- [26] SCHLEGELBERGER B, ZWINGERS T, HARDER L, NOWOTNY H, SIEBERT R, VESELY M, BARTELS H, SONNEN R, HOPFINGER G, NADER A, OTT G, MÜLLER-HERMELINK K, FELLER A, HEINZ R for the Kiel-Wien-Lymphoma Study Group Clinicopathogenetic Significance of Chromosomal Abnormalities in Patients With Blastic Peripheral B-Cell Lymphoma. *Blood* 1999; **94**: 3114–3120.
- [27] WALEWSKI J, PIENKOWSKA-GRELA B, RYM-KIEWICZ G, POPLAWSKA-SZCZYGŁOWSKA L, GRYGALEWICZ B, RYGIER J, WITKOWSKA A, WORONIECKA R, MIODUSZEWSKA O. Combined pathologic, immunophenotypic, and cytogenetic analysis of Burkitt's and Burkitt-like lymphoma. *Hematol J (Suppl)* 2001; **1**: 142.

- [28] WANG HC, FEDOROFF S. Banding in humane chromosomes treated with tripsin. *Nature, New Biol* 1972; **235**: 52–53.
- [29] ZECH L, HAGLUND U, NILSSON K, KLEIN G. Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid cell lines from patients with Burkitt's and non-Burkitt lymphomas. *Int J Cancer* 1976; **17**: 47–56.
- [30] ZUCCA E, ROGGERO E, PILERI A. B-Cell lymphoma of malt type: a review with special emphasis on diagnostic and management problems of low-grade gastric tumors. *Br J Haematol* 1998; **100**: 3–14.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 09.07.2001 r.

Przyjęto: 03.09.2001 r.

*Adres autora: Samodzielna Pracownia Cytogenetyki,
Centrum Onkologii-Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie,
02-781 Warszawa, ul. K.W.Roentgena 5*

1) [Illegible text]

2) [Illegible text]

3) [Illegible text]

4) [Illegible text]

5) [Illegible text]

6) [Illegible text]

7) [Illegible text]

8) [Illegible text]

9) [Illegible text]

10) [Illegible text]

11) [Illegible text]

12) [Illegible text]

13) [Illegible text]

14) [Illegible text]

15) [Illegible text]

16) [Illegible text]

17) [Illegible text]

18) [Illegible text]

19) [Illegible text]

20) [Illegible text]

21) [Illegible text]

22) [Illegible text]

23) [Illegible text]

24) [Illegible text]

25) [Illegible text]

26) [Illegible text]

27) [Illegible text]

28) [Illegible text]

29) [Illegible text]

30) [Illegible text]

31) [Illegible text]

32) [Illegible text]

33) [Illegible text]

34) [Illegible text]

35) [Illegible text]

36) [Illegible text]

37) [Illegible text]

38) [Illegible text]

39) [Illegible text]

40) [Illegible text]

41) [Illegible text]

42) [Illegible text]

43) [Illegible text]

44) [Illegible text]

45) [Illegible text]

46) [Illegible text]

47) [Illegible text]

48) [Illegible text]

49) [Illegible text]

50) [Illegible text]

51) [Illegible text]

52) [Illegible text]

53) [Illegible text]

54) [Illegible text]

55) [Illegible text]

56) [Illegible text]

57) [Illegible text]

58) [Illegible text]

59) [Illegible text]

60) [Illegible text]

61) [Illegible text]

62) [Illegible text]

63) [Illegible text]

64) [Illegible text]

65) [Illegible text]

66) [Illegible text]

67) [Illegible text]

68) [Illegible text]

69) [Illegible text]

70) [Illegible text]

71) [Illegible text]

72) [Illegible text]

73) [Illegible text]

74) [Illegible text]

75) [Illegible text]

76) [Illegible text]

77) [Illegible text]

78) [Illegible text]

79) [Illegible text]

80) [Illegible text]

81) [Illegible text]

82) [Illegible text]

83) [Illegible text]

84) [Illegible text]

85) [Illegible text]

86) [Illegible text]

87) [Illegible text]

88) [Illegible text]

89) [Illegible text]

90) [Illegible text]

91) [Illegible text]

92) [Illegible text]

93) [Illegible text]

94) [Illegible text]

95) [Illegible text]

96) [Illegible text]

97) [Illegible text]

98) [Illegible text]

99) [Illegible text]

100) [Illegible text]

CD39 (NTPDaza 1) – CHARAKTERYSTYKA ENZYMU ORAZ JEGO ROLA W REGULACJI KRZEPNIĘCIA I PROCESÓW ZAPALNYCH

CD39 (NTPDase 1) – CHARACTERISTICS OF THE ENZYME AND ITS ROLE IN REGULATING COAGULATION AND INFLAMMATION PROCESSES

Katarzyna KOZIAK

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Nadciśnienia Tętniczego
Akademii Medycznej, Warszawa

Streszczenie: CD39 (NTPDaza 1) – ektoenzym, występujący w śródbłonku naczyń oraz w komórkach krwi, odgrywa istotną rolę w regulacji krzepnięcia, procesów zapalnych oraz angiogenezy. W wyniku działania CD39 dochodzi do hydrolizy zewnątrzkomórkowego ATP i ADP i w konsekwencji do modulacji funkcji receptorów P2 purynergicznym. Tri- i difosforany nukleozydowe indukują w komórkach zjawiska tak różnorodne, jak: proliferacja, różnicowanie, chemotaksja czy uwalnianie cytokin. Zahamowanie aktywności CD39, które jest konsekwencją aktywacji komórek śródbłonka i które towarzyszy procesowi niedotlenienia i reperfuzji, prowadzi do aktywacji i agregacji płytek krwi. O roli CD39 w angiogenezie świadczy silne upośledzenie powstawania nowych naczyń krwionośnych *in vivo* oraz *in vitro* u myszy *cd39^{-/-}*. W pracy przedstawiono także aktualny stan wiedzy dotyczący posttranslacyjnych modyfikacji cząsteczki, genów grupy CD39 oraz potencjalne możliwości zastosowania terapeutycznego CD39.

(*Postępy Biologii Komórki* 2002; 29: 15–25)

Słowa kluczowe: ADP, ATP, CD39, komórka śródbłonka, NTPDaza 1, płytka krwi, krzepnięcie

Summary: CD39 (NTPDase 1), an ectoenzyme expressed on vascular endothelium and blood cells, plays a significant role in regulation of blood clotting, inflammation and angiogenesis. CD39 hydrolyses extracellular ATP and ADP, and therefore modulates function of P2 receptors, for which these nucleotides are agonists. Nucleoside tri- and diphosphates elicit in cells various responses such as proliferation, differentiation, chemotaxis and cytokine release. Loss of CD39 activity associated with activation of endothelial cells and ischemia-reperfusion process leads to activation and aggregation of platelets. Crucial role of CD39 in angiogenesis is indicated by significant impairment of new blood vessel formation *in vivo* and *in vitro* in *cd39* knockout mice. In this review, CD39 is characterized and current data related

to posttranslational modifications of the molecule, CD39 like family and potential therapeutical applications of CD39 are presented.

(*Advances in Cell Biology 2002; 29: 15–25*)

Key words: ADP, ATP, ATPDase, CD39, endothelial cell, NTPDase 1, platelet, thrombosis.

Nukleotydy pojawiają się we krwi w następstwie uszkodzenia tkanek i śmierci komórek, są także uwalniane do przestrzeni okołokomórkowej w wyniku działania mechanizmów nielitycznych [1–6]. Istotnym źródłem ATP i ADP są ziarnistości gęste płytek krwi [7, 8].

Zewnątrzkomórkowe 5'-tri- i 5'-difosforany nukleozydowe nie przechodzą przez błonę komórkową i wiążą się z białkami występującymi na powierzchni komórek. Sygnał generowany w komórkach przez nukleotydy przekazywany jest przez specyficzną klasę receptorów błonowych, zwanych receptorami purynergicznymi P2. Ze względu na budowę dzieli się je na dwie podgrupy: kanały jonowe dla N^+ , K^+ i Ca^{2+} , P2X oraz receptory związane z białkiem G, P2Y [9, 10].

Indukowanie sygnału przez receptory purynergiczne utrzymuje się do momentu degradacji nukleotydu do nukleozydu i wolnych fosforanów lub pirofosforanów przez enzymy znajdujące się na powierzchni komórek.

Zgodnie z aktualnie przyjętymi zasadami nazewnictwa, CD39 (EC 3.6.1.5) został określony NTPDazą 1 (nukleotydaza difosfohydrolaza 1) i dał początek rodzinie NTPDaz, enzymów hydrolizujących NTP i/lub NDP. CD39 jest ciągle najlepiej scharakteryzowanym przedstawicielem tej grupy, występującym w literaturze także pod nazwą ekto-apyrazy, ATPazy, ADPazy lub ekto-ATPDazy [11]. CD39 hydrolizuje 5'-trifosforany i 5'-difosforany nukleozydowe i jego aktywność zależna jest od Ca^{2+} i Mg^{2+} . Ludzki gen CD39 zlokalizowano na chromosomie 10q23.1-q24.1, myszy odpowiednik genu o 75% homologii z ludzkim CD39 znajduje się na chromosomie 19 [12].

Antygen CD39 został po raz pierwszy opisany jako glikozylowane białko powierzchniowe aktywowanych limfocytów T i B, subpopulacji komórek NK, monocytów oraz nieaktywowanych komórek śródbłonna naczyń [13]. Był uznany za marker aktywacji komórek, ale opisano także jego udział w adhezji homotypowej limfocytów B. Przeciwciała monoklonalne przeciwko niektórym epitopom CD39 wywoływały ją prawdopodobnie poprzez zaangażowanie integryny LFA-1 (CD11a/CD18) [14].

Hipotezę o identyczności CD39 i ATPDazy wysunięto, kiedy analiza niepełnej sekwencji białkowej enzymu oczyszczonego z ludzkiego łożyska, świńskiej trzustki oraz aorty wołowej wykazała znaczną homologię z ludzką cząsteczką CD39 [15]. Podobieństwa dotyczyły również aminokwasowej sekwencji enzymów występujących pozanacyniowo (w świńskiej trzustce oraz w kurzym narządzie trącym) oraz apyrazy, enzymu wyizolowanego z ziemniaka. Ponad 95% aktywności ATPDazy uzyskanej z błon komórkowych śródbłonna żyły pępowinowej (HUVEC) można

było immunoprecypitować przy użyciu przeciwciał rozpoznających ludzkie CD39 [16]. Wreszcie wyizolowanie cDNA dla CD39 z ludzkich komórek śródbłonna naczyń i transfekowanie nim komórek COS-7 prowadziło do znaczącej indukcji aktywności ATPazy i ADPazy [15]. Niezwykle ważną obserwacją poczynioną podczas tych doświadczeń było blokowanie agregacji płytek krwi w odpowiedzi na ADP, kolagen i trombinę przez izolowane błony komórek COS-7 transfekowanych cDNA CD39 [15]. W ten sposób po raz pierwszy zademonstrowano, że zmiany w stężeniu nukleotydów zewnątrzkomórkowych zależne od aktywności CD39 mogą stanowić istotny element mechanizmu regulującego agregację płytek krwi. Znaczenie CD39 w aktywacji i agregacji płytek zostało potwierdzone kilka lat później w doświadczeniach przeprowadzonych na myszach *cd39^{-/-}*.

BUDOWA CZĄSTECZKI CD39

Przyjęty model topologii enzymu zakłada istnienie 2 obszarów transbłonowych na obu końcach cząsteczki i hydrofobową pętlę zewnątrzkomórkową [13]. Jest to nietypowa dla ektoenzymów struktura. Zazwyczaj są to białka związane z błoną komórkową pojedynczym wiązaniem białkowym lub lipidowym, natomiast podobnie zbudowane są niektóre cząsteczki tworzące w błonie komórkowej kanały i pory, na przykład epithelialne kanały sodowe czy receptory purynergiczne P2X. Analiza sekwencji aminokwasowej CD39 ujawnia 6 możliwych miejsc N-glikozylacji i 11 reszt cysteinowych (Cys), z których jedna, Cys 13, jest niesparowana i znajduje się w cytoplazmatycznej części aminowego końca [13]. W sekwencji znajdują się też miejsca palmitylacji oraz miejsca fosforylacji przez kinazę białkową C, kinazę kazeinową i kinazę zależną od cAMP/cGMP.

Szereg opisanych dotychczas modyfikacji posttranslacyjnych cząsteczki CD39 służy regulacji aktywności enzymu.

Do znanych modyfikacji posttranslacyjnych rdzenia białkowego CD39 należy przyłączenie łańcuchów cukrowych. Stopień glikozylacji enzymu zależy od typu komórki, w której dochodzi do ekspresji tego białka: różny jest w komórkach śródbłonna naczyń, megakariocytach, płytkach krwi i leukocytach [17]. Jednak deglikozylacja cząsteczki nie wpływa na aktywność enzymatyczną CD39 [18].

Konstytutywna palmitylacja CD39, czyli przyłączenie szesnastowęglowego nasyconego kwasu tłuszczowego do cysteiny znajdującej się w cytoplazmatycznej części cząsteczki, prawdopodobnie służy utrzymaniu białka w błonie komórkowej. Wiele białek zaangażowanych w przekazywanie sygnału jest palmitylowanych (podjednostki białka G, receptory beta-adrenergiczne, niereceptorowe kinazy tyrozynowe i inne) i są one umiejscowione w odrębnych strukturach błonowych zwanych kaweolami [19].

Częściowa proteoliza dokonywana w warunkach doświadczalnych przy pomocy trypsyny indukuje aktywność enzymatyczną CD39 [18]. Obecność proteaz serynowych w śródbłonku naczyń [20] sugeruje, że taka modyfikacja mogłaby następować po aktywacji komórek śródbłonka towarzyszącej procesom zapalnym [21, 22]. Jej następstwem jest zmniejszona zdolność CD39 do tworzenia multimerów. W literaturze istnieją sprzeczne doniesienia na temat zależności aktywności enzymatycznej CD39 od występowania tego białka w formie monomeru lub oligomeru. Według niektórych autorów [18] powstawanie multimerów utrzymywanych przez mostki dwusiarczkowe prowadzi do zahamowania aktywności enzymu. Według innych [23] CD39 jest aktywne jako niekowalencyjnie utrzymywany tetramer i dysocjacja do monomerów pod wpływem detergentów równoznaczna jest z utratą aktywności. Za stabilizację białka w formie oligomeru odpowiedzialne byłyby oddziaływania między końcami aminowymi i karboksylowymi czterech monomerów.

Pomimo intensywnych badań zmierzających do pełnego scharakteryzowania CD39, nadal nieznanne jest miejsce katalityczne enzymu. W obrębie sekwencji cDNA wyróżnić można cztery do pięciu obszarów silnie konserwowanych sekwencji (*apyrase conserved regions*, ACR) występujących u ATPDaz przedstawicieli tak odległych od siebie gatunków roślin i zwierząt, jak: groszek ogrodowy, drożdże, *Toxoplasma gondii* czy *Caenorabditis elegans*. Aktualnie wiadomo jedynie, że do utrzymania aktywności, integralności strukturalnej i ekspresji w błonie komórkowej niezbędne jest zachowanie ACR-1, ACR-4 i końca karboksylowego zawierającego ACR-5 [18].

GENY GRUPY CD39

Od zidentyfikowania CD39 jako pierwszej ekto-ATP difosfohydrolazy lub NTPDazy (gdzie N może oznaczać dowolny nukleotydy) [13], opisano 5 homologicznych genów zaliczanych do grupy CD39 (*CD39-like family*) kodujących białka CD39-L1 do CD39-L5 [24]. Kolejno poznawane cDNA i białka tej grupy nadal często opisuje się przyjmując za podstawę nazwę antygeny powierzchniowego limfocytów CD39. Powszechnie stosowane określenia enzymów tej grupy, ekto-ATP difosfohydrolazy czy ekto-ATPazy są nieściśle. CD39 i CD39-L1 hydrolizują nie tylko ATP i ADP, ale wszystkie 5'-tri i difosforany nukleozydów purynowych i pirymidynowych, z kolei CD39-L5 jest UDPazą [26]. CD39 nazwane jest NTPDazą 1, pozostałe białka grupy NTPDazami 2–6 i odpowiadają one CD39-L1-L5 [25]. Nomenklatura tej grupy białek może być myląca, dlatego dążąc do usystematyzowania nazewnictwa przyjęto za podstawę określenie nukleotydydowa difosfohydrolaza (NTPDaza) i nukleotydydowa trifosfohydrolaza (NTPaza). Tylko CD39 i CD39-L1 są trwale związane z zewnętrzną błoną komórkową. Analiza sekwencji CD39-L2 i CD39-L4 wskazuje, że posiadają one tylko jeden odcinek mocujący je w błonie

i są to prawdopodobnie białka uwalniane z błony [25]. Z kolei CD39-L5 występuje wewnątrz komórki, w błonach aparatu Golgiego.

ZNACZENIE CD39 W REGULACJI AGREGACJI PŁYTEK

Prawidłowe, nieaktywowane komórki śródbłonka naczyń mają zdolność do zapobiegania krzepnięciu w obrębie naczynia krwionośnego. Efekt antykoagulacyjny osiągany jest poprzez syntezę i sekrecję do krwi związków hamujących reaktywność płytek krwi: eikosanoidów, prostacykliny (PGI_2) i prostaglandyny D_2 [27] oraz tlenku azotu (NO) [28]. Do ważnych czynników tromboregulacyjnych związanych z komórkami śródbłonka zalicza się białka C i S, trombomodulinę, inhibitor szlaku czynnika tkankowego (TFPI), tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA), antytrombinę III i siarczany heparanu. CD39, hydrolizujący ADP i uniemożliwiający aktywację i agregację płytek, dołącza do grupy czynników zapobiegających tworzeniu skrzepiny.

Aktywacja komórek śródbłonka przez cytokiny prozapalne (np. czynnik martwicy nowotworów α , TNF- α) oraz wolne rodniki tlenowe (efekt działania np. oksydazy ksantynowej czy oksydazy NADPH) prowadzi do zahamowania aktywności CD39 [29, 30]. W warunkach eksperymentalnych procesowi temu można zapobiec stosując środki przeciwutleniające, takie jak: dyzmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza czy 21-aminosterydy [29]. Podobny efekt uzyskuje się po zastosowaniu substancji redukującej, jaką jest β -merkaptoetanol [29].

Związana z utratą aktywności CD39 aktywacja i agregacja płytek jest następstwem procesu niedotlenienia i reperfuzji m.in. po przeszczepieniu narządów w modelu allo- i ksenogenicznym. O znaczeniu CD39 w procesie odrzucania przeszczepu świadczy fakt, że podanie szczurom rozpuszczalnej apyrazy znacząco przedłużyło przeżycie heterotropowo przeszczepionych serc pochodzących ze świnek morskich oraz dramatycznie zmniejszyło obecność złożeń płytkowych w naczyniach krwionośnych przeszczepu [31].

Inną udokumentowaną funkcją, jaką pełni CD39 w śródbłonku naczyń, jest modulowanie procesu uwalniania IL-1 α z komórek po ich stymulacji endotoksyną bakteryjną (LPS) [32]. IL-1 α jest cytokiną indukującą szereg reakcji w komórkach śródbłonka: ekspresję czynnika tkankowego [33], śródbłonkowego czynnika wzrostu C (VEGF-C) [34] oraz CD44 [35], aktywację komórek endotelialnych *in vitro* [36] oraz ich migrację *in vitro* [37]. Mechanizm prowadzący do wydzielenia IL-1 α z komórek nie jest dokładnie poznany, ale wiadomo, że rolę w tym procesie odgrywa ATP. Prawdopodobnie hydroliza ATP przez CD39 uniemożliwia przekazanie sygnału przez receptory purynergiczne i prowadzi do zahamowania uwalniania IL-1 α .

Niezwykle ważne fizjologiczne znaczenie śródbłonkowego CD39 zostało potwierdzone po wyhodowaniu myszy pozbawionych cd39 i poznaniu ich fenotypu, zwłaszcza parametrów krzepnięcia krwi [38]. Nieoczekiwanie, myszy cd39 $^{-/-}$ miały

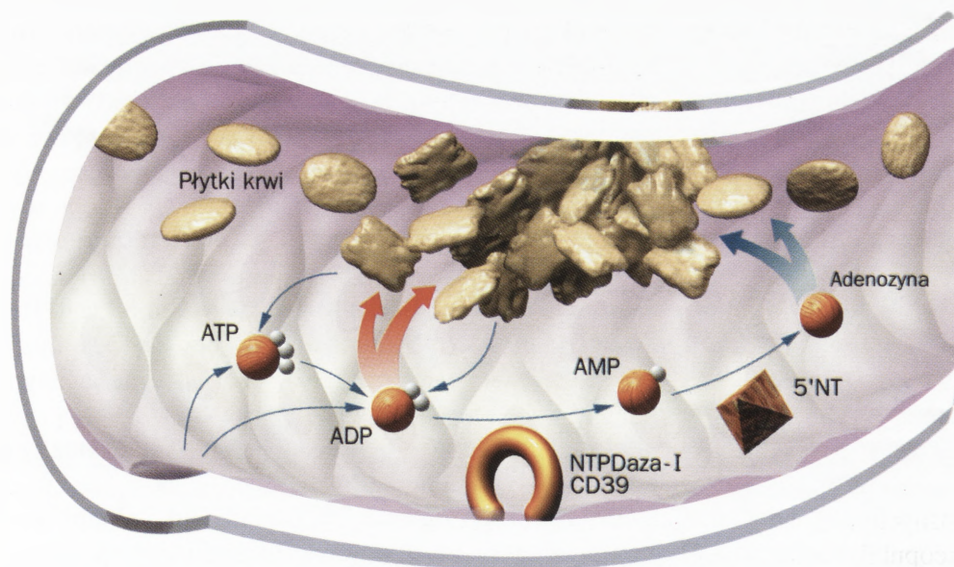
znacznie wydłużony czas krwawienia. Płytki krwi zmutowanych zwierząt wykazywały znacznie niższą reaktywność z uszkodzoną ścianą naczyń krwionośnych *in vivo*, a *in vitro* nie agregowały w odpowiedzi na ADP, kolagen i niskie stężenia trombiny. Przyczyną zaburzenia funkcji płytek było zablokowanie przekazywania sygnału przez receptory purynergiczne P2Y1. Podanie zwierzętom rozpuszczalnej apyrazy przywracało normalną reaktywność płytek krwi. Inną ważną obserwacją było stwierdzenie złożeń włóknika w płucach, sercu i śledzionie u myszy *cd39^{-/-}* i *cd39^{-/+}* oraz w sercach myszy *cd39^{-/-}* przeszczepionych szczurom. Ksenogeniczne przeszczepy serca podlegały przyspieszonemu odrzucaniu [38]. Pozostaje to w związku ze znacznym podwyższeniem aktywności czynnika tkankowego w komórkach śródbłonna wyizolowanych z naczyń krwionośnych zmutowanych myszy.

Najnowsze, zaskakujące dane potwierdzające znaczenie CD39 w regulacji hemostazy i krzepnięcia oraz w modulacji szlaku purynergicznego dotyczą zaburzeń angiogenezy *in vitro* oraz silne upośledzenie powstawania nowych naczyń krwionośnych w nowotworach *in vivo* u myszy *cd39^{-/-}* (T. Hoshi i S. Robson, dane nieopublikowane). Te obserwacje rzucają nowe światło na patogenezę zjawisk, takich jak: nowotworzenie, procesy zapalne czy gojenie się ran.

W poznawaniu mechanizmów działania CD39 istotne znaczenie odgrywa możliwość wykorzystania rozpuszczalnego CD39 (sCD39). sCD39 otrzymano przez wprowadzenie sekwencji DNA kodującej zewnątrzkomórkową część cząsteczki do wektora ekspresyjnego zawierającego sekwencję wiodącą IL-2, odpowiedzialną za sekrecję białka [39]. Komórki COS-7 transfekowane tym wektorem wydzielają do pożywki hodowlanej 66 kDa rekombinowane białko o potwierdzonej aktywności ATPdazowej (sCD39). Oczyszczone sCD39 hamuje *in vitro* agregację płytek krwi zachodzącą w obecności kolagenu i ADP. Ekspresja sCD39 w komórkach CHO umożliwiła produkcję białka na większą skalę i pierwsze próby *in vivo*. Z pierwszych opublikowanych danych wynika, że po podaniu myszom sCD39 aktywność enzymu we krwi utrzymuje się przez około 2 dni i u zwierząt doświadczalnych nie obserwuje się istotnych objawów ubocznych [39].

MODULACJA AKTYWNOŚCI RECEPTORÓW PURYNERGICZNYCH PRZEZ CD39/NTPDazę 1

Przez wiele lat utrzymywano, że receptory purynergiczne P2 pełnią fizjologiczną rolę tylko w tkankach zdolnych do pobudzenia. Dzisiaj wiadomo już, że receptory P2 występują powszechnie i zaangażowane są w przekazywanie sygnału indukowanego przez nukleotydy w wielu tkankach. Oprócz powszechnie znanej roli ADP w procesie aktywacji płytek, nukleotydy mają wpływ na większość komórek krwi indukując w nich zjawiska tak różnorodne, jak: proliferacja, różnicowanie, chemotaksja czy uwalnianie cytokin [40]. Defosforylacja zewnątrzkomórkowych nu-



RYCINA 1. Mechanizm działania CD39/NTPDazy 1; 5'-NT-5'-nukleotydaza

kleotydydów zależna od aktywności śródbłonkowego CD39 może mieć krytyczne znaczenie dla ich funkcji. W monocytach pod wpływem ATP dochodzi do aktywacji kaspazy-1, znanej też pod nazwą enzymu konwertującego $IL-1\beta$ (*IL-1 β -converting enzyme, ICE*) i w konsekwencji do powstania i sekrecji aktywnej cząsteczki $IL-1\beta$ [41, 42]. Pojawiły się doniesienia o roli ATP w procesie uwalniania $IL-18$ z monocytów [43, 44]. ATP odgrywa rolę w procesie fuzji makrofagów w wielojądrzaste komórki olbrzymie [45]. Limfocyty B reagują na ATP wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia i nasileniem syntezy mRNA dla protoonkogenów *c-myc* i *c-fos* [46]. ATP indukuje degranulację z neutrofilów i monocytów [47, 48] oraz uwolnienie histaminy z mastocytów [49, 50]. W neutrofilach pod wpływem ATP dochodzi do nasilenia ekspresji $CD11b/CD18$ w błonie komórkowej [51]. Następstwem działania zewnątrzkomórkowego ATP jest zwiększenie przepuszczalności błony komórkowej erytrocytów i wyciek cytoplazmatycznego ATP [52].

Roli nukleotydydów w regulacji funkcji komórek śródbłonka naczyniowego poświęca się szczególnie dużo uwagi. Pod wpływem ATP i ADP w komórkach endotelialnych dochodzi do syntezy i uwolnienia tlenu azotu i prostacykliny, związków rozszerzających naczynia oraz hamujących agregację płytek krwi oraz do wzrostu stężenia cytoplazmatycznego Ca^{2+} [53]. Istnieją doniesienia sugerujące zaangażowanie ATP w proces wydzielania czynnika von Willebranda [54] oraz w indukcję apoptozy w komórkach śródbłonka tętnicy płucnej [55].

CD39 może modyfikować reakcje mediowane przez receptory purynergiczne nie tylko hydrolizując ATP i ADP, ale pośrednio, prowadząc do zmiany stężenia adenozyiny. 5'-monofosforany nukleotydydowe pojawiające się na skutek aktywności CD39 są hydrolizowane przez ekto-5'-nukleotydazę (CD73) do nukleozydów, w tym adenozyiny. Aktywacja specyficznych receptorów adenozyinowych często wywołuje reakcje przeciwstawne do zjawisk indukowanych pobudzeniem receptorów purynergicznych. Wolne nukleozydy mogą zostać związane i przetransportowane do komórki przez wyspecjalizowane błonowe białka transportowe. Ten szlak odzyskiwania puryn umożliwi m.in. uzupełnienie zapasów ATP w komórkach. Regulowana defosforylacja zewnątrzkomórkowych nukleotydydów przez CD39 może mieć więc zasadnicze znaczenie dla przekazywania sygnału w szlaku purynergicznym oraz regulacji zawartości ATP w komórce.

Zastosowanie CD39 do interwencji farmakologicznych jest na razie możliwe tylko w warunkach doświadczalnych, tym niemniej trwają intensywne prace zmierzające do szybkiego umożliwienia aplikacji klinicznych. Istnienie rekombinowanego, rozpuszczalnego CD39 stwarza nowe możliwości w leczeniu chorób serca i mózgu, takich jak: udar czy zawał mięśnia sercowego, a także po interwencjach naczyniowych, na przykład po angioplastyce czy stentowaniu. Rekombinowane CD39 mogłoby być stosowane w kombinacji z innymi lekami przeciwzakrzepowymi. Hamowanie reaktywności płytek przez CD39 jest wynikiem hydrolizy zewnątrzkomórkowego ADP, występuje więc niezależnie od działania kwasu acetylosalicylowego, heparyny, inhibitorów GPIIb/IIIa czy związków blokujących płytkowe receptory dla ADP.

PODZIĘKOWANIA

Autorka składa serdeczne podziękowania Piotrowi Kaczmarkowi za wykonanie ilustracji do tekstu oraz dr Elżbiecie Kaczmarek i prof. dr hab. med. Zbigniewowi Gaciongowi za cenne uwagi.

PIŚMIENNICTWO

- [1] FILIPPINI A, TAFFS RE, SITKOVSKY MV. Extracellular ATP in T-lymphocyte activation: possible role in effector functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 8267–8271.
- [2] FERRARI D, CHIOZZI P, FALZONI S, HANAU S, DI VIRGILIO F. Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *J Exp Med* 1997; **185**: 579–582.
- [3] JORGENSEN NR, GEIST ST, CIVITELLI R, STEINBERG TH. ATP- and gap junction-dependent intercellular calcium signaling in osteoblastic cells. *J Cell Biol* 1997; **139**: 497–506.
- [4] MITCHELL CH, CARRE DA, MCGLINN AM, STONE RA, CIVAN MM. A release mechanism for stored ATP in ocular ciliary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 7174–7178.

- [5] COTRINA ML, LIN JH, ALVES-RODRIGUES A, LIU S, LI J, AZMI-GHADIMI H, KANG J, NAUS CC, NEDERGAARD M. Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 15735–15740.
- [6] JIANG Q, MAK D, DEVIDAS S, SCHWIEBERT EM, BRAGIN A, ZHANG Y, SKACH WR, GUGGINO WB, FOSKETT JK, ENGELHARDT JF. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-associated ATP release is controlled by a chloride sensor. *J Cell Biol* 1998; **143**: 645–657.
- [7] MEYERS KM, HOLMSEN H, SEACHORD CL. Comparative study of platelet dense granule constituents. *Am J Physiol* 1982; **243**: R454–R461.
- [8] HOLMSEN H, STORM E, DAY HJ. Determination of ATP and ADP in blood platelets: a modification of the firefly luciferase assay for plasma. *Anal Biochem* 1972; **46**: 489–501.
- [9] RALEVIC V, BURNSTOCK G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 1998; **50**: 413–492.
- [10] ABBRACCHIO MP, BURNSTOCK G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* 1994; **64**: 445–475.
- [11] PLESNER L. Ecto-ATPases: identities and functions. *Int Rev Cytol* 1995; **158**: 141–214.
- [12] SCHOENBORN MA, JENKINS NA, COPELAND NG, GILBERT DJ, GAYLE RB, 3RD, MALISZEWSKI CR. Gene structure and chromosome location of mouse Cd39 coding for an ecto-apyrase. *Cytogenet Cell Genet* 1998; **81**: 287–289.
- [13] MALISZEWSKI CR, DELESPESE GJ, SCHOENBORN MA, ARMITAGER J, FANSLAW WC, NAKAJIMA T, BAKER E, SUTHERLAND GR, POINDEXTER K, BIRKS C i wsp. The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. *J Immunol* 1994; **153**: 3574–3583.
- [14] KANSAS GS, WOOD GS, TEDDER TF. Expression, distribution, and biochemistry of human CD39. Role in activation-associated homotypic adhesion of lymphocytes. *J Immunol* 1991; **146**: 2235–2244.
- [15] KACZMAREK E, KOZIAK K, SEVIGNY J, SIEGEL JB, ANRATHER J, BEAUDOIN AR, BACH FH, ROBSON SC. Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. *J Biol Chem* 1996; **271**: 33116–3322.
- [16] MARCUS AJ, BROEKMAN MJ, DROSOPOULOS JH, ISLAM N, ALYONYCHEVA TN, SAFIER LB, HAJJAR KA, POSNETT DN, SCHOENBORN MA, SCHOOLEY KA, GAYLE RB, MALISZEWSKI CR. The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. *J Clin Invest* 1997; **99**: 1351–1360.
- [17] KOZIAK K, SEVIGNY J, ROBSON SC, SIEGEL JB, KACZMAREK E. Analysis of CD39/ATP diphosphohydrolase (ATPDase) expression in endothelial cells, platelets and leukocytes. *Thromb Haemost* 1999; **82**: 1538–1544.
- [18] SCHULTE AM, ESCH J 2ND, SEVIGNY J, KACZMAREK E, SIEGEL JB, IMAI M, KOZIAK K, BEAUDOIN AR, ROBSON SC. Structural elements and limited proteolysis of CD39 influence ATP diphosphohydrolase activity. *Biochemistry* 1999; **38**: 2248–2258.
- [19] KOZIAK K, KACZMAREK E, KITTEL A, SEVIGNY J, BLUSZTAJN JK, SCHULTE AM, ESCH J 2ND, IMAI M, GUCKELBERGER O, GOEPFERT C, QAWI I, ROBSON SC. Palmitoylation targets CD39/endothelial ATP diphosphohydrolase to caveolae. *J Biol Chem* 2000; **275**: 2057–2062.
- [20] KOSHIKAWA N, NAGASHIMA Y, MIYAGI Y, MIZUSHIMA H, YANOMA S, YASUMITSU H, MIYAZAKI K. Expression of trypsin in vascular endothelial cells. *FEBS Lett* 1997; **409**: 442–448.
- [21] BACH FH, FERRAN C, SOARES M, WRIGHTON CJ, ANRATHER J, WINKLER H, ROBSON SC, HANCOCK WW. Modification of vascular responses in xenotransplantation: inflammation and apoptosis. *Nat Med* 1997; **3**: 944–948.

- [22] HWA JJ, GHIBAUDI L, WILLIAMS P, CHINTALA M, ZHANG R, CHATTERJEE M, SYBERTZ E. Evidence for the presence of a proteinase-activated receptor distinct from the thrombin receptor in vascular endothelial cells. *Circ Res* 1996; **78**: 581–588.
- [23] WANG TF, OU Y, GUIDOTTI G. The transmembrane domains of ectoapyrase (CD39) affect its enzymatic activity and quaternary structure. *J Biol Chem* 1998; **273**: 24814–24821.
- [24] CHADWICK BP, FRISCHAUF AM. The CD39-like gene family: identification of three new human members (CD39L2, CD39L3, and CD39L4), their murine homologues, and a member of the gene family from *Drosophila melanogaster*. *Genomics* 1998; **50**: 357–367.
- [25] ZIMMERMANN H. Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function. *Trends Pharmacol Sci* 1999; **20**: 231–236.
- [26] WANG TF, GUIDOTTI G. Golgi localization and functional expression of human uridine diphosphatase. *J Biol Chem* 1998; **273**: 11392–11399.
- [27] MARCUS AJ, WEKSLER BB, JAFFE EA, BROEKMAN MJ. Synthesis of prostacyclin from platelet-derived endoperoxides by cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* 1980; **66**: 979–986.
- [28] BROEKMAN MJ, EIROA AM, MARCUS AJ. Inhibition of human platelet reactivity by endothelium-derived relaxing factor from human umbilical vein endothelial cells in suspension: blockade of aggregation and secretion by an aspirin-insensitive mechanism. *Blood* 1991; **78**: 1033–1040.
- [29] ROBSON SC, KACZMAREK E, SIEGEL JB, CANDINAS D, KOZIAK K, MILLAN M, HANCOCK WW, BACH FH. Loss of ATP diphosphohydrolase activity with endothelial cell activation. *J Exp Med* 1997; **185**: 153–163.
- [30] CANDINAS D, KOYAMADA N, MIYATAKE T, SIEGEL J, HANCOCK WW, BACH FH, ROBSON SC. Loss of rat glomerular ATP diphosphohydrolase activity during reperfusion injury is associated with oxidative stress reactions. *Thromb Haemost* 1996; **76**: 807–812.
- [31] KOYAMADA N, MIYATAKE T, CANDINAS D, HECHENLEITNER P, SIEGEL J, HANCOCK WW, BACH FH, ROBSON SC. Apyrase administration prolongs discordant xenograft survival. *Transplantation* 1996; **62**: 1739–1743.
- [32] IMAI M, GOEPFERT C, KACZMAREK E, ROBSON SC. CD39 modulates IL-1 release from activated endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **270**: 272–278.
- [33] RIBEIRO MJ, PHILLIPS DJ, BENSON JM, EVATT BL, ADES EW, HOOPER WC. Hemostatic properties of the SV-40 transfected human microvascular endothelial cell line (HMEC-1). A representative *in vitro* model for microvascular endothelium. *Thromb Res* 1995; **79**: 153–161.
- [34] RISTIMAKI A, NARKO K, ENHOLM B, JOUKOV V, ALITALO K. Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C. *J Biol Chem* 1998; **273**: 8413–8418.
- [35] KULSETH MA, KOLSET SO, RANHEIM T. Stimulation of serglycin and CD44 mRNA expression in endothelial cells exposed to TNF-alpha and IL-1alpha. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1428**: 225–232.
- [36] STEEN MB, TUCK FL, SELVAN RS. Spontaneous activation of endothelial cells: a central role for endogenous IL-1alpha. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1999; **35**: 327–332.
- [37] MCMAHON GA, GARFINKEL S, PRUDOVSKY I, HU X, MACIAG T. Intracellular precursor interleukin (IL)-1alpha, but not mature IL-1alpha, is able to regulate human endothelial cell migration *in vitro*. *J Biol Chem* 1997; **272**: 28202–28205.
- [38] ENJYOJI K, SEVIGNY J, LIN Y, FRENETTE PS, CHRISTIE PD, ESCH JS 2ND, IMAI M, EDELBERG JM, RAYBURN H, LECH M, BEELER DL, CSIZMADIA E, WAGNER DD, ROBSON SC, ROSENBERG RD. Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nat Med* 1999; **5**: 1010–1017.
- [39] GAYLE RB 3RD, MALISZEWSKI CR, GIMPEL SD, SCHOENBORN MA, CASPARY RG, RICHARDS C, BRASEL K, PRICE V, DROSOPOULOS JH, ISLAM N, ALYONYCHEVA

- TN, BROEKMAN MJ, MARCUS AJ. Inhibition of platelet function by recombinant soluble ecto-ADPase/CD39. *J Clin Invest* 1998; **101**: 1851–1859.
- [40] DI VIRGILIO F, CHIOZZI P, FERRARID, FALZONI S, SANZ JM, MORELLI A, TORBOLI M, BOLOGNESI G, BARICORDI OR. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 2001; **97**: 587–600.
- [41] BUDIARDJO I, OLIVER H, LUTTER M, LUO, X, WANG X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; **15**: 269–290.
- [42] HOGQUIST KA, NETT MA, UNANUE ER, CHAPLIN DD. Interleukin 1 is processed and released during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 8485–8489.
- [43] PERREGAUX DG, MCNIFF P, LALIBERTE R, CONKLYN M, GABEL CA. ATP acts as an agonist to promote stimulus-induced secretion of IL-1 beta and IL-18 in human blood. *J Immunol* 2000; **165**: 4615–4623.
- [44] MEHTA VB, HART J, WEWERS MD. ATP stimulated release of IL-1beta and IL-18 requires priming by LPS and is independent of caspase-1 cleavage. *J Biol Chem* 2000; **30**: 30.
- [45] FAIS S, BURGIO VL, CAPOBIANCHI MR, GESSANI S, PALLONE F, BELARDELLI F. The biological relevance of polykaryons in the immune response. *Immunol Today* 1997; **18**: 522–527.
- [46] PADEH S, COHEN A, ROIFMAN CM. ATP-induced activation of human B lymphocytes via P2-purinoceptors. *J Immunol* 1991; **146**: 1626–1632.
- [47] COCKCROFT S, STUTCHFIELD J. ATP stimulates secretion in human neutrophils and HL60 cells via a pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding protein coupled to phospholipase C. *FEBS Lett* 1989; **245**: 25–29.
- [48] DUBYAK GR, COWEN DS, MEULLER LM. Activation of inositol phospholipid breakdown in HL60 cells by P2- purinergic receptors for extracellular ATP. Evidence for mediation by both pertussis toxin-sensitive and pertussis toxin-insensitive mechanisms. *J Biol Chem* 1988; **263**: 18108–18117.
- [49] COCKCROFT S, GOMPERTS BD. ATP induces nucleotide permeability in rat mast cells. *Nature* 1979; **279**: 541–542.
- [50] COCKCROFT S, GOMPERTS BD. Activation and inhibition of calcium-dependent histamine secretion by ATP ions applied to rat mast cells. *J Physiol* 1979; **296**: 229–243.
- [51] FREYER DR, BOXER LA, AXTELL RA, TODD RF, 3rd. Stimulation of human neutrophil adhesive properties by adenine nucleotides. *J Immunol* 1988; **141**: 580–586.
- [52] TRAMS, EG. A proposal for the role of ecto-enzymes and adenylates in traumatic shock. *J Theor Biol* 1980; **87**: 609–621.
- [53] MOTTE S, COMMUNI D, PIROTON S, BOEYNAEMS JM. Involvement of multiple receptors in the actions of extracellular ATP: the example of vascular endothelial cells. *Int J Biochem Cell Biol* 1995; **27**: 1–7.
- [54] VISCHER, UM WOLLHEIM CB. Purine nucleotides induce regulated secretion of von Willebrand factor: involvement of cytosolic Ca²⁺ and cyclic adenosine monophosphate-dependent signaling in endothelial exocytosis. *Blood* 1998; **91**: 118–127.
- [55] DAWICKI DD, CHATTERJEE D, WYCHE J, ROUNDS, S. Extracellular ATP and adenosine cause apoptosis of pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol* 1997; **273**: L485–494.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 18.07.2001 r.

Przyjęto: 23.10.2001 r.

ul. Żwirki i Wigury 61, 02-091 Warszawa

e-mail: kkoziak@amwaw.edu.pl

DYNAMIKA ROZMIESZCZENIA RECEPTORÓW HORMONÓW STEROIDOWYCH W JAJNIKU*

THE DYNAMIC OF THE STEROID HORMONE RECEPTORS DISTRIBUTION IN THE OVARY

Maria SŁOMCZYŃSKA

Pracownia Endokrynologii Zwierząt i Hodowli Tkanek,
Zakład Fizjologii Zwierząt, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie: W jajniku dojrzałej samicy ssaka nieustannie przebiega proces rozwoju pęcherzyków jajnikowych, wyrazem którego jest proliferacja i różnicowanie się komórek. Ekspresja genów w jajniku zachodzi w określonej kolejności zależnej od wielu czynników. Wiadomo, że niektóre białka ulegają ekspresji w określonym stadium rozwoju pęcherzyka i luteinizacji ciała żółtego. Hormonami regulującymi wiele funkcji jajnika są steroidy, tak więc rozmieszczenie receptorów tych hormonów jest niezwykle ważne. Metody immunohistochemiczne, hybrydyzacji *in situ* i analiza biochemiczna, analizowane łącznie, pozwalają na lepsze poznanie procesów folikulogenezy.

(*Postępy Biologii Komórki* 2002; 29: 27–46)

Słowa kluczowe: hormony steroidowe, receptory, immunohistochemia, hybrydyzacja *in situ*,

Summary: In the adult ovary the process of follicle development, which involves cell proliferation and differentiation, takes place. The expression of genes in the ovary occurs in a sequential hormone-dependent manner and is dependent on numerous factors. Some of the proteins are known to be expressed at defined stages of follicular development and luteinization. As ovarian functions are also regulated by ovarian steroids, the distribution of their receptors is crucial. Immunohistochemistry, hybridization *in situ* and biochemical analysis provide data which, when they are analysed jointly, may led to a better understanding of folliculogenesis.

(*Advances in Cell Biology* 2002; 29: 27–46)

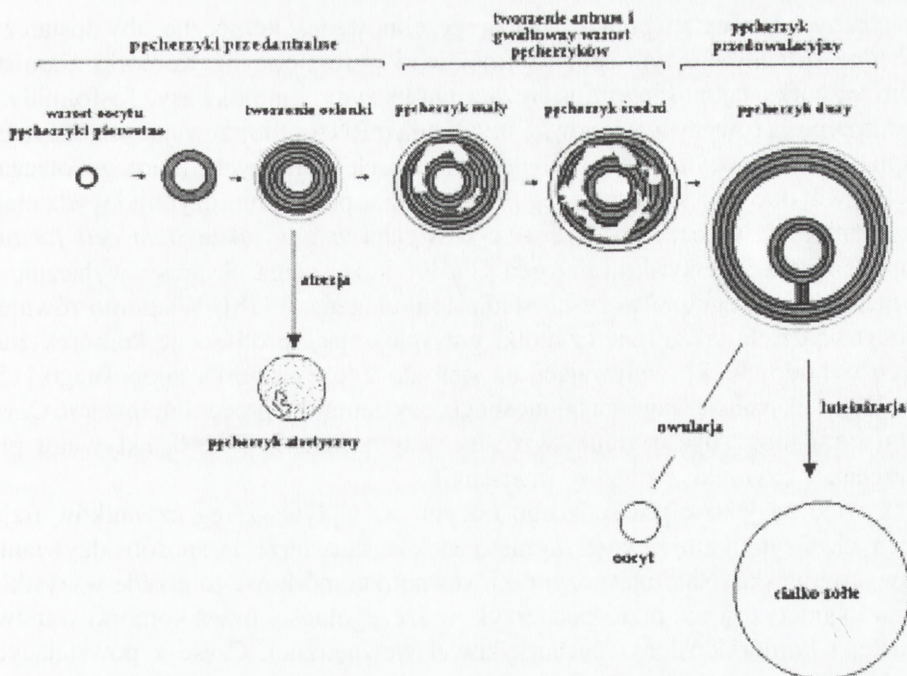
Key words: steroids, receptors, immunohistochemistry, *in situ* hybridization

*W artykule wykorzystano książki i czasopisma zakupione z grantu WHO (Small Grant, Special Programme of Research, Development and Research Training in Human Reproduction) oraz grantu DS/IZ/ZFZ/2001.

Główną funkcją jajników jest wyprodukowanie dojrzałego oocytu, zdolnego do zapłodnienia i dalszego rozwoju, a tym samym zapewniającego przedłużenie gatunku. Jajniki ssaków zawierają liczne pęcherzyki, które są ważnymi funkcjonalnymi jednostkami. Wzrost i rozwój pęcherzyków i zawartych w nich oocytów decyduje o zdolnościach reprodukcyjnych osobników żeńskich. Z kolei o losie każdego z pęcherzyków decydują czynniki endokrynne i parakrynne [33, 35, 57, 68]. Ważnymi hormonami produkowanymi przez jajniki są steroidy, które regulują funkcje jajników, umożliwiają rozwój drugorzędnych cech płciowych i podtrzymują ciążę. Jajniki dorosłych osobników podlegają cyklicznym zmianom morfologicznym i hormonalnym. Te ostatnie dotyczą przede wszystkim produkcji hormonów steroidowych: estradiolu, androgenów i progesteronu. Ważną rolę odgrywają również białka regulatorowe, takie jak np. inhibiny i aktywiny. Pęcherzyki jajnikowe przechodzą przez stadium pęcherzyków pierwotnych, a następnie sukcesywnie rozpoczynają rozwój, w trakcie którego komórki ziarniste, a później również komórki osłonki, proliferują i różnicują się. Dalszy rozwój prowadzi do powstania jamki (*antrum*). Jeszcze w stadium przedowulacyjnym pęcherzyki stają się wrażliwe na gonadotropiny, a w kolejnym, zwykle wczesnoantralnym stadium zależne od gonadotropin. Od momentu osiągnięcia stadium antralnego, większość pęcherzyków ulega zmianom atretycznym, podczas gdy tylko niewiele z nich (przede wszystkim pod wpływem hormonów gonadotropowych) osiąga stadium przedowulacyjne. Podczas każdego cyklu menstruacyjnego ludzki jajnik produkuje zwykle pojedynczy dominujący pęcherzyk, zwany pęcherzykiem Graafa, który pod wpływem wyrzutu gonadotropin pod koniec fazy folikularnej, uwalnia do jajowodu dojrzały oocyt gotowy do zapłodnienia (ryc. 1). Taki właśnie pęcherzyk Graafa w czasie cyklu wydziela wzrastające ilości estradiolu. Pozostałe po owulacji komórki ziarniste i komórki osłonki ulegają przemianom tworząc ciało żółte.

ROZWÓJ PĘCHERZYKA JAJNIKOWEGO

Pęcherzyk jest podstawową funkcjonalną jednostką jajnika, w skład której wchodzi oocyt otoczony przez komórki ziarniste i komórki osłonki pęcherzykowej. Podczas rozwoju zdrowego pęcherzyka obserwowana jest koordynacja wzrostu i dojrzewania, a komórki ziarniste i osłonki proliferują i różnicują się [24]. Większość wczesnych pęcherzyków antralnych ulega atrezji – procesowi, któremu towarzyszy apoptoza komórek ziarnistych. Tylko niektóre z nich zostają „ocalone” przez działające na nie FSH. W pęcherzykach „wybranych” do dalszego rozwoju, LH stymuluje produkcję androgenów przez komórki osłonki wewnętrznej, podczas gdy FSH stymuluje komórki ziarniste do proliferacji, aromatyzacji androgenów do estrogenów i tworzenia się receptorów LH. Inhibina wydzielana przez komórki ziarniste obniża poziom



RYCINA 1. Ilustracja głównych morfologicznych zmian w procesie folikulogenezy. Proces ten kończy się owulacją lub atrezią tworzącego się pęcherzyka (na podstawie [24])

FSH, podczas gdy duża ilość estrogenów pęcherzykowych pobudza przysadkę do wyrzutu LH. Tak więc zmiany w poziomie gonadotropin w cyklu estralnym są regulowane przez sprzężenie zwrotne między podwzgórzem, przysadką i pęcherzykiem. Po wyrzucie LH następuje uwolnienie oocytu z pęcherzyka i pozostałe komórki ziarniste ulegają luteinizacji. Ciało żółte, będące efektem tych przeobrażeń, jest bardzo unaczynionym, endokrynnym organem, który przede wszystkim produkuje progesteron, konieczny do przygotowania macicy do implantacji i utrzymania ciąży [68].

Wszystkie rosnące pęcherzyki mogą być podzielone na dwie grupy: zdrowe i atretyczne w zależności od tego, czy zachodzi w nich proces apoptozy w komórkach ziarnistych [26, 43]. Nieznany jest mechanizm zapoczątkowania wzrostu pęcherzyków, ale zaktywizowane pęcherzyki rosną, rozwijają się i owulują lub giną w procesie atrezji.

Rozwój oocytów u ssaków zachodzi w dwu oddzielnych fazach. W pierwszej z nich obserwowany jest jednoczesny wzrost pęcherzyka i oocytu, a w drugiej oocyt już prawie nie zwiększa rozmiarów, chociaż obserwowany jest dalszy wzrost samego pęcherzyka. Podczas fazy wzrostu oocyt świni zwiększa swoje wymiary do 120 μm w pęcherzyku, który osiąga średnicę 1,8 mm [62]. Połączenie komórek

somatycznych z oocytem poprzez złącza szczelinowe jest konieczne, aby dostarczyć niezbędne składniki, a tym samym umożliwić wzrost oocytu. Komórki ziarniste, w tym wzgórką jajonośnego dostarczają nukleozydy, aminokwasy, fosfolipidy, a także utrzymują równowagę jonową i stabilizują mRNA w dojrzewających oocytach. Tempo wzrostu oocytu zależy od ilości komórek ziarnistych, które go otaczają [37]. Rozwój oocytu jest również regulowany przez parakrynnne czynniki wydzielane przez komórki ziarniste (np. SCF – c-kit ligand zwany także *stem cell factor*). U myszy został zidentyfikowany gen *Gdf-9*, który ulega ekspresji wyłącznie w oocytach i który reguluje wczesne stadia folikulogenezy [18]. Wiadomo również, że oocyt wydziela także inne czynniki przyspieszające proliferację komórek ziarnistych w hodowli [7], wpływające na steroidogenezę wzgórką jajonośnego [15], stymulujące ekspansję wzgórką jajonośnego, czy hamujące proces luteinizacji. Czynniki tymi mogą być czynniki wzrostu, w tym GDF-9, TGF- β , aktywator plazminogenu i czynniki z rodziny interleukin.

Tak więc na jakość powstającego oocytu ma wpływ szereg czynników fizjologicznych. Czynniki zewnętrznymi są wiek i rasa zwierzęcia, sposób odżywiania, wpływ środowiska. Natomiast czynniki wewnątrzkomórkowe to przede wszystkim czynniki syntetyzowane przez pęcherzyk, w szczególności przez komórki warstwy ziarnistej i komórki osłonki pęcherzykowej wewnętrznej. Część z powstających produktów jest wydzielana do płynu pęcherzykowego, a znaczna ilość jest wykorzystywana przez komórki, które są wyposażone w system receptorów i enzymów umożliwiających liczne przemiany. Znanych jest wiele czynników wpływających na jądrowe i/lub cytoplazmatyczne dojrzewanie oocytów ssaków. Są to czynniki pęcherzykowe: steroidy: androgeny, progesteron, estrogeny; gonadotropiny: FSH i LH; czynniki wzrostu: IGF-I, EGF; inne czynniki: prolaktyna, glikokortykoidy, kwas hialuronowy [44].

Pęcherzyki pierwotne pozostają pod stałym wpływem czynników hamujących ich wzrost. Obniżenie poziomu tych czynników i wzrost stężenia czynników stymulujących pozwala na rozpoczęcie wzrostu pęcherzyka [95]. Rozwój pęcherzyków przedantralnych odbywa się znacznie wolniej niż dużych pęcherzyków antralnych, więc istnieje możliwość, że jajnikowe geny wzrostu i różnicowania są hamowane podczas wczesnych etapów folikulogenezy. Genem takim może być między innymi *WT1* (*Wilm's tumor gene*) występujący u ptaków, ssaków (świnia, mała i sznur). *WT1* jest czynnikiem transkrypcyjnym z domeną palców cynkowych, hamuje on ekspresję kilku czynników wzrostu i ich receptorów w różnych typach tkanek [24]. Hamuje on również aktywność promotora inhibiny- α i promotor receptora FSH, które są genami koniecznymi dla rozwoju pęcherzyka. Zmniejszająca się ilość *WT1* umożliwia rozpoczęcie rozwoju wczesnych pęcherzyków. Wzrost pęcherzyków przedantralnych jest możliwy przy braku gonadotropin, ale odbywa się on znacznie wolniej i podlega mu znacznie mniej pęcherzyków [36], które osiągają jedynie wczesne stadia antralne. Rozwój antralnych i dużych pęcherzyków jest zależny

od obecności FSH i LH, ale zdolność odpowiedzi na gonadotropiny uzyskuje pęcherzyk już znacznie wcześniej, kiedy w stadium pęcherzyków drugorzędowych stwierdzono obecność receptorów FSH i LH.

Każdy potencjalnie owulujący pęcherzyk przechodzi w swoim rozwoju przez kilka faz. Początkowo jego rozwój jest niezależny od gonadotropin, a następnie aby wejść w kolejną fazę rozwoju (rekrutacja), musi być zastymulowany przez „ponadprogowe” stężenia FSH. W procesie selekcji zdobywa dominację, co jest związane z aktywną syntezą estradiolu i supresją uwalniania FSH. Do przedowulacyjnego rozwoju niezbędne jest stymulujące działanie LH (konieczne do syntezy androgenów i aromatyzacji do estrogenów). W ostatniej fazie obserwowany jest przedowulacyjny wyrzut LH, prowadzący do wzmożonej syntezy progesteronu, wznowienia mejozy w oocycie i wytworzenia się otworu owulacyjnego. Hormonalna regulacja procesu rekrutacji, selekcji i dominacji w rozwoju pęcherzyków jajnikowych ssaków została przedstawiona w artykule przeglądowym [86].

Steroidy są niezbędnymi czynnikami, które kontrolują rozród kręgowców. Normalny rozród ssaków jest ściśle uzależniony od biosyntezy hormonów płciowych. Istnieją choroby spowodowane zaburzeniami metabolizmu androgenów lub estrogenów [55, 71], co może być wynikiem genetycznych zaburzeń dotyczących enzymów szlaku steroidogenezy lub receptorów hormonów steroidowych [98]. Wiele cennych danych uzyskano stosując badania na zwierzętach z usuniętym określonym genem receptora (*knockout*) [16]. Tak więc równowaga pomiędzy androgenami i estrogenami jest nie tylko konieczna dla normalnego rozwoju płciowego i rozrodu, ale również dla normalnego wzrostu i fizjologicznej równowagi obu płci [13].

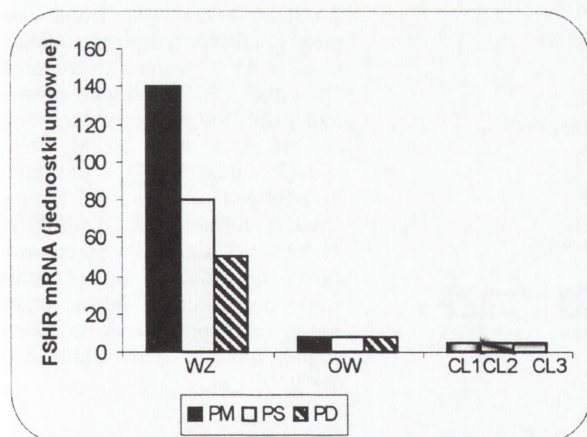
Prawidłowy rozwój pęcherzyka i oocytu zależy od współdziałania wszystkich wymienionych czynników. Istotne niezwykle staje się zbadanie dynamiki rozmieszczenia receptorów hormonów steroidowych i gonadotropin w jajniku w trakcie cyklu estralnego. Większość przeprowadzanych badań dotyczyła człowieka oraz zwierząt laboratoryjnych: myszy i szczura. Znacznie mniej badań przeprowadzono na zwierzętach gospodarskich, takich jak: koń, krowa czy świnia. W artykule tym oparto się na wynikach badań prowadzonych głównie na świni.

Przedantralne stadia wzrostu pęcherzyków jajnikowych są względnie niezależne od stymulacji gonadotropinami. Jednak do utworzenia jamki jest już niezbędna stymulacja przez FSH [32]. Wzrost pęcherzyków jajnikowych jest sterowany głównie przez FSH działający na komórki ziarniste. FSH działający przez cAMP reguluje geny, które wspólnie wpływają na proliferację i różnicowanie tych komórek w rosnącym pęcherzyku, a także stymulują syntezę glukozaaminoglikanów – niezbędnych składników płynu pęcherzykowego [41, 83]. Kiedy w okresie życia dorosłego stężenie FSH jest odpowiednio wysokie, wówczas pęcherzyki antralne nie ulegają atrezji i rozpoczyna się rozwój przedowulacyjny. Rozwój ten i wydzielanie estrogenów przez jajniki są procesami ze sobą powiązanymi. Aromataza, która przekształca androgeny do estrogenów, jest aktywowana w komórkach ziarnistych w

odpowiedzi na działanie FSH. Synteza estrogenów wymaga obecności jako substratu androgenów syntetyzowanych tylko w komórkach osłonki wewnętrznej, regulowanych przez LH [41]. Wynikiem działania FSH na komórki ziarniste jest wzrost ekspresji genu kodującego inhibinę, która to wzmacnia stymulowane przez LH tworzenie androgenów w komórkach osłonki. FSH indukuje również receptory LH w komórkach ziarnistych, a LH łącząc się z tymi receptorami stymuluje aktywność aromatazy. Tak więc w miarę dojrzewania pęcherzyka jego system aromatazy jest aktywowany przez LH, jak również FSH [102]. W dużym pęcherzyku przedowulacyjnym, LH poprzez swoje receptory w osłonce wewnętrznej stymuluje syntezę androgenów, a w komórkach ziarnistych aromatyzację i w ten sposób bezpośrednio reguluje syntezę estrogenów. LH jest również niezbędny do utrzymania czynności ciała żółtego. W jajniku jedynie komórki ziarniste mają receptor FSH. U wszystkich zbadanych dotąd gatunków mRNA dla FSHR zmniejsza się w miarę wzrostu pęcherzyka jajnikowego i stwierdza się brak mRNA w komórkach ciała żółtego [33, 59]. Podobne wyniki (ryc. 2) otrzymano w badaniach własnych dotyczących lokalizacji mRNA w pęcherzykach jajnikowych świni [77, 101]. Natomiast wyniki prac innych autorów wskazują [91], że w pęcherzyku przedowulacyjnym ilość mRNA dla FSHR była porównywalna z tą dla pęcherzyka małego albo nawet nieco wyższa.

Badanie zmian ekspresji białka FSHR jest utrudnione, ponieważ do tej pory żadnej z firm nie udało się wyprodukować przeciwciała anti-FSHR. Jednak w kilku laboratoriach naukowych pokonano tę trudność i dzięki temu wykazano techniką immunohistochemiczną lokalizację tego receptora w różnych tkankach [65]. W jajniku świni potwierdzono obecność receptora wyłącznie w komórkach ziarnistych, jednak nie zaobserwowano jego zmian ilościowych w trakcie rozwoju pęcherzyka [78]. Receptor FSH znajduje się w komórkach ziarnistych do czasu, gdy stają się atretyczne lub ulegają luteinizacji, a liczba receptorów przypadających na komórkę jest wielkością stałą, lecz zwiększa się ich ilość w całym pęcherzyku w miarę jego wzrostu, co jest związane z proliferacją komórek ziarnistych.

Ekspresja receptora LH jest obserwowana w komórkach ziarnistych pęcherzyków jajnikowych szczura przechodzących od stadium małego pęcherzyka antralnego do średniego, a poziom ten wzrasta gwałtownie w pęcherzyku dużym [4]. W komórkach osłonki pęcherzykowej wewnętrznej receptor LH jest obecny już w pęcherzykach przedantralnych, a jego ilość zwiększa się wraz ze wzrostem pęcherzyka. Podczas luteinizacji i tworzenia ciała żółtego obserwowany jest powtórny wzrost stężenia LH. W ciałku żółtym wiązanie LH wzrasta od wczesnej fazy lutealnej poprzez fazę środkowolutealną, a w późnej fazie lutealnej ulega obniżeniu. Immunohistochemiczne badania przy użyciu monoklonalnych przeciwciał pozwoliły na precyzyjne zlokalizowanie receptora LH w jajniku świni [58] i określenie kompartmentów w strukturze jajnika. W ciałku żółtym cyklicznym, zewnętrzne regiony komórek utworzone prawdopodobnie z komórek osłonki wewnętrznej pęcherzyka zawierają receptory LH. Natomiast rejony centralne, pochodzenia ziarnistego są



RYCINA 2. Zmiany poziomu ekspresji mRNA receptora FSH w warstwie komórek ziarnistych (WZ) i osłonki wewnętrznej (OW) w pęcherzykach jajnikowych świni: małych (PM), średnich (PS), dużych (PD) oraz w ciałkach żółtych wczesnych (CL1), fazy środkowolutealnej (CL2) i późnej fazy lutealnej (CL3). Po przeprowadzeniu hybrydyzacji *in situ* zmierzono powierzchnię zajęta przez ziarna srebra i przeliczono na umowne pole $200 \mu\text{m}^2$ (jednostki umowne)

pozbawione receptorów. Zaobserwowano bardzo ścisłe zależności pomiędzy ekspresją genu receptora LH a innych genów, w tym receptorów estrogenów, enzymów steroidogenezy oraz białka StAR.

RECEPTORY HORMONÓW STEROIDOWYCH

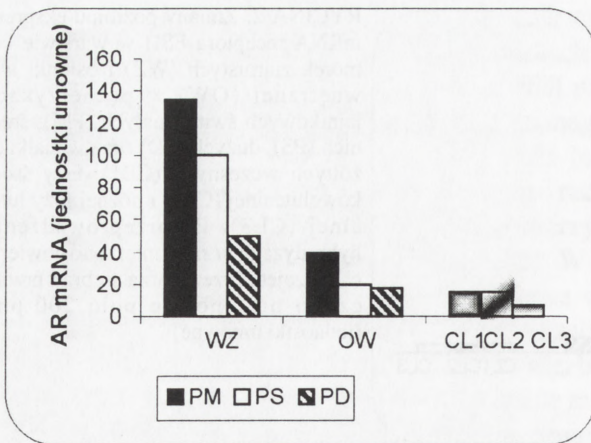
Budowa i funkcje receptorów steroidowych zostały przedstawione w artykułach przeglądowych [5, 75, 92]. Należą one wszystkie do nadrodziny receptorów hormonów steroidowych i działają jako czynniki transkrypcyjne na geny docelowe. Receptory hormonów steroidowych, w przeciwieństwie do błonowych receptorów dla gonadotropin, są receptorami jądrowymi, które są lokalizowane zarówno w jądrze komórkowym, jak i w cytoplazmie. Istnieje jednak coraz więcej doniesień dokumentujących obecność receptorów progesteronu i estrogenów w błonie komórkowej [53, 64].

Receptor androgenów

Jednym z dobrze poznanych regulatorów steroidogenezy są androgeny. Działają one trzema różnymi drogami:

- (1) wzmagają różnicowanie pęcherzyków,
- (2) hamują folikulogenezę,
- (3) są substratem dla syntezy estrogenów.

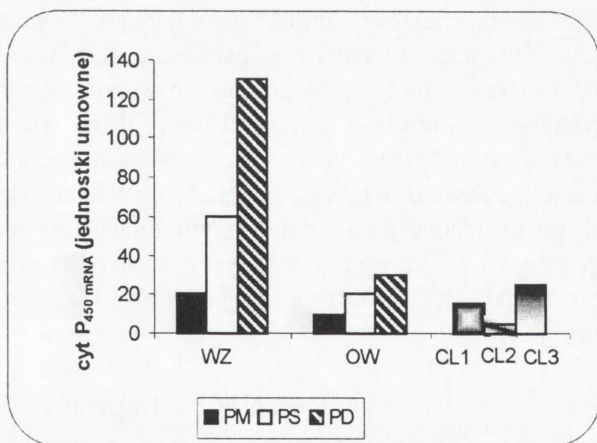
Mechanizm komórkowy, przez który działają androgeny w jajniku, jest bardzo ważny w procesach rozrodu. Obecność receptorów androgenowych (AR) została wykazana w komórkach ziarnistych pęcherzyka jajnikowego wielu gatunków, w



RYCINA 3. Zmiany poziomu ekspresji mRNA receptora androgenów (AR) w warstwie komórek ziarnistych (WZ) i osłonki wewnętrznej (OW) w pęcherzykach jajnikowych świni: małych (PM), średnich (PS), dużych (PD) oraz w ciałkach żółtych wczesnych (CL1), fazy środkowolutealnej (CL2) i późnej fazy lutealnej (CL3). Po przeprowadzeniu hybrydyzacji *in situ* zmierzono powierzchnię zajętej przez ziarna srebra i przeliczono na umowne pole 200 μm^2 (jednostki umowne)

tym człowieka [84], innych naczelnych [39, 42], świni [30], owcy [10], szczura [88], kury [100]. Androgeny działają poprzez AR modulując funkcje pęcherzyków, jako że androgeny wzmagają stymulowaną przez FSH syntezę estradiolu i progesteronu w komórkach [29, 97]. Androgeny synergistycznie z FSH wzmagają aktywność aromatazy [90], a następnie służą jako substrat dla zaktywowanego enzymu. Aktywność aromatazy wzrasta w miarę rozwoju pęcherzyka. Z drugiej jednak strony androgeny mogą również hamować różnicowanie pęcherzyka i indukować procesy atrezji [43]. Tetsuka i wsp. [89] sugerują, że działanie androgenów jest przynajmniej częściowo regulowane na poziomie receptorów, aby stworzyć warunki najbardziej korzystne dla rosnących pęcherzyków. Świńskie pęcherzyki jajnikowe różnią się nieco od innych gatunków, ponieważ komórki osłonki mają również zdolność produkowania estrogenów. Zastosowanie hybrydyzacji *in situ* pozwoliło na prześledzenie zmian w ilości mRNA receptora androgenowego i aromatazy w rozwijającym się pęcherzyku i ciałku żółtym [77]. Ilość AR mRNA malała wraz ze wzrostem pęcherzyka jajnikowego i po owulacji, w powstającym ciałku żółtym ilości te były już nieznaczne (ryc. 3). Podobnie jak w jajniku szczura [85] obniżenie ilości transkryptu jest obserwowane, kiedy pęcherzyk antralny rozpoczyna różnicowanie i w komórkach muralnych pojawia się pseudostratyfikacja (warstwowy układ komórek ziarnistych w pobliżu błony podstawnej). Obecność AR mRNA obserwowano również w komórkach osłonki wewnętrznej, które mają zdolność konwersji androgenów do estrogenów. Wzrastające ilości androgenów produkowane przez komórki osłonki służą jako substrat dla cytochromu P450 aromatazy. Tak więc, zgodnie z oczekiwaniami ekspresja tego enzymu zwiększa się wraz ze wzrostem procesu różnicowania pęcherzyka, w odpowiedzi na działanie FSH i LH (ryc. 4). Podobny schemat ekspresji AR i aromatazy obserwowano zarówno u szczura, jak i u świni. Tetsuka i Hillier sugerują, iż końcowe stadia rozwoju pęcherzykowego w jajniku szczura zależą od równowagi w ekspresji AR i aromatazy [88, 90].

RYCINA 4. Zmiany poziomu ekspresji mRNA cytochromu P450 aromatazy w warstwie komórek ziarnistych (WZ) i osłonki wewnętrznej (OW) w pęcherzykach jajnikowych świni: małych (PM), średnich (PS), dużych (PD) oraz w ciałkach żółtych wczesnych (CL1), fazy środkowolutealnej (CL2) i późnej fazy lutealnej (CL3). Po przeprowadzeniu hybrydyzacji *in situ* zmierzono powierzchnię zajęta przez ziarna srebra i przeliczono na umowne pole $200 \mu\text{m}^2$ (jednostki umowne)



Badania immunohistochemiczne pozwoliły na zlokalizowanie AR i aromatazy w komórce. Najwięcej białka AR obserwowano w małym pęcherzyku, gdzie prawie wszystkie komórki ziarniste zawierały receptor androgenów, a w trakcie wzrostu pęcherzyka malała ilość komórek zawierających to białko. Różnicowanie komórek ziarnistych rozpoczyna się od komórek muralnych i podąża w kierunku jamki (*antrum*) pęcherzyka. Dlatego w mniej zróżnicowanych komórkach antralnych jest więcej AR i tu androgeny działają głównie przez receptory własne, podczas gdy w warstwie komórek muralnych służą głównie jako substrat. W pęcherzyku przedowulacyjnym obserwowano AR głównie w części antralnej i wzgórku jajonośnym. W trakcie rozwoju pęcherzyka stwierdzono spadek ilości AR przy równoczesnym wzroście ilości aromatazy [81]. Subpopulacje komórek ziarnistych dużego pęcherzyka różnią się zdolnościami aromatyzacyjnymi i zdolnością odpowiadania na różne czynniki. Małe pęcherzyki antralne nie wykazywały niemal wcale obecności aromatazy, lecz w miarę rozwoju ilość enzymu gwałtownie wzrastała. Zrozumiałe jest, że stan taki jest związany ze zmianą roli, jaką pełnią androgeny – obserwowane jest przejście od działania androgenów poprzez swoiste receptory do etapu, kiedy to androgeny stają się jedynie substratem dla aromatazy. Conley i wsp. [14] sugerują, że synteza estrogenów wydzielanych przez przedowulacyjny pęcherzyk jest kontrolowana przez triadę enzymów, a mianowicie P450 aromatazę komórek osłonki, P450 aromatazę komórek ziarnistych oraz P450c17 w komórkach osłonki. Synteza androgenów i estrogenów w pęcherzyku świni maleje w okresie przedowulacyjnym, po wyrzucie LH. Zlokalizowanie AR mRNA w ciałku żółtym naczelnych [21], owcy [6], człowieka [60] i świni [77] stanowi potwierdzenie teorii, iż tkanki te są również docelowymi dla androgenów. P450 arom mRNA zostało zlokalizowane w komórkach lutealnych ciężarnej królicy [2] i kłaczy [1]. U świni obserwowano niewielkie ilości mRNA w regresyjnym ciałku żółtym [77]. U niektórych gatunków (człowiek czy ciężarna szczurzyca) aromataza jest aktywna w ciałku żółtym [16,

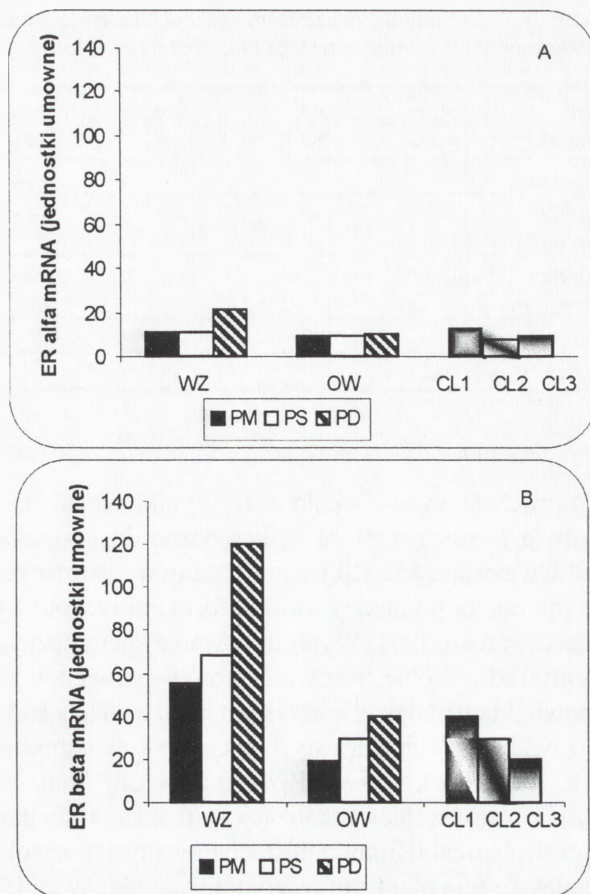
38]. U świni niektóre komórki regresyjnego ciała żółtego wykazują obecność aromatazy, co jest potwierdzone obserwacjami, że takie ciała żółte wydzielają pewne ilości estrogenów [34]. Wiadomo, że w tym okresie wzrasta nieco produkcja androgenów, a nie obserwowano wzrostu ilości AR, nasuwa się przypuszczenie, że powstające androgeny służą jako substrat dla aromatazy. Można podejrzewać, że powstający estradiol może odgrywać rolę w luteolizie podczas regresji ciała żółtego lub może działać jako czynnik stymulujący proliferację i wzrost nowej generacji pęcherzyków. Tak więc widać wyraźnie, że dynamiczne zmiany w ilości receptorów i aromatazy dotyczą nie tylko pęcherzyków, ale też ciała żółtego podczas przebiegu fazy lutealnej.

Receptory estrogenowe α i β

Występowanie receptorów estrogenowych w jajniku jest niezwykle interesujące, ponieważ estradiol jest głównym steroidem produkowanym przez przedowulacyjny pęcherzyk. Mattioli i wsp. [56] pokazali, że brak estradiolu podczas początkowych stadiów dojrzewania oocytu *in vitro* powodował niepowodzenia rozwoju. Receptor estrogenów, który jest aktywowany przez ligand czynnikiem transkrypcyjnym, może być aktywowany również przez niesteroidowe czynniki. Czynniki wzrostu, IGF-I oraz EGF są szczególnie ważne w kontrolowaniu funkcji tych receptorów. Przez wiele lat uważano, że estradiol działa poprzez jeden typ receptorów. Ostatnio wyizolowano z prostaty nowy typ receptora nazwany receptorem estrogenowym β [52]. Receptory te są produktami dwu różnych genów. ER β jest podobny do ER α i wykazuje 95% homologii w domenie wiążącej DNA i tylko 55% C-końcowej domenie wiążącej ligand [51]. Obydwa receptory różnią się zdecydowanie wielkością i homologią regionu N-końcowego [61]. Rozmieszczenie w tkankach i poziom ekspresji tych dwu receptorów są różne, ponieważ niektóre tkanki mają tylko jeden z receptorów, natomiast inne wykazują obecność obu typów [66]. Biologiczne znaczenie istnienia dwu form receptora nie jest jasne, ale może stanowić przynajmniej częściowe wytłumaczenie selektywnego działania estrogenów na różne tkanki [49].

W jajniku szczura występują oba typy ER mRNA [20], a ER β jest zlokalizowany w komórkach ziarnistych małych, rosnących i przedowulacyjnych pęcherzyków [9]. Na podstawie badań na gryzoniach wykazano obecność ER α mRNA (przy zastosowaniu hybrydyzacji *in situ* oraz *RNase protection assay*) w komórkach osłonki i interstycjalnych [74, 87]. Enmark [25] natomiast stwierdził w komórkach ziarnistych człowieka obecność jedynie ER β mRNA. W kolejnych badaniach prowadzonych na pęcherzykach jajnikowych mały obserwowano ekspresję obu typów pod wpływem stymulacji gonadotropinami [22]. Dominująca rola ER β w pęcherzykach jajnikowych potwierdzona jest obserwacją, że tylko ER β mRNA zmienia się podczas cyklu jajnikowego i jest hamowany przez przedowulacyjny wyrzut gonadotropiny [9]. Tworzenie homodimerów ER α i ER β oraz heterodimerów ER α /ER β może

RYCINA 5. Zmiany poziomu ekspresji mRNA receptora estrogenowego: A – ER α oraz B – ER β w warstwie komórek ziarnistych (WZ) i osłonki wewnętrznej (OW) w pęcherzykach jajnikowych świnej: małych (PM), średnich (PS), dużych (PD) oraz w ciałkach żółtych wczesnych (CL1), fazy środkowolutealnej (CL2) i późnej fazy lutealnej (CL3). Po przeprowadzeniu hybrydyzacji *in situ* zmierzono powierzchnię zajęłą przez ziarna srebra i przeliczono na umowne pole 200 μm^2 (jednostki umowne)



modulować funkcje estrogenów w tkance docelowej [63, 66]. Badania przy użyciu hybrydyzacji *in situ* wykazały [76], że w jajniku świnej obecne są mRNA obu form receptora. Podobnie jak u wymienionych wyżej zwierząt dominującą formą był receptor β , który występował we wszystkich typach pęcherzyków (w komórkach ziarnistych i osłonki). Natomiast receptor α udało się zlokalizować tylko w pęcherzykach przedowulacyjnych. Badania prowadzone metodą hybrydyzacji *in situ* na seryjnych skrawkach, pozwalają stwierdzić, że komórki ziarniste niektórych pęcherzyków przedowulacyjnych wykazują obecność mRNA obu form receptora, lecz zdecydowana większość pęcherzyków wykazuje ekspresję ER β . Stosunkowo niski poziom hybrydyzacji ER β obserwowano w ciałku żółtym, a ER α mRNA zostało zlokalizowane jedynie we wczesnym ciałku żółtym. Obserwowane zmiany ekspresji receptorów estrogenowych w jajniku świnej podczas fazy pęcherzykowej i lutealnej zostały przedstawione na rycinie 5 A i B. W pęcherzykach jajnikowych formą dominującą jest ER β , co jest zgodne z doniesieniami [17], że stosunek ER β do

TABELA 1. Immunohistochemiczna reakcja lokalizująca receptory estrogenowe w różnych typach komórek określona jako słaba (+), średnia (++) lub mocna (+++).

Typ komórki	Mały pęcherzyk		Średni pęcherzyk		Duży pęcherzyk	
	ER α	ER β	ER α	ER β	ER α	ER β
Ziarniste	-	+	-	+++	+	+++
Oślonka wewnętrzna	-	+	-	+++	+	+++
Oślonka zewnętrzna	-	-	-	-	-	+
Oocyt	-	+	-	+	-	+
Interstycjalne	-	+	-	+	-	

ER α mRNA wynosi około 5:1. Wyniki badań na myszach ERKO sugerują, że obydwie formy receptora są konieczne do normalnego funkcjonowania jajników [54]. Uważa się, że ER β jest niezbędny we wczesnych stadiach wzrostu pęcherzyka i że interakcja pomiędzy dwoma formami receptora jest konieczna w późniejszym okresie wzrostu [27]. Wyprodukowanie specyficznych przeciwciał, pozwalających zidentyfikować obie formy receptorów estrogenowych, umożliwiło zlokalizowanie odpowiednich białek w komórkach jajnika. Wielu badaczy wykazało obecność białka ER α w komórkach ziarnistych pęcherzyków jajnikowych owcy [93], małpy *Rhesus* [45], królika [46], a także ER β u gryzoni [28], konia [69]. Różne formy ER wykazują zróżnicowany stopień lokalizacji w tkankach jajnikowych [51]. Dokładne badania przy użyciu metod immunohistochemicznych pozwoliły na precyzyjne prześledzenie rozmieszczenia obu form receptora w jajniku świni [82]. Zaobserwowano wyraźnie, że sposób rozmieszczenia ER β różni się zasadniczo od formy ER α . Receptor estrogenowy β był obecny w komórkach ziarnistych we wszystkich typach pęcherzyków, w oocycie, a także w ciałku żółtym, chociaż ilość występującego białka zależała od wielkości pęcherzyka i stopnia regresji ciałka żółtego (patrz tabele 1 i 2). Białko ER α zlokalizowano jedynie w nielicznych komórkach ziarnistych i osłonki w pę-

TABELA 2. Immunohistochemiczna reakcja na obecność receptorów estrogenowych w ciałkach żółtych: wczesna faza lutealna (CL1), środkowa faza (CL2) oraz regresyjne ciałko (CL3) – określana jako słaba (+), średnia (++) lub mocna (+++)

Typ ciałka żółtego	ER α	ER β
CL1	+	+++
CL2	-	+
CL3	-	+

cherzyku przedowulacyjnym, a także we wczesnym ciałku żółtym. Rozmieszczenie białka nie było typowe w jądrze komórkowym, lecz obserwowano lokalizację cytoplazmatyczną. Otrzymane wyniki pozostają w zgodzie z danymi uzyskanymi nad lokalizacją receptorów estrogeno-

wych w jajniku innych gatunków. Wydaje się, że to właśnie receptor estrogenowy β pośredniczy w działaniu estrogenów podczas regulacji wzrostu i rozwoju pęcherzyka. Konieczne są dalsze badania pozwalające wyjaśnić molekularne mechanizmy działania estradiolu i roli, jaką pełnią ER w regulacji docelowych genów.

Receptor progesteronu

Modulowanie funkcji jajników przez progesteron zostało omówione przez wielu autorów [48]. Progesteron jest ważnym lokalnym regulatorem rozwoju pęcherzyka. Wpływ progesteronu może być pośredni poprzez podwzgórze i przysadkę lub bezpośredni przez receptory progesteronu (dwie formy: PR-A i PR-B) znajdujące się w jajniku, które aktywują geny docelowe. Progesteron hamuje stymulowaną przez FSH syntezę estradiolu i tworzenie receptorów LH [94], a także hamuje dojrzewanie pęcherzyków [50]. Jest również niezbędny w procesach przygotowania macicy do ciąży i umożliwia implantację zarodka. Rothchild [70] uważa, że progesteron wywiera lokalny luteotropowy wpływ przez stymulację swojej własnej produkcji i uwalniania. Receptor progesteronu (PR) został zlokalizowany w jajniku małpy [11], kury [99], człowieka [47] oraz świni [80]. Receptory progesteronu podlegają zmianom ilościowym podczas rozwoju pęcherzyka. We wczesnych fazach rozwoju pęcherzyka PR był zlokalizowany tylko w komórkach osłonki, co wskazuje na pierwotne miejsce działania progesteronu. Bezpośrednie działanie progesteronu na komórki ziarniste hamuje rozwój pęcherzyka na tym etapie [31], natomiast kiedy zostaje utworzona jamka, komórki ziarniste nie zawierają receptora progesteronu. W pęcherzykach antralnych małych i średnich receptor ten jest obecny jedynie w komórkach osłonki. W pęcherzyku przedowulacyjnym po wyrzucie LH obserwowano receptor zarówno w komórkach ziarnistych, jak i osłonki, ponieważ LH stymuluje ekspresję PR w komórkach ziarnistych. Zjawisko to było zaobserwowane w małych antralnych pęcherzykach jajnikowych świni, które po inkubacji z LH wykazywały obecność PR w komórkach ziarnistych [80]. Warto zauważyć, że również FSH reguluje ekspresję genu PR w komórkach ziarnistych [80]. Wiadomo, że pod wpływem FSH [3] świńskie komórki ziarniste małych pęcherzyków antralnych produkują zwiększoną ilość progesteronu. Możliwe jest, że stymuluje on syntezę swego własnego receptora. Zmiany ekspresji PR pod wpływem obu gonadotropin były obserwowane zarówno na poziomie mRNA, jak i białka receptorowego. Wydaje się zatem, że progesteron odgrywa istotną rolę w utrzymaniu gwałtownego wzrostu przedowulacyjnego pęcherzyka poprzez wpływ na reorganizację zewnątrzkomórkowej macierzy [99], a także w drodze sprzężenia zwrotnego reguluje syntezę estradiolu.

PR był również zlokalizowany w komórkach lutealnych wskazując tym samym, że progesteron odgrywa istotną funkcję w rozwoju i funkcjonowaniu ciała żółtego. Został on zlokalizowany w komórkach zdolnych do produkcji progesteronu (co określono aktywnością enzymu 3β HSD). Pod koniec fazy lutealnej, wraz ze spadkiem

TABELA 3. Lokalizacja receptorów hormonów steroidowych w różnych typach pęcherzyków jajnikowych i ciałkach żółtych izolowanych z jajnika świni. Immunohistochemiczna reakcja w różnych typach komórek została określona jako bardzo słaba (+/-), słaba (+), średnia (++) lub mocna (+++). WZ – warstwa ziarnista, OZ – osłonka zewnętrzna, CL1 – ciało żółte wczesne, CL2 – ciało żółte środkowolutealne, CL3 – ciało żółte regresyjne

Lokalizacja	Pęcherzyk mały		Pęcherzyk średni		Pęcherzyk duży		CL1	CL2	CL3
	WZ	OZ	WZ	OZ	WZ	OZ			
AR	+++	+	+	+/-	+	+/-	+/-	+/-	-
PR-	-	+	-	+	+++	+	+	+	+/-
ER α	-	-	-	-	+	+/-	+	-	-
ER β	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+	+

poziomu progesteronu obniża się ilość receptorów progesteronowych w ciałku żółtym. Tak więc poziom PR jest skorelowany pozytywnie z ilością progesteronu i ilość receptorów zmniejsza się w miarę regresji ciałka żółtego: od wczesnego poprzez fazę środkową do regresyjnego. U większości gatunków obecne są obie formy receptora: PR-A i PR-B. Stosunki ilościowe pomiędzy tymi dwiema formami mogą dodatkowo wpływać na odpowiedź genów docelowych na działanie progesteronu.

Regulacja receptorów hormonów steroidowych pozostaje zwykle pod kontrolą wielu hormonów – włączając w to takie hormony, jak: prolaktyna i hormony tarczycy [72]. Najbardziej znanym działaniem PRL jest jej wpływ na gruczoły mleczne [96], ale wiadomo, że działa również na wzrost i dojrzewanie pęcherzyków jajnikowych i utrzymanie funkcji ciałka żółtego u wielu gatunków zwierząt [23]. U świni, podobnie jak u szczurów, prolaktyna jest głównym czynnikiem luteotropowym [12, 67]. Receptory prolaktyny zlokalizowane w jajniku wielu zwierząt [8, 79] podlegają również dynamicznym zmianom podczas cyklu pęcherzyka, a prolaktyna może działać parakrynnie, jako że komórki ziarniste świni mają zdolność produkowania tego hormonu.

Dynamika rozmieszczenia receptorów hormonów steroidowych jest zależna od rodzaju tkanki i działających na nie hormonów (tab. 3).

PODSUMOWANIE

Zastosowanie metod immunohistochemii, hybrydyzacji *in situ* i analiza biochemiczna dostarczają danych, które analizowane łącznie pozwalają na lepsze zrozumienie procesów zachodzących w rozwijającym się pęcherzyku jajnikowym, bowiem w jego rozwoju istotną rolę odgrywa oddziaływanie między oocytem a

otaczającymi go komórkami ziarnistymi. Zmiany związane ze wzrostem oocytu, tworzeniem warstwy ziarnistej, powstawaniem jamki, różnicowaniem komórek osłonki wymagają ekspresji odpowiednich genów, ponieważ konieczna jest koordynacja procesów oogenezy i folikulogenezy. Zachodzące cyklicznie zmiany w pęcherzyku wywołują cykliczną produkcję hormonów (estradiolu i progesteronu) oraz kluczowych białek (np.inhibina). Dlatego też regulacja ekspresji tych czynników jest niezwykle ważna w utrzymaniu zdolności rozrodczych samicy.

LITERATURA

- [1] ALBRECHT BA, MACLEOD JN, DAELS PF. Differential transcription of steroidogenic enzymes in the equine primary *corpus luteum* during diestrus and early pregnancy. *Biol Reprod* 1997; **56**: 821–829.
- [2] ARIOUA RK, FERAL C, BENHAIM A, DELARUE B, LEYMARIE P. Luteotropic factor in hyperstimulated pseudopregnant rabbit: Evidence for aromatase activity in luteal tissue and luteal cells. *J Endocrinol* 1997; **154**: 249–257.
- [3] BAE I, CHANNING CP. Effect of FSH and hCG on progesterone secretion by cultured oocyte-cumulus complexes and granulosa cells from porcine antral follicles: influence of follicular development. *Gamete Res* 1981; **4**: 473–483.
- [4] BAO B, KUMAR N, KARP RM, GARVERICK A, SUNDARAM K. Estrogen receptor- β expression in relation to the expression of luteinizing hormone receptor and cytochrome P450 enzymes in rat ovarian follicles. *Biol Reprod* 2000; **63**: 1747–1755.
- [5] BILIŃSKA B, SCHMALZ-FRĄCZEK B. Receptory androgenowe w gonadzie męskiej. *Post Biol Kom* 1999; **26**: 181–188.
- [6] BRAMLEY TA, MENZIES GS. Particulate binding sites for steroid hormones in subcellular fractions of the ovine *corpus luteum*: properties and hormone specificity. *Mol Cell Endocrinol* 1994; **103**: 39–49.
- [7] BRANKIN V, WEBB R, HUNTER MG. Factor(s) secreted by the porcine oocyte modulate granulosa cell growth and steroidogenesis. *J Reprod Fert Abstract Series* 1999; **23**: 66.
- [8] BROWN-BORG HM, ZHANG FP, HUHTANIEMI I, BARTKE A. Developmental aspects of prolactin receptor gene expression in fetal and neonatal life. *Eur J Endocrinol* 1996; **134**: 751–757.
- [9] BYERS M, KUIPER GGJM, GUSTAFSSON JA, PARK-SARGE OK. Estrogen receptor- β mRNA expression in rat ovary: down regulation by gonadotropins. *Mol Endocrinol* 1997; **11**: 172–182.
- [10] CAMPO SM, CARSON RS, FINDLAY JK. Distribution of specific androgen binding sites within the ovine ovarian follicles. *Mol Cell Endocrinol* 1985; **39**: 255–265.
- [11] CHANDRASEKHER YA, MELNER MH, NAGALLA SR, STOUFFER RL. Progesterone receptor, but not estradiol receptor, messenger ribonucleic acid is expressed in luteinizing granulosa cells and *corpus luteum* in *Rhesus* monkeys. *Endocrinology* 1994; **135**: 307–314.
- [12] CIERESZKOR, DUSZA L. Exogenous prolactin elevates plasma progesterone concentrations and reduces androgen concentrations during early luteal phase of the porcine estrous cycle. *Animal Reprod Sci* 1993; **31**: 141–154.
- [13] CONLEY A, HINSHELWOOD M. Mammalian aromatases. *Reproduction* 2001; **121**: 685–695.

- [14] CONLEY AJ, KAMINSKI MA, DUBOWSKI S.A., JABLONKA-SHARIFF A, REDMER DA, REYNOLDS LP. Immunohistochemical localization of 3β -hydroxysteroid dehydrogenase and P450 17α -hydroxylase during follicular and luteal development in pigs, sheep and cattle. *Biol Reprod* 1995; **52**: 1081–1094.
- [15] COSKUN S, UZUMCU M, LIN Y, FRIEDMAN CI, ALAK BM. Regulation of granulosa cell steroidogenesis by the porcine oocyte and preliminary characterization of oocyte-produced factor(s). *Rev Reprod* 1995; **53**: 670–675.
- [16] COUSE JF, KORACH KS. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will it lead us? *Endocrine Rev* 1999; **20**: 358–417.
- [17] COUSE JF, LIZEY J, GRANDIEN K, GSTAFSSON JA, KORACH KS. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha ($ER\alpha$) and estrogen receptor-beta ($ER\beta$) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER alpha-knockout mouse. *Endocrinology* 1997; **138**: 4613–4621.
- [18] DONG J, ALBERTINI DF, NISHIMORI K, KUMAR TR, LU N, MATZUK MM. Growth differentiation factor 9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 1996; **383**: 531–535.
- [19] DOODY KJ, LORENCE MC, MASON JI, SIMPSON ER. Expression of messenger ribonucleic acid species encoding steroidogenic enzymes in human follicles and *corpora lutea* throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metabol* 1990; **70**: 1041–1045.
- [20] DRUMMOND AE, BAILLIE AJ, FINDLAY JK. Ovarian estrogen receptor α and β expression: impact of development and estrogen. *Mol Cell Endocrinol* 1999; **149**: 153–161.
- [21] DUFFY DM, ABDELGAIR SE, STOTT KR, RESKO JA, STOUFFER RL, ZELINSKI-WOTEN MB. Androgen receptor mRNA expression in the rhesus monkey ovary. *Endocrine* 1999; **11**: 23–30.
- [22] DUFFY DM, CHAFFIN CL, STOUFFER RL. Expression of estrogen receptor alpha and beta in the rhesus monkey *corpus luteum* during the menstrual cycle: regulation by luteinizing hormone and progesterone. *Endocrinology* 2000; **141**: 1711–1717.
- [23] DUSZAL, TILTON JE. Role of prolactin in the regulation of ovarian function in pigs. *J Reprod Fert* 1990; **Suppl 40**: 33–45.
- [24] ELVIN JA, MATZUK MM. Mouse models of ovarian failure. *Rev Reprod* 1998; **3**: 183–195.
- [25] ENMARK E, PELTO-HUIKKO M, GRANDIEN K, LAGERCRANTZ S, LAGERCRANTZ J, FRIED G, NORDENSKJOLD M, GUSTAFSSON JA. Human estrogen receptor β -gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metabol* 1997; **82**: 4258–4265.
- [26] ERICKSON GF. Defining apoptosis: Players and systems. *J Soc Gynecol Invest* 1997; **4**: 219–228.
- [27] FINDLAY JK, DRUMMOND AE, BRITT KL, DYSON M, WREFORD NG, ROBERTSON DM, GROOME NP, JONES MEE, SIMPSON ER. The roles of activins, inhibins and estrogen in early committed follicles. *Mol Cell Endocrinol* 2000; **163**: 81–87.
- [28] FITZPATRICK SL, FUNKHOUSER JM, SINDONIDM, STEVIS PE, DEECKER DC, BAPAT AR, MERCHENTHALER I, FRAIL DE. Expression of estrogen receptor- β protein in rodent ovary. *Endocrinology* 1999; **140**: 2581–2591.
- [29] FITZPATRICK SL, RICHARDS JS. Regulation of cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid and activity of steroids and gonadotropin in rat granulosa cells. *Endocrinology* 1991; **129**: 1452–1462.
- [30] GARRETT WM, GUTHRIE HD. Expression of androgen receptor and steroidogenic enzyme in relation to follicular growth and atresia following ovulation in pigs. *Biol Reprod* 1996; **55**: 949–955.
- [31] GOODMAN AL, HODGEN GD. Antifolliculogenic action of progesterone despite hypersecretion of FSH in monkey. *Am J Physiol* 1982; **243**: E387–390.

- [32] GOUGEON A. Rate of follicular growth in the human ovary. [w] Rolland R, van Hall EV, Hillier SG, McNatty KP, Schoemaker J [ed] Follicular maturation and ovulation. Excerpta Medica, Amsterdam, 1982: 155–163.
- [33] GOUGEON A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 1996; **17**: 121–155.
- [34] GREGORASZCZUK E. Interrelations between steroid hormone secretion and morphological changes of porcine *corpora lutea* at various periods of luteal phase. *Endocrine Reg* 1992; **26**: 189–194.
- [35] GRENWALD G, ROY SY. Follicle development and its control. [w] Knobil E, Neill J [wyd] The Physiology of Reproduction. Raven Press, New York, 1994: 629–724.
- [36] HALPIN DM, JONES A, FINK G, CHARLTON HM. Postnatal ovarian follicle development in hypogonadal (hpg) and normal mice and associated changes in the hypothalamic-pituitary ovarian axis. *J Reprod Fertil* 1986; **77**: 287–296.
- [37] HERLANDS RL, SCHULTZ RM. Regulation of mouse oocyte growth: probable nutritional role for intercellular communication between follicle cells and oocytes in oocyte growth. *J Exp Zool* 1984; **229**: 317–325.
- [38] HICKEY GJ, CHEN S.A., BESMAN MJ, SHIVELY JE, HALL PF, GADDY-KURTEN D, RICHARDS JS. Hormonal regulation, tissue distribution, and content of aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid and enzyme in rat ovarian follicles and *corpora lutea*: relationship to estradiol biosynthesis. *Endocrinology* 1988; **122**: 1426–1436.
- [39] HILD PETITO S, WEST NB, BRENNER RM, STOUFFER RL. Localization of androgen receptor in the follicle and *corpus luteum* of primate ovary during the menstrual cycle. *Biol Reprod* 1991; **44**: 561–568.
- [40] HILD-PETITO S, STOUFFER RL, BRENNER RM. Immunocytochemical localization of estradiol and progesterone receptors in the monkey ovary throughout the menstrual cycle. *Endocrinology* 1988; **123**: 2896–2905.
- [41] HILLIER RS. Cellular basis of follicular endocrine function. [w] Hillier SG [wyd] Ovarian Endocrinology. Blackwell, London, 1991: 73–106.
- [42] HILLIER SG, TETSUKA M. Down regulation of androgen receptor in primate preovulatory follicle. *J Endocrinol Suppl* 1996; **148**: 36.
- [43] HSUEH AJ, BILLIG H, TSAFRIRI A. Ovarian follicle atresia: A hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev* 1994; **15**: 707–724.
- [44] HUNTER M. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Rev Reprod* 2000; **5**: 122–130.
- [45] HUTZ RJ, WAGNER N, KRAUSE P, FISHER C, SYED N, DIERSCHKE DJ, MONNIAUX D, TOMANEK M. Localization of estrogen receptor in rhesus monkey ovary. *Am J Primatol* 1993; **31**: 299–309.
- [46] IWAI T, FUJII S, NANBU Y, NONOGAKI H, KONISHI I, MORI T, OKAMURA H. Effect of human chorionic gonadotropin on the expression of progesterone receptors and estrogen receptors in rabbit ovarian granulosa cells and the uterus. *Endocrinology* 1991; **129**: 1840–1848.
- [47] IWAI T, NABU J, IWAI M, TAI S, FUJII S, MORI T. Immunohistochemical localization of estrogen receptors and progesterone receptors in the human ovary throughout the menstrual cycle. *Virchow Arch* 1990; **417**: 369–375.
- [48] JACOBS BR, SUCHOCKI S, SMITH RG. Evidence for a human ovarian progesterone receptor. *Am J Obstet Gynecol* 1980; **138**: 332–326.
- [49] KATZENELLEBOGEN JA, O'MALLEY BW, KATZENELLEBOGEN BS. Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: interactions with multiple effector sites as a basis for the cell- and promoter-specific actions of these hormones. *Mol Endocrinol* 1996; **10**: 119–131.
- [50] KIM I, GREENWALD GS. Stimulatory and inhibitory effects progesterone on follicular development in the hypophysectomized FSH/LH-treated hamster. *Biol Reprod* 1987; **36**: 270–276.

- [51] KUIPER GG, CARLSON B, GRANDIEN K, ENMARK E, HAGBLAD J, NILSSON S, GUSTAFSSON JA. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology* 1997; **138**: 863–870.
- [52] KUIPER GG, ENMARK E, PELTO-HUIKKO M, NILSSON S, GUSTAFSSON JA. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 5925–5930.
- [53] LIU Z, PATINOR. High-affinity binding of progesterone to the plasma membrane of *Xenopus* oocytes: characteristics of binding and hormonal and developmental control. *Biol Reprod* 1993; **49**: 980–988.
- [54] LUBAHN DB, MOYER JS, GOLDING TS, COUSE JF, KORACH KS, SMITHIES O. Alteration of reproductive function but not preantral sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 11162–11166.
- [55] MASON H, FRANKS S. Local control of ovarian steroidogenesis. *Bailliere's Clin Obstet Gynaecol* 1997; **11**: 261–280.
- [56] MATTIOLI M, GALEATI G, BACCI ML, SEREN E. Follicular factors influence oocyte fertilizability by modulating the intercellular co-operation between cumulus cells and oocytes. *Gamete Res* 1988; **21**: 223–232.
- [57] MCGEE EA, HSUEH AJW. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 2000; **21**: 200–214.
- [58] MEDURI G, VU HAI-LUU THI MT, JOLIVET A, MILGROM E. New functional zonation in the ovary as shown by immunohistochemistry of luteinizing hormone receptor. *Endocrinology* 1992; **131**: 366–373.
- [59] MINEGISHI T, TANO M, IGARASHI M, ROKUKAWA S, ABE Y, IBUKI Y, MIYAMOTO K. Expression of follicle-stimulating hormone receptor in human ovary. *Eur J Clin Invest* 1997; **27**: 469–474.
- [60] MISAO R, NAKANISHI Y, FUJIMOTO J, TAMAYA T. Steroid receptor mRNA levels in human *corpus luteum*. *Horm Res* 1998; **50**: 155–159.
- [61] MOSSELMAN S, POLMAN J, DIJKEMA R. ER: Identification and characterisation of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 1996; **392**: 49–53.
- [62] MOTLIK J, FULKA J. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenol* 1986; **25**: 87–96.
- [63] OGAWA S, INOUE S, WATANABE T, HIROI H, ORIMO A, HOSOI T, OUCHI Y, MURAMATSU M. The complete primary structure of human estrogen receptor β (hER β) and its heterodimerization with ER α *in vivo* and *in vitro*. *BBRC* 1998; **243**: 122–126.
- [64] PAPPAS TC, GAMETCHU B, YANARIELLO-BROWN J, COLLINS TJ, WATSON CS. Membrane estrogen receptor in GH3/B6 cells are associated with rapid estrogen-induced release of prolactin. *Endocrine* 1994; **2**: 813–822.
- [65] PETERSON AJ, LINDAU-SHEPARD B, BRUMBERG HA, DIAS JA. Human follicle stimulating hormone receptor variants lacking transmembrane domains display altered post-translational conformations. *Mol Cell Endocrinol* 2000; **160**: 203–217.
- [66] PETERSON K, GRANDIEN K, KUIPER GGJM, GUSTAFSSON JA. Mouse estrogen receptor β forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor α . *Mol Endocrinol* 1997; **11**: 1486–1489.
- [67] PRZALA J, GRAZUL A, WIĘSAK T, MUSZYŃSKA A, DUSZA L. Steroid hormones and prolactin in porcine follicular fluid in estrous cycle and early pregnancy. *Exp Clin Endocrinol* 1984; **85**: 101–110.
- [68] RICHARDS JS, FITZPATRIC SL, CLEMENS JW, MORRIS JK, ALLISTON T, SIROIS J. Ovarian cell differentiation: a cascade of multiple hormones, cellular signals, and regulated genes. *Recent Prog Horm Res* 1995; **50**: 223–254.

- [69] ROSENFELD CS, YUAN X, MANIKKAM M, CALDER MD, GARVERICK HA, LUBAHN DB. Cloning, sequencing, and localization of bovine estrogen receptor- β within ovarian follicle. *Biol Reprod* 1999; **60**: 691–697.
- [70] ROTHCHILD I. The regulation of the mammalian *corpus luteum*. *Recent Prog Horm Res* 1981; **37**: 183–298.
- [71] SASANO H, HARADA N. Intratumoral aromatase in human breast, endometrial and ovarian malignancies. *Endocr Rev* 1998; **19**: 593–607.
- [72] SHAFIE S, BROOKS S.C. Effect of prolactin on growth and the estrogen receptor level of human breast cancer cells (MCF-7). *Cancer Res* 1997; **37**: 792–799.
- [73] SHUGHRUE PJ, KOMM BS, MERCHENTHALER I. The distribution of estrogen receptor- β mRNA in the rat hypothalamus. *Steroids* 1996; **61**: 678–681.
- [74] SHUGHRUE PJ, LANE MV, SERIMOPJ, MERCHENTHALER I. Comparative distribution of estrogen receptor- α (ER α) and β (ER β) mRNA in the rat pituitary, gonad, and reproductive tract. *Steroids* 1998; **63**: 498–504.
- [75] SŁOMCZYŃSKA M. Receptory hormonów steroidowych – budowa i funkcja. *Post Biol Kom* 1995; **22**: 3–21
- [76] SŁOMCZYŃSKA M, DUDA M, GALAS J. Estrogen receptor and expression in the porcine ovary. *Folia Histochem Cytobiol* 2001; **39**: 137–138.
- [77] SŁOMCZYŃSKA M, DUDA M, ŚLĘZAK K. The expression of androgen receptor, cytochrome P450 aromatase and FSH receptor mRNA in the porcine ovary. *Folia Histochem Cytobiol* 2001; **39**: 9–13.
- [78] SŁOMCZYŃSKA M, DUDA M, SZOŁTYŚ M. Localization of FSH receptor in the porcine ovary. *BASE, Special issue* 2001; **5**: 53.
- [79] SŁOMCZYŃSKA M, GREGORASZCZUK E, KOCHMAN K, STOKŁOSOWA S. Prolactin binding analysis and immunohistochemical localization of prolactin receptor in porcine ovarian cells. *Endocrine J* 2001; **48**: 71–80.
- [80] SŁOMCZYŃSKA M, KROK M, PIERŚCIŃSKI A. Localization of the progesterone receptor in the porcine ovary. *Acta Histochem* 2000; **102**: 183–191.
- [81] SŁOMCZYŃSKA M, TABAROWSKI Z. Localization of androgen receptor and cytochrome P450 aromatase in the follicle and *corpus luteum* of the porcine ovary. *Anim Reprod Sci* 2001; **65**: 127–134.
- [82] SŁOMCZYŃSKA M, WOŹNIAK J. Differential distribution of estrogen receptor- β and estrogen receptor- α in the porcine ovary. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001; **109**: 238–244.
- [83] STEELE GS, LEUNG PCK. Signal transduction mechanism in ovarian cells. [w] Adashi EY, Leung PCK [wyd] *The Ovary: Comprehensive Endocrinology* 1993; 113–127.
- [84] SUZUKI T, SASANO H, KIMURA N, TAMURA M, FUKAYA T, YAIMA A, NAGURA H. Immunohistochemical distribution of progesterone, androgen and estrogen receptors in the human ovary during the menstrual cycle relationship to expression of steroidogenic enzymes. *Hum Reprod* 1993; **9**: 1589–1595
- [85] SZOŁTYŚ M, SŁOMCZYŃSKA M. Changes in distribution of androgen receptor during maturation of rat ovarian follicles. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2000; **108**: 228–234.
- [86] SZOŁTYŚ M. Hormonalna regulacja procesu rekrutacji, selekcji i dominacji w rozwoju pęcherzyków jajnikowych ssaków. Wydawnictwo Drukrol, 2000.
- [87] TETSUKA M, MILNE M, HILLIER SG. Expression of oestrogen receptor isoforms in relation to enzymes of oestrogen synthesis in rat ovary. *Mol Cell Endocrinol* 1998; **141**: 29–35.
- [88] TETSUKA M, HILLIER SG. Androgen receptor gene expression in rat granulosa cells the role of follicle stimulating hormone and steroid hormones. *Endocrinology* 1966; **137**: 4392–4397.
- [89] TETSUKA M, WHITELAW PF, BREMNER WJ, MILLAR MR, SMYTH CD, HILLIER SG. Developmental regulation of androgen receptor in rat ovary. *J Endocrinol* 1995; **145**: 535–543.

- [90] TETSUKA M., HILLIER SG. Differential regulation of aromatase and androgen receptor in granulosa cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1996; **61**: 233–239.
- [91] TILLY JL, KOWALSKI KI, SCHOMBERG DW, HSUEH AJW. Apoptosis in atretic ovarian follicles is associated with selective decreases in messenger ribonucleic acid transcripts for gonadotropin receptors and cytochrome P450 aromatase. *Endocrinology* 1992; **131**: 1670–16776.
- [92] TKACZYK M, KALITA K. Receptor estrogenowy β – budowa, regulacja i funkcja. *Post Biochemii* 2001; **47**: 72–79.
- [93] TOMANEK M, PISSELET C, MONGET P, MADIGOUE T, THIEULANT ML, MONNIAUX D. Estrogen receptor protein and mRNA expression in the ovary of sheep. *Mol Reprod Dev* 1997; **48**: 53–62.
- [94] TONETTA SA, DEVINNA RS, DIZEREGA GS. Modulation of porcine thecal cell aromatase activity by humane chorionic gonadotropin, progesterone, estradiol-17 β , and dihydrotestosterone. *Biol Reprod* 1986; **35**: 785–791.
- [95] WANDJI SA, SRSEN V, VOSS AK, EPPIG JJ, FORTUNE JE. Initiation *in vitro* of growth of bovine primordial follicles. *Biol Reprod* 1996; **55**: 942–948.
- [96] WATSON CJ, BURDEN TG. Prolactin signal transduction mechanism in the mammary gland: the role of Jak/Stat pathway. *Rev Reprod* 1996; **1**: 1–5.
- [97] WEIL S, VENDOLA K, ZHOU J, BONDY CA. Androgen and follicle stimulating hormone interactions in primate ovarian follicle development. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; **84**: 2951–2956.
- [98] WHITE PC. Genetic diseases of steroid metabolism. *Vit Horm* 1994; **49**: 131–195.
- [99] YOSHIMURA Y, BAHR JM. Localization of progesterone receptors in pre- and postovulatory follicles of the domestic hen. *Endocrinology* 1991; **128**: 323–330.
- [100] YOSHIMURA Y, CHANG C, OKAMOTO T, TAMURA T. Immunolocalization of androgen receptor in the small, preovulatory, and postovulatory follicles of laying hens. *Gen Comp Endocrinol* 1993; **91**: 81–89.
- [101] YUAN W, LUCY MC, SMITH MF. Messenger ribonucleic acid for insulin-like growth factor-1 and 11, insulin-like growth factor binding protein-2, gonadotropin receptors and steroidogenic enzymes in porcine follicles. *Biol Reprod* 1996; **55**: 1045–1054.
- [102] ZELEZNIK AJ, HILLIER SG. The role of gonadotrophins in the selection of the preovulatory follicle. *Clin Obstet Gynaecol* 1984; **27**: 927–940.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 10.08.2001 r.

Przyjęto: 22.10.2001 r.

Adres autora: Instytut Zoologii UJ
30-060 Kraków, ul. Ingardena 6
e-mail: slom@zuk.iz.uj.edu.pl

METABOLIZM SACHAROZY U ROŚLIN ORAZ JEGO REGULACJA W WARUNKACH STRESÓW ŚRODOWISKOWYCH

SUCROSE METABOLISM IN PLANTS AND ITS REGULATION UNDER ENVIRONMENTAL STRESSES

Anna SZADEL, Gabriela LORENC-PLUCIŃSKA

Instytut Dendrologii PAN, Kórnik

Streszczenie: W artykule omówiono współzależność pomiędzy donorami produktów fotosyntezy i ich akceptorami ze szczególnym uwzględnieniem metabolizmu sacharozy. Scharakteryzowano enzymy degradujące sacharozę (syntazę sacharozy i inwertazy) oraz zawartość regulatora metabolicznego – fruktozo-2,6-bisfosforanu i aktywność fosfofruktokinazy zależnej od PP_i . Przedyskutowano również wpływ czynników środowiskowych (temperatury, zasolenia, suszy, zmian zawartości składników mineralnych, anaerobiozy, zanieczyszczeń środowiska) na metabolizm sacharozy.
(*Postępy Biologii Komórki* 2002; 29: 47–59)

Słowa kluczowe: alokacja węglowodanów, metabolizm sacharozy, czynniki stresowe.

Summary: This paper discusses the mechanism that regulate sucrose metabolism and source-sink relations and describes possible functions for sucrose-cleaving enzymes. The influence of abiotic stress factors such as low temperature, nutrient deficit, drought, salinity, anaerobiosis and environmental pollution on sucrose metabolism are also explored.

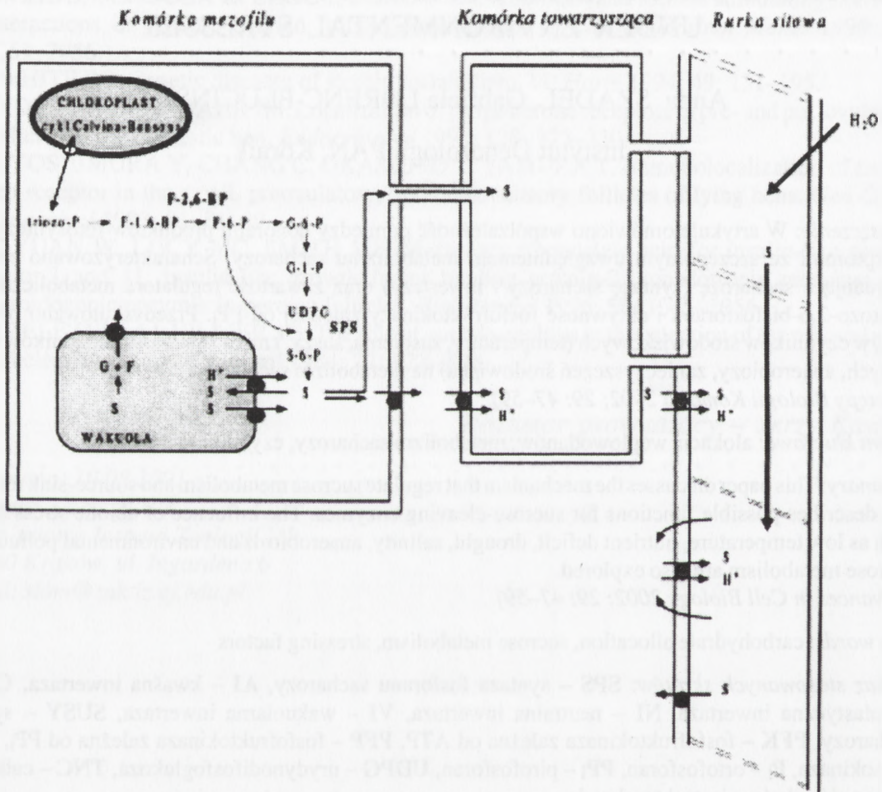
(*Advances in Cell Biology* 2002; 29: 47–59)

Key words: carbohydrate allocation, sucrose metabolism, stressing factors

Wykaz stosowanych skrótów: SPS – syntaza fosforanu sacharozy, AI – kwaśna inwertaza, CWI – apoplastyczna inwertaza, NI – neutralna inwertaza, VI – wakuolarna inwertaza, SUSY – syntaza sacharozy, PFK – fosfofruktokinaza zależna od ATP, PFP – fosfofruktokinaza zależna od PP_i , HK – heksokinaza, P_i – ortofosforan, PP_i – pirofosforan, UDPG – urydynodifosfoglukoz, TNC – całkowita zawartość cukrów niestrukturalnych

1. WSTĘP

Dystrybucja produktów fotosyntezy pomiędzy tkankami jest podstawowym procesem zachodzącym u organizmów wielokomórkowych. Kończym produktem fotosyntezy i formą transportową węgla u większości roślin wyższych jest sacharoza (ryc. 1). Jej synteza ma miejsce przede wszystkim w liściach-donorach (*sources*), skąd transportowana jest do tkanek akceptorowych (*sinks*) [10, 48]. Transport sacharozy może odbywać się drogą symplastyczną poprzez plazmodesmy lub apoplastyczną z udziałem nośników białkowych (transporterów) sacharozy [20, 57]. Zdolność akceptorów do importu substancji pokarmowych (*sink capacity*) zależy między innymi od aktywności enzymów degradujących sacharozę [35, 38, 56]. Podstawą przejścia akceptor – donor są zmiany aparatu enzymatycznego liścia, polegające na wzroście aktywności enzymów odpowiedzialnych za syntezę sacharozy i obniżeniu potencjału sacharolitycznego [10, 35]. Obniżone zapotrzebowanie akcep-



RYCINA 1. Synteza i transport sacharozy wewnątrz komórki donora oraz załadunek sacharozy do floemu (wg [20 i 28], zmienione): F – fruktoza, F-6-P – fruktozo-6-fosforan, F-1,6-BP – fruktozo-1,6-bisfosforan, F-2,6-BP – fruktozo-2,6-bisfosforan, G – glukoza, G-1-P – glukozo-1-fosforan, G-6-P – glukozo-6-fosforan, S – sacharoza, S-6-P – sacharozo-6-fosforan, trioza-P – triozaofosforany, UDPG – urydynodifosfoglukoza, SPS – syntaza fosforanu sacharozy

tora na fotosymlaty może prowadzić do obniżenia intensywności fotosyntezy [14, 22, 35, 38].

Alokacja asymilatów kontrolowana jest przez aktywność nośników białkowych sacharozy i heksoz. Pierwszy transporter sacharozy wyizolowano ze szpinaku (*SosUTI*) [28]. Dotychczas sklonowano transportery sacharozy m.in. z: ziemniaka, pomidora, *Arabidopsis* i ryżu [28, 52]. Ekspresja genów *SUT* zachodzi w błonach rurek sitowych i komórek towarzyszących floemu. Podlega ona regulacji na poziomie mRNA i białka poprzez hormony, rytmikę dobową i poziom cukrów [25, 34]. Transportery heksoz aktywne są głównie w tkankach akceptorowych [20, 24].

Mechanizmem przystosowującym roślinę do zmiennych warunków środowiska jest regulacja ekspresji genów poprzez cukry. Czynnikiem sygnałnym wpływającym na metabolizm komórkowy może być sacharoza, glukoza, fruktoza lub fosforylacja heksoz przy udziale heksokinazy (HK) [6, 15, 19, 21, 38, 41, 43]. Sacharoza kontroluje ekspresję genu zamka leucynowego u *Arabidopsis*, czynnika transkrypcyjnego *ATB2* i promotora *rolC Agrobacterium* [28]. Geny, których ekspresja uzależniona jest od poziomu cukrów mogą wpływać na dystrybucję fotosymlatów pomiędzy tkankami i organami. W liściach-donorach asymilatów niski poziom cukrów indukuje geny związane z fotosyntezą, remobilizacją i eksportem fotosymlatów [15, 21, 24]. W tkankach akceptorów wysoki poziom cukrów indukuje geny związane z magazynowaniem asymilatów lub ich wykorzystaniem na potrzeby wzrostu i rozwoju [10, 35, 38]. Geny metabolizmu sacharozy pełnią funkcję w produkcji potencjalnych czynników sygnałnych, jak również same podlegają modulacji przez poziom cukrów [21, 24, 25].

2. KLUCZOWE ENZYMY METABOLIZMU SACHAROZY

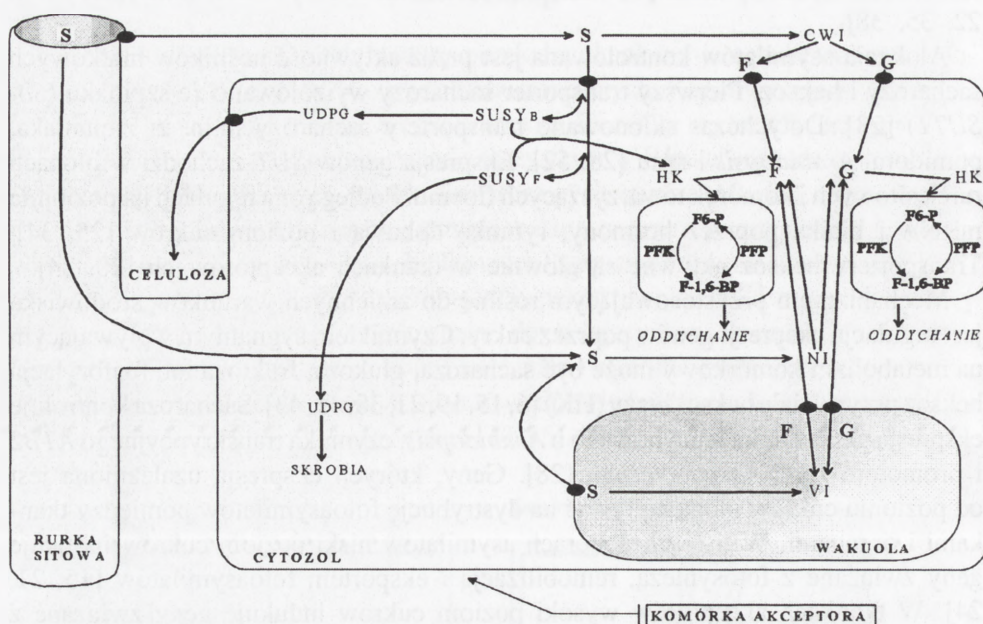
Enzymem biorącym udział w syntezie sacharozy są syntaza sacharozy (UDP-glukoza:D-fruktozo-2- α -D-glukozylo transferaza; EC 2.4.1.13; SUSY) oraz syntaza fosforanu sacharozy (UDP-glukoza:D-fruktozo-6-fosforo-2-glukozylotransferaza; EC 2.4.1.14; SPS) [61]. Syntaza fosforanu sacharozy katalizuje tworzenie sacharozo-6-fosforanu (Suc-6-P) z UDP-glukozy (UDPG) i fruktozo-6-fosforanu (Fru-6-P) (ryc. 1). Powstały Suc-6-P hydrolizowany jest przez sacharozo-6-fosfofosfatazę (SPPazę). Pozorna stała równowagi (K_{app}) dla SPS zależy od stężenia jonów magnezowych i pH [61]. Aktywność SPS może być regulowana przez modyfikację allosteryczną, gdzie Glu-6-P jest aktywatorem, a P_i – inhibitorem. SPS podlega również odwracalnej fosforylacji kowalencyjnej w pozycjach:

Ser¹⁵⁸, która jest inaktywowana w ciemności przez kinazę PK_{III},

Ser⁴²⁴ aktywowaną podczas stresu osmotycznego przez kinazę PK_{IV} oraz

Ser²²⁹, miejsce fosforylacji przez kinazę PK_I i przyłączania białek 14-3-3s.

W organach akceptorowych sacharoza może być wykorzystana po uprzedniej hydrolizie do heksoz (ryc. 2). Reakcję tę katalizują inwertaza (β -D-fruktofuranozydo-



RYCINA 2. Transport i metabolizm cukrów wewnątrz komórki akceptora (wg [26] zmienione): S – sacharoza, CWI – apoplastyczna inwertaza, F – fruktoza, G – glukoza, SUSY B – syntaza sacharozy, forma zasocjowana z plazmalemą, SUSY F – syntaza sacharozy, forma rozpuszczalna w cytozolu, UDPG – urydynodifosfoglukoza, HK – heksokinaza, F-6-P – fruktozo-6-fosforan, F-1,6-BP – fruktozo-1,6-bisfosforan, PFK – fosfofruktokinaza zależna od ATP, PFP – fosfofruktokinaza zależna od PPi, NI – neutralna inwertaza, VI – wakuolarna inwertaza

fruktohydrolaza, EC 3.2.1.26) oraz syntaza sacharozy (SUSY) [13, 47, 49]. Hydroliza sacharozy przez inwertazę do glukozy i fruktozy powoduje utratę energii wiązania glikozydowego. Reakcja katalizowana przez SUSY prowadzi do powstania wysoko energetycznego związku, UDP-glukozy (UDPG) [6, 48]. Syntaza sacharozy katalizuje zarówno syntezę, jak i degradację sacharozy. Przyjmuje się jednak, że jej podstawową funkcją jest przekształcenie sacharozy do fruktozy i UDPG [38, 48].

2.1. Charakterystyka inwertaz

Komórki roślinne mają kwaśne inwertazy (AI): wakuolarną (VI) i apoplastyczną (ściany komórkowej, CWI) oraz neutralne/alkaliczne (NI) zlokalizowane w cytozolu [13, 26, 55, 62]. Większość gatunków roślin zawiera co najmniej dwie izoformy VI, które akumulują się jako białko rozpuszczalne w kompartmentcie kwaśnym. Stwierdzono także istnienie kilku izoform CWI jonowo związanych ze ścianą komórkową. Aktywność kwaśnych inwertaz (AI) charakterystyczna jest dla młodych,

rozwijających się liści, będących akceptorami asymilatów [47]. Jej wysoką aktywność stwierdzano niekiedy także w dojrzałych organach asymilacyjnych [1, 9]. Inwertaza cytoplazmatyczna występuje co najmniej w dwóch izoformach, hydrolizujących sacharozę w pH neutralnym lub lekko alkalicznym [29, 47, 49, 55].

Fizjologiczne funkcje pełnione przez inwertazy zależą od organu, tkanki lub komórki, w której ulegają ekspresji [26, 47, 55]. Inwertazy pośrednio biorą udział w rozdziale sacharozy pomiędzy donory i akceptory [38]. W młodych organach akceptorowych CWI może zwiększać import węglowodanów utrzymując gradient koncentracji sacharozy pomiędzy floemem a akceptorem [49]. W organach dojrzałych inwertazy mogą ograniczać intensywność eksportu sacharozy hydrolizując sacharozę do heksoz, co obniża jej załadunek do floemu i prowadzi do regulacji zwrotnej fotosyntezy [22].

Funkcje pełnione przez inwertazy w różnych przedziałach komórki poznano dzięki roślinom transgenicznym z ekspresją inwertazy drożdżowej [18, 23, 53]. W przypadku transgenicznego pomidora z ekspresją genu inwertazy wykluczającego ekspresję białka inwertazy następowała akumulacja sacharozy [23]. Wzrost aktywności NI w bulwie transgenicznego ziemniaka wpływał na zwiększenie przepływu węgla w kierunku glikolizy i akumulacji ufosforylowanych pośredników metabolicznych [18]. Zredukowana aktywność CWI w transgenicznej marchwi prowadziła do hamowania wzrostu korzenia i akumulacji sacharozy i skrobi w liściach [53].

Geny kodujące inwertazy tworzą rodziny genowe, których ekspresja zależna jest od organu i od stadium rozwojowego. Geny VI ulegają ekspresji głównie w młodych liściach, a CWI w liściach dojrzałych. Ekspresja genów inwertaz modulowana jest przez takie czynniki, jak: poziom cukrów, infekcja patogenów, zranienie, grawitropizm, niska temperatura, światło, kwas giberelinowy, auksyny, cytokininy, inhibitor białkowy [26, 47, 49, 55]. Poziom cukrów może wpływać w odmienny sposób na aktywność różnych izoform inwertazy wakuolarniej. W przypadku genów kodujących inwertazę wakuolarną wykazano hamowanie aktywności genu *Ivr1* i indukcję ekspresji genu *Ivr2* w obecności glukozy i sacharozy [55].

Poznano już ponad 20 sekwencji cDNA kwaśnych inwertaz pochodzących głównie z roślin dwuliściennych [47, 55, 62]. Inwertaza wakuolarna i apoplastyczna mają podobne właściwości molekularne i biochemiczne [49]. Cechą charakterystyczną sekwencji aminokwasowych kwaśnych inwertaz jest występowanie w pobliżu N-końca pentapeptydu NDPNG (motyw β F), propeptydu i peptydu sygnałnego, a w pobliżu C-końca reszty Cys i przylegających aminokwasów oraz C-końcowego wydłużenia w przypadku inwertazy wakuolarniej. Obie kwaśne inwertazy, VI i CWI, ulegają N-glikozylacji. Masa molekularna większości białek kwaśnych inwertaz kształtuje się pomiędzy 55 a 70 kDa [47]. Miejsce aktywne VI najczęściej tworzą grupy karboksylowe, histydylowe i sulfhydrylowe [47].

Inwertaza neutralna/alkaliczna (NI) zlokalizowana jest w cytozolu. Jej funkcja polega na dostarczaniu substratów do cyklu kwasów trójkarboksylowych w tkankach,

gdzie aktywność SUSY i AI jest niska [13, 61]. U marchwi zidentyfikowano inwertazę neutralną, która jest oktamerem o masie molekularnej 456 kDa oraz alkaliczną charakteryzującą się strukturą tetrameru o masie 504 kDa [29, 47]. Inwertaza neutralna wykazuje maksymalną aktywność w pH 6,8, a alkaliczna w pH 8,0. Aktywność obu enzymów hamowana jest przez produkty reakcji, przy czym fruktoza jest inhibitorem kompetycyjnym, a glukoza niekompetycyjnym. Inwertaza neutralna/alkaliczna jest polipeptydem pozbawionym wiązania N-glikozydowego [29, 55]. Inwertaza alkaliczna wykazuje aktywność specyficzną dla sacharozy [29, 47]. Inwertaza neutralna hydrolizuje również rafinozę i stachiozę, jest zatem β -fruktofuranazydazą.

2.2. Charakterystyka syntazy sacharozy

Syntaza sacharozy (SUSY) jest głównym enzymem hydrolizującym sacharozę w akceptorach [10, 35, 61]. Białko SUSY występuje w formie rozpuszczalnej w cytozolu (SUSY F) lub jest związane z błoną komórkową (SUSY B) [26]. Hydroliza sacharozy przez SUSY związana jest z procesami anabolicznymi, w których powstała UDPG jest prekursorem wielu związków: skrobi [35, 61], celulozy [8], kalozy [47]. SUSY zlokalizowana w komórkach towarzyszących floemu dostarcza energię potrzebną do załadunku i rozładunku sacharozy z apoplastu [11].

U gatunków jednoliściennych SUSY kodowana jest przez dwa geny niealleliczne, które u kukurydzy zidentyfikowane zostały jako *Sh1* (*Shrunken*=*Sus2*) oraz *Sus1* [11, 49]. Oba geny SUSY kodujące izoformy SS1 i SS2 zlokalizowane są na chromosomie 9 [48]. Ekspresja *Sh1* ograniczona jest do ziarniaka, *Sus1* ekspresjonowany jest w większości tkanek (ziarniaki, embriony, korzenie, pędy). Maksymalna ekspresja *Sh1* następuje w warunkach ograniczonej dostępności węgla; transkrypt *Sus1* jest niewykrywalny w tych warunkach [11, 20, 48]. U roślin dwuliściennych analiza genomu ziemniaka doprowadziła do identyfikacji dwóch klas genów: *Sus3* i *Sus4*, których regiony kodujące wykazują 87% homologię [48]. Geny te są funkcjonalnie analogiczne odpowiednio do genów *Sus1* i *Sus2* kukurydzy. *Sus4* ulega indukcji w warunkach wysokiego poziomu sacharozy; transkrypt *Sus3* pozostaje w tych warunkach niezmieniony [11]. Za indukcję genu *Sus4* (jak również *Sus1* kukurydzy, ryżu i *Arabidopsis*) przez sacharozę odpowiedzialny jest 18-bp konserwatywny motyw sekwencyjny zlokalizowany w pobliżu końca 5'-*SURE1* (*Suc-responsive element*) [43, 61].

Badania przeprowadzone u kukurydzy wykazały, że obie izoformy SUSY ulegają fosforylacji poprzez kinazy serynowo-treoninowe aktywowane przez Ca^{2+} lub fosfolipidy, zwłaszcza w pozycji Ser¹⁵ zlokalizowanej na N-końcu [61]. Fosforylacja zwiększa aktywność hydrolityczną SUSY oraz wpływa na dystrybucję subkomórkową enzymu [30]. Posttranslacyjna modyfikacja SUSY zachodzi również przez

odwracalną redukcję/oksydację grup tiolowych. Oksydacja zwiększa aktywność syntetyczną i obniża aktywność hydrolityczną enzymu [61].

2.3. Wpływ PP_i -zależnej fosfofruktokinazy i fruktozo-2,6-bisfosforanu

W organach importujących sacharozę stwierdzono wysoki poziom fosfofruktokinazy zależnej od PP_i (fruktozo-6-fosforo-1-transferaza; EC 2.7.1.90; PFP). Katalizuje ona, obok fosfofruktokinazy zależnej od ATP (EC 2.7.1.11; PFK), odwrotalną konwersję F-6-P do F-1,6-BP, gdzie donorem grup fosforylowych w kierunku glikolitycznym jest PP_i , a akceptorem grup fosforylowych w reakcjach glukoneogenicznych jest P_i (ryc. 2) [44]. PFP uważana jest za enzym adaptacyjny, zależny od wymagań metabolicznych tkanki. Jego aktywność utrzymuje równowagę pomiędzy pulą heksozofosforanów, triozofosforanów, P_i i PP_i w warunkach wysokiej aktywności metabolicznej. Aktywność PFP powiązana jest z hydrolizą sacharozy katalizowaną przez SUSY. Szlak degradacji sacharozy rozpoczynający się od SUSY i obejmujący również przemianę $UDP \rightarrow UTP$ korzysta z reakcji defosforylacji F-1,6-BP jako źródła PP_i [27, 44]. Produkowany PP_i wykorzystywany jest przez UDP-glukozo pirofosforylazę do przekształcenia UDPG w glukozo-1-fosforan i UTP. UTP może być wykorzystany do fosforylacji fruktozy [27]. Stosunek sumy aktywności PFP i PFK, reprezentujący maksymalny potencjał fosforylacji F-6-P, do aktywności SUSY $[(PFP+PFK)/SUSY]$ może być wskaźnikiem siły mobilizacyjnej akceptora [51].

Reakcja katalizowana przez PFP przebiega w cytozolu i jest aktywowana przez fruktozo-2,6-bisfosforan (F-2,6-BP) w kierunku glikolitycznym. Reakcja odwrotna w kierunku glukoneogenezy wykazuje niższą wrażliwość na F-2,6-BP [44]. Metabolizm sacharozy w cytoplazmie komórek roślinnych podlega zatem częściowej kontroli przez F-2,6-BP, który uważany jest za inhibitora syntezy sacharozy przez inhibicję cytoplazmatycznej fruktozo-1,6-bisfosfatazy (FBPazy) i aktywację PFP [54, 61].

3. METABOLIZM SACHAROZY W ODPOWIEDZI NA ZMIENIAJĄCE SIĘ WARUNKI ŚRODOWISKA

3.1. Niska temperatura

Tolerancja na niską temperaturę jest wynikiem działania mechanizmów krioprotekcyjnych, do których należy akumulacja cukrów rozpuszczalnych (TNC) w różnych przedziałach komórki roślinnej [36]. Z akumulacją sacharozy związana jest podwyższona aktywność SPS, co obserwowano u roślin poddanych stresowi niskiej temperatury [5, 39, 46]. Zwiększona intensywność fotosyntetyczna u odmiany

ozimej pszenicy podczas aklimatyzacji do niskiej temperatury wiązała się ze zwiększonym eksportem sacharozy do wakuoli, stymulacją biosyntezy fruktanu, wzmożoną aktywnością kwaśnej i neutralnej inwertazy oraz PFP i PFK [40]. Indukcja enzymów metabolizujących sacharozę wzmagają fosforylację heksoz, natężenie procesu glikolizy i/lub glukoneogenezy [40].

3.2. Stres osmotyczny

Zasolenie gleby oddziałuje na rośliny obniżając potencjał osmotyczny roztworu glebowego i uniemożliwiając pobieranie składników pokarmowych. Rośliny wykorzystują wówczas fotoasymilaty do zmniejszenia potencjału osmotycznego. W pomidorach poddanych stresowi zasolenia wzrasta aktywność sacharolityczna, następuje akumulacja skrobi oraz obniżenie siły mobilizacyjnej akceptora [3]. W liściach szpinaku i komórkach batatu obserwowano aktywację SPS i zwiększoną syntezę sacharozy [59]. Podwyższoną tolerancję na zasolenie wykazywał transgeniczny tytoń z ekspresją CWI [3, 12]. Następowala u niego akumulacja sacharozy w donorach oraz glukozy i fruktozy w chloroplastach, co chroniło aparat fotosyntetyczny przed stresem zasolenia [12].

3.3. Zasobność podłoża w biogeny

Deficyt fosforu powoduje wzrost zawartości glukozy, sacharozy i skrobi w korzeniach oraz liściach fasoli, a także aktywację SPS, NI, AI w liściach i korzeniach oraz SUSY w liściach [7]. Aktywność NI jest wyższa niż AI. Obniżony jest poziom ufosforylowanych cukrów oraz aktywności heksokinazy i fruktokinazy, co wskazuje na spadek natężenia oddychania i zawartości ATP [7].

Wysoki poziom fluorków w glebie obniża produkcję biomasy i wielkość plonowania. Nadmiar fluorków prowadzi do akumulacji cukrów redukujących i sacharozy, natomiast synteza skrobi jest zahamowana [2]. Obecność fluorków moduluje aktywność NI, która stymulowana jest w łupinie nasiennej, ale zredukowana w liścieniach [2].

Stres wywołany obecnością szkodliwych jonów glinu (np. Al^{+3}) powoduje w korzeniach pszenicy wzrost aktywności SUSY oraz enzymów fermentacyjnych. Nie stwierdzono natomiast wpływu jonów glinu na aktywność AI, PFP i PFK [31].

3.4. Anaerobioza

W warunkach obniżonej zawartości tlenu zwiększona aktywność SUSY odgrywa krytyczną rolę w indukowaniu tolerancji na anoksję [37]. W warunkach anoksji na poziomie mRNA stwierdzono indukcję *Sh1*. W przeciwieństwie do powyższego, w warunkach hypoksji silnie wzrastał *Sus1* mRNA [37]. W korzeniach poddanych

anoksji następuje posttranslacyjna regulacja SUSY, polegająca na fosforylacji i defosforylacji izoform. Defosforylacja SH1 wpływa na jej lokalizację w membranie komórkowej i udział w syntezie kalozy. Izofорма SUS1 pozostaje w cytoplazmie i związana jest z glikolizą [50]. W warunkach anoksji obserwowano również aktywację PFP, a aktywność PFK nie zmienia się lub wzrasta [14]. W siewkach kukurydzy poddanych anoksji i hypoksji następuje represja inwertaz na poziomie transkrypcji i aktywności enzymu [25]. Obniżenie transkrypcji *Ivr2* jest większe niż *Ivr1* [63]. Zmiana metabolizmu w kierunku reakcji katalizowanych przez SUSY w warunkach stresu anaerobowego może prowadzić do oszczędnej gospodarki zasobami ATP, a także dotyczy efektu wywieranego na transdukcję sygnałów przez obniżenie przepływu węgla i redukcję sygnałów pochodzących od glukozy [63].

3.5. Zanieczyszczenia środowiska

Ozon jest istotnym czynnikiem zanieczyszczającym środowisko, który powoduje obniżenie natężenia procesu fotosyntezy i zmiany w alokacji węglowodanów [16, 17]. Pod wpływem działania ozonu obserwowano redukcję eksportu cukrów z donorów, inaktywację SPS i zwiększony przepływ węgla w kierunku syntezy skrobi, jak również wzrost aktywności SUSY i NI i wzmocnienie reakcji glikolitycznych [9].

Dwutlenek siarki wpływa na przebieg procesu fotosyntezy, stymuluje eksport triozofosforanów z chloroplastów, hamuje załadunek sacharozy do floemu oraz powoduje akumulację skrobi w liściach [32]. Pod wpływem SO₂ następuje wzrost zawartości F-2,6-BP, obniżenie aktywności SPS oraz obniżenie stosunku stężeń sacharozy i skrobi [33].

Wzrost całkowitej zawartości węglowodanów niestrukturalnych (TNC) jest odpowiedzią roślin na podwyższoną zawartość CO₂ w atmosferze [42, 60]. Może on być efektem akumulacji skrobi, chociaż w większości przypadków jest następstwem zwiększenia zawartości niestrukturalnych cukrów rozpuszczalnych w liściach-donorach asymilatów [4, 45, 60]. W warunkach zwiększonego poziomu CO₂ obserwowano podwyższoną aktywność SPS i AI [58].

4. PODSUMOWANIE

Heterotroficzne organy rośliny zależne są od stałego zaopatrzenia w składniki odżywcze, zwłaszcza w wysokoenergetyczne związki węglowe. Formą transportową węgla u większości roślin wyższych jest sacharoza. Jest ona cukrem indukującym transdukcję sygnału(ów), molekułą sygnałną regulującą bezpośrednio lub pośrednio ekspresję odpowiednich genów i aktywności enzymatycznych, przekazującą infor-

macje o przebiegu procesów fizjologicznych w poszczególnych organach-donorach metabolitów i ich akceptorach. Wykorzystanie sacharozy w komórkach akceptora wymaga uprzedniej hydrolizy do heksoz. Reakcję tę katalizują syntaza sacharozy oraz inwertazy. Enzymy te są biochemicznymi markerami importu związków energetycznych przez organy akceptorowe. Stresy środowiskowe indukują zmiany w zawartości cukrów rozpuszczalnych i skrobi, co znajduje odzwierciedlenie w zmniejszonej aktywności enzymów uczestniczących w metabolizmie węglowodanów. Zmiany w dystrybucji fotoasymilatów oraz w metabolizmie sacharozy mogą być wskaźnikiem aklimatyzacji rośliny do zmiennych warunków środowiska.

LITERATURA

- [1] ALAOUI-SOSSE B, RICAUD S, BARNOLA P, DIZENGREMEL P. Rythmic growth and carbon allocation in *Quercus robur*. Sucrose metabolizing enzymes in leaves. *Physiol Plant* 1996; **96**: 667–673.
- [2] ASTHIR B, BASRA AS, BATTI SK. Differential response of carbon and nitrogen metabolism to fluoride application in fruiting structures of chickpea (*Cicer arietinum*). *Acta Physiol Plant* 1999; **21**: 67–73.
- [3] BALIBREA ME, AMICO JD, BOLARIN MC, PEREZ-ALFOCEA F. Carbon partitioning and sucrose metabolism in tomato plants growing under salinity. *Physiol Plant* 2000; **110**: 503–511.
- [4] BAXTER R, FARRAR JF. Export of carbon from leaf blades of *Poa alpina* L. at elevated CO₂ and two nutrient regimes. *J Exp Bot* 1999; **50**: 1215–1221.
- [5] BRAVO LA, ULLOA N, ZUNIGA GE, CASANOVA A, CORCUERA LJ, ALBERDI M. Cold resistance in Antarctic angiosperms. *Physiol Plant* 2001; **111**: 55–65.
- [6] CHIOU TJ, BUSH DR. Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proc Natl Acad Sci* 1998; **95**: 4784–4778.
- [7] CIERESZKO I, BARBACHOWSKA A. Sucrose metabolism in leaves and roots of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during phosphate deficiency. *J Plant Physiol* 2000; **156**: 640–644.
- [8] DELMER DP, AMOR Y. Cellulose biosynthesis. *Plant Cell* 1995; **7**: 987–1000.
- [9] EINIG W, LAUXMANN U, HAUCH B, HAMPP R, LANDOLT W, MAURER S, MATYSSEK R. Ozone-induced accumulation of carbohydrates changes enzyme activities of carbohydrate metabolism in birch leaves. *New Phytol* 1997; **137**: 673–680.
- [10] FARRAR J, POLLOCK CH, GALLAGHER J. Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants. *Plant Sci* 2000; **154**: 1–11.
- [11] FU H, KIM SY, PARK WD. High-level tuber expression and sucrose inducibility of a potato *Sus4* sucrose synthase gene require 5' and 3' flanking sequences and the leader intron. *Plant Cell* 1995; **7**: 1387–1394.
- [12] FUKUSHIMA E, ARATA Y, TSUYOSHI E, SONNEWALD U, FUMIHIKO S. Improved salt tolerance of transgenic tobacco expressing apoplastic yeast-derived invertase. *Plant Cell Physiol* 2001; **42**: 245–249.
- [13] GALLAGHER JA, POLLOCK CHJ. Isolation and characterization of a cDNA clone from *L. tremulenta* L. encoding for a sucrose hydrolytic enzyme which shows alkaline/neutral invertase activity. *J Exp Bot* 1998; **49**: 789–795.

- [14] GIBBS J, MORRELL S, VALDEZ A, SETTER TL, GREENWAY H. Regulation of alcoholic fermentation in coleoptiles of two rice cultivars differing in tolerance to anoxia. *J Exp Bot* 2000; **51**: 785–796.
- [15] GIBSON S. Plant sugar-response pathways. Part of a complex regulatory web. *Plant Physiol* 2000; **124**: 1532–1539.
- [16] GRANTZ DA, FARRAR JF. Acute exposure to ozone inhibits rapid carbon translocation from source leaves of Pima cotton. *J Exp Bot* 1999; **50**: 1253–1262.
- [17] GUIDI L, NALI C, LORENZINI G, SOLDATINI GF. Photosynthetic response to ozone of two poplar clones showing different sensitivity. *Chemosphere* 1998; **36**: 657–662.
- [18] HAJIREZAEI MR, TAKAHATA Y, TRETHERWEY RN, WILLMITZER L, SONNEWALD U. Impact of elevated cytosolic and apoplastic invertase activity on carbon metabolism during potato tuber development. *J Exp Bot* 2000; **51**: 439–445.
- [19] HALFORD NG, PURCELL PC, HARDIE DG. Is hexokinase really a sugar sensor in plants? *Trends Plant Sci* 1999; **4**: 117–120.
- [20] HELLMANN H, BARKER L, FUNCK D, FROMMER WB. The regulation of assimilate allocation and transport. *Aust J Plant Physiol* 2000; **27**: 583–594.
- [21] JANG JCH, SHEEN J. Sugar sensing in higher plants. *Trends Plant Sci* 1997; **2**: 208–214.
- [22] KIM JY, MAHE A, BRANGEON J, PRIOUL JL. A maize vacuolar invertase, *IVR2*, is induced by water stress. Organ-tissue specificity and diurnal modulation of expression. *Plant Physiol* 2000; **124**: 71–84.
- [23] KLANN EM, HALL B, BENNET AB. Antisense acid invertase (*TIV1*) gene alters soluble sugar composition and size in transgenic tomato fruit. *Plant Physiol* 1996; **112**: 1321–1330.
- [24] KOCH KE. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1996; **47**: 509–540.
- [25] KOCH KE, YING Z, WU Y, AVIGNE W. Multiple paths of sugar-sensing and sugar/oxygen overlap for genes of sucrose and ethanol metabolism. *J Exp Bot* 2000; **51**: 417–427.
- [26] KRAUSGRILL S, SANDER A, GREINER S, WEIL M, RAUSCH T. Regulation of cell wall invertase by a proteinaceous inhibitor. *J Exp Bot* 1996; **47**: 1193–1197.
- [27] KROOK J, VANT SLOT KAE, VREUGDENHIL D, DIJKEMA C, VAN DER PLAS LHW. The triose-hexose phosphate cycle and the sucrose cycle in carrot (*Daucus carota* L.) cell suspensions are controlled by respiration and PPi: fructose-6-phosphate phosphotransferase. *J Plant Physiol* 2000; **156**: 595–604.
- [28] LALONDE S, BOLES E, HELLMANN H, BARKER L, PATRICK JW, FROMMER WB, WARD JM. The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing. *Plant Cell* 1999; **11**: 707–726.
- [29] LEE SH, STURM A. Purification and characterization of neutral and alkaline invertase from carrot. *Plant Physiol* 1996; **112**: 1513–1522.
- [30] LINDBLOM S, EK P, MUSZYŃSKA G, EK B, SZCZEGIELNIAK J, ENGSTROM L. Phosphorylation of sucrose synthase from maize seedlings. *Acta Bioch Pol* 1997; **44**: 809–818.
- [31] LORENC-PLUCIŃSKA G. Fizjologiczne i biochemiczne aspekty oddziaływania glinu na rośliny. [w] Siwecki R. [red.] Reakcje biologiczne drzew na zanieczyszczenia przemysłowe. Sorus 1996: 465–469.
- [32] LORENC-PLUCIŃSKA G. Sulfite inhibition of sucrose transport into vacuoles of cottonwood leaves. *Acta Soc Bot Pol* 1996; **65**: 291–295.
- [33] LORENC-PLUCIŃSKA G. The effect of sulphite on the regulation of photosynthetic sucrose synthesis in poplar leaves. *J Exp Bot* 1998; **49**: 213–219.
- [34] MATSUKURA C, SAITOH T, HIROSE T, OHSUGI R, PERATA P, YAMAGUCHI J. Sugar uptake and transport in rice embryo. Expression of companion cell-specific sucrose transporter (*OsSUT1*) induced by sugar and light. *Plant Physiol* 2000; **124**: 85–93.
- [35] PAUL MJ, FOYER CH. Sink regulation of photosynthesis. *J Exp Bot* 2001; **52**: 1383–1400.

- [36] PEREZ P, MORCUENDE R, DEL MOLINO IM, DE LA PUENTE LS, MARTINEZ-CARRASCO R. Contrasting responses of photosynthesis and carbon metabolism to low temperatures in tall fescue and clovers. *Physiol Plant* 2001; **112**: 478–486.
- [37] RICARD B, VAN TOAIT T, CHOUREY P, SAGLIO P. Evidence for the critical role of sucrose synthase for anoxic tolerance of maize roots using a double mutant. *Plant Physiol* 1998; **116**: 1323–1331.
- [38] ROITSCH T. Source-sink regulation by sugar and stress. *Curr Opin Plant Biol* 1999; **2**: 118–205.
- [39] SASAKI H, ICHIMURA K, IMADA S, SHOHEI Y. Sucrose synthase and sucrose phosphate synthase, but not acid invertase, are regulated by cold acclimation and deacclimation in cabbage seedlings. *J Plant Physiol* 2001; **158**: 847–852.
- [40] SAVITCH LV, HARNEY T, HUNER NPA. Sucrose metabolism in spring and winter wheat in response to high irradiance, cold stress and cold acclimation. *Physiol Plant* 2000; **108**: 270–278.
- [41] SHEEN J, ZHOU L, JANG JCH. Sugars as signalling molecules. *Curr Opin Plant Biol* 1999; **2**: 410–418.
- [42] SILD E, YOUNIS S, PLEIJEL H, SELLDEN G. Effect of CO₂ enrichment on non-structural carbohydrates in leaves, stems and ears of spring wheat. *Physiol Plant* 1999; **107**: 60–67.
- [43] SMEEKENS S. Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 2000; **51**: 49–81.
- [44] STITT M. Pyrophosphate as an energy donor in the cytosol of plant cells: an enigmatic alternative to ATP. *Bot Acta* 1998; **111**: 167–175.
- [45] STITT M, KRAPP A. The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant Cell Environ* 1999; **22**: 583–621.
- [46] STRAND A, HURRY V, HENKES S, HUNER N, GUSTAFSSON P, GARDESTROM P, STITT M. Acclimation of *Arabidopsis* leaves developing at low temperatures. Increasing cytoplasmic volume accompanies increased activities of enzymes in the Calvin cycle and in the sucrose-biosynthesis pathway. *Plant Physiol* 1999; **119**: 1387–1397.
- [47] STURM A. Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiol* 1999; **121**: 1–7.
- [48] STURM A, LIENHARD S, SCHATT S, HARDEGGER M. Tissue-specific expression of two genes for sucrose synthase in carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Mol Biol* 1999; **39**: 349–360.
- [49] STURM A, TANG GQ. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends Plant Sci* 1999; **4**: 401–407.
- [50] SUBBAIAH CC, SACHS MM. Altered patterns of sucrose synthase phosphorylation and localization precede callose induction and root tip death in anoxic maize seedlings. *Plant Physiol* 2001; **125**: 585–594.
- [51] SUNG SJ, KORMANIK PP, BLACK CC. Temporal and spatial aspects of root and stem sucrose metabolism in loblolly pine trees. *Tree Physiol* 1996; **16**: 1003–1008.
- [52] TAKEDA T, TOYOFUKU K, MATSUKURA C, YAMAGUCHI J. Sugar transporters involved in flowering and grain development of rice. *J Plant Physiol* 2001; **158**: 465–470.
- [53] TANG GQ, LÜSCHER M, STURM A. Antisense repression of vacuolar and cell wall invertase in transgenic carrot alters early development and sucrose partitioning. *Plant Cell* 1999; **11**: 177–189.
- [54] TREVANION SJ. Photosynthetic carbohydrate metabolism in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves: optimization of methods for determination of fructose 2,6-bisphosphate. *J Exp Bot* 2000; **51**: 1037–1045.
- [55] TYMOWSKA-LALANNE Z, KREIS M. The plant invertases: physiology, biochemistry and molecular biology. *Adv Bot Res* 1998; **28**: 72–117.

- [56] USUDA H, DEMURA T, SHIMOGAWARA K, FUKUDA H. Development of sink capacity of the „storage root” in a radish cultivar with a high ratio of „storage root” to shoot. *Plant Cell Physiol* 1999; **40**: 369–377.
- [57] VAN BEL AJE. Interaction between sieve element and companion cell and the consequences for photoassimilate distribution. Two structural hardware frames with associated physiological software packages in dicotyledons? *J Exp Bot* 1996; **47**: 1129–1140.
- [58] VU JCV, GESCH RW, PENNANEN AH, ALLEN LH, BOOTE KJ, BOWES G. Soybean photosynthesis, Rubisco, and carbohydrate enzymes function at supraoptimal temperatures in elevated CO₂. *J Plant Physiol* 2001; **158**: 295–307.
- [59] WANG HL, LEE PD, CHEN WL, HUANG DJ, SU JC. Osmotic stress-induced changes of sucrose metabolism in cultured sweet potato cells. *J Exp Bot* 2000; **51**: 1991–1999.
- [60] WIEMKEN V, INEICHEN K. Seasonal fluctuations of the levels of soluble carbohydrates in spruce needles exposed to elevated CO₂ and nitrogen fertilization and glucose as a potential mediator of acclimation to elevated CO₂. *J Plant Physiol* 2000; **156**: 746–750.
- [61] WINTER H, HUBER SC. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. *Crit Rev Plant Sci* 2000; **19**: 31–67.
- [62] XU J, AVIGNE WT, MC CARTHY DR, KOCH K. A similar dichotomy of sugar modulation and developmental expression affects both paths of sucrose metabolism: evidence from a maize invertase gene family. *Plant Cell* 1996; **8**: 1206–1220.
- [63] ZENG Y, WU Y, AVIGNE WT, KOCH KE. Rapid repression of maize invertases by low oxygen. Invertase/sucrose synthase balance, sugar signalling potential, and seedling survival. *Plant Physiol* 1999; **121**: 599–608.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 06.09.2001 r.

Przyjęto: 18.10.2001 r.

Adres autorów: Instytut Dendrologii PAN, ul. Parkowa 5, 62-035 Kórnik

REGULACJA EKSPRESJI I FUNKCJI RECEPTORÓW JĄDROWYCH RODZINY Nur77 I ICH UDZIAŁ W KONTROLNYCH PUNKTACH SZLAKÓW SYGNAŁOWYCH PROWADZĄCYCH DO APOPTOZY, RÓŻNICOWANIA I PRODUKCJI HORMONÓW STEROIDOWYCH*

REGULATION OF EXPRESSION AND FUNCTION
OF Nur77 FAMILY OF NUCLEAR RECEPTORS
AND THEIR ROLE IN THE CONTROL POINTS OF SIGNALING
PATHWAYS LEADING TO APOPTOSIS, DIFFERENTIATION
AND SYNTHESIS OF STEROID HORMONES

Janusz MATUSZYK, Leon STRZAŁA

Laboratorium Immunologii Komórkowej, Zakład Immunologii Nowotworów,
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im L.Hirszfelda, Wrocław

Streszczenie: Receptory jądrowe Nur77, Nurrl i Nor-1 należą do rodziny Nur77 i do nadrodziny receptorów steroidowo-tyroidowych. Białka te biorą udział w procesach apoptozy tymocytów, różnicowania komórek nerwowych, produkcji hormonów steroidowych. Wpływanie na te procesy w celach terapeutycznych wymaga poznania mechanizmów regulacji ekspresji i funkcji białek rodziny Nur77 i ich roli w różnych szlakach sygnałowych. Ekspresja i funkcja Nur77 jest regulowana na poziomie transkrypcji genu i fosforylacji białka. Białka rodziny Nur77 funkcjonują jako aktywatory transkrypcji w formie monomerów, homodimerów i heterodimerów z receptorami typu X retinoidów. Białka rodziny Nur77 funkcjonują w miejscach krzyżowania się szlaków sygnałowych zależnych od receptorów dla czynników wzrostowych, hormonów, antygenów (receptor komórek T) ze szlakami sygnałowymi kontrolowanymi przez glikokortykoidy i pochodne witaminy A. W szlaku sygnałowym prowadzącym do apoptozy Nur77 jest eksportowany z jądra do mitochondrium i działa jak białko adaptorowe. (*Postępy Biologii Komórki* 2002; 29: 61–80)

*Praca finansowana przez grant KBN 4 P05A 068 19

Słowa kluczowe: Nur77, Nurr1, receptory jądrowe, szlaki sygnałowe, apoptoza.

Summary: The orphan nuclear receptors Nur77, Nurr1 and Nor-1 are the members of Nur77 family and of the steroid/thyroid hormone receptor superfamily. These proteins are mediators in signaling pathways leading to apoptosis of thymocytes, neuronal differentiation, synthesis of steroid hormones. Therapeutic intervention in these processes should be preceded by the knowledge of mechanisms of regulation of expression and function of Nur77 family proteins and their role in different signaling pathways. Expression and function of Nur77 is regulated on the levels of transcription of gene and phosphorylation of protein. Nur77 family proteins function as transcription activators in the form of monomers, homodimers and heterodimers with retinoid X receptors. Nur77 family proteins are involved in cross-talk of signaling pathways dependent on receptors of growth factors, hormones, antigens (T cell receptor) with glucocorticoids and retinoids dependent signaling pathways. In the signaling pathway leading to apoptosis Nur77 is exported from the nucleus to the mitochondria and may act as an adaptor protein. (*Advances in Cell Biology* 2002; 29: 61–80)

Key words: Nur77, Nurr1, orphan nuclear receptors, signaling pathways, apoptosis.

Wykaz skrótów: **NBRE** (ang. *NGFI-B response element*) – element odpowiedzi monomeru Nur77; **NurRE** (ang. *Nur77 response element*) – element odpowiedzi homodimeru Nur77; **DR-5** (ang. *direct repeats*) – element odpowiedzi heterodimeru Nur77 z RXR; **NGF** (ang. *Nerve growth factor*) – czynnik wzrostu nerwów; **POMC** (ang. *proopiomelanocortin*) – proopiomelanokortyna; **TCR** (ang. *T cell receptor*) – receptor dla antygeny na komórkach T; **Ser** – seryna.

1. WSTĘP

Białka rodziny Nur77 biorą udział w tak różnych procesach, jak: apoptoza (proces prowadzący do śmierci komórki), różnicowanie, produkcja hormonów steroidowych. Wpływanie na te procesy w celach terapeutycznych wymaga poznania regulacji ekspresji i funkcji receptorów rodziny Nur77 i ich udziału w różnych szlakach sygnałowych. W prawidłowych tymocytach (niedojrzałe limfocyty T w grasicy) receptory jądrowe Nur77 i Nor-1 funkcjonują jako białka szlaku sygnałowego prowadzącego do apoptozy zależnej od TCR (ang. *T cell receptor*). W badaniach własnych, dotyczących szlaków sygnałowych z udziałem Nur77 [36], stwierdzono, że w procesie transformacji nowotworowej tymocytów dochodzi do zablokowania indukcji apoptozy zależnej od Nur77. Czynnik wzrostu nerwów (NGF) powoduje indukcję ekspresji Nur77 w neuronach cholinergicznym, jednak jest ona krótkotrwała w porównaniu z tymocytami. Receptory jądrowe rodziny Nur77 funkcjonują jako monomery, homodimery i heterodimery z receptorem retinoidów typu RXR. W zależności od formy występowania białka te rozpoznają różne sekwencje DNA i mogą aktywować transkrypcję różnych zestawów genów. W związku z tym białka te mogą pełnić istotną rolę w punktach zwrotnych procesów proliferacji, różnicowania i apoptozy. Apoptoza neuronów ma miejsce zarówno w trakcie procesu różnicowania (czynnikiem ograniczającym rozwój neuronów jest dostępność czynników neurotrofowych) [51], jak i w procesach chorobowych (przykładem może być indukcja

apoptozy komórek neuronalnych przez złoży amyloidu β) [50, 73]. Można oczekiwać, że zmiany patologiczne zachodzące w komórkach neuronalnych mogą być związane z nieprawidłowym funkcjonowaniem szlaków sygnałowych, w tym związanych z Nur77, który w wyniku nieprawidłowej ekspresji i funkcji mógłby inicjować w komórkach neuronalnych szlaki sygnałowe prowadzące do apoptozy, podobnie jak zachodzi to w prawidłowych tymocytach.

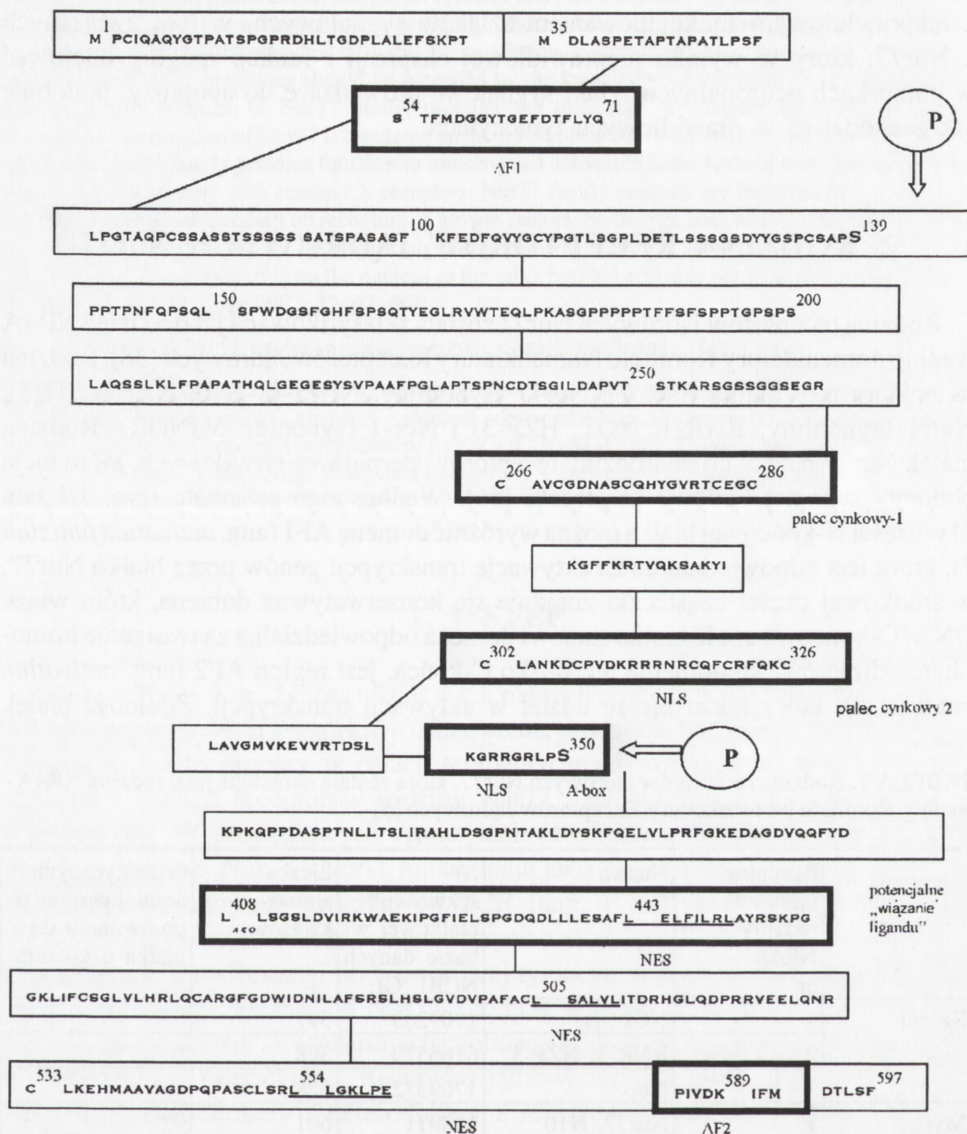
2. RODZINA RECEPTORÓW JĄDROWYCH Nur77

Rodzina receptorów jądrowych Nur77 została sklasyfikowana jako rodzina NR4A według nomenklatury Komitetu Nomenklatury Receptorów Jądrowych [38]. Rodzina ta zawiera trzy białka (tab. 1): Nur77 (synonimy: NGFI-B, N10, NAK-1, TR3), Nurr1 (synonimy: RNR-1, NOT, HZF-3) i Nor-1 (synonim: MINOR). Rodzina białek Nur77 należy do nadrodziny receptorów steroidowo-tyroidowych, które mają podobny schemat budowy cząsteczki [56]. Według tego schematu (ryc. 1 i tab. 2) w części N-końcowej białka można wyróżnić domenę AF1 (ang. *activation function 1*), która jest odpowiedzialna za aktywację transkrypcji genów przez białko Nur77; w środkowej części cząsteczki znajduje się konserwatywna domena, która wiąże DNA; C-końcową część białka stanowi domena odpowiedzialna za tworzenie homo- i heterodimerów. W domenie tej, blisko C-końca, jest region AF2 (ang. *activation function 2*), który także bierze udział w aktywacji transkrypcji. Zdolność białek

TABELA 1. Rodzina receptorów jądrowych Nur77, która została określona jako rodzina NR4A według Komitetu Nomenklatury Receptorów Jądrowych [5]

	Receptor jądrowy rodziny NR4A nr	Nazwa	Nr sekwencji* białkowej w bazie danych NCBI, GI:	Liczba aminokwasów	%identycznych** aminokwasów w porównaniu do białka u szczura
Szczur	1	NGFI-B	1709263	597	
	2	RNR-1, HZF-3	6166579	598	
	3	Nor-1	1709332	628	
Mysz	1	Nur77, N10	128911	601	92
	2	Nurr1	548390	598	99
	3	Nor-1	7657397	627	99
Człowiek	1	NAK1, TR3	127819	598	90
	2	NOT	1362989	598	99
	3	Nor-1	1651191	626	92

*Numer sekwencji w bazie sekwencji białkowych NCBI (*National Center for Biotechnology Information*); **Obliczony przy użyciu programu BLAST (NCBI).



RYCINA 1. Domeny białka Nur77. Sekwencja reszt aminokwasowych według sekwencji NGFI-B u szczura, GI:1709263. Zaznaczono domeny AF1 i AF2, odpowiedzialne za zdolność do aktywacji transkrypcji genów [5, 44], w regionach końców N i C cząsteczki białka; palce cynkowe i A-box [67] tworzące domenę wiążącą DNA; potencjalne miejsca wiązania ligandu; dwie sekwencje NLS (ang. *nuclear localization sequence*) w obrębie domeny wiążącej DNA; trzy sekwencje NES (ang. *nuclear export sequence*) [25] w regionie C-końcowym; miejsca fosforylacji Ser-350 [21] i Ser-139 [25], które wpływają na wiązanie z DNA oraz eksport białka z jądra

TABELA 2. Homologie między domenami białkowymi rodziny Nur77 oraz wybranych receptorów jądrowych. Liczby oznaczają numery reszt aminokwasowych danej domeny oraz % identyczności danej domeny z odpowiednią domeną NGFI-B. Z domeną wiążącą DNA receptora NGFI-B porównywano domeny wybranych receptorów nienależących do rodziny Nur77; RXR α (ang. *retinoid X receptor α*), GI:6981496; COUP-TFII (ang. *COUP transcription factor 2*) GI:3913096; ER α (ang. *estrogen receptor α*) GI: 119600; GR (ang. *glucocorticoid receptor*) GI:1169883

Receptor	Domena białka					
	N końcowa	odpowiedzialna za wiązanie DNA	„A-box”	region zawiasowy	zawiera potencjalne miejsce wiązania ligandu	C końcowa
NGFI-B (Nur77)	1–265	266–331	332–353	354–407	408–458	459–597
RNR-1 (Nurr1)	1–262 27%	263–328 92%	329–350 100%	351–408	409–459 72%	460–598 64%
Nor-1	1–293 32%	294–359 90%	360–381 100%	382–441	442–492 64%	493–628 58%
RXR α		140–205 69%				
COUP-TFII		79–144 59%				
ER α		190–255 57%				
GR		440–505 53%				

rodziny Nur77 do aktywacji transkrypcji genów nie wymaga przyłączenia ligandów do tych receptorów i odpowiednie ligandy nawet nie zostały zidentyfikowane. Stąd receptory te nazywane są sierocymi (ang. *orphan nuclear receptors*).

Klony cDNA *Nur77* wyizolowano zarówno z komórek fibroblastów NIH 3T3 stymulowanych surowicą, jak i z komórek PC12 (szczurzej linii komórkowej wywodzącej się z nowotworu rdzenia nadnerczy), które pod wpływem NGF różnicują się w kierunku neuronów z neurytami [18]. Indukcja ekspresji mRNA *Nur77* nie wymaga uprzedniej syntezy innych białek; *Nur77* jest więc genem natychmiastowej odpowiedzi na bodziec (ang. *immediate-early response*). Ekspresja i funkcja *Nur77* jest regulowana na poziomie transkrypcji genu i fosforylacji białka. Receptory rodziny Nur77 mogą pełnić funkcję czynników transkrypcyjnych zarówno w formie monomerów, jak i dimerów [13]. Nur77 jako monomer aktywuje transkrypcję genu w następstwie wiązania się w regionie promotorowym z sekwencją DNA złożoną z nukleotydów AAAGGTCA. Sekwencja ta, określana jako NBRE (ang. *NGFI-B*

response element) [66], jest elementem odpowiedzi Nur77. W skład domeny białka wiążącej DNA wchodzi dwa palce cynkowe (palec cynkowy jest strukturą, w której reszty cysteiny utrzymują atom cynku) [56] oraz tak zwany „A-box” (konserwatywna sekwencja aminokwasów charakterystyczna dla białek rodziny Nur77). Palce cynkowe białka Nur77 rozpoznają motyw AGGTCA-3' w sekwencji NBRE, natomiast A-box cząsteczki Nur77 rozpoznaje 5'-AA w sekwencji NBRE [67]. Natomiast homodimery białek Nur77 i Nurrl, jak i Nor-1 wiążą cząsteczki DNA, które zawierają konsensusowe sekwencje NurRE (TGACCTTTnnnnnnAAAGGTCA), gdzie n oznacza nukleotyd nieistotny dla wiązania Nur77, natomiast podkreślona jest sekwencja NBRE [33, 48]. NurRE jest elementem odpowiedzi Nur77 w postaci homodimeru, natomiast NBRE jest elementem odpowiedzi Nur77 w postaci monomeru.

2.1. Nur77

Transkrypt genu kodującego Nur77 [19] u myszy (synonim N10) został zidentyfikowany w fibroblastach NIH 3T3, które znajdowały się w fazie spoczynkowej G₀ cyklu komórkowego i następnie były stymulowane przez dodanie surowicy w obecności cykloheksimidu, inhibitora syntezy białka. Transkrypt *Nur77* obserwowano już po 15 minutach stymulacji komórek przy użyciu surowicy lub czynników wzrostowych, takich jak: płytkowy czynnik wzrostu, czynnik wzrostu naskórka, czynnik wzrostu fibroblastów, a także estru forbolu, który aktywuje kinazę białkową C [52]. Odpowiednikiem Nur77 u szczurów jest białko NGFI-B (ang. *nerve growth factor induced factor B*). Transkrypt genu *NGFI-B* obserwowano w komórkach PC12 stymulowanych przy użyciu NGF i zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów (stymulują różnicowanie PC12), czynnika wzrostu naskórka, KCl (powoduje depolaryzację błony komórkowej), estru forbolu (aktywator PKC), A23187 (jonofor Ca²⁺) [15, 20, 24, 64]. U ludzi odpowiednikiem Nur77 jest TR3. Transkrypt genu *TR3* zidentyfikowano w bibliotece cDNA komórek prostaty [8]. Ekspresję mRNA *Nur77* stwierdzono w mózgu, jajnikach, jądrach, gruczołach ślinowych, mięśniach, śledzionie, grasicy [27, 52].

2.2. Nurrl

cDNA *Nurrl* (ang. *Nur-related factor 1*) wyizolowano z biblioteki mózgu myszy [27]. Jego odpowiednik u szczura zidentyfikowano jako *RNR-1* (ang. *regenerating liver nuclear receptor*) w komórkach regenerującej wątroby po częściowej hepatektomii [55] oraz jako *HZF-3* (ang. *hippocampal zinc finger 3*) w bibliotece cDNA hipokampa szczura [46]. Ekspresję mRNA *Nurrl* u gryzoni stwierdzono w mózgu, wątrobie, korze nadnerczy [27, 46, 55, 10]. Zróżnicowaną ekspresję genów kodujących receptory Nur77 i Nurrl stwierdzono w różnych regionach mózgu [72].

Na przykład w komórkach hipokampa ma miejsce wysoka ekspresja obu genów, natomiast w istocie czarnej mózgu ulega ekspresji jedynie *Nurr1*.

2.3. Nor-1

Nor-1 (ang. *neuron-derived orphan receptor*) został zidentyfikowany w hodowli pierwotnej komórek wyizolowanych z przodomózgowia płodu szczura [40]. Stwierdzono występowanie mRNA *Nor-1* u szczurów w grasicy oraz w gruczołach przysadki i nadnerczy, a także w mózgu embrionu [34].

2.4. Organizacja genów kodujących receptory rodziny Nur77

Gen *Nur77* składa się z 7 egzonów rozdzielonych intronami [52, 64]. Białko jest kodowane przez egzony 2–7. Transkrypt pierwszego egzonu zawiera 5'-końcowy region mRNA nie ulegający translacji (tzw. 5'UTR). Egzon 2 koduje domenę białka odpowiedzialną za zdolność *Nur77* do aktywacji transkrypcji genów oraz pierwszy palec cynkowy wchodzący w skład domeny wiążącej DNA. Egzon 3 koduje drugi palec cynkowy. Egzon 4 koduje region zawiasowy białka pomiędzy domeną wiążącą DNA i C-kończącą domeną odpowiedzialną za dimeryzację. Egzony 5–7 kodują domenę odpowiedzialną za dimeryzację *Nur77* z innym receptorem jądrowym. Transkrypt egzonu 7 także zawiera nie ulegający translacji 3'-końcowy region mRNA (tzw. 3'UTR). Geny *Nurr1* [4, 22, 53, 61] i *Nor-1* [41] składają się z 8 egzonów, czyli o jeden więcej niż w przypadku genu *Nur77*. Transkrypt tego dodatkowego egzonu zawiera sekwencję 5'UTR. Organizacja pozostałych egzonów *Nurr1* i *Nor-1* jest taka jak w przypadku *Nur77*. Organizacja genów *Nur77*, *Nurr1* i *Nor-1* jest podobna jak w przypadku innych genów kodujących białka nadrodziny receptorów jądrowych. Jednak są pewne odrębne cechy wspólne tylko dla genów kodujących opisywane białka. Na przykład, miejsce połączenia egzonów kodujących dwa palce cynkowe jest unikalne dla genów *Nur77*, *Nurr1* i *Nor-1* [52], co sugeruje, że geny te tworzą odrębną rodzinę wśród receptorów jądrowych [14] oraz wywodzą się ze wspólnego genu w rozwoju filogenetycznym.

3. FUNKCJA

Wykazano znaczącą rolę białek rodziny *Nur77* w różnych procesach, takich jak:

- apoptoza tymocytów i komórek nowotworowych;
- udział w szlakach sygnałowych inicjowanych przez receptory hormonów i w regulacji produkcji hormonów steroidowych;
- różnicowanie komórek nerwowych.

3.1. Udział Nur77 i Nor-1 w szlaku sygnałowym prowadzącym do apoptozy tymocytów w prawidłowej selekcji negatywnej

Aktywacja komórek T zachodzi w wyniku rozpoznania antygeny przez TCR (receptor komórek T). Proces selekcji negatywnej w grasicy prowadzi do eliminacji tymocytów potencjalnie autoreaktywnych (rozpoznają własne antygeny organizmu) w drodze apoptozy zależnej od kompleksu TCR/CD3 [35]. Do aktywacji tymocytów i hybrydoma komórek T doprowadza również traktowanie komórek przeciwciałami anti-TCR lub anti-CD3. Silna i długotrwała ekspresja Nur77, spowodowana przez aktywację szlaku sygnałowego zależnego od TCR/CD3, prowadzi do apoptozy tymocytów i hybrydoma komórek T [32, 69, 70]. Zahamowanie ekspresji i funkcji białka Nur77 w hybrydoma komórek T powodowało zahamowanie procesu apoptozy komórek [32, 69]. Ekspresję Nur77 hamowano przez wprowadzenie do komórek wektora produkującego antysensowne mRNA *Nur77* [32]. Natomiast funkcję białka Nur77 hamowano przez wprowadzenie do komórek wektora kodującego zmutowane białko Nur77: DN-Nur77 (ang. *dominant negative Nur77*) [69]. Z drugiej strony, u myszy transgenicznych z konstytutywną ekspresją prawidłowego białka Nur77 grasica była szczątkowa w związku z maszyną apoptozą tymocytów [65]. Obserwacje te wskazują na udział Nur77 w szlaku sygnałowym prowadzącym do apoptozy zależnej od TCR/CD3. Jednak u myszy z nokautem genu (tzn. brak w genomie genu kodującego funkcjonalne białko) kodującego receptor Nur77 selekcja negatywna tymocytów przebiegała prawidłowo [28], co sugeruje, że w szlakach sygnałowych prowadzących do apoptozy tymocytów funkcję Nur77 może pełnić także inne białko. Faktycznie, stwierdzono indukcję ekspresji Nor-1 oprócz Nur77, ale nie *Nurr1*, w tymocytach stymulowanych przeciwciałami anti-CD3 [9]. Również u myszy z transgenem *Nor-1*, ale nie *Nurr1* obserwowano zwiększoną apoptozę tymocytów i znaczne zmniejszenie liczby komórek w grasicy w porównaniu do myszy nietransgenicznych [9]. Wskazuje to na udział Nor-1 i Nur77, ale nie *Nurr1*, w szlakach sygnałowych prowadzących do apoptozy tymocytów. Nie są znane geny docelowe dla Nur77 w szlaku sygnałowym prowadzącym do apoptozy. Wskazywano na zwiększoną ekspresję ligandu Fas w tymocytach myszy z nadekspresją transgeny *Nur77* [65], jednakże badania innych autorów nie potwierdziły tych danych [2, 7].

3.2. Udział Nur77 i Nor-1 w indukcji apoptozy komórek nowotworowych

Obserwowano indukcję ekspresji mRNA *Nur77* i apoptozę komórek linii ludzkiego raka płuc w następstwie traktowania przez syntetyczny retinoid CD437 [31]. W tych komórkach zablokowanie funkcji białka c-Jun hamowało zarówno ekspresję Nur77, jak i apoptozę. Z kolei zablokowanie w komórkach LNCaP (linia komórkowa

ludzkiego raka prostaty) produkcji białka Nur77 hamowało apoptozę komórek traktowanych przez szereg związków chemicznych, które indukują różne szlaki sygnałowe prowadzące do apoptozy [29, 63]. Obserwowano także ekspresję Nur77 i apoptozę komórek HCT-15, ludzkiego raka okrężnicy, po traktowaniu indometacyną, podczas gdy kwas retinoidowy all-trans hamował zarówno transkrypcję genu *Nur77*, jak i apoptozę komórek HCT-15 [23]. Także w komórkach MCF-7 (linia komórkowa ludzkiego raka piersi) traktowanych jonoforem Ca^{2+} stwierdzono transkrypcję *Nor-1* oraz proces apoptozy komórek [39].

3.3. Udział białek rodziny Nur77 w szlakach sygnałowych układu endokrynnego

Nur77 bierze udział w regulacji syntezy i uwalniania hormonów układu endokrynnego [12, 43]. W komórkach przysadki genem docelowym dla homodimeru białka Nur77 jest gen kodujący POMC (proopiomelanokortyna), białko prekursorowe między innymi dla adrenokortykotropiny. Z sekwencją NurRE w promotorze *POMC* wiąże się białko Nur77 i w niewielkim stopniu Nurr1 [33], natomiast nie stwierdzono wiązania białka *Nor-1* [16]. W następstwie uwolnienia z podwzgórza kortykoliberyny (hormon uwalniający kortykotropinę), w komórkach przysadki jest aktywowany szlak sygnałowy z udziałem Nur77, który powoduje aktywację transkrypcji *POMC*. Adrenokortykotropina stymuluje syntezę i uwalnianie glikokortykoidów z kory nadnerczy. Natomiast glikokortykoidy zwrótnie hamują układ endokrynną na poziomie podwzgórza i przysadki. Stwierdzono, że adrenokortykotropina indukuje ekspresję Nur77 w komórkach kory nadnerczy oraz w komórkach Y1 (linii komórkowej nowotworu kory nadnerczy myszy) [12, 68]. Znany gen docelowym dla czynnika transkrypcyjnego Nur77 w komórkach kory nadnerczy jest gen kodujący enzym 21-hydroksylazę steroidu. Enzym ten bierze udział w biosyntezie hormonów steroidowych. Transkrypcja genu kodującego ten enzym jest regulowana przez adrenokortykotropinę. W promotorze genu kodującego 21-hydroksylazę steroidu występuje sekwencja NBRE, która jest rozpoznawana przez białko Nur77 działające w tym wypadku w formie monomerycznej.

Nur77 jest także mediatorem szlaku sygnałowego zależnego od prostaglandyny $\text{F}_2\alpha$, która w komórkach ciała żółtego szczura prowadzi do indukcji ekspresji 20 α -dehydrogenazy hydroksysteroidu, enzymu katabolizującego progesteron [57]. Prawdopodobnie Nur77 bierze również udział w szlaku sygnałowym zależnym od receptora parathormonu w komórkach kościotwórczych [60]. W tym przypadku potencjalnym celem dla Nur77 mogą być między innymi geny kodujące kolagen typu I oraz kolagenaza, gdyż w promotorach tych genów są sekwencje NBRE [60].

3.4. Udział *Nurr1* w różnicowaniu neuronów dopaminergicznych

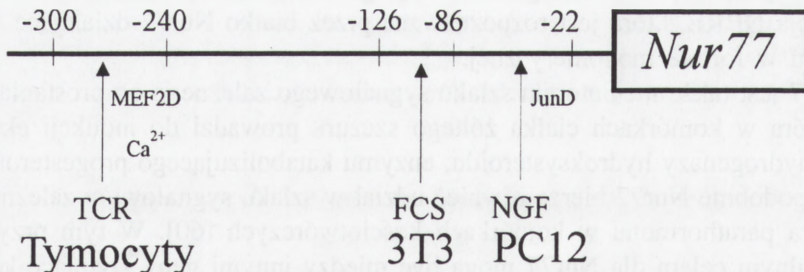
Neurony dopaminergiczne produkują dopaminę, która jest niezbędnym neurotransmiterem w regulacji czynności ruchowych. Ekspresja białka *Nurr1* jest niezbędna w końcowych etapach dojrzewania neuronów dopaminergicznych z prekursorów zawierających marker $Ptx-3^+$ [54]. Żadne inne białko z rodziny *Nur77* nie może w tym wypadku zastąpić *Nurr1* w neuronach dopaminergicznych. W mózgu myszy z nokautem *Nurr1* nie występowały neurony dopaminergiczne [54, 78]. Myszy takie zdychały wkrótce po urodzeniu [78].

4. REGULACJA EKSPRESJI

W regionach promotorowych genów *Nurr1* i *Nor-1* [22, 42, 61] są sekwencje zbliżone do CRE, które prawdopodobnie są odpowiedzialne za indukcję transkrypcji przez szlak sygnałowy zależny od cAMP lub od wzrostu stężenia jonów Ca^{2+} w cytoplazmie [39]. Natomiast sekwencja CRE nie występuje w promotorze genu *Nur77* (GenBank X16995). Wykazane różnice sugerują zasadniczo odmienny mechanizm kontroli transkrypcji *Nur77* oraz *Nurr1* i *Nor-1*.

W różnych komórkach do transkrypcji genu *Nur77* są wykorzystywane odmiennie regiony promotora (ryc. 2), a nawet te same sekwencje promotora są rozpoznawane przez różne czynniki transkrypcyjne w zależności od kontekstu innych czynników transkrypcyjnych w komórce.

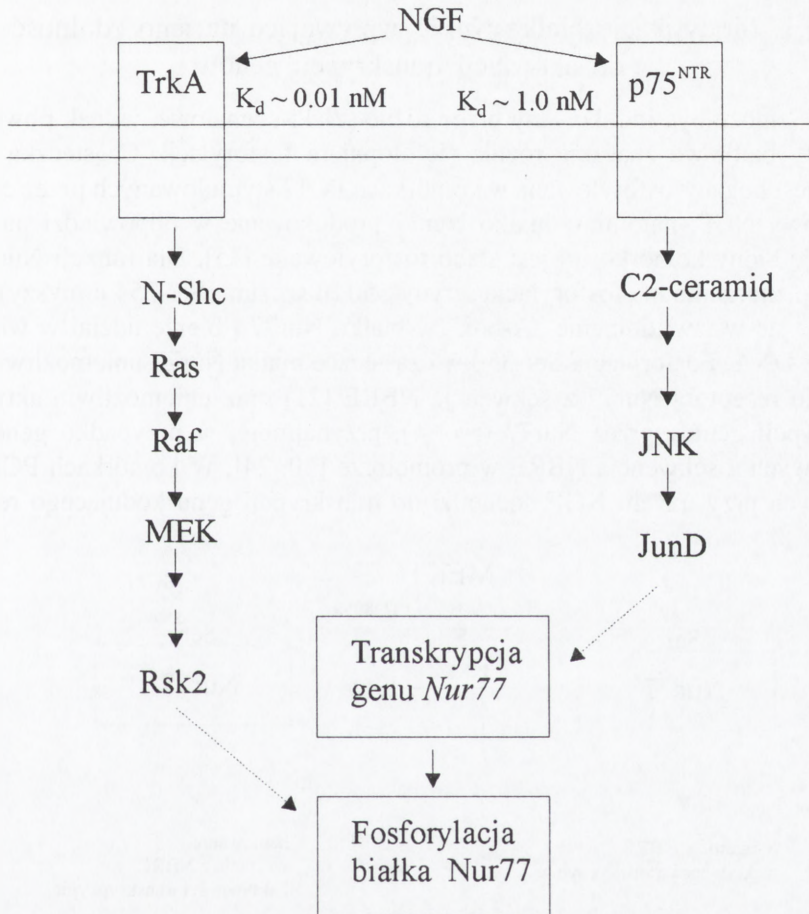
Na przykład w komórkach PC12 stymulowanych przez NGF transkrypcja *Nur77* jest aktywowana przez czynniki transkrypcyjne rozpoznające dwie sekwencje AP1-podobne w promotorze *Nur77* [74]. Indukcja transkrypcji *Nur77* nie wymaga uprzedniej syntezy białka, natomiast jest inicjowana przez modyfikacje gotowych białek



RYCINA 2. Regulacja transkrypcji genu *Nur77* wykorzystuje odmiennie regiony promotora w tymocytach, fibroblastach 3T3 i w komórkach PC12. Liczby oznaczają pozycje nukleotydów w promotorze genu *Nur77* w górę od miejsca początku transkrypcji. Transkrypcja *Nur77* w komórkach PC12 stymulowanych przez NGF prowadzi do transkrypcji *Nur77* zależnej od JunD. Natomiast w tymocytach szlak sygnałowy inicjowany przez TCR prowadzi do aktywacji transkrypcji *Nur77* zależnej od czynnika transkrypcyjnego MEF2D

(najczęściej są to zmiany fosforylacji), w wyniku których białka te pełnią rolę czynników aktywujących transkrypcję genów. Wykazano, że niezbędny udział w rozpoznaniu sekwencji AP1-podobnych i inicjacji transkrypcji genu *Nur77* w komórkach PC12 ma kompleks z udziałem białka JunD [75]. Szlaki sygnałowe inicjowane przez receptor NGF lub depolaryzację błony komórek PC12 prawdopodobnie prowadzą do fosforylacji JunD (ryc. 3) lub innych białek, które wiążą się z JunD i w wyniku tych modyfikacji kompleks białek z JunD ma zdolność do aktywacji transkrypcji *Nur77* [75].

Z kolei w tymocytach transkrypcja *Nur77*, niezbędna dla procesu selekcji negatywnej, jest zależna od szlaku sygnałowego związanego z TCR [70] i jest precyzyjnie regulowana przez zmiany stężenia jonów Ca^{2+} w cytoplazmie. Transkrypcja



RYCINA 3. Hipotetyczne szlaki sygnałowe regulujące ekspresję i funkcję Nur77 w komórkach PC12. NGF wiąże się z wysokim powinowactwem z receptorem TrkA i z niskim powinowactwem z receptorem $p75^{NTR}$. Fosforylacja czynnika transkrypcyjnego JunD prowadzi do aktywacji transkrypcji genu *Nur77*. Kinaza Rsk2 fosforyluje białko Nur77

Nur77 zależna od TCR w tymocytach jest inicjowana przez inne czynniki transkrypcyjne [1, 76, 77] niż w komórkach PC12 stymulowanych NGF (ryc. 2).

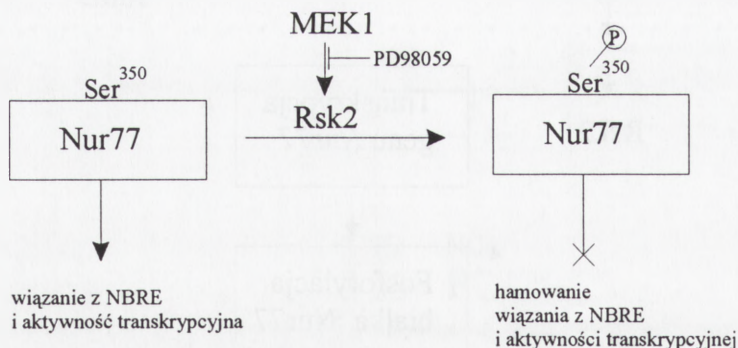
5. REGULACJA FUNKCJI

Funkcja białek rodziny *Nur77* jest regulowana przez:

- liczne fosforylacje reszt seryny w części N-końcowej białek oraz w domenie wiążącej DNA;
- oddziaływanie z innymi receptorami jądrowymi.

5.1. Modyfikacje białka *Nur77* wpływające na jego zdolność do aktywacji transkrypcji genów

Nur77 może być indukowany przez różne szlaki sygnałowe, jednak powstające produkty białkowe znacznie różnią się stopniem fosforylacji. Częsteczka białka *Nur77* jest bogato fosforylowana w komórkach PC12 stymulowanych przez czynnik wzrostowy NGF, natomiast białko *Nur77* produkowane w odpowiedzi na depolaryzację błony komórkowej jest słabo fosforylowane [15]. Dla funkcji *Nur77* zasadnicze znaczenie ma fosforylacja seryny-350 (u szczura; Ser-354 u myszy), która znajduje się w tzw. domenie „A-box” w białku *Nur77* i bierze udział w wiązaniu białka z DNA. Fosforylacja Ser-350 w cząsteczce białka *Nur77* uniemożliwia wiązanie się receptora *Nur77* z sekwencją NBRE [21] oraz uniemożliwia aktywację transkrypcji genów przez *Nur77* (ryc. 4), przynajmniej w przypadku genów reporterowych z sekwencją NBRE w promotorze [30, 24]. W komórkach PC12 traktowanych przy użyciu NGF dochodzi do transkrypcji genu kodującego receptor



RYCINA 4. Regulacja funkcji *Nur77* przez fosforylację Ser-350 w cząsteczce białka. Fosforylacja Ser-350 w cząsteczce białka *Nur77*, dokonywana przez kinazę Rsk2, utrudnia wiązanie się białka *Nur77* z sekwencją NBRE w promotorach genów aktywowanych przez *Nur77* i hamuje aktywację transkrypcji tych genów przez *Nur77*

Nur77, a następnie Ser-350 w cząsteczce białka Nur77 jest fosforylowana przez kinazę Rsk2 [58], która jest aktywowana przez szlak sygnałowy zależny od receptora dla NGF [24] (ryc. 3). Wykazano, że kinaza Akt także może fosforylować Ser-350 w białku Nur77 [45].

5.2. Modyfikacje białka Nur77 prowadzące do eksportu z jądra do cytoplazmy

Ekspresja Nur77 jest indukowana w komórkach linii ludzkiego raka prostaty LNCaP przez tak różne induktory apoptozy, jak: syntetyczne retinoidy, ester forbolu, jonofor Ca^{2+} , etopozyd. Traktowanie tymi związkami prowadzi do translokacji Nur77 z jądra do mitochondrium [29]. Oddziaływanie Nur77 z zewnętrzną błoną mitochondrium prowadzi do uwolnienia cytochromu c z mitochondrium do cytoplazmy [3, 29]. W cytoplazmie cytochrom c powoduje aktywację kaspaz, które rozpoczynają fazę egzekucyjną procesu apoptozy prowadzącą do degradacji DNA i rozpadu komórek na ciała apoptotyczne [37]. W tym wypadku, w szlaku sygnałowym apoptozy, Nur77 bierze udział nie jako czynnik transkrypcyjny, ale działa jak białko adaptorowe (tab. 3), które wiąże się z białkiem błony mitochondrium. Eksport Nur77 z jądra może być warunkiem koniecznym dla przekazania sygnału do rozpoczęcia apoptozy, ale nie jest jeszcze warunkiem wystarczającym, gdyż obserwowano eksport Nur77 z jądra do cytoplazmy w komórkach PC12 stymulowanych czynnikiem wzrostu nerwów [25].

5.3. Heterodimery białek rodziny Nur77

Receptory jądrowe dla hormonów tyroksyny oraz pochodnych witamin A i D tworzą aktywne heterodimery z RXR (receptor typu X retinoidu 9-cis) [11, 26]. Wykazano tworzenie podobnych heterodimerów przez białka rodziny Nur77 z receptorem RXR [17, 47]. Elementem docelowym dla heterodimerów RXR-Nur77 są sekwencje typu DR-5 (ang. *direct repeats*). Heterodimery RXR-Nur77 po przyłączeniu ligandu (retinoid 9-cis) do RXR mają zdolność do aktywacji transkrypcji tych genów docelowych, które mają sekwencje DR-5 w regionie promotorowym [17, 47]. Oddziaływanie receptorów RXR z białkami rodziny Nur77 prowadzi do aktywacji transkrypcji genów docelowych z sekwencjami NBRE, NurRE lub DR-5 w regionach promotorowych (ryc. 5). Dzięki takim powiązaniom szlaków sygnałowych można ingerować w procesy zależne od Nur77 przez zastosowanie syntetycznych retinoidów, które są agonistami lub antagonistami wobec określonego typu receptora RAR (α , β , γ) lub RXR (α , β , γ) [59]. Na przykład traktowanie komórek Jurkat przy użyciu syntetycznych retinoidów CD336 (agonista dla RAR α) lub CD437 (agonista dla RAR γ) prowadziło do zmniejszenia lub zwiększenia, odpowiednio, aktywacji transkrypcji genu reporterowego docelowego dla Nur77 i

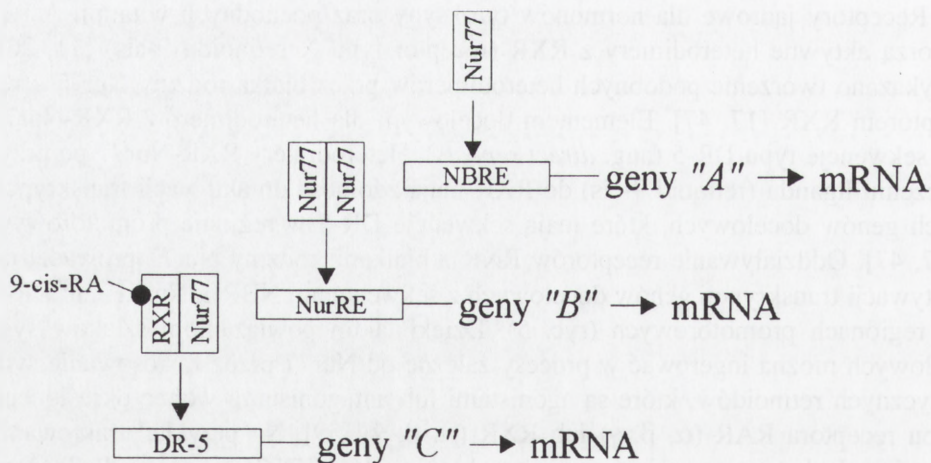
TABELA 3. Udział białek rodziny Nur77 w szlakach sygnałowych

Forma występowania receptora		Funkcja	Rozpoznawana sekwencja DNA	
			motyw	w konfiguracji*
Nur77 jako czynnik transkrypcyjny	monomery: Nur77 Nurr1 Nor-1	aktywacja transkrypcji	NBRE: AAAGGTCA RAAGGTCA	
	homodimery: Nur77+Nur77 Nurr1+Nurr1 Nor-1+Nor-1	aktywacja transkrypcji		NurRE w POMC: TGATATTTACCTCCAAATGCCA konsensus: TGACCTTTNNNNNAAAGGTCA
	heterodimery RXR+Nur77 RXR+Nurr1	aktywacja transkrypcji	AGGTCA	DR-5: AGGTCANNNAAGGTCA
	Nur77+GR	blokuje wiązanie GR z:	AGAACA	IR-3
	Nur77+COUP	blokuje wiązanie COUP z:	RGGTCA	DR-x, IR-x
Nur77 jako białko adaptorowe	Nur77+ nieznane białko mitochondrium	indukcja apoptozy		

*konfiguracje motywów DNA rozpoznawanych przez receptory jądrowe:

DR-x (ang. *direct repeats*) – kierunek sekwencji motywów $\rightarrow (N)_x \rightarrow$

IRx (ang. *inverted repeats*) – kierunek sekwencji motywów $\rightarrow (N)_x \leftarrow$



RYCINA 5. Nur77 jako przekaźnik transkrypcji genów zawierających NBRE, NurRE lub DR-5 w promotorze, szczegóły w tekście

apoptozy komórek Jurkat traktowanych przeciwciałami anti-CD3 [62]. Nur77 tworzy heterodimery także z COUP-TF [71] (ang. *chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor*), represorem, który wiąże się z sekwencjami w genach docelowych dla receptorów RAR lub receptora witaminy D. Wykazano także, że receptor glikokortykoidów w obecności deksametazonu (syntetyczny ligand receptora glikokortykoidów) hamował aktywację transkrypcji przez Nur77 [49]. Białka rodziny Nur77 ze względu na możliwość tworzenia homo- i heterodimerów (tab. 3) funkcjonują w miejscu rozgałęzienia różnych szlaków sygnałowych.

6. PODSUMOWANIE

Receptory jądrowe rodziny Nur77 (Nur77, Nurr1, Nor-1) pełnią istotne funkcje w takich procesach, jak:

- proces apoptozy, który jest odpowiedzialny za eliminację w grasicy niedojrzałych tymocytów mogących rozpoznawać własne antygeny organizmu;
- biosynteza i uwalnianie hormonów układu neuroendokrynnego z przysadki i nadnerczy;
- różnicowanie komórek nerwowych (niezbędny udział Nurr1 w rozwoju neuronów produkujących dopaminę).

Pełnienie przez białka rodziny Nur77 różnorodnych funkcji jest możliwe dzięki funkcjonowaniu tych białek zarówno w formie monomeru, jak i w połączeniu z innymi receptorami jądrowymi (tab. 3). Ekspresja i funkcja Nur77 jest regulowana na poziomie transkrypcji genu i licznych fosforylacji białka, z których tylko część została poznana (ryc. 3). Oddziaływanie Nur77 i Nurr1 z receptorami RXR, COUP-TF, receptorami glikokortykoidów wpływa na ich funkcję (jako aktywatorów lub represorów transkrypcji) oraz prowadzi do zmiany zestawu transkrybowanych genów. Oznacza to, że białka rodziny Nur77 biorą udział w miejscach krzyżowania się szlaków sygnałowych zależnych od receptorów zewnątrzkomórkowych dla czynników wzrostowych (m.in. NGF), hormonów (np. kortykoliberyny, adrenokortykotropiny, parathormonu), antygenów (receptor komórek T) ze szlakami sygnałowymi kontrolowanymi przez ligandy receptorów jądrowych (glikokortykoidy, pochodne witaminy A). Obrazowo funkcję Nur77 można przedstawić jako „przełącznik” na skrzyżowaniu dróg sygnałowych, który po dokonaniu interpretacji informacji odebranych z różnych szlaków sygnałowych prowadzi do przełączenia transkrypcji pomiędzy zestawami docelowych genów (ryc. 5). Oprócz pełnienia roli czynnika transkrypcyjnego, po pewnych modyfikacjach (fosforylacje) Nur77 może być transportowany z jądra do cytoplazmy, gdzie pełni funkcję białka adaptorowego. Jedną z nich może być dostarczenie do mitochondrium informacji o realizacji programu śmierci komórki (apoptoza).

Nieprawidłowa regulacja funkcji Nur77 w procesie selekcji negatywnej tymocytów może być jedną z przyczyn powstawania klonów komórek T z receptorami skierowanymi przeciwko własnym antygenom. Defekt Nurr1 w rozwoju komórek dopaminergicznych prowadzi do choroby Parkinsona. Możliwe, że niektóre zmiany patologiczne zachodzące w komórkach nerwowych są związane z nieprawidłowym funkcjonowaniem szlaków sygnałowych związanych z Nur77, który w wyniku nieprawidłowej ekspresji i funkcji mógłby inicjować w komórkach nerwowych szlaki sygnałowe prowadzące do apoptozy, podobnie jak zachodzi to w prawidłowych tymocytach. Wiedza na temat udziału Nur77 w szlakach sygnałowych kontrolujących proliferację i apoptozę może pomóc w planowaniu odpowiednich strategii terapeutycznych.

LITERATURA

- [1] BLAESER F, HO N, PRYWES R, CHATILA TA. Ca^{2+} -dependent gene expression mediated by MEF2 transcription factors. *J Biol Chem* 2000; **275**: 197–209.
- [2] BRAS A, ALBAR JP, LEONARDO E, DE BUITRAGO GG, MARTINEZ-A C. Ceramide-induced cell death is independent of the Fas/Fas ligand pathway and is prevented by Nur77 overexpression in A20 B cells. *Cell Death Differ* 2000; **7**: 262–271.
- [3] BRENNER C, KROEMER G. Mitochondria – the death signal integrators. *Science* 2000; **289**: 1150–1151.
- [4] CASTILLO SO, XIAO Q, LYU MS, KOZAK CA, NIKODEM VM. Organization, sequence, chromosomal localization, and promoter identification of the mouse orphan nuclear receptor Nurr1 gene. *Genomics* 1997; **41**: 250–257.
- [5] CASTRO DS, ARVIDSSON M, BONDESSON BOLIN M, PERLMANN T. Activity of the Nurr1 carboxyl-terminal domain depends on cell type and integrity of the activation function 2. *J Biol Chem* 1999; **274**: 37483–37490.
- [6] CHAN FKM, ZHANG J, CHENG L, SHAPIRO DN, WINOTO A. Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16^{ink4}. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 2682–2688.
- [7] CHAN FKM, CHEN A, WINOTO A. Thymic expression of the transcription factor Nur77 rescues the T cell but not the B cell abnormality of *gld/gld* mice. *J Immunol* 1998; **161**: 4252–4256.
- [8] CHANG C, KOKONTIS J, LIAO S, CHANG Y. Isolation and characterization of human TR3 receptor: a member of steroid receptor superfamily. *J Steroid Biochem* 1989; **34**: 391–395.
- [9] CHENG LEC, CHAN FKM, CADOD, WINOTO A. Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis. *EMBO J* 1997; **16**: 1865–1875.
- [10] CRAWFORD PA, SADOVSKY Y, WOODSON K, LEE SL, MILBRANDT J. Adrenocortical function and regulation of the steroid 21-hydroxylase gene in NGFI-B-deficient mice. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 4331–4336.
- [11] CZEKAJ P. Interakcje receptorów hormonu tarczycy i pochodnych witamin A i D z DNA. *Post Biol Kom* 1996; **23**: 261–278.
- [12] DAVIS IJ, LAU LF. Endocrine and neurogenic regulation of the orphan nuclear receptors Nur77 and Nurr-1 in the adrenal glands. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 3469–3483.

- [13] DROUIN J, MAIRA M, PHILIPS A. Novel mechanism of action for Nur77 and antagonism by glucocorticoids: a convergent mechanism for CRH activation and glucocorticoid repression of POMC gene transcription. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998; **65**: 59–63.
- [14] ENMARK E, GUSTAFSSON JA. Orphan nuclear receptors – the first eight years. *Mol Endocrinol* 1996; **10**: 1293–1307.
- [15] FAHRNER TJ, CARROLL SL, MILBRANDT J. The NGFI-B protein, an inducible member of the thyroid/steroid receptor family, is rapidly modified posttranslationally. *Mol Cell Biol* 1990; **10**: 6454–6459.
- [16] FERNANDEZ PM, BRUNEL F, JIMENEZ MA, SAEZ JM, CEREGHINI S, ZAKIN MM. Nuclear receptors Nor1 and NGFI-B/Nur77 play similar, albeit distinct, roles in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology* 2000; **141**: 2392–2400.
- [17] FORMAN BM, UMESONO K, CHEN J, EVANS RM. Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. *Cell* 1995; **81**: 541–550.
- [18] GREENE LA, ALETTA JM, RUKENSTEIN A, GREEN SH. PC12 pheochromocytoma cells: culture, nerve growth factor treatment, and experimental exploitation. *Meth Enzymol* 1987; **147**: 207–216.
- [19] HAZEL TG, NATHANS D, LAU LF. A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 8444–8448.
- [20] HAZEL TG, MISRA R, DAVIS IJ, GREENBERG ME, LAU LF. Nur77 is differentially modified in PC12 cells upon membrane depolarization and growth factor treatment. *Mol Cell Biol* 1991; **11**: 3239–3246.
- [21] HIRATA Y, KIUCHI K, CHEN HC, MILBRANDT J, GUROFF G. The phosphorylation and DNA binding of the DNA-binding domain of the orphan nuclear receptor NGFI-B. *J Biol Chem* 1993; **268**: 24808–24812.
- [22] ICHINOSE H, OHYE T, SUZUKI T, SUMI-ICHINOSE C, NOMURA T, HAGINO Y, NAGATSU T. Molecular cloning of the human Nurr1 gene: characterization of the human gene and cDNAs. *Gene* 1999; **230**: 233–239.
- [23] KANG HJ, SONG MJ, CHOUNG SY, KIM SJ, LE MO. Transcriptional induction of Nur77 by indomethacin that results in apoptosis of colon cancer cells. *Biol Pharmaceut Bull* 2000; **23**: 815–819.
- [24] KATAGIRI Y, HIRATA Y, MILBRANDT J, GUROFF G. Differential regulation of the transcriptional activity of the orphan nuclear receptor NGFI-B by membrane depolarization and nerve growth factor. *J Biol Chem* 1997; **272**: 31278–31284.
- [25] KATAGIRI Y, TAKEDA K, YU ZX, FERRANS VJ, OZATO K, GUROFF G. Modulation of retinoid signalling through NGF-induced nuclear export of NGFI-B. *Nat Cell Biol* 2000; **2**: 435–440.
- [26] KWIATKOWSKA D, KWIATKOWSKA-KORCZAK J. Kwas retinowy: jego metabolizm i mechanizm działania. *Post Biol Kom* 1999; **26**: 579–592.
- [27] LAW SW, CONNEELY OM, DEMAYO FJ, O'MALLEY BW. Identification of a new brain-specific transcription factor, NURR1. *Mol Endocrinol* 1992; **6**: 2129–2135.
- [28] LEE SL, WESSELSCHMIDT RL, LINETTE GP, KANAGAWA O, RUSSELL JH, MILBRANDT J. Unimpaired thymic and peripheral T cell death in mice lacking the nuclear receptor NGFI-B (Nur77). *Science* 1995; **269**: 532–535.
- [29] LI H, KOLLURI SK, GU J, DAWSON MI, CAO X, HOBBS PD, LIN B, CHEN GQ, LU JS, LIN F, XIE Z, FONTANA JA, REED JC, ZHANG XK. Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3. *Science* 2000; **289**: 1159–1164.
- [30] LI Y, LAU LF. Adrenocorticotrophic hormone regulates the activities of the orphan nuclear receptor Nur77 through modulation of phosphorylation. *Endocrinology* 1997; **138**: 4138–4146.

- [31] LI Y, LIN B, AGADIR A, LIU R, DAWSON MI, REED JC, FONTANA JA, BOST F, HOBBS PD, ZHENG Y, CHEN GQ, SHROOT B, MERCOLA D, ZHANG XK. Molecular determinants of AHPN (CD437)-induced growth arrest and apoptosis in human lung cancer cell lines. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 4719–4731.
- [32] LIU ZG, SMITH SW, MCLAUGHLIN KA, SCHWARTZ LM, OSBORNE BA. Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene nur77. *Nature* 1994; **367**: 281–284.
- [33] MAIRA M, MARTENS C, PHILIPS A, DROUIN J. Heterodimerization between members of the Nur subfamily of orphan nuclear receptors as a novel mechanism for gene activation. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 7549–7557.
- [34] MARUYAMA K, TSUKADA T, BANDO S, SASAKI K, OHKURA N, YAMAGUCHI K. Expression of the putative transcription factor NOR-1 in the nervous, the endocrine and the immune systems and the developing brain of the rat. *Neuroendocrinology* 1997; **65**: 2–8.
- [35] MATUSZYK J, STRZĄDAŁA L. Szlaki przekazywania sygnału i ich rola w dojrzewaniu i funkcji limfocytów T. *Post Hig Med Dośw* 1997; **51**: 351–365.
- [36] MATUSZYK J, KOBZDEJ M, ZIOŁO E, KAŁAS W, KISIELOW P, STRZĄDAŁA L. Thymic lymphomas are resistant to Nur77-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **249**: 279–282.
- [37] MATUSZYK J, KAŁAS W, KOZICKI R, STRZĄDAŁA L. Rola białka Vav w zamianie informacji o oddziaływaniach TCR z kompleksem MHC/peptyd na sygnały inicjujące pozytywną lub negatywną selekcję tymocytów. *Post Hig Med Dośw* 1999; **53**: 531–543.
- [38] NUCLEAR RECEPTORS NOMENCLATURE COMMITTEE. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 1999; **97**: 161–163.
- [39] OHKUBO T, OHKURA N, MARUYAMA K, SASAKI K, NAGASAKI K, HANZAWA H, TSUKADA T, YAMAGUCHI K. Early induction of the orphan nuclear receptor NOR-1 during cell death of the human breast cancer cell line MCF-7. *Mol Cell Endocrinol* 2000; **162**: 151–156.
- [40] OHKURA N, HIJIKURO M, YAMAMOTO A, MIKI K. Molecular cloning of a novel thyroid/steroid receptor superfamily gene from cultured rat neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **205**: 1959–1965.
- [41] OHKURA N, ITO M, TSUKADA T, SASAKI K, YAMAGUCHI K, MIKI K. Structure, mapping and expression of a human NOR-1 gene, the third member of the Nur77/NGFI-B family. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1308**: 205–214.
- [42] OHKURA N, ITO M, TSUKADA T, SASAKI K, YAMAGUCHI K, MIKI K. Alternative splicing generates isoforms of human neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) mRNA. *Gene* 1998; **211**: 79–85.
- [43] OKABE T, TAKAYANAGI R, ADACHI M, IMASAKI K, NAWATA H. Nur77, a member of the steroid receptor superfamily, antagonizes negative feedback of ACTH synthesis and secretion by glucocorticoid in pituitary corticotrope cells. *J Endocrinol* 1998; **156**: 169–175.
- [44] PAULSEN RE, WEAVER CA, FAHRNER TJ, MILBRANDT J. Domains regulating transcriptional activity of the inducible orphan receptor NGFI-B. *J Biol Chem* 1992; **267**: 16491–16496.
- [45] PEKARSKY Y, HALLAS C, PALAMARCHUK A, KOVAL A, BULLRICH F, HIRATA Y, BICHI R, LETOFSKY J, CROCE CM. Akt phosphorylates and regulates the orphan nuclear receptor Nur77. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 3690–3694.
- [46] PENA DE ORTIZ S, JAMIESON GA JR. HZF-3, an immediate-early orphan receptor homologous to NURR1/NOT: induction upon membrane depolarization and seizures. *Brain Res Mol Brain Res* 1996; **38**: 1–13.
- [47] PERLMANN T, JANSSON L. A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes Dev* 1995; **9**: 769–782.

- [48] PHILIPS A, LESAGE S, GINGRAS R, MAIRA MH, GAUTHIER Y, HUGO P, DROUIN J. Novel dimeric Nur77 signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells. *Mol Cell Biol* 1997; **17**: 5946–5951.
- [49] PHILIPS A, MAIRA M, MULLICK A, CHAMBERLAND M, LESAGE S, HUGO P, DROUIN J. Antagonism between Nur77 and glucocorticoid receptor for control of transcription. *Mol Cell Biol* 1997; **17**: 5952–5959.
- [50] RABIZADEH S, BITLER CM, BUTCHER LL, BREDESEN DE. Expression of the low-affinity nerve growth factor receptor enhances β -amyloid peptide toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 10703–10706.
- [51] RAFF MC, BARRES BA, BURNE JF, COLES HS, ISHIZAKI Y, JACOBSON MD. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* 1993; **262**: 695–699.
- [52] RYSECK RP, MACDONALD-BRAVO H, MATTEI MG, RUPPERT S, BRAVO R. Structure, mapping and expression of a growth factor inducible gene encoding a putative nuclear hormonal binding receptor. *EMBO J* 1989; **8**: 3327–3335.
- [53] SAUCEDO-CARDENAS O, KARDON R, EDIGER TR, LYDON JP, CONNEELY OM. Cloning and structural organization of the gene encoding the murine nuclear receptor transcription factor, NURR1. *Gene* 1997; **187**: 135–139.
- [54] SAUCEDO-CARDENAS O, QUINTANA-HAU JD, LE WD, SMIDT MP, COX JJ, DE MAYO F, BURBACH JP, CONNEELY OM. Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 4013–4018.
- [55] SCEARCE LM, LAZ TM, HAZEL TG, LAU LF, TAUB R. RNR-1, a nuclear receptor in the NGFI-B/Nur77 family that is rapidly induced in regenerating liver. *J Biol Chem* 1993; **268**: 8855–8861.
- [56] SŁOMCZYŃSKA M. Receptory hormonów steroidowych – budowa i funkcja. *Post Biol Kom* 1995; **22**: 3–21.
- [57] STOCCO CO, ZHONG L, SUGIMOTO Y, ICHIKAWA A, LAU LF, GIBORI G. Prostaglandin F₂ α -induced expression of 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase involves the transcription factor NUR77. *J Biol Chem* 2000; **275**: 37202–37211.
- [58] SWANSON KD, TAYLOR LK, HAUNG L, BURLINGAME AL, LANDRETH GE. Transcription factor phosphorylation by pp90rsk2. *J Biol Chem* 1999; **274**: 3385–3395.
- [59] SZONDY Z, REICHERT U, FESUS L. Retinoic acids regulate apoptosis of T lymphocytes through an interplay between RAR and RXR receptors. *Cell Death Differ* 1998; **5**: 4–10.
- [60] TETRADIS S, BEZOUGLAIA O, TSINGOTJIDOU A, VILA A. Regulation of the orphan receptor Nur77 in bone by parathyroid hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **281**: 913–916.
- [61] TORII T, KAWARAI T, NAKAMURA S, KAWAKAMI H. Organization of the human orphan nuclear receptor Nurr1 gene. *Gene* 1999; **230**: 225–232.
- [62] TOTH R, SZEGEZDI E, REICHERT U, BERNARDON JM, MICHEL S, ANCIAN P, KIS-TOTH K, MACSARI Z, FESUS L, SZONDY Z. Activation-induced apoptosis and cell surface expression of Fas (CD95) ligand are reciprocally regulated by retinoic acid receptor α and γ and involve nur77 in T cells. *Eur J Immunol* 2001; **31**: 1382–1391.
- [63] UEMURA H, CHANG C. Antisense TR3 orphan receptor can increase prostate cancer cell viability with etoposide treatment. *Endocrinology* 1998; **139**: 2329–2334.
- [64] WATSON MA, MILBRANDT J. The NGFI-B gene, a transcriptionally inducible member of the steroid receptor gene superfamily: genomic structure and expression in rat brain after seizure induction. *Mol Cell Biol* 1989; **9**: 4213–4219.
- [65] WEIH F, RYSECK RP, CHEN L, BRAVO R. Apoptosis of nur77/N10-transgenic thymocytes involves the Fas/Fas ligand pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 5533–5538.

- [66] WILSON TE, FAHRNER TJ, JOHNSTON M, MILBRANDT J. Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science* 1991; **252**: 1296–1300.
- [67] WILSON TE, FAHRNER TJ, MILBRANDT J. The orphan receptors NGFI-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction. *Mol Cell Biol* 1993; **13**: 5794–5804.
- [68] WILSON TE, MOUW AR, WEAVER CA, MILBRANDT J, PARKER KL. The orphan nuclear receptor NGFI-B regulates expression of the gene encoding steroid 21-hydroxylase. *Mol Cell Biol* 1993; **13**: 861–868.
- [69] WORONICZ JD, CALNAN B, NGO V, WINOTO A. Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T-cell hybridomas. *Nature* 1994; **367**: 277–281.
- [70] WORONICZ JD, LINA A, CALNAN BJ, SZYCHOWSKI S, CHENG L, WINOTO A. Regulation of the Nur77 orphan steroid receptor in activation-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 6364–6376.
- [71] WU Q, LI Y, LIU R, AGADIR A, LEE MO, LIU Y, ZHANG X. Modulation of retinoic acid sensitivity in lung cancer cells through dynamic balance of orphan receptors nur77 and COUP-TF and their heterodimerization. *EMBO J* 1997; **16**: 1656–1669.
- [72] XIAO Q, CASTILLO SO, NIKODEM VM. Distribution of messenger RNAs for the orphan nuclear receptor Nurr1 and Nur77 (NGFI-B) in adult rat brain using *in situ* hybridization. *Neuroscience* 1996; **75**: 221–230.
- [73] YAAR M, ZHAI Š, PILCH PF, DOYLE SM, EISENHAUER PB, FINE RE, GILCHREST BA. Binding of β -amyloid to the p75 neurotrophin receptor induces apoptosis. A possible mechanism for Alzheimer's disease. *J Clin Invest* 1997; **100**: 2333–2340.
- [74] YOON JK, LAU LF. Transcriptional activation of the inducible nuclear receptor gene nur77 by nerve growth factor and membrane depolarization in PC12 cells. *J Biol Chem* 1993; **268**: 9148–9155.
- [75] YOON JK, LAU LF. Involvement of JunD in transcriptional activation of the orphan receptor gene nur77 by nerve growth factor and membrane depolarization in PC12 cells. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 7731–7743.
- [76] YOUN HD, SUN L, PRYWES R, LIU JO. Apoptosis of T cells mediated by Ca^{2+} -induced release of the transcription factor MEF2. *Science* 1999; **286**: 790–793.
- [77] YOUN HD, LIU JO. Cabin1 represses MEF2-dependent Nur77 expression and T cell apoptosis by controlling association of histone deacetylases and acetylases with MEF2. *Immunity* 2000; **13**: 85–94.
- [78] ZETTERSTROM RH, SOLOMIN L, JANSSON L, HOFFER BJ, OLSON L, PERLMANN T. Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science* 1997; **276**: 248–250.

Redaktorzy prowadzący – Jerzy Kawiak i Barbara Płytycz

Otrzymano: 03.08.2001 r.

Przyjęto: 29.10.2001 r.

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

E-mail: matuszyk@iitd.pan.wroc.pl

PROFILOWANIE EKSPRESJI GENÓW KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

GENE EXPRESSION PROFILING OF TUMOR CELLS

Joanna CICHY

Zakład Immunologii, Instytut Biologii Molekularnej UJ, Kraków

Streszczenie: Jednym z ważniejszych wyzwań w badaniach nad rakiem jest określenie zmian odpowiedzialnych za rakowacenie komórek i tworzenie się przerzutów. Upřednie badania koncentrowały się na zidentyfikowaniu roli pojedynczych genów w tych procesach. Obecnie, możliwość przekształcenia normalnych ludzkich komórek w komórki nowotworowe za pomocą zdefiniowanych elementów genetycznych, jak również profilowanie ekspresji genów przy użyciu matryc DNA rewolucjonizuje nasze podejście do badań nad rakiem.

(*Postępy Biologii Komórki* 2002; 29: 81–86)

Słowa kluczowe: nowotwór, przerzuty, telomeraza, retinoblastoma, p53, RhoC, fibronektyna, tymozyna β 4.

Summary: For biologists studying cancer, a major challenge is to identify the underlying molecular changes that switch cells to tumorigenic and metastatic state. Previous research has focused on the contribution of individual genes to tumour formation and metastasis. Now, creation of human tumour cells with defined genetic elements as well as gene-expression profiling using DNA microarrays, is revolutionizing our approach to study cancer.

(*Advances in Cell Biology* 2002; 29: 81–86)

Key words: tumour, metastasis, telomerase, retinoblastoma, p53, RhoC, fibronectin, thymosin β 4.

Nasza ograniczona wiedza dotycząca biologii komórek nowotworowych jest czynnikiem blokującym postęp w leczeniu raka. Ogólnie przyjmuje się, że powstawanie nowotworu jest wynikiem kumulatywnych zmian genetycznych o charakterze: mutacji punktowych, amplifikacji, translokacji lub delecji, którym podlegają głównie geny kontrolujące wzrost i różnicowanie komórek. Dotyczy to między innymi genów z rodziny *ras*, których produkty jako czynniki wiążące GTP pośredniczą w głównych etapach odpowiedzi komórkowej na sygnał wywołany czynnikami wzrostu, jak

również genów retinoblastomy (*Rb*) i *p53* [1,4]. Osoby, które oddziedziczą tylko jedną funkcjonalną kopię genów *Rb* lub *p53*, wykazują predyspozycję do zachorowań na raka. W odróżnieniu od białka *Rb*, które występuje w komórkach w dużej ilości i w drodze regulacji wiąże czynnik odpowiedzialny za proliferację komórek, białko *p53* pojawia się w komórce głównie w warunkach ekstremalnych, np. związanych z uszkodzeniem wywołanym ekspozycją na światło UV lub promieniowaniem γ . Białko *p53* przez zahamowanie podziałów komórkowych nie dopuszcza do przeniesienia powstałych uszkodzeń w obrębie DNA na potomne komórki. Zarówno białko *Rb*, jak i *p53* są częstym przedmiotem ataku wirusów, które aktywują proliferację komórek wytwarzając czynniki wiążące *Rb* lub *p53* albo obydwie białka (*Rb*, *p53*), jak to ma miejsce w przypadku dużego antygeny T wirusa SV40 [1].

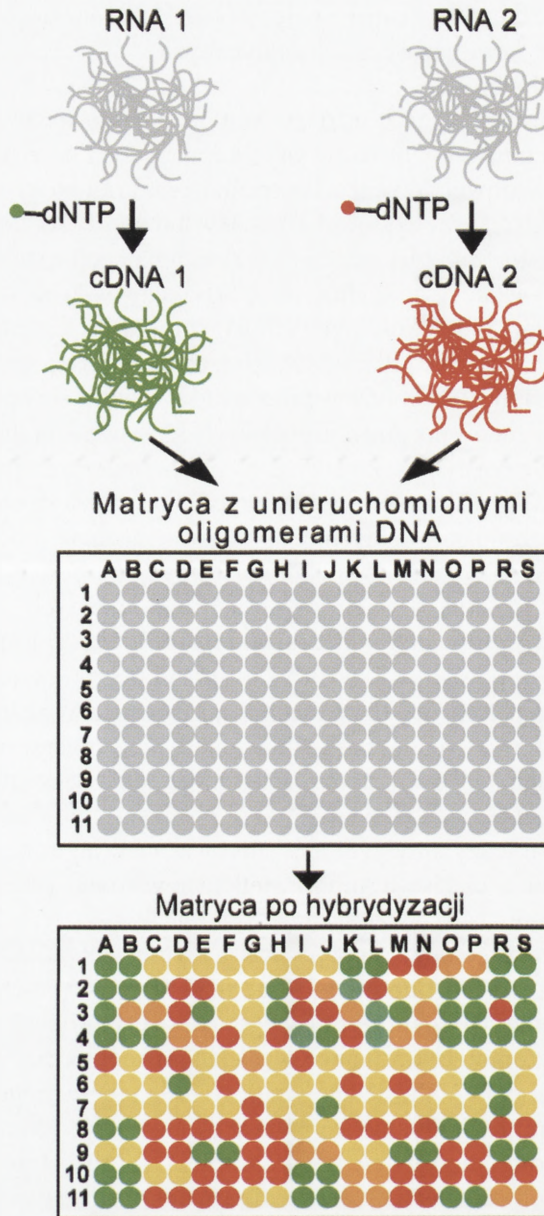
Na przestrzeni ostatnich lat dużo wysiłku włożono w znalezienie modelu do badań rakowacenia ludzkich komórek *in vitro*, który mógłby ułatwić zrozumienie mechanizmów warunkujących powstawanie raka. Jak do tej pory przekształcenie normalnej ludzkiej komórki w komórkę nowotworową wymagało użycia następujących strategii: zastosowania chemicznych lub fizycznych czynników „nieśmiertelniających” komórki, wyselekcjonowania spośród hodowanych komórek niewielu, spontanicznie pojawiających się komórek nowotworowych lub wprowadzenia do normalnych komórek całego genomu wirusowego [3,10,11,14,18]. Wadą wymienionych zabiegów okazała się ich mała skuteczność i trudność w zdefiniowaniu zmian koniecznych do wywołania transformacji nowotworowej. W odróżnieniu od komórek ludzkich, komórki mysie lub szczurze można przekształcić w komórki nowotworowe w wyniku jednoczesnej ekspresji kilku współdziałających onkogenów. Jedną z cech, jakie odróżniają komórki ludzkie od komórek gryzoni, jest brak w większości normalnych komórek ludzkich telomerazy, enzymu warunkującego wydłużanie końcowych odcinków chromosomów-telomerów. Postuluje się, że komórki ludzkie wykorzystują mechanizm skracania telomerów do określania liczby podziałów, jakie przeszły i że ten mechanizm jest odpowiedzialny za zahamowanie wzrostu ludzkich komórek po określonej liczbie podziałów [8,9,16,17,].

Jeśli do pierwotnych ludzkich komórek nabłonkowych lub fibroblastów wprowadzi się jednocześnie geny kodujące duży antygen T wirusa SV40, zmutowaną, onkogeną formę *H-ras* i telomerazę, to komórki ludzkie podobnie jak komórki gryzoni ulegają transformacji nowotworowej [7]. Możliwość przekształcenia normalnych ludzkich komórek w komórki nowotworowe za pomocą kilku zdefiniowanych elementów genetycznych może stanowić o przełomie w zrozumieniu zjawiska transformacji nowotworowej.

Powstanie nowotworu i jego inwazyjność (zdolność do tworzenia przerzutów) znajdują się pod kontrolą różnych genów [1, 7]. Nie wiadomo, na jakim etapie rozwoju komórki nowotworowe nabywają zdolności do tworzenia przerzutów. Jeśli jednak komórki nowotworowe staną się inwazyjne, to zdolność ta utrzymuje się. W procesie powstawania przerzutów nowotworowych można wyróżnić kilka etapów:

- i) kolonizację otaczających tkanek, najczęściej tkanki łącznej,
- ii) inwazję naczyń krwionośnych i limfatycznych,
- iii) wyjście z krwioobiegu,
- iv) powstanie wtórnych ognisk wzrostu komórek nowotworowych.

Powstawanie przerzutów nowotworowych stanowi jeden z najgroźniejszych aspektów choroby nowotworowej. Wysoka śmiertelność, która towarzyszy rakowi, jest w większości przypadków spowodowana rozsiewaniem się komórek nowotworowych, któremu nie można zapobiec przy wykorzystaniu obecnie stosowanych terapii antynowotworowych. Dlatego jednym z ważniejszych wyzwań w badaniach nad rakiem jest zdefiniowanie molekularnych zmian warunkujących zdolność komórek nowotworowych do tworzenia przerzutów. Uprzednie badania koncentrowały się na określeniu roli pojedynczych genów w procesie rozsiewania się komórek. Obecnie, profilowanie ekspresji genów przy użyciu gotowych matryc zawierających od kilkuset do kilkunastu tysięcy swoistych sekwencji DNA (*DNA microarrays*) może ułatwić badanie i klasyfikowanie nowotworów złośliwych. Dzięki zsekwencjonowaniu genomu ludzkiego stworzono bazy danych obejmujące sekwencje tysięcy genów. Choć geny te w wielu przypadkach można zaszeregować pod względem funkcji do określonych klas, ich rola w wielu procesach biologicznych pozostaje niewyjaśniona. Ważnym krokiem w kierunku zrozumienia roli tych genów jest określenie profilu ich ekspresji, tj. porównanie wzorów ekspresji genów w różnych tkankach lub na różnych etapach rozwoju tkankowego, jak również w tkankach zdrowych i zmienionych chorobowo. Technika profilowania genetycznego, która umożliwia zbadanie ekspresji wielu genów jednocześnie, wydaje się szczególnie obiecująca w przypadkach, kiedy dane zjawisko biologiczne jest wynikiem wielu nakładających się zmian. Dotyczy to między innymi procesu rakowacenia i przerzutowania komórek [1]. W celu porównania ekspresji genów w tkance zdrowej i nowotworowej lub w komórkach przerzutujących i nieinwazyjnych należy wyizolować z tych tkanek lub komórek RNA, a następnie na matrycy RNA zsyntetyzować cDNA przy użyciu znakowanych izotopowo lub fluorescencyjnie nukleotydów. W efekcie otrzymuje się pulę znakowanego cDNA reprezentującego całkowity produkt ekspresji genów aktywnych w danej komórce lub tkance w badanym momencie. Do identyfikacji genów w badanej puli cDNA służą sondy molekularne unieruchomione na matrycy (*microarray*), do której hybryduje się wyznakowany cDNA. Matryca najczęściej zawiera syntetyczne oligomery DNA lub produkty PCR [13]. Hybrydyzacji cDNA, pochodzącego z dwóch badanych układów, można dokonać na dwóch identycznych matrycach lub w przypadku znakowanego fluorescencyjnie cDNA na tej samej matrycy pod warunkiem, że cDNA pochodzący z komórek, które porównuje się między sobą, został wyznakowany za pomocą fluorochromów o różnej barwie. Jeśli określoną ilość cDNA pochodzącego z komórek normalnych wyznakowano np. na zielono, a porównywalną ilość cDNA pochodzącego z komórek nowotworowych na czerwono, to w wyniku jednoczesnej hybrydyzacji do tej samej matrycy



RYCINA 1. Analiza ekspresji genów przy wykorzystaniu matryc DNA: Porównywalne ilości RNA z próbek 1 i 2 (RNA1, RNA2) poddano odwrotnej transkrypcji przy użyciu znakowanych zielonym i czerwonym fluorochromem nukleotydów (dNTP). Wyznakowany cDNA z obydwu próbek zhybrydowano z matrycą (każda plamka reprezentuje inną sekwencję DNA). Po hybrydyzacji otrzymano czerwone, zielone i żółte plamki, które odpowiadają odpowiednio: zwiększonej ekspresji określonych genów w próbce 1, np. A1, B1; zwiększonej ekspresji określonych genów w próbce 2, np. D2, E2 oraz porównywalnej ekspresji określonych genów w obydwu próbkach, np. C1, D1

obydwu typów cDNA można otrzymać czerwony, zielony lub żółty produkt, który będzie wskazywał albo na przewagę ekspresji danego genu w komórkach nowotworowych (kolor czerwony), na zwiększoną ekspresję tego genu w komórkach normalnych (kolor zielony) lub na taki sam poziom ekspresji badanego genu w obydwu typach komórek (kolor żółty). Strategię profilowania ekspresji genów przy użyciu sond fluorescencyjnych przedstawiono na rycinie 1.

W wyniku analizy ekspresji genów w komórkach czerniaka, jednego z najbardziej złośliwych nowotworów wyłoniono kilka genów, których zwiększona ekspresja koreluje z inwazyjnością komórek. Właściwości inwazyjne linii komórek mysiego (B16F10) lub ludzkiego (A375) czerniaka można modulować poprzez warunki pasażu [12]. Jeśli pasaż prowadzi się na zwierzętach, to komórki czerniaka zachowują cechy inwazyjne. Kilka pasaży w warunkach *in vitro* prowadzi do drastycznego zmniejszenia cech inwazyjności, a nawet, jeśli pasaże *in vitro* są wykonywane odpowiednio długo, do całkowitego zaniku właściwości inwazyjnych. Tym sposobem, komórki czerniaka można rozfrakcjonować na komórki przerzutujące i nieinwazyjne. Porównanie wzorów aktywnych genów w obydwu frakcjach komórek ujawnia wspólną dla ludzkich i mysich komórek inwazyjnych, zwiększoną ekspresję genów kodujących fibronektynę, tymozynę $\beta 4$ i białko *RhoC* [5]. Podwyższona ekspresja fibronektyny, składnika macierzy zewnątrzkomórkowej może świadczyć o wykorzystywaniu tego białka przez komórki inwazyjne jako podścieliska do kolonizacji okolicznych tkanek. Nie wiadomo, w jaki sposób zwiększenie ekspresji tymozyny $\beta 4$ (białka wiążącego monomery aktyny) i *RhoC* (białka hydrolizującego GTP) sprzyja inwazji, ale jest prawdopodobne, że rola obu cząsteczek w tym procesie jest wynikiem ich wpływu na migrację komórek [15]. Na uwagę zasługuje fakt, że transfekcja komórek o słabych zdolnościach do tworzenia przerzutów za pomocą genu kodującego białko *RhoC* znacząco zwiększa inwazyjność tych komórek [5].

W przebadanych do tej pory nowotworach złośliwych, profil ekspresji genów nie jest na tyle unikalny, aby mieć wymiar genetycznego „odcisku palca” komórki inwazyjnej, innymi słowy znając profil aktywnych genów w danej komórce nie można stwierdzić, czy mamy do czynienia z komórką przerzutującą. Jednakże, dzięki zastosowaniu techniki profilowania ekspresji genów wykazano, że nowotwory złośliwe posiadają charakterystyczne wzory aktywnych genów, które mogą stanowić podstawę lepszej klasyfikacji nowotworów [2, 6].

LITERATURA

- [1] ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WATSON JD. Cancer. [w] Molecular biology of the cell. Garland Publishing, Inc. New York and London, 1994:1255–1294.
- [2] BITTNER M, MELTZER P, CHEN Y, JIANG Y, SEFTOR E, HENDRIX M, RADMACHER M, SIMON R, YAKHINI Z, BEN-DOR A, SAMPAS N, DOUGHERTY E, WANG E, MARINCOLA F, GOODEN C, LUEDERS J, GLADFELTER A, POLLOCK P, CARPTEN J,

- GILLANDERS E, LEJA D, DIETRICH K, BEAUDRY C, BERENS M, ALBERTS D, SONDAK V, HAYWARD N, TRENT J. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* 2000; **406**: 536–540.
- [3] BURGER AM, FIEBIG HH, KUETTEL MR, LAUTENBERGER JA, KUNG HF, RHIM JS. Effect of oncogene expression on telomerase activation and telomere length in human endothelial, fibroblast and prostate epithelial cells. *Int J Oncol* 1998; **13**: 1043–1048.
- [4] CHIN L, TAM A, POMERANTZ J, WONG M, HOLASH J, BARDEESY N, SHEN Q, OHAGAN R, PATGINS J, ZHOU H, HORNER II JW, CORDON-CARDO C, YANCOPOULOS GD, DEPINHO RA. Essential role of oncogenic Ras in tumour maintenance. *Nature* 1999; **400**: 486–472.
- [5] CLARK EA, GOLUB TR, LANDER ES, HYNES RO. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* 2000; **406**: 532–535.
- [6] GOLUB TR, SLONIM DK, TAMAYO P, HUARD C, GAASENBEEK M, MESIROV JP, COLLER H, LOH ML, DOWNING JR, CALIGIURI MA, BLOOMFEILD CD, LANDER ES. Molecular classification of cancer: Class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* **286**: 531–537.
- [7] HAHN WC, COUNTER CM, LUNDBERG AS, BEIJERSBERGEN RL, BROOKS MW, WEINBERG RA. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 1999; **400**: 464–468.
- [8] HARLEY CB. Telomere loss, mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* 1991; **256**: 271–282.
- [9] HERBERT B, PITTS AE, BAKER SI, HAMILTON SE, WRIGHT WE, SHAY JW, COREY DR. Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomerase shortening and cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 14276–14281.
- [10] HURLIN PJ, MAHER VM, MCCORMIC JJ. Malignant transformation of human fibroblasts caused by expression of a transfected T24 Hras oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 187–191.
- [11] KANG JS. Involvement of tyrosine phosphorylation of p185c-erb/neu in tumorigenicity induced by X-rays and the neu oncogene in human breast epithelial cells. *Mol Carcinogen* 1998; **21**: 225–233.
- [12] KOZLOWSKI JM, HART IR, FIDLER IJ, HANNA N. A human melanoma cell line heterogeneous with respect to metastatic capacity in athymic nude mice. *J Natl Cancer Inst* 1984; **72**: 913–917.
- [13] MARSHALL A, HODGSON J. DNA chips: An array of possibilities. *Nature Biotechnology* 1998; **16**: 27–31.
- [14] RHIM JS, JAY G, ARNSTEIN P, PRICE FM, SANFORD KK, AARONSON SA. Neoplastic transformation of human epidermal keratinocytes by AD12-SV40 and Kristen sarcoma viruses. *Science* 1985; **227**: 1250–1252.
- [15] RIDLEY A. Molecular switches in metastasis. *Nature* 2000; **406**: 466–467.
- [16] SHAY JW, WRIGHT WE. When do telomeres matter? *Science* **291**: 839–840.
- [17] WRIGHT WE, SHAY JW. The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. *Exp Gerontol* 1992; **27**: 383–389.
- [18] YAKUM GH. Transformation of human bronchial epithelial cells transfected by the Harvey ras oncogene. *Science* 1985; **227**: 1174–1179.

Redaktorzy prowadzący – M. Kapiszewska i J. Kawiak

Otrzymano: 09.2001 r.

Przyjęto: 30.10.2001 r.

Adres autora: ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków,

e-mail Cichy@mol.uj.edu.pl

WODA W SYMULACJACH DYNAMIKI MOLEKULARNEJ

METHODS FOR REPRESENTING WATER IN MOLECULAR DYNAMICS SIMULATION STUDIES

Krzysztof MURZYN

Zakład Biofizyki, Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet Jagielloński,
Kraków

Streszczenie: W pracy przedstawiono krótki przegląd sposobów opisu efektów polarnego środowiska w symulacjach dynamiki molekularnej bioukładów. Dokładniej omówiono: (1) skalowanie oddziaływań elektrostatycznych, (2) potencjał solwatacji, (3) efekt polaryzacji rozpuszczalnika oraz (4) jawne uwzględnienie cząsteczek wody. Podano teoretyczne podstawy metod oraz możliwe obszary ich zastosowań. Kolejność omawiania metod odpowiada rosnącym równoległe z ich złożonością wymaganiom obliczeniowym. Na koniec przedstawiono wybrane parametryzacje cząsteczki wody, których celem jest możliwie wierne odtworzenie własności wody w fazie skondensowanej.

(Postępy Biologii Komórki 2002; 29: 87–101)

Słowa kluczowe: symulacja dynamiki molekularnej, woda

Summary: Water plays a crucial role in living cells; therefore, proper treatment of water in molecular dynamics (MD) simulations of biological systems is very important. A brief review of most popular methods for representing water in MD simulations is presented. The methods range from simple modifications of Coulombic term in the potential function through solvation potential and polarization of solvent, to explicit inclusion of solvent molecules. Possible applications and validity of the methods are discussed. Various models of a water molecule whose parametrization reflects properties of water in the condensed phase are presented.

(Advances in Cell Biology 2002; 29: 87–101)

Key words: molecular dynamics (MD) simulations, water

1. RÓŻNORODNOŚĆ FUNKCJONALNA I STRUKTURALNA WODY W UKŁADACH BIOLOGICZNYCH

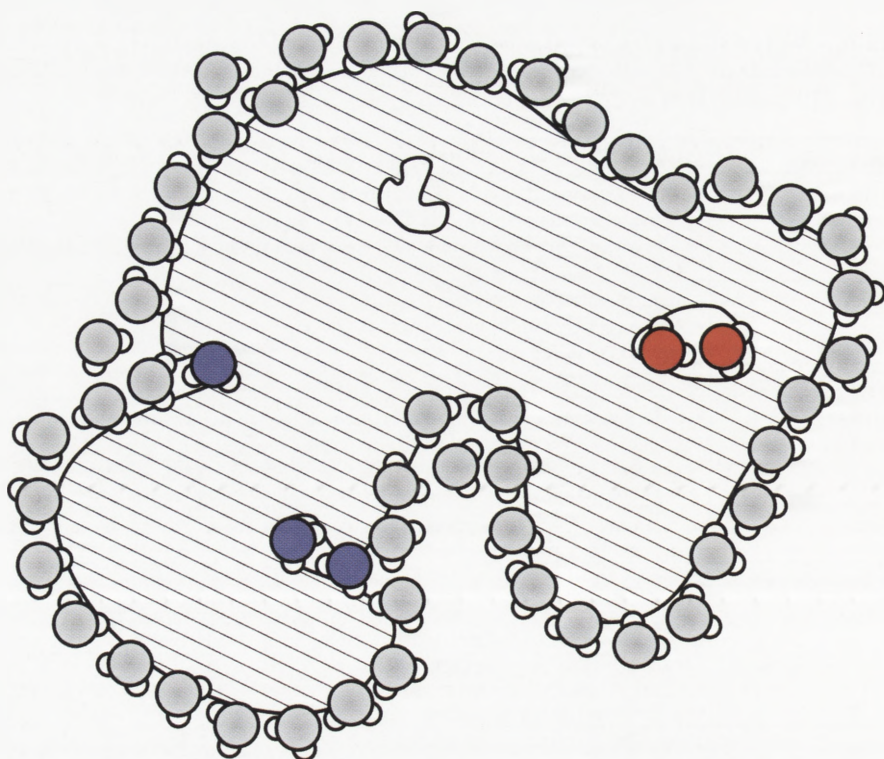
W układach biologicznych woda pełni szereg istotnych funkcji wpływając na strukturę i funkcjonowanie biocząsteczek. Dowodzą tego badania [16], w których systematyczna zmiana jednego tylko parametru: uwodnienia próbki h wyrażonego w liczbie gramów wody na gram białka, dostarczyła całej gamy obserwacji poczynawszy od całkowitego zamrożenia ruchliwości konformacyjnej oraz aktywności enzymatycznej białka przy $h < 0,07$, po pełne odzyskanie biologicznej sprawności i strukturalnej mobilności białka dla $h > 0,38$ (por. tab. 1). Można podać wiele innych przykładów, gdzie woda wpływa na aktywność enzymatyczną białek nie poprzez obniżanie bariery energetycznej między niskoenergetycznymi konformacjami białka, ale bezpośrednio uczestnicząc w katalizowanej reakcji jako donor lub akceptor protonów [10].

Wnikliwsze spojrzenie na rolę cząsteczek wody w strukturze białek pozwala dokonać ich podziału na wodę wewnętrzną (ang. *internal water*), wnękową (ang. *interstitial water*) i powierzchniową (ang. *surface water*). Podział ten wynika z różnej lokalizacji cząsteczek wody w białku (por. ryc. 1) i znajduje swoje odbicie w ich wyraźne zróżnicowanych własnościach fizykochemicznych. Woda wewnętrzna, z uwagi na pełnione funkcje, często nazywana jest wodą strukturalną. Wewnętrzne cząsteczki wody, których średnia liczba w małym globularnym białku (15 kD) wynosi około 6, naprawiają niedoskonałe upakowanie reszt aminokwasowych uczestnicząc w wewnętrznej sieci wiązań wodorowych, a przez to wpływając bezpośrednio na strukturę i stabilność białka. Woda powierzchniowa wraz z polarnymi resztami aminokwasowymi tworzy rozległą sieć wiązań wodorowych i promuje niezwykle szybkie, zachodzące w pikosekundowej skali czasowej zmiany konformacyjne łańcucha peptydowego [21].

Połączenie szeregu technik badawczych obejmujących m.in. pomiary aktywności optycznej w rozpraszaniu Ramana [1] (ang. *Raman Optical Activity*, ROA) oraz metody symulacji dynamiki molekularnej [13] (ang. *Molecular Dynamics Simulation*), MD) pozwoliły uzyskać wgląd w molekularny mechanizm rearanżacji strukturalnych białek zachodzącej z udziałem cząsteczek wody. Zgodnie z tym mechanizmem, cząsteczka wody zaburza wiązanie wodorowe we fragmencie α -helisy tworząc początkowo trójboczne, rozwidlane wiązanie wodorowe obejmujące atomy tlenu i azotu łańcucha peptydowego oraz atom tlenu wody. Powoduje to zmiany w konformacji łańcucha peptydowego wyrażone kątami ϕ i ψ prowadząc do powstania całej gamy β -skrętów zajmujących na mapie Ramachandrana (ψ vs. ϕ) obszar między konformacją α -helikalną a β -kartką. Umożliwia to szybkie „przełączanie” między tymi konformacjami (ang. $\alpha \leftrightarrow \beta$ flickering); stała szybkości tego procesu, uzyskana z pomiarów ROA i metodą MD wynosi odpowiednio: $2,6 \times 10^{12} \cdot \text{s}^{-1}$ i $3,0 \times 10^{12} \cdot \text{s}^{-1}$.

TABELA 1. Wpływ stopnia hydratacji h na strukturę i dynamikę lizozymu [5], (dla porównania: $h = 0,07$ odpowiada ok. 50 cząsteczkom wody na cząsteczkę lizozymu, natomiast $h = 0,38$ odpowiada ok. 270 cząsteczkom wody na cząsteczkę lizozymu)

Stopień uwodnienia	$h = 0 + 0,07$
STRUKTURA	<ul style="list-style-type: none"> • brak wyraźnych różnic w strukturze białka w porównaniu do warunków pełnego uwodnienia (RMSD < 1 Å) • cząsteczki wody lokują się w otoczeniu naładowanych reszt aminokwasowych (ok. 2 cząsteczki na resztę)
DYNAMIKA	<ul style="list-style-type: none"> • mała ruchliwość wody • zamrożona dynamika białka • brak aktywności enzymatycznej
Stopień uwodnienia	$h = 0,07 + 0,15$
STRUKTURA	<ul style="list-style-type: none"> • woda oddziałuje głównie z polarnymi resztami aminokwasowymi na powierzchni białka (ok. 1 cząsteczka wody na resztę) • cząsteczki wody tworzą zróżnicowane w wielkości i kształcie klastry zlokalizowane w bezpośrednim otoczeniu polarnych i naładowanych reszt aminokwasowych
DYNAMIKA	<ul style="list-style-type: none"> • amplituda ruchu wewnętrznych fragmentów białka rośnie z 1/1000 przy $h=0,04$ do charakteryzującej całkowicie uwodnione białko przy $h=0,15$
Stopień uwodnienia	$h = 0,15 + 0,25$
STRUKTURA	<ul style="list-style-type: none"> • przy $h=0,15$ ustala się sieć połączeń o charakterze wiązań wodorowych (woda-woda, woda-białko) i kulombowskich (woda-białko), która obejmuje całą powierzchnię białka • liczba wiązań wodorowych w tej sieci rośnie w miarę wzrostu uwodnienia • obserwuje się liczne reorganizacje połączeń
DYNAMIKA	<ul style="list-style-type: none"> • po przekroczeniu progu perkolacji następuje długo-zasięgowe przemieszczanie protonów z wykorzystaniem utworzonej sieci
Stopień uwodnienia	$h = 0,25 + 0,38$
STRUKTURA	<ul style="list-style-type: none"> • przy $h=0,25$ rośnie warstwa solwatacyjna wokół białka
DYNAMIKA	<ul style="list-style-type: none"> • aktywność enzymatyczna lizozymu systematycznie rośnie, zwiększa się również ruchliwość niekowalencyjnie związanego substratu • ruchliwość wody wolno wzrasta w miarę wzrostu uwodnienia • zacierają się różnice we własnościach fizykochemicznych wody powierzchniowej i związanej wodorowo z białkiem • aktywność enzymatyczna lizozymu dochodzi do 10% wartości charakteryzującej białko w stanie pełnego uwodnienia
Stopień uwodnienia	$h > 0,38$
STRUKTURA	<ul style="list-style-type: none"> • utworzona zostaje pierwsza sfera hydratacyjna wokół białka • maleje uporządkowanie cząsteczek wody w okolicach polarnych reszt aminokwasowych • rośnie liczba wiązań wodorowych między cząsteczkami wody powierzchniowej
DYNAMIKA	<ul style="list-style-type: none"> • przywrócona zostaje pełna aktywność biologiczna białka



RYCINA 1. Podział cząsteczek wody ze względu na lokalizację w cząsteczce białka. Cząsteczki wody wewnętrznej, wnekowej i powierzchniowej pokazane są kolorami: czerwonym, niebieskim i szarym

Sieć wiązań wodorowych z udziałem cząsteczek wody powstaje również na powierzchni błony lipidowej. Pomosty wodne wraz z parami ładunkowymi, tworzonymi pomiędzy przeciwnie naładowanymi grupami głów polarnych lipidów, wpływają na stabilność błon i decydują o właściwościach interfazy woda/błona [15]. Istnienie takiej sieci zakłada teoria efektywnego transportu protonów (ang. *percolation theory*). Na jej podstawie można wytłumaczyć nagłe pojawienie się długo-zasięgowego przewodnictwa protonów po przekroczeniu granicznego uwodnienia białka lub błony, a także sposób, w jaki elektrochemiczny gradient protonów generowany z udziałem światła przez pompy protonowe (np. bakteriorodopsynę) jest wykorzystywany przez inne białka błonowe (np. syntetazy ATP).

2. METODA SYMULACJI DYNAMIKI MOLEKULARNEJ

Symulacja dynamiki molekularnej jest niezależną metodą badawczą, w której wyznacza się położenia wszystkich atomów w układzie w kolejnych krokach czasowych przez iteracyjne rozwiązanie równań Newtona dla tych atomów. Proces

iteracyjny rozpoczyna się od dobrze zdefiniowanego stanu początkowego. W klasycznych symulacjach dynamiki molekularnej nie uwzględnia się *explicite* efektów kwantowych, a atomy traktowane są jako masy punktowe.

Aby zastosować równanie Newtona do opisu dynamicznego zachowania układu atomów, konieczne jest zdefiniowanie oddziaływań pomiędzy atomami w układzie. Definicja ta obejmuje zarówno matematyczną postać funkcji potencjału jak również parametryzację oddziaływań międzyatomowych.

Tradycyjnie oddziaływania międzyatomowe dzieli się na dwie grupy:

- (1) oddziaływania wiążące między kolejnymi czterema atomami połączonymi wiązaniami chemicznymi,
- (2) oddziaływania niewiążące, między atomami oddalonymi od siebie o więcej niż trzy wiązania chemiczne lub należącymi do różnych cząsteczek. Na oddziaływania wiążące składają się zwykle trzy człony potencjału opisujące:
 - (a) oscylacyjne zmiany długości wiązania,
 - (b) oscylacyjne deformacje kątów walencyjnych między dwoma kolejnymi wiązaniami oraz
 - (c) zmiany kąta torsyjnego.

Oddziaływania wiążące opisane są wzorem:

$$V_B(r, \theta, \phi) = \frac{1}{2} \sum_{bond} k_b (r - r_0)^2 + \frac{1}{2} \sum_{angles} k_a (\theta - \theta_0)^2 + \frac{1}{2} \sum_{torsion} V_t (1 + \cos(n\phi - \phi_0)) \quad (1)$$

gdzie:

k_b i k_a – stałe siłowe,

r – chwilowa odległość między atomami tworzącymi wiązanie,

r_0 – równowagowa długość wiązania,

θ – chwilowy kąt pomiędzy wiązaniami,

θ_0 – kąt równowagowy,

V_t – bariera rotacyjna,

ϕ – chwilowy kąt torsyjny,

ϕ_0 – przesunięcie fazowe (w zależności od tego, czy potencjał torsyjny dla 0° ma *maksimum* czy też *minimum*, ϕ_0 przyjmuje odpowiednio wartość 0° lub 180°),

n – krotność kąta torsyjnego (liczba minimów energetycznych w zakresie kąta pełnego).

Sumowanie we wzorze przebiega po wszystkich wiązaniach (*bond*), kątach walencyjnych (*angle*) i torsyjnych (*torsion*) w układzie.

Na oddziaływania niewiążące składają się oddziaływania van der Waalsa (V_{vdw}) i oddziaływania kulombowskie (elektrostatyczne, V_{qq}) dane wzorem:

$$V_{\text{NB}}(r) = \underbrace{\frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_{\text{pair}} \frac{q_i q_j}{r_{ij}}}_{V_{\text{qq}}} + \underbrace{\sum_{\text{pair}} \left(\frac{A}{r_{ij}^{12}} - \frac{C}{r_{ij}^6} \right)}_{V_{\text{vdw}}} \quad (2)$$

gdzie: i, j – para oddziałujących atomów;

q_i, q_j – ładunki cząstkowe na atomach;

r_{ij} – odległość pomiędzy atomami;

ϵ_0 – przenikalność dielektryczna próżni.

$$A = \epsilon_{ij} \sigma_{ij}^{12} \quad \text{i} \quad C = 2 \epsilon_{ij} \sigma_{ij}^6$$

gdzie: ϵ_{ij} – uśredniona dla oddziałujących atomów głębokość studni potencjału,

σ_{ij} – uśrednione promienie van der Waalsa oddziałujących atomów.

Sumowanie przebiega po wszystkich parach atomów (*pair*).

Przydatność metody dynamiki molekularnej do badania układów biologicznych została już wielokrotnie pozytywnie zweryfikowana dla białek, peptydów, kwasów nukleinowych i błon lipidowych. Burzliwy rozwój metody był możliwy dzięki postępowi technologicznemu, jaki dokonał się w produkcji komputerów, a przede wszystkim powstaniu imponującego zaplecza algorytmicznego metody. Mimo wielu sukcesów, zastosowanie metody MD do badania układów biologicznych jest nadal ograniczone i wymaga rozwiązania wielu problemów.

Aby zrozumieć istotę tych problemów, należy uświadomić sobie, że stosowanie MD wymaga pogodzenia dwóch skrajności: z jednej strony wysokiej dokładności obliczeń, z drugiej zaś ograniczonych możliwości komputerów, na których te obliczenia się przeprowadza. Poprawne uwzględnienie rozpuszczalnika w symulowanych układach nabiera więc szczególnego znaczenia. W kolejnej części pracy, przedstawione zostały najpopularniejsze metody uwzględniania wody w symulacjach oraz obszary ich zastosowań.

3. MODELOWANIE WODY W SYMULACJACH UKŁADÓW BIOLOGICZNYCH

W miarę rozwoju metod modelowania molekularnego powstawały kolejne sposoby uwzględniania wody w symulacjach. Wiele z nich zostało wnikliwie przetestowanych. Umożliwiło to scharakteryzowanie ich wad i zalet w kontekście rozwiązywania określonych problemów badawczych. Dokonany poniżej przegląd metod, z oczywistych względów ograniczony, stanowi jednak dobrą ilustrację kierunków, w jakich zachodzi rozwój metod modelowania molekularnego.

Skalowanie oddziaływań elektrostatycznych

Najprostszym sposobem uwzględnienia rozpuszczalnika w układzie symulacyjnym jest prosta modyfikacja pierwszego członu funkcji potencjału opisującej oddziaływania niewiążące (V_{qq} por. równanie (2)). Wpływ dielektrycznego otoczenia na oddziaływania kulombowskie między atomami o niezerowym ładunku określa stała przenikalności dielektrycznej ϵ_r :

$$V_{qq} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0 \epsilon_r} \sum_{pair} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad (3)$$

Z punktu widzenia modelowania molekularnego na poziomie atomowym takie proste podejście ma szereg wad, z których najbardziej istotnymi są:

- (1) brak atomowej rozdzielczości dla rozpuszczalnika, a tym samym
- (2) pominięcie specyficznych oddziaływań między wodą a biocząsteczką, co powoduje, że
- (3) obliczona energia ma niepoprawną wartość. Jednocześnie,
- (4) wpływ dodatnio i ujemnie naładowanych grup biocząsteczki na otaczające ją dielektryczne medium (polaryzacja „rozpuszczalnika”) jest nierozróżnialny.

Proste skalowanie oddziaływań elektrostatycznych jest jednym z możliwych sposobów uwzględnienia w obliczeniach środowiska o różnej polarności. Stosuje się je m.in. przy przeszukiwaniu przestrzeni konformacyjnej krótkich liniowych peptydów w środowisku odpowiadającym roztworom wodnym ($\epsilon_r = 78,5$) lub na granicy faz woda/błona, gdzie część błonową charakteryzuje $\epsilon_r \approx 5$. Oprócz zdefiniowania zbioru nisko-energetycznych konformacji peptydu, w tym drugim przypadku możliwe jest poprawne określenie lokalizacji peptydu w błonie. Metoda skalowania oddziaływań kulombowskich jest często pierwszym przybliżeniem w metodzie symulowanego wyżarzania z wykorzystaniem więzów uzyskanych eksperymentalnie metodami jądrowego rezonansu magnetycznego. Główną zaletą metody skalowania oddziaływań elektrostatycznych jest fakt, że jest ona mało wymagająca z punktu widzenia nakładów obliczeniowych.

Efektywna stała dielektryczna

Proste skalowanie oddziaływań elektrostatycznych przez ϵ_r oznacza, że wpływ rozpuszczalnika na oddziaływania w układzie nie zależy od odległości. Tymczasem, własności ekranujące rozpuszczalnika rosną z odległością. Efekt ten uwzględnia metoda efektywnej stałej dielektrycznej ϵ_{eff} , w której efektywność stałej przejawia się w jej zależności funkcyjnej od odległości. Człon kulombowski funkcji potencjału (V_{qq} por. równ. (2)) przyjmie więc postać (por. równ. (3)):

$$V_{qq} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_{\text{pair}} \frac{q_i q_j}{\epsilon_{\text{eff}}(r_{ij}) r_{ij}} \quad (4)$$

Największą popularność zyskały dwie postaci funkcyjne. Pierwsza zakłada liniową zależność ϵ_{eff} od odległości: $\epsilon_{\text{eff}}(r_{ij}) = d r_{ij}$, gdzie d jest z przedziału od 1 do 4 \AA^{-1} . Po podstawieniu tej zależności do równania (4) dostajemy:

$$V_{qq} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0 d} \sum_{\text{pair}} \frac{q_i q_j}{r_{ij}^2} \quad (5)$$

Oddziaływania między ładunkami zależą w tym przypadku od kwadratu odległości, co oznacza, że szybciej zanikają z odległością i dla dużych odległości ($r_{ij} > 15,0 \text{ \AA}$) można je zaniedbać. Warto zauważyć, że metoda ta posiada zalety prostego skalowania oddziaływań elektrostatycznych, a jednocześnie lepiej od niej opisuje wpływ rozpuszczalnika na modelowaną cząsteczkę.

W alternatywnym podejściu ϵ_{eff} przyjmuje sigmoidalną zależność od odległości:

$$\epsilon_{\text{eff}}(r_{ij}) = \epsilon_r - \frac{\epsilon_r - 1}{2} [r_{ij}^2 S^2 + 2r_{ij} S + 2] e^{-r_{ij} S} \quad (6)$$

W równaniu (6) ϵ_{eff} zmienia się od 1,0 (ϵ_0) przy $r_{ij} = 0,0 \text{ \AA}$ do ϵ_r dla $r_{ij} \approx 0,15 \text{ \AA}$ w zależności od parametru S , który zwykle przyjmuje wartości od 0,15 do $0,30 \text{ \AA}^{-1}$. W porównaniu z liniową postacią ϵ_{eff} sigmoidalna zależność stałej efektywnej lepiej opisuje ekranujące własności wody. Niezależnie od postaci funkcyjnej ϵ_{eff} omawiana metoda nie pozwala na rozróżnienie przypadków, kiedy dwa ładunki oddziałują:

- (1) przez przestrzeń zajmowaną przez białko (niska przenikalność dielektryczna) i
- (2) przez wodę (wysoka przenikalność dielektryczna).

Pole efektywne

W metodzie pola efektywnego (ang. *reaction field*), bezpośredni wkład do potencjału elektrostatycznego wnoszą jedynie te pary atomów o niezerowych ładunkach, których wzajemna odległość jest mniejsza niż z góry ustalona wartość graniczna R_c (zwykle ok. 12 \AA). Wpływ reszty układu na oddziaływania między tymi atomami modelowany jest w sposób pośredni przez dielektryczne medium o stałej dielektrycznej ϵ_1 .

W algorytmicznym ujęciu, rozważany atom umieszczony jest w środku kuli o promieniu R_c . Do potencjału V_{qq} mają wkład oddziaływania tego atomu ze *wszystkimi* atomami znajdującymi się wewnątrz kuli (stąd wewnątrz kuli stała diele-

ktryczna wynosi 1,0, ϵ_0). Kula otoczona jest dielektrycznym medium o stałej dielektrycznej ϵ_1 . Funkcja potencjału V_{qq} (por. równ. (2)) przyjmuje postać:

$$V_{qq} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_{pair} q_i q_j \left[\frac{1}{r_{ij}} + \frac{B_0 r_{ij}^2}{R_c^3} \right] \quad (7)$$

$$B_0 = \frac{\epsilon_1 - \epsilon_0}{2\epsilon_1 + \epsilon_0}$$

a wkład od j -tego atomu do siły $\vec{f}_i = -\nabla V_{qq}$ działającej na i -ty atom w polu potencjału V_{qq} wynosi:

$$\vec{f}_i(r_{ij}) = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0} \left[\frac{1}{r_{ij}^3} - \frac{2B_0}{R_c^3} \right] \vec{r}_{ij} \quad (8)$$

Dla odległości r_{ij} równych lub bliskich R_c siła \vec{f}_i

$$\vec{f}_i(r_{ij} = R_c) = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0} [1 - 2B_0] \vec{r}_{ij} \quad (9)$$

jest zanedbywalnie mała, ponieważ $2B_0 \approx 1$ dla $\epsilon_1 \gg \epsilon_0$.

Równanie (8) jest poprawne jedynie dla przypadków, kiedy całkowity ładunek wnętrza kuli jest równy zero. Ponadto, przyjęcie, że część układu stanowi ciągłe medium o określonej stałej dielektrycznej zakłada, że jest ono jednorodne. Ogranicza to zastosowania metody do prostych cieczy, takich jak: woda lub rozpuszczalniki organiczne.

Ograniczeń tych pozbawione są metody pokrewne [19] specjalnie rozwijane do opisu niejednorodnych układów biologicznych. W tych metodach siły, z jakimi oddziałują atomy odległe od siebie o mniej niż R_c , są tak zmodyfikowane, aby zanikały przy odległościach bliskich R_c (ang. *shifted-force potentials*). Warto zauważyć, że zastosowanie metody pola efektywnego wymaga odpowiednio zmodyfikowanego pola siłowego, którego parametryzacja uwzględnia zmienioną postać funkcyjną potencjału V_{qq} [20]. W przeciwnym wypadku generowana trajektoria jest niepoprawna i niestabilna.

Kolejnym problemem przy stosowaniu metody pola efektywnego są duże fluktuacje energii potencjalnej układu, gdy atomy opuszczają lub wchodzą w obszar ograniczony powierzchnią kuli. Ma to miejsce przez cały czas trwania symulacji dynamiki molekularnej. W efekcie, fluktuacje energii potencjalnej nie znoszą się całkowicie, co prowadzi do naruszenia zasady zachowania energii. Dwoma naj-

częściej stosowanymi rozwiązaniami problemu nieciągłości energii potencjalnej na powierzchni kuli są (1) liniowe przeskalowywanie oddziaływań w pobliżu powierzchni kuli (ang. *tapering functions*) oraz (2) zmodyfikowanie potencjału polegające na odjęciu jego wielkości na powierzchni kuli ($r_{ij} = R_c$) dla każdej oddziałującej we wnętrzu kuli pary ładunków q_i i q_j .

W pierwszym z rozważanych rozwiązań stosuje się czynnik skalujący $t(r_{ij})$ dla tych par oddziałujących ładunków, dla których odległość r_{ij} jest w przedziale między r_t i R_c , gdzie r_t zwykle wynosi około $0,95 R_c$:

$$t(r_{ij}) = \begin{cases} 1.0 : r_{ij} < r_t \\ (R_c - r_{ij}) / (R_c - r_t) : r_t \leq r_{ij} \leq R_c \\ 0.0 : r_{ij} > R_c \end{cases} \quad (10)$$

W drugim przypadku odejmowana od funkcji V_{qq} poprawka V_{corr} wyraża się wzorem:

$$V_{corr} = \frac{1 + B_0}{4\pi\epsilon_0 R_c} \sum_{pair} q_i q_j \quad (11)$$

Potencjał solwatacji

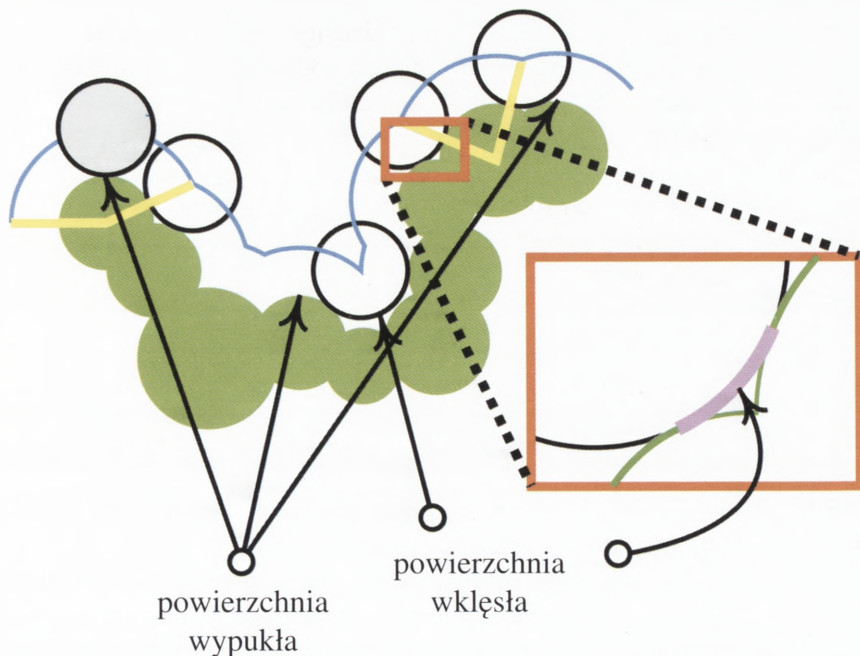
Alternatywny sposób modelowania oddziaływań makrocząsteczki z rozpuszczalnikiem opiera się na założeniu, że swobodna energia solwatacji substancji rozpuszczonej jest sumą wkładów od poszczególnych fragmentów cząsteczki (atomów):

$$\Delta G_{solv} = \sum_{atoms} \Delta g_i A_i \quad (12)$$

przy czym wielkość poszczególnych wkładów zależy od:

- (1) stopnia wyeksponowania A_i danego atomu do niejawnie reprezentowanego rozpuszczalnika,
- (2) właściwego danemu typowi atomu parametru solwatacji Δg_i .

Podstawowym ograniczeniem metody jest konieczność dysponowania polem siłowym odpowiednio poszerzonym o atomowe parametry solwatacji Δg_i , co jednak obecnie nie stanowi problemu w przypadku wielu pól siłowych. Większy problem związany jest z obliczaniem A_i , które może być bardzo czasochłonne dla dużych cząsteczek. Złożoność tego problemu dobrze ilustruje rycina 2, na której przed-

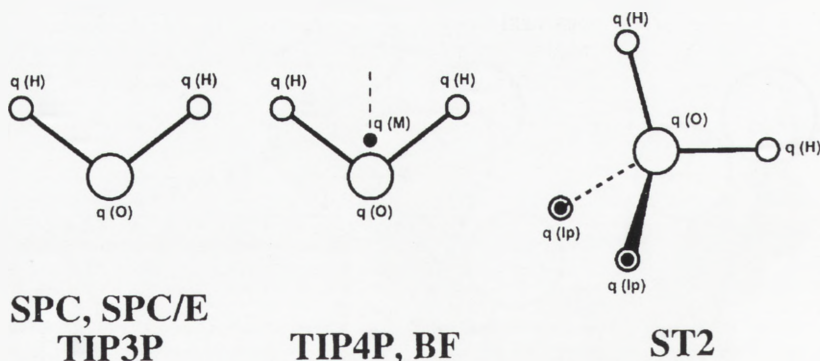


RYCINA 2. Definicja powierzchni molekularnych. Strzałkami zaznaczono powierzchnie wypukłe (ang. *contact surface*) oraz wklęsłe (ang. *re-entrant surface*) współtworzące powierzchnię van der Waalsa. Powierzchnia dostępności dla rozpuszczalnika (niebieski) wyznaczana jest przez tor ruchu środka kulistej próbki (szary) wyznaczony w taki sposób, że próbka zawsze znajduje w kontakcie z co najmniej jednym atomem cząsteczki (zielony)

stawiono rodzaje powierzchni cząsteczkowych używanych w modelowaniu molekularnym. Istniejące obecnie algorytmy pozwalają efektywnie obliczać A_i zarówno w sposób dokładny [12], jak i przybliżony [9]. Stosowanie potencjału solwatacji może 20- do 30-krotnie skrócić czas obliczeń w porównaniu do symulacji, w których rozpuszczalnik jest jawnie reprezentowany. Użycie potencjału solwatacji dało dobre wyniki przy modelowaniu wpływu rozpuszczalnika na strukturę białka [8], a ostatnio umożliwiło przeprowadzenie serii kilkudziesięciu symulacji o łącznym czasie 4 μ s, które pozwoliły zbadać proces zwijania do natywnej konformacji 20-aminokwasowego peptydu [7].

Modele cząsteczki wody

W modelowaniu molekularnym najpopularniejszym sposobem uwodnienia biocząsteczek jest uwzględnianie cząsteczek rozpuszczalnika *explicitie*. Pociąga to jednakże duże nakłady obliczeniowe, ponieważ pełne lub choćby częściowe uwodnienie układu istotnie zwiększa liczbę atomów w układzie, np. pełne uwodnienie lizozymu



RYCINA 3. Topologia modeli cząsteczki wody w różnych parametryzacjach. Znaczenie symboli znajdujących się na rycinie podano w opisie tabeli 2

(stopień hydratacji h wynosi ok. 4,5) oznacza, że atomy cząsteczek wody stanowią blisko 90% wszystkich atomów w układzie symulacyjnym.

Potencjalnie duże nakłady obliczeniowe nie są jedynym problemem symulacji z wodą *explicitie*. Parametryzacja trójatomowej cząsteczki wody, która pozwoliłaby odtworzyć eksperymentalne własności roztworów wodnych, jest niezwykle trudna.

Pierwszy model cząsteczki wody został zaproponowany w latach trzydziestych ubiegłego wieku przez Bernala i Fowlera (model BF [4]). Jego obecne znaczenie jest czysto historyczne, ponieważ burzliwy rozwój metod modelowania molekularnego, a tym samym rosnące zapotrzebowanie na wiarygodny model cząsteczki wody, zaowocował powstaniem szeregu parametryzacji, które w lepszym stopniu oddają własności wody w fazie skondensowanej.

Istniejące modele cząsteczki wody różnią się wielkością parametrów van der Waalsa, ładunków punktowych i parametrami wiązającymi definiującymi geometrię cząsteczki. W niektórych parametryzacjach wprowadza się punkty z zerową masą i niezerowym ładunkiem, których położenie ustalane jest względem atomów tlenu i wodoru. Na przykład, w pięciocentrowym modelu Stillingera i Rahmana (ST2 [18]), oprócz 3 atomów w cząsteczce H_2O definiuje się 2 punkty: lp^1 i lp^2 (por. ryc. 3), odpowiadające położeniom wolnych par elektronowych atomu tlenu. Modele czterocentrowe (TIP4P [11], BF) mają jeden dodatkowy punkt zlokalizowany na dwusiecznej kąta $\angle (HOH)$ w odległości 0,15 Å od atomu tlenu w kierunku atomów wodoru (por. ryc. 3). W trójcentrowych modelach: SPC [3], SPC/E [2] oraz TIP3P [11], nie występują dodatkowe ładunki punktowe. W tabeli 2 zestawiono parametry wymienionych powyżej modeli.

Ocenę jakości modeli wody prowadzi się zwykle porównując własności fizykochemiczne (przenikalność dielektryczna, stała dyfuzji itp.) oraz strukturalne modelu komputerowego i układu eksperymentalnego (geometria i energetyka wiązań wodorowych, funkcja rozkładu radialnego cząsteczek wody w roztworze). Wyniki

TABELA 2. Parametryzacje cząsteczki wody: r_{OH} jest długością wiązania między atomem tlenu i wodoru; \angle (HOH) kątem między wiązaniami OH; A i C są parametrami van der Waalsa w równaniu (2); q (O), q (H) i q (M) są ładunkami punktowymi odpowiednio dla atomu tlenu, wodoru i dodatkowego punktu (punktów) w cząsteczce (por. ryc. 3), którego położenie dane jest przez odległość od atomu tlenu r_{OM}

	SPC	SPC/E	TIP3P	BF	TIP4P	ST2
r_{OH} [Å]	1,0	1,0	0,9572	0,96	0,9572	1,0
\angle (HOH) [deg]	109,47	109,47	104,52	105,7	104,52	109,47
$A \times 10^{-3}$ [kcal Å ¹² /mol]	629,4	629,4	582,0	560,4	600,0	238,7
C [kcal Å ⁶ /mol]	625,5	625,5	595,0	837,0	610,0	268,9
q (O) [e]	-0,82	-0,8472	-0,834	-	-	-
q (H) [e]	0,41	0,4238	0,417	0,49	0,52	0,2375
q (M) [e]	-	-	-	-0,98	-1,04	-0,2375
r_{OM} [Å]	-	-	-	0,15	0,15	0,8

porównań na podstawie tych kryteriów zestawiono w tabeli 3. Wybór określonego modelu wody, jaki zastosowany będzie w modelowaniu molekularnym nie opiera się jedynie na wynikach porównań (w świetle parametrów zestawionych w tabeli 3, najlepszym modelem jest parametryzacja SPC/E). Należy również wziąć pod uwagę szereg innych czynników, takich jak: kompatybilność parametryzacji wody i reszty układu, nakłady obliczeniowe związane z danym modelem wody (z reguły większa zgodność z eksperymentem oznacza większą czasochłonność obliczeń).

TABELA 3. Porównanie własności fizykochemicznych i strukturalnych wody dla różnych parametryzacji. Jako własności strukturalne podano parametry opisujące radialną funkcję rozkładu dla wody (położenie pierwszych dwóch lokalnych maksimum i minimum). Parametry radialnej funkcji rozkładu podane są jako para liczb, z których pierwsza oznacza położenie ekstremum na wykresie funkcji (r [Å]), a druga wartość funkcji w tym punkcie ($f(r)$). Zakresy eksperymentalnie wyznaczonych parametrów radialnej funkcji rozkładu zestawiono w ostatniej kolumnie. Dane zebrano na podstawie [20, 17]

		SPC	SPC/E	TIP3P	TIP4P	Exp.
Przenikalność dielektryczna		65	72	94	44	78,5
Stała dyfuzji [10^{-9} m ² /s]		5,0	3,3	7,0	4,0	2,3
Gęstość [g/cm ³] przy 25°C		0,971	0,995	0,982	0,999	0,997
Moment dipolowy [D]		2,27	2,39	2,35	2,18	1,85
RDF pik 1	r [Å]	2,77	2,75	2,77	2,76	2,73 ÷ 2,88
	$f(r)$	2,82	3,07	2,69	2,98	2,18 ÷ 3,09
RDF min 1	r [Å]	3,49	3,31	3,53	3,36	3,33 ÷ 3,49
	$f(r)$	0,91	0,80	0,94	0,82	0,73 ÷ 0,83
RDF pik 2	r [Å]	4,53	4,49	4,63	4,40	4,44 ÷ 4,50
	$f(r)$	1,04	1,11	1,00	1,09	1,13 ÷ 1,15
RDF min 2	r [Å]	5,70	5,65	5,77	5,60	5,51 ÷ 5,68
	$f(r)$	0,93	0,90	0,96	0,91	0,86 ÷ 0,89

Jeśli decydujemy się na kompromis między nakładami obliczeniowymi a jakością modelu, można wtedy wybrać parametryzację, która lepiej oddaje wybrane własności lub bardziej odpowiada specyfice badanego układu. Na przykład, niepowodzenie symulacji błony lipidowej zbudowanej z ujemnie naładowanych lipidów [6] było zapewne spowodowane słabymi zdolnościami ekranującymi modelu SPC oraz niedostatecznym stopniem uwodnienia błony. Jednocześnie użycie modelu TIP3P charakteryzującego się nieco zawyżoną wielkością stałej dielektrycznej było jednym z czynników, który zdecydował o powodzeniu innej symulacji błony zawierającej ujemnie naładowane cząsteczki fosfatydyloglicerolu [14].

PODZIĘKOWANIA

Autor pragnie wyrazić podziękowania Prof. Marcie Pasenkiewicz-Gieruli za pomoc w redagowaniu tekstu pracy oraz szereg krytycznych uwag. Autor jest beneficjentem stypendium krajowego Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej dla młodych naukowców, 2001/077.

BIBLIOGRAFIA

- [1] BARRON LD, HECHT L, BLANCH EW, BELL AF. Solution structure and dynamics of biomolecules from Raman optical activity. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 2000; **73**: 1–49.
- [2] BERENDSEN HJC, GRIGERA JR, STRAASMA TP. The missing term in effective pair potentials. *J Physical Chemistry* 1987; **91**: 6269–6271.
- [3] BERENDSEN HJC, POSTMA JPM, VAN GUNSTEREN WF, HERMANS J. Intermolecular Forces. Reidel, Dordrecht. 1981: 331–342.
- [4] BERNAL JD, FOWLER RH. A theory of water and ionic solutions, with particular reference to hydrogen and hydroxyl ions. *J Chemical Physics* 1933; **1**: 515–548.
- [5] CARERI G. Collective effects in hydrated proteins. [w] Marie-Claire Bellissent-Funel [red.] Hydration Processes in Biology. Amsterdam, Berlin, Oxford, Tokyo, Washington DC: {IOS} Press. 1999: 143–155.
- [6] CASCALES JLL, DE LA TORRE JG, MARRINK SJ, BERENDSEN HJC. Molecular dynamics simulation of a charged biological membrane. *J Chemical Physics* 1996; **104**: 2713–2720.
- [7] FERRARA P, CAFLISCH A. Folding simulations of a three-stranded antiparallel β -sheet peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 10780–10785.
- [8] FRATERNALI F, VAN GUNSTEREN WF. An efficient mean solvation force model for use in molecular dynamics simulations of proteins in aqueous solutions. *J Mol Biol* 1996; **256**: 939–948.
- [9] HASEL W, HENDRICKSON TF, STILL WC. A rapid approximation to the solvent accessible surface areas of atoms. *Tetrahedron Comput Methodol* 1988; **1**: 103–116.
- [10] JACKMAN JE, JR. KMM, FIERKE CA. Disruption of the active site solvent network in carbonic anhydrase II decreases the efficiency of proton transfer. *Biochemistry* 1996; **35**: 16421–16428.

- [11] JORGENSEN WL, CHANDRASEKHAR J, MADURA JD, IMPEY RW, KLEIN ML. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chemical Physics* 1983; **79**: 926–935.
- [12] LIANG J, EDELSBRUNNER H, FU P, SUDHARKAR PV, SUBRAMANIAM S. Analytic shape computation of macromolecules I: molecular area and volume through alpha shape. *Proteins: Structure Function and Genetics* 1998; **33**: 1–17.
- [13] McCAMMON JA, NORTHRUP SH, KARPLUS M, LEVY RM. Helix-coil transitions in a simple polypeptide model. *Biopolymers* 1980; **19**: 2033–2045.
- [14] MURZYN K, PASENKIEWICZ-GIERULA M. Construction and optimisation of a computer model for a bacterial membrane. *Acta Biochim Pol* 1999; **46**: 631–639.
- [15] MURZYN K, RÓG T, JEZERSKI G, TAKAOKA Y, PASENKIEWICZ-GIERULA M. Effects of phospholipid unsaturation on the membrane/water interface: a molecular simulation study. *Biophysical J* 2001; **81**: 170–183.
- [16] RUPLEY JA, CARERI G. Protein hydration and function. *Advances in Protein Chemistry* 1991; **41**: 17–37.
- [17] SORENSON JM, HURA G, GLAESER RM, HEAD-GORDON T. What can {X}-ray scattering tell us about the radial distribution functions of water. *J Physical Chemistry* 2000; **113**: 9149–9161.
- [18] STILLINGER FH, RAHMAN A. Improved simulation of liquid water by molecular dynamics. *J Chemical Physics* 1974; **60**: 1545–1557.
- [19] TASAKI K, McDONALD S, BRADY JW. Observations concerning the treatment of long-range interactions in molecular dynamics simulations. *J Computational Chemistry* 1993; **3**: 278–284.
- [20] van der SPOEL D, van MAAREN PJ, BERENDSEN HJC. A systematic study of water models form molecular simulation: Derivation of water models optimized for use with a reaction field. *J Chemical Physics* 1998; **108**: 10220–10230.
- [21] WILSON G, HECHT L, BARRON LD. Residual structure in unfolded proteins revealed by Raman optical activity. *Biochemistry* 1996; **35**: 12518–12525.

Redaktorzy prowadzący – M. Kapiszewska i J. Kawiak

Otrzymano: 09.2001 r.

Przyjęto: 30.10.2001 r.

ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków.

E-mail: murzyn@mol.uj.edu.pl

SYSTEMY REGULATOROWE *agr* I *sar* U *STAPHYLOCOCCUS AUREUS**

REGULATORY ELEMENTS *agr* AND *sar* IN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Dorota CHMIEL, Barbara MICKOWSKA

Zakład Biochemii Analitycznej, Instytut Biologii Molekularnej UJ, Kraków

Streszczenie: *Staphylococcus aureus* jest oportunistycznym patogenem wywołującym liczne groźne choroby ludzi i zwierząt. Infekcja związana jest z ekspresją czynników wirulencji, kontrolowaną głównie przez dwa systemy regulatorowe: *agr* i *sar*. Locus *agr* składa się z dwóch transkryptów: RNAIII będącego cząsteczką regulatorową i RNAII kodującego cztery białka niezbędne do stymulacji transkrypcji RNAII i RNAIII. Locus *sar*, kodujący białko SarA będące aktywatorem *agr* i wiążące się do DNA, złożony jest z trzech nachodzących na siebie ramek odczytu. Rezultatem współdziałania *agr* i *sar* jest redukcja ekspresji białek powierzchniowych i wzrost sekrecji białek zewnątrzkomórkowych. System *agr* oparty jest na mechanizmie *quorum sensing*, czyli na komunikowaniu się komórek bakterii polegającym na produkowaniu i wydzielaniu cząsteczek sygnałowych – autoinduktorów. Wykorzystując autoinduktor bakterie w sposób skoordynowany regulują ekspresję czynników wirulencji w zależności od gęstości populacji. Dokładne poznanie mechanizmu *quorum sensing* być może przyczyni się do opracowania nowej klasy antybiotyków opartych na blokowaniu komunikacji międzykomórkowej. Homologi opisanych systemów regulacyjnych wykryto u gronkowców koagulazo-ujemnych, a ponadto u *S. aureus* zidentyfikowano geny homologiczne do *sar*.

(*Postępy Biologii Komórki* 2002; 29: 105–120)

Słowa kluczowe: *agr*, *sar*, czynniki wirulencji, *quorum sensing*, *S. aureus*

Summary: *Staphylococcus aureus* is a human pathogen, capable of causing a wide range of diseases, including life-threatening. The expression of virulence factors is controlled mainly by two global regulatory systems called *agr* and *sar*. The *agr* locus is composed of two transcripts: RNA III (effector molecule) and RNA II. The last encodes four proteins involved in stimulation of transcription of RNA II and RNA III. The locus *sar* is composed of three overlapping open reading frames, all encoding DNA-binding protein SarA, an *agr* activator. The result of interactions between *agr* and *sar* is reduction of expression of surface proteins and increasing secretion of exoproteins. The *agr* operon is a part of

*Praca częściowo finansowana z projektu badawczego KBN 6 PO4A 083 20

cell-to-cell communication mechanism called „quorum sensing”, based on self generated signal molecules (autoinducers). Owing to the usage of autoinducers bacteria can collectively regulate the expression of wide spectrum of virulence factors dependently on population density. Quorum sensing seems to be an attractive new target for the development of novel antibiotics-blocking the intercellular signalling mechanism will help to fight drug-resistant bacteria. Regulatory elements homologous to described above were discovered in coagulase-negative staphylococci and additional *sar*-homologous genes in *S. aureus*. (*Advances in Cell Biology* 2002; 29: 105–120)

Key words: *agr*, *sar*, virulence factors, quorum sensing, *S. aureus*

WSTĘP

Przez długi czas sądzono, że bakterie egzystują jako indywidualne komórki, które odżywiają się i rozmnażają. Odkrycie międzykomórkowej komunikacji pomiędzy bakteriami doprowadziło do zrozumienia, że są one zdolne do skoordynowanej aktywności, która była przypisywana tylko organizmom wielokomórkowym. Umiejętność funkcjonowania jako grupa ma oczywiste zalety, np. podczas migrowania do środowiska bogatszego w pożywienie. Język tej komunikacji oparty jest na małych cząsteczkach sygnałowych będących autoinduktorami. Bakterie „wyczuwają” gęstość populacji i reagują na zmieniające się warunki wzrostu. Ten fenomen jest powszechnie nazywany systemem *quorum sensing*, czyli komunikacji między bakteriami. Opiera się on na zasadzie, że kiedy pojedyncza komórka wydziela autoinduktor (AIs), jego stężenie w środowisku jest zbyt niskie, aby mogła ona na niego odpowiedzieć. Jeżeli jednak jest dużo bakterii produkujących ten czynnik, osiąga on stężenie progowe, które pozwala bakterii na „wycucie” gęstości populacji i na aktywację lub hamowanie genów docelowych [16].

Regulacja ekspresji genów oparta na systemie *quorum sensing* opisana została u wielu bakterii zarówno gram dodatnich, jak i u gramujemnych. Rola systemu *quorum sensing* w regulowaniu produkcji czynników wirulencji i patogenności jest najlepiej poznana u *Pseudomonas aeruginosa* [16]. U *Streptococcus mitis* i *Streptococcus anginosus* (operon *com*) peptyd sygnałowy nagromadza się podczas eksponencjalnej fazy wzrostu i indukuje procesy regulatorowe. Pokazano, że peptyd jednego szczepu może hamować odpowiedź u podtypów tego samego szczepu. U *Streptococcus pyogenes* opisano dwuskładnikowy system regulacyjny zależny od fazy wzrostu, regulujący ekspresję genów dla czynników wirulencji. Operon ten nazwany *csrR/csrS* (ang. *capsule synthesis regulator Regulator/Sensor*) hamuje ekspresję genów kodujących otoczki bakteryjne i bierze udział w regulacji ekspresji streptolizyny S i proteinazy cysteinowej. Regulator ten działa również w sposób serotypowo specyficzny. U bakterii *Streptococcus* poznano również regulon Mga, który pozytywnie kontroluje geny regulonu *mga*, wliczając w to białko M. U tych bakterii wykryto ponadto operon zawierający dwie kinazy i jeden regulator od-

powiedzi. „W dół” sekwencji tego operonu nazwanego *fas* (ang. *fibronectin/fibrinogen binding/haemolytic activity/streptokinase regulator*) znajduje się gen kodujący krótką cząsteczkę RNA, której obecność jest wymagana do funkcjonowania genu regulatorowego *fasA* [24].

Scharakteryzowany w tej pracy system regulacyjny *agr* jest również systemem *quorum sensing*, który kontroluje ekspresję białek zewnątrzkomórkowych i powierzchniowych w zależności od fazy wzrostu u *Staphylococcus aureus* [23, 35, 41].

Staphylococcus aureus jest oportunistycznym patogenem wywołującym liczne, groźne choroby zarówno u ludzi (zapalenie wśierdza, reumatoidalne zapalenie stawów i szok toksyczny), jak i u zwierząt [23]. Początkowym etapem infekcji jest adhezja do komórek gospodarza i kolonizacja powierzchni jego tkanek [44]. Bakterie te produkują i wydzielają do środowiska toksyny, które uszkodzają lub wywołują liżę komórek gospodarza; enzymy degradujące komponenty tkanek oraz związane z błoną białka zaangażowane w adhezję do komórek gospodarza, jak i w ochronę przed atakiem systemu odpornościowego [23].

Zauważono, że hodowla *S. aureus* produkuje różne białka w zależności od fazy cyklu wzrostu. Większość białek koniecznych do wzrostu i podziału komórek bakterii (białko A i koagulaza) syntetyzowanych jest we wczesnej fazie wzrostu, podczas gdy w fazie postekspencyjnej i stacjonarnej produkowane są w większości białka sekrecyjne (α -toksyna, β -hemolizyna, δ -lizyna, TSST-1 (toksyna 1 syndromu szoku toksycznego), enterotoksyna B, epidermolityczne toksyny A i B, leukocydyna, stafilokinaza, nukleaza, proteinaza serynowa i metaloproteinaza, kwaśna fosfataza) [8, 20, 38]. W związku z tym konieczny jest mechanizm, który „przełączy” komórkę na syntezę odpowiednich białek na danym etapie wzrostu. Odpowiedzialne są za to między innymi dwa systemy regulacyjne: *agr* (ang. *accessory gene regulator*) i *sar* (ang. *staphylococcal accessory regulator*). Składniki tych loci tworzą część złożonej ścieżki, która prowadzi do represji transkrypcji białek powierzchniowych i stymulacji transkrypcji białek i toksyn sekrecyjnych. Rola systemu *agr-sar* polega na skoordynowanej regulacji aktywności genów, których produkty są niezbędne w odpowiedniej fazie infekcji.

SYSTEM *agr*

agr jest aktywnym elementem regulatorowym koniecznym do wysokiego poziomu ekspresji białek sekrecyjnych w postekspencyjnej fazie wzrostu [41]. Po sklonowaniu i zsekwencjonowaniu locus *agr* [19, 38] okazało się, że zawiera on dwa operony transkrybowane z dwóch różnych promotorów (P2 i P3) w przeciwnych kierunkach (ryc. 1). Promotory te oddzielone są od siebie odcinkiem o długości około 120 bp i są słabo aktywne w ekspencyjnej fazie wzrostu, a silnie w post-

eksponencjalnej. W obrębie *agr* znajduje się ponadto trzeci słaby promotor P1 o niewyjaśnionej jeszcze roli w systemie, zlokalizowany tuż przy końcu 5' *agrA* [38].

Spod silniejszego promotora P2 transkrybowany jest odcinek mRNA wielkości 3,0 kb nazwany RNAII [32, 34, 38], zawierający cztery ramki odczytu (w kolejności od promotora) *agrB*, *agrD*, *agrC* i *agrA* [34]. Operon P3 koduje odcinek o długości 0,5 kb nazwany RNAIII zawierający gen *hld* kodujący δ -lizynę oraz małą ramkę odczytu z 21 kodonami [20, 21]. Transkrypt ten, a nie jego białkowy produkt, jest cząsteczką uaktywniającą lub hamującą geny będące pod kontrolą systemu *agr* [20]. Działa on przede wszystkim na poziomie inicjacji transkrypcji, a w pewnych przypadkach również na poziomie translacji poprzez bezpośrednią interakcję z transkryptami genów docelowych [34].

Wykazano, że RNAIII jest transkryptem o długim czasie półtrwania, a optymalne funkcjonowanie systemu *agr* wymaga wysokiego stężenia tej cząsteczki [33]. Jego transkrypcja zachodzi w połowie eksponencjalnej fazy wzrostu, translacja do δ -lizyny opóźniona jest o jedną godzinę, podczas gdy jego geny docelowe aktywowane są jeszcze godzinę później, w posteksponencjalnej fazie wzrostu. Sugeruje to, że pewne modyfikacje potranslacyjne cząsteczki RNAIII są konieczne do regulacji ekspresji genów docelowych [3].

Na podstawie sekwencji genów *agrA* i *agrC* wysunięto przypuszczenie, że ich produkty odpowiadają białku regulatorowemu i przekaźnikowi sygnału w bakteryjnym dwuskładnikowym systemie transdukcji sygnału. W takim układzie, pierwszy składnik – receptor odbierający sygnał jest białkiem transbłonowym, którego część zewnątrzkomórkowa lub peryplazmatyczna odpowiada na sygnał ze środowiska przez allosteryczną zmianę. Zmiana ta jest przekazywana na fragment C-końcowy. Wynikiem tego jest aktywacja fosfokinazy (HPK – kinaza histydynowa), która autofosforyluje specyficzną histydyne. Grupa fosforanowa jest następnie przenoszona na resztę aspartylową na N-końcu drugiego składnika będącego białkiem wewnątrzkomórkowym. Dochodzi do allosterycznej zmiany, która czyni C-koniec aktywatorem transkrypcji genów docelowych [20, 33].

Istotnie okazało się, że gen *agrC* koduje białko o wielkości 46 kDa, które jest prawdopodobnie z pomocą chaperonów kotranslacyjnie transportowane do błony. Region N-końcowy zawiera 5 transbłonowych helis. Miejsce wiązania ligandu jest zlokalizowane między 16–18 resztą aminokwasową na trzeciej zewnątrzkomórkowej pętli. Fragment cytoplazmatyczny AgrC ma aktywność kinazy histydynowej. Związanie zewnątrzkomórkowego sygnału prowadzi do dimeryzacji receptora i transfosforylacji na resztach histydyny. Grupa fosforanowa jest następnie przenoszona na białko regulatorowe – AgrA, które aktywuje transkrypcję RNAII i RNAIII w nieznanym jeszcze sposób [26, 30].

Co jest ligandem dla AgrC? *S. aureus* produkuje i wydziela co najmniej jeden związek, który odpowiedzialny jest za aktywację systemu *agr*. Delecja *agrB* i *agrD*

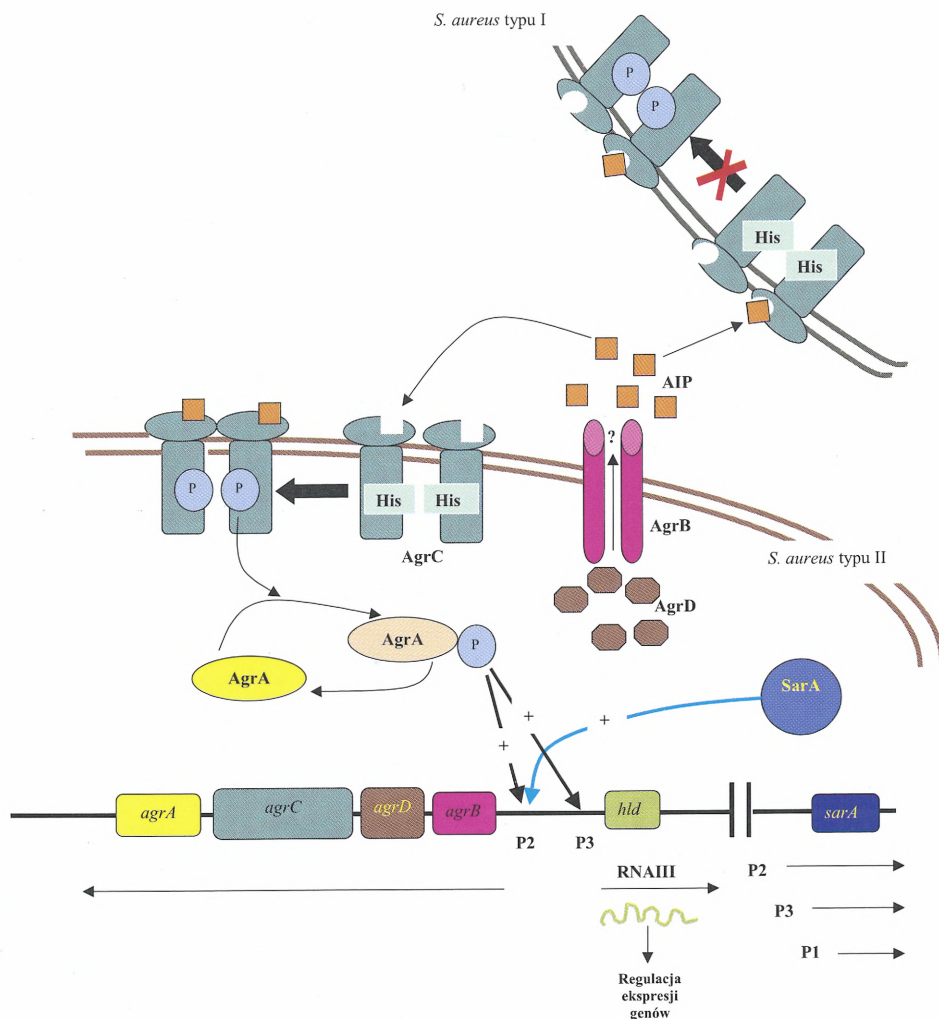
eliminuje powstawanie tego czynnika i powoduje utratę transkryptów *agrA* i *agrC*. Wyniki te dowodzą, że aktywator jest albo kodowany przez *agrB* i *agrD*, albo też geny te „napędzają” powstawanie tej cząsteczki [33]. Wcześniejsze badania sugerowały, że czynnik aktywujący jest białkiem wielkości 38 kDa [2]. Ostatecznie okazało się, że aktywator jest zmodyfikowanym oktapeptydem, w którego powstawanie zaangażowane są dwa geny *agrB* i *agrD* [23].

Obecnie wiadomo, że produktem genu *agrD* jest propeptyd, który jest wytwarzany i wydzielany przy udziale AgrB [22], integralnego białka błony komórkowej. Powstaje dojrzały peptyd AIP (ang. *autoinducing peptide*), który wiąże się do transbłonowego receptora kodowanego przez *agrC* [30]. Autokatalityczny peptyd może mieć długość 7–9 aminokwasów u różnych szczepów *S. aureus*, ale zawsze w pozycji piątej od C-końca ma konserwatywną cysteinę. W natywnym peptydzie bierze ona udział w tworzeniu wewnątrzcząsteczkowej, tiolaktanowej pętli, w której grupa sulfhydrylowa połączona jest z grupą karboksylową C-końcowego aminokwasu. AgrB jest konieczny do wytworzenia tego cyklicznego wiązania, jak również do sekrecji peptydu AgrD [22]. AIP jest feromonem, ponieważ aktywowanie przez niego systemu *agr* zależy od gęstości komórek [37].

Wykazano, że peptyd wydzielany przez pewien szczep *S. aureus*, będący dla niego autoaktywatorem, może być inhibitorem dla innych szczepów (ryc. 1). Na tej podstawie rozróżniono kilka typów *S. aureus* (m.in. typ I i II). Sugeruje się, że peptyd powstały z AgrD wiąże się do swojego własnego receptora (tzn. do receptora tego samego typu *S. aureus*) w inny sposób niż do receptora AgrC innego typu *S. aureus* lub innego rodzaju bakterii. Może to wynikać z dwóch różnych orientacji peptydu wewnątrz miejsca wiązania [30]. Również inne gatunki bakterii np. *Staphylococcus epidermidis* generalnie hamują odpowiedź *agr* u *S. aureus*. Takie krzyżowe hamowanie ekspresji genów może wynikać z walki bakterii o kolonizację miejsc i ich zainfekowanie [22, 35, 36, 48].

AIP i AgrC wykazują wysoki stopień zróżnicowania pod względem sekwencji u różnych gatunków i szczepów bakterii [28]. AgrC ma zmienną sekwencję aminokwasową w części N-terminalnej, która przechodzi przez błonę cytoplazmatyczną i odpowiada za związanie ligandu, czyli oktapeptydu powstałego z AgrD. Natomiast część C-końcowa zawierająca resztę histydyny i odpowiedzialna za przekazywanie ufosforylowanej grupy na białko regulatorowe jest konserwatywna [22].

Przedstawione powyżej fakty dowodzą, że operon P2 jest podwójnie autokatalizowany. Po pierwsze koduje swój własny aktywator w formie zmodyfikowanego oktapeptydu, który jest ligandem dla receptora również kodowanego przez ten operon. Po drugie aktywuje on swój własny promotor (jak również promotor P3), który napędza produkcję aktywatora, jak również białek transdukcji sygnału. Wynikiem tej podwójnej aktywacji jest szybka ekspresja RNAPIII na wysokim poziomie. Uważa się, że cząsteczka RNAPIII jest mało reaktywna, dlatego wymagane jest jej wysokie stężenie [23, 33].



RYCINA 1. Model funkcjonowania systemu *agr/sar* oraz krzyżowej inhibicji różnych typów *S. aureus* (wg [2, 28, 31] zmienione) P1, P2 i P3 – promotory, P – reszta fosforanowa, (+) działanie stymulujące, *gen* i jego produkt translacyjny mają identyczny kolor

Na ekspresję RNAIII ma wpływ nie tylko białko AgrA, ale również między innymi SarA będące produktem genu *sarA* należącego do locus *sar*, o którym będzie mowa w dalszej części niniejszego artykułu. SarA aktywuje promotor P2 i przez to inicjuje zależną od *agr* produkcję RNAIII [32].

Analiza sekwencji odcinka DNA oddzielającego promotory P2 i P3 ujawnia istotną homologię tych regionów. Nad każdym z nich znajdują się przerywane powtórzenia sekwencji 5'-AGTTAAG-3' zlokalizowane w takiej samej odległości

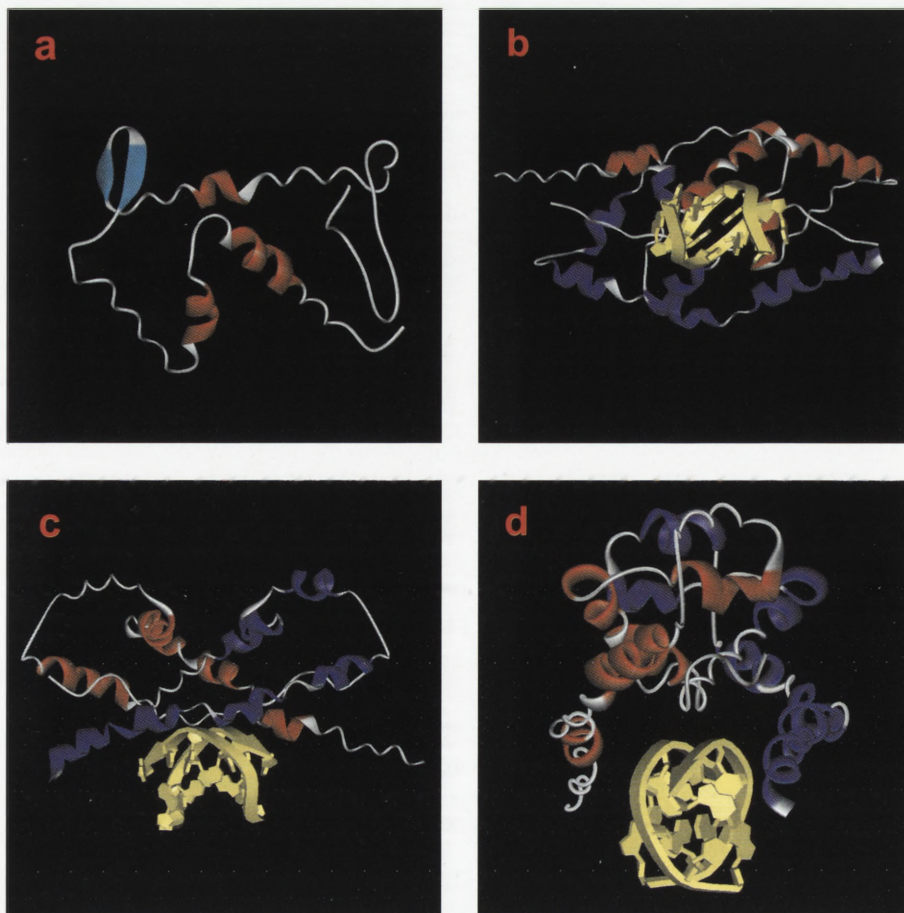
od siebie. Ponieważ operony P2 i P3 są rozbieżnie transkrybowane, powtórzenia te są także odwrócone, co pozwala na wiązanie się do nich cząsteczki regulatorowej o dwukierunkowej aktywności [32]. Okazało się, że odcinek zawierający powtórzone sekwencje jest konieczny do transkrypcji P3 zależnej od *agr*. Z kolei obecność takich powtórzonych sekwencji przed promotorem P2 jest konieczna do transkrypcji tego operonu. Te regiony przed promotorem współzawodniczą o białko wiążące DNA zidentyfikowane jako SarA [32]. Nie stwierdzono interakcji żadnego z produktów *agr* z sekwencją regulatorową DNA. Sugeruje to, że P2 i P3 kontrolowane są przez mechanizm wymagający wiązania białka SarA do regionu regulatorowego pomiędzy obydwoma promotorami [14, 32].

Na ekspresję *agr* – określoną poziomem RNAIII – wpływa pH pożywki hodowlanej. Szczep rosnący w pH 6,5 i 7,0 miał od 16 do 32 razy wyższy poziom RNAIII niż rosnący w pH 8,0. W 6,5-godzinnej hodowli w niekontrolowanym pH, które wówczas wynosiło 8,0, nie wykryto RNAIII, podczas gdy kultura z kontrolowanym pH utrzymywanym na poziomie 6,5 miała ciągle wysoki poziom tej cząsteczki. Jednak ilość RNAIII malała z czasem w kulturze o pH 6,5, co sugeruje, że drugi czynnik oprócz pH moduluje ekspresję *agr*. Wykazano również, że hodowla o pH 6,5 produkuje cztery razy więcej enterotoksyny C. Mechanizm regulowania *agr* przez pH nie jest zrozumiały [42].

Dodanie glukozy lub galaktozy do pożywki wzrostowej *S. aureus* prowadzi do drastycznego obniżenia poziomu RNAII i RNAIII, jeżeli pH hodowli nie jest utrzymywane na stałym poziomie, ale samoistnie maleje. Efekt ten spowodowany jest prawdopodobnie obecnością węglowodanów lub też wynika ze zmian w metabolizmie komórki w środowisku spowodowanym utylizacją węglowodanów [43].

SYSTEM *sar*

Locus *sar* składa się z otwartej ramki odczytu (ORF) nazwanej *sarA* o długości 372 bp poprzedzonej regionem zawierającym trzy promotory, poprzerplątane mniejszymi otwartymi ramkami odczytu (ORF3 i ORF4). Częściowo pokrywające się transkrypty locus *sar* nazwane *sarA* (0,56 kb), *sarC* (0,8 kb) i *sarB* (1,2 kb) mają wspólne 3' końce, ale rozpoczynają się z trzech różnych promotorów [4]. Białko SarA początkowo zostało scharakteryzowane jako aktywator locus *agr*, poprzez jego interakcje z 7-nukleotydowymi powtórzeniami (AGTTAAG) wewnątrz obszarów promotorowych *agr*, wykazując zdecydowanie wyższe powinowactwo do promotora *agrP2* niż do promotora *agrP3* [12]. Późniejsze badania wykazały, że białko SarA wiąże się z łatwością do bogatych w parę A+T fragmentów DNA o zmiennej długości. Aby ekspresja RNAII i RNAIII była maksymalna, oprócz głównego białka regulatorowego SarA niezbędne są jeszcze dwa mniejsze peptydy:



RYCINA 2. Struktura krystaliczna SarA: a – monomer białka SarA; b, c, d – model wiązania DNA przez dimer SarA widziany w różnych płaszczyznach (ilustracje wykonano przy pomocy programu WebLab Viewer Lite 3.7 na podstawie współrzędnych z Protein Data Bank – kod 1FZN, 1FZP)

jeden o długości 39 aminokwasów nazwany ORF3 oraz drugi mający mniejsze znaczenie, 19 aminokwasowy peptyd ORF4. Prawdopodobnie ORF3 i ORF4 mogą wpływać na poziom ekspresji *agr* poprzez modulację ekspresji białka *sarA*. Poziom ekspresji systemu *agr* jest skorelowany z poziomem białka SarA, którego ilość jest maksymalna podczas fazy eksponencjalnego wzrostu i obniża się w trakcie fazy postekspansyjnej, z kolei transkrypcja RNAII i RNAPIII wzrasta w fazie postekspansyjnej [7,13].

Locus *sarA* reguluje transkrypcję genów również poprzez mechanizm niezależny od *agr*. Białko SarA wiąże się do sekwencji genów, homologicznych do promotorów *agr* wiążących SarA, modulując transkrypcję zarówno białek zewnątrzkomórkowych,

jak i ściany komórkowej, takich jak: hla (α -hemolizyna), spa (białko A – białko powierzchniowe *S. aureus*, stanowiące ok. 7% ściany komórkowej), fnbA (białko wiążące fibronektynę) czy sec (enterotoksyna C) [6, 8, 13].

Fizjologicznie aktywna cząsteczka SarA występuje w postaci dimeru [46]. Według danych otrzymanych metodą dichroizmu kołowego udział α -helis wynosi 55%, arkuszy β 6%, struktur zwrotnych 15% [40]. Według danych krystalograficznych monomer SarA składa się z pięciu α -helis, krótkiej spinki do włosów β w środku łańcucha polipeptydowego oraz długiej C-terminalnej pętli złożonej z 17 aminokwasów. Spinka β i fragment C-terminalny usytuowane są na przeciwległych końcach monomeru (ryc. 2) [45].

DODATKOWE SYSTEMY REGULACJI HOMOLOGICZNE DO SYSTEMU *sar* U *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

U *Staphylococcus aureus* wykryto również inne geny będące dodatkowymi regulatorami genów wirulencji – nazwano je *sarHI*, *sarR* oraz *sarS*.

Gen *sarHI* zlokalizowany jest między genami *sir A*, *B* i *C* (ang. *staphylococcal iron-regulated genes*) i genem *spa* (białko A). Zidentyfikowano trzy transkrypty genu *sarHI*, o różnych rozmiarach (952, 1549 i ok. 3000 nukleotydów). Zasadowe białko wiążące DNA kodowane przez gen *sarHI* ma masę cząsteczkową 29,9 kDa i teoretyczny punkt izoelektryczny 9,6. Ponadto wykazuje ponad 32% homologii w sekwencji aminokwasów do białka SarA, a jego struktura jest prawdopodobnie zbliżona do dimeru SarA. Ekspresja *sarHI* jest silnie hamowana przez *sarA* oraz *agr*. Stwierdzono powinowactwo SarHI do czterech promotorów: hla (α -toksyna), hld (RNAIII), spa (białko A), ssp (proteinaza serynowa). Pozytywny lub negatywny wpływ SarHI na poziom transkrypcji tych białek zależy od *agr* i *sarA*, a właściwie od stosunku stężeń produktów tych genów, wskazując na to, że współdziałanie wszystkich trzech regulatorów ostatecznie ustala poziom ekspresji genów wirulencji. Alternatywna teoria sugeruje, iż SarHI reguluje ekspresję innych białek regulatorowych, być może są to trzy inne homologi Sar; SarH2, SarH3, SarH4 [46].

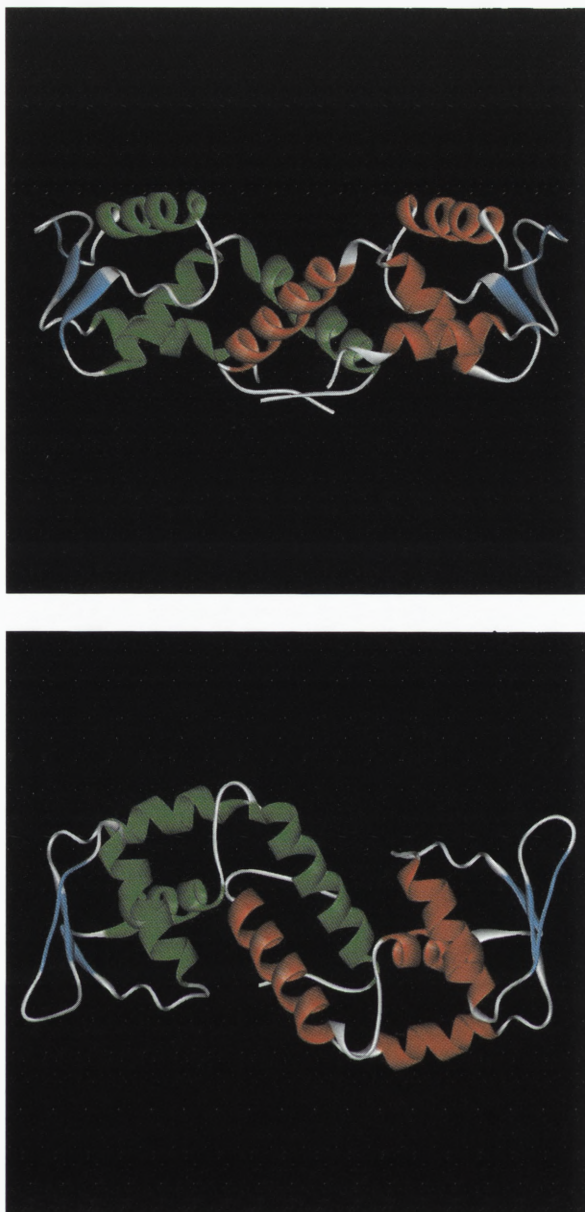
sarR jest genem o długości 345 par zasad, kodującym białko regulatorowe SarR o masie cząsteczkowej 13,7 kDa, teoretycznym punkcie izoelektrycznym 9,8 oraz dominującym udziale aminokwasów obdarzonych ładunkiem (34%). Białko SarR ma sekwencje homologiczne do SarA (51% podobieństw, 28% identyczności) [29]. Monomer białka SarR składa się z pięciu α -helis (stanowiących 75% struktur drugorzędowych), trzech krótkich nici β formujących arkusz antyrównoległy oraz kilku pętli łączących. Helisy α_3 i α_4 tworzą motyw strukturalny HTH, czyli helisa-skręt-helisa (reszty aminokwasowe od 51 do 75). Dzięki międzycząsteczkowym oddziaływaniom hydrofobowym tworzone są dimery. W dimerze SarR pomiędzy

monomerami tworzy się głęboki „kanion”, którego dno stanowią helisy α_1 i α_2 , natomiast krawędzie helisy α_4 . Z przeciwnej strony cząsteczki zgrupowane są wszystkie cztery końce łańcuchów polipeptydowych, tworzące strukturę płaską, zbliżoną do platformy (ryc. 3.). Białko SarR ma nie tylko klasyczną domenę HTH (ang. *helix-turn-helix*) wiążącą się z DNA w dużym rowku, ale także dodatkową pętlę oddziałującą z małym rowkiem DNA. Wiązanie DNA przebiega poprzez interakcje helisy α_4 , która wpasowuje się do dużego rowka DNA. Dodatkowe oddziaływania z DNA tworzone są przez strukturę spinki do włosów, utworzonej przez nici β_2 i β_3 , która dopasowana jest do wąskiego rowka DNA. Powstały w ten sposób kompleks SarR-DNA ma cztery miejsca zaczepienia dimeru białka do nici DNA [27]. Wykazano wiązanie się białka SarR do wszystkich trzech regionów promotorowych znajdujących się w locus *sar*. Głównym efektem wiązania do promotorów *sar* jest obniżenie transkrypcji *sarP1*, a w konsekwencji ekspresji białka SarA. Maksymalna ekspresja SarR występuje w fazie stacjonarnej, co prowadzi do obniżenia ekspresji białka SarA, zwłaszcza w późnej fazie eksponencjalnego wzrostu i w fazie stacjonarnej [29].

SarS jest białkiem zbudowanym z 250 aminokwasów, o masie cząsteczkowej 29,9 kDa, teoretycznym punkcie izoelektrycznym 9,36 i 33,2% zawartości aminokwasów obdarzonych ładunkiem. Stopień homologii SarS do SarA wynosi około 30%. Całą cząsteczkę można podzielić na dwie domeny homologiczne do SarA, każda o długości 125 aminokwasów: fragment C-terminalny o indycentności 34,5% oraz N-terminalny o 28,3% indycentności z SarA. SarS jest aktywatorem syntezy białka A, poprzez specyficzne wiązanie się do promotora *spa*. SarS jest represjonowany przez *sarA* i *agr* [11].

HOMOLOGI SYSTEMÓW *agr* I *sar* WŚRÓD GRONKOWCÓW KOAGULAZO-UJEMNYCH

Locus *agr* jest obecny nie tylko u *Staphylococcus aureus*. Cząsteczkę RNAIII homologiczną do występującej u *S. aureus* wykryto u kilku gronkowców koagulazo-ujemnych: *Staphylococcus lugdunensis* [5, 50], *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus simulans*. Homologi RNAIII tych trzech ostatnich gatunków są podobne do RNAIII *S. aureus*, zwłaszcza w 50 pierwszych i 150 ostatnich nukleotydach oraz obecnością otwartej ramki odczytu [47]. Natomiast cząsteczka RNAIII *S. lugdunensis* nie ma genu dla δ -hemolizyny [5]. RNAIII z różnych szczepów gronkowców koagulazo-ujemnych ma zdolność całkowitej represji transkrypcji białka A i stymulowania genów dla α -toksyny i proteinaz serynowych u *S. aureus* [47].



RYCINA 3. Struktura krystaliczna dimeru SarR widziana w różnych płaszczyznach (rysunki wykonano przy pomocy programu WebLab Viewer Lite 3.7 na podstawie współrzędnych z Protein Data Bank – kod 1HSJ)

Homolog locus *agr* u *S. epidermidis* jest podobnie zorganizowany: zawiera *agrABCD* oraz RNAIII [49]. Ta ostatnia zawiera otwartą ramkę odczytu kodującą 26-aminokwasowy polipeptyd, który różni się trzema aminokwasami od RNAIII kodującego δ -hemolizynę u *S. aureus*. Poziom transkryptu RNAIII jest największy w postekspencyjnej fazie wzrostu [49]. Mutant *S. epidermidis* pozbawiony locus *agr* wykazuje produkcję białek powierzchniowych na wysokim poziomie, a wewnątrzkomórkowych na niskim [51]. Peptyd autoaktywujący u *S. epidermidis* jest oktapeptydem zawierającym tiolestrykowy mostek pomiędzy cysteiną a C-końcową grupą karboksylową. U 15 szczepów *S. epidermidis* znaleziono tylko jeden typ feromonu [37].

U *Staphylococcus epidermidis* stwierdzono ponadto obecność homologu *sar*, w 84% identycznego z białkiem SarA *S. aureus*. Obliczona masa cząsteczkowa tego białka wynosi 14,7 kDa, a teoretyczny punkt izoelektryczny 8,5. Produktami genu *sar* *S. epidermidis* są również trzy nakładające się transkrypty, rozpoczynające się z trzech oddzielnych promotorów, lecz krótsze niż u *S. aureus*. W przeciwieństwie do *S. aureus*, transkrypcja promotora P1 osiąga maksimum w fazie postekspencyjnej. Być może produkt genu *sar* *S. epidermidis* oddziałuje z promotorem homologu genu *agr* również odkrytego u *S. epidermidis* [17].

ROLA *agr* PODCZAS ZAKAŻEŃ GRONKOWCOWYCH

Myszy zainfekowane dzikim szczepem *S. aureus* częściej chorują na zapalenie stawów niż myszy zainfekowane mutantem pozbawionym systemu *agr*. Bakterie po dostaniu się do krwiobiegu migrują z krwią i przedostają się do płynu stawowego. Komórki *S. aureus* z nieaktywnym *agr* mają problemy z „zakotwiczeniem się” w stawie. Nadprodukcja białek powierzchniowych (np. białka A) u mutantu podnosi interakcje bakterii z białkami osocza. Mutanty wiążą więcej niż dziki szczep składników osocza, takich jak: vitronektyna i fibronektyna. Konsekwencją tego jest fagocytoza takich bakterii. Niewiele wiadomo o mechanizmie penetracji naczyń krwionośnych przez *S. aureus*. W procesie tym bierze udział z pewnością czynnik martwicy nowotworu (TNF) oraz interleukina 1 (IL-1), których produkcja indukowana jest przez α -toksynę wydzielaną przez szczep dziki, ale nie przez mutantu *agr*. W procesie wywołującym zapalenie stawów istotna jest również zdolność wiązania sjaloprotein przez bakterie. Mutanty wiążą je o wiele słabiej. Wiele proteinaz wydzielanych przez dziki szczep *S. aureus* uszkadza budujące staw kolagen i proteoglikany [1].

Sprawnie działające systemy *agr* i *sar* są również niezbędne do wywołania zapalenia wśródzia przez *S. aureus* u królika. Podwójny mutant *agr⁻/sar⁻* ma mniejszą zdolność do wywołania tej choroby w porównaniu ze szczepem dzikim. Powodem

jest obniżona produkcja czynników wirulencji. Gęstość bakterii zawierających mutację jest znacznie obniżona, co jest być może związane z obniżoną produkcją α -hemolizyny, cytotoksyny zdolnej do tworzenia porów w błonie i niszczenia płytek krwi i komórek śródbłonka naczyń [9].

Zaobserwowano również, że mutacja wyłączająca *agr* powoduje znaczącą redukcję w powstawaniu i w rozwoju rozmiękczenia kości [18].

agr jest zaangażowany w ekspresję bakteryjnego polisacharydu otoczkowego typu 5 (CP5), który jest produkowany przez ponad 90% gatunków *S. aureus*. Jego rola polega prawdopodobnie na zwiększaniu oporności bakterii na fagocytozę, a tym samym na zwiększaniu ich wirulencji [15]. Przywieranie *S. aureus* do komórek śródbłonkowych jest prawdopodobnie najważniejszym etapem prowadzącym do wywołania infekcji. Mutacje i warunki wzrostu, które eliminują powstawanie polisacharydów otoczkowych, podwyższają zdolność do adhezji u tych bakterii. Wówczas najwyższy poziom wiązania do komórek epitelialnych osiągany jest w postekspozycyjnej fazie wzrostu i nie zależy od *agr*. CP5 hamuje adhezję do bakterii prawdopodobnie przez maskowanie głównych adhezyn. Uważa się, że *agr* jest inhibitorem ekspresji adhezyn [39].

Ekspresja koagulazy u *S. aureus* jest pozytywnie i negatywnie regulowana przez *agr*. Stafylokoagulaza jest białkiem, które przyczynia się do tworzenia fibryny w osoczu ludzkim poprzez nieenzymatyczną aktywację protrombiny. Jest ona, podobnie jak białko A, produkowana głównie podczas ekspozycyjnej fazy wzrostu. Poziom transkryptów genu *coa* kodującego koagulazę jest najwyższy w postekspozycyjnej fazie wzrostu i z czasem maleje. Dowodzi to, że ekspresja koagulazy jest pozytywnie i negatywnie regulowana przez *agr*, podczas gdy ekspresja genu *spa* dla białka A jest hamowana przez RNAIII [25].

Zdolność *S. aureus* do wiązania fibrynogenu jest ważna w przywieraniu bakterii do tkanek gospodarza podczas infekcji. Odpowiedzialne za to są między innymi koagulaza (*coa*) oraz *clumping factor* (*clfA*). Koagulaza *S. aureus* jest odpowiedzialna za zdolność wywoływania krzepnięcia krwi, podczas gdy *clumping factor A* pośredniczy w przemieszczaniu się („kroczeniu”) komórek w obecności fibrynogenu. Regulacja białek wiążących fibrynogen u *S. aureus* jest tylko częściowo zrozumiała. Transkrypcja *coa* jest negatywnie modulowana przez *agr* i występuje głównie podczas ekspozycyjnej fazy wzrostu. W przeciwieństwie do tego transkrypcja *clfA* jest niezależna od *agr* i jest najsilniejsza w postekspozycyjnej fazie wzrostu [52].

Ekspresja białek wiążących fibronektynę (FnBPs) jest negatywnie regulowana przez *agr*, jak również przez mechanizm niezależny od *agr* (prawdopodobnie metabolizm komórki), które hamują syntezę mRNA dla *fnb* we wczesnej ekspozycyjnej fazie wzrostu [44].

PODSUMOWANIE

Zdolność bakterii z rodzaju *Staphylococcus* do wywoływania różnorodnych stanów chorobowych przypisywana jest imponującej ilości zewnątrzkomórkowych, jak i powierzchniowych czynników wirulencji produkowanych przez te mikroorganizmy. Ekspresja wielu białek zaangażowanych w patogenezę jest kontrolowana przez systemy regulacyjne, w których wspólny regulator kontroluje transkrypcję wielu genów. Ekspresja wielu czynników wirulencji jest wysoce skoordynowana i kontrolowana przez dwa główne współpracujące ze sobą systemy regulacji – *agr* i *sar*. Cząsteczki autoregulatorowe wpływają na ekspresję białek powierzchniowych, których synteza jest zredukowana w miarę wzrostu gęstości komórek bakteryjnych, a równocześnie wzrasta produkcja białek zewnątrzkomórkowych [10]. Taka zależność zachowania komórek bakteryjnych od fazy wzrostu wskazuje na kompleksowe interakcje między systemami regulacji. Skoordynowane działanie komórek bakterii możliwe jest dzięki wykształconemu systemowi komunikacji międzykomórkowej *quorum sensing*, opartej na reagowaniu na uwalniane do środowiska cząsteczki sygnałowe – autoinduktory. Po przekroczeniu masy krytycznej komórek bakteryjnych stężenie autoinduktora osiąga wykrywalny poziom, a odpowiedzią jest aktywacja lub represja odpowiednich genów. Funkcjonowanie mechanizmu *quorum sensing* zidentyfikowano u bakterii związanych relacjami pasożytniczymi lub symbiotycznymi z organizmami zwierzęcymi lub roślinnymi. Niejednokrotnie różne gatunki bakterii patogennych współdziałają podczas infekcji. W tej sytuacji być może dzięki komunikacji międzykomórkowej następuje wzajemne wzmocnienie patogenności współpracujących gatunków [16].

Używając mechanizmu *quorum sensing* bakterie uzyskują przewagę nad zaatakowanym organizmem, gdyż mogą osiągnąć dużą gęstość komórek, zanim nastąpi ekspresja determinant wirulencji wywołujących odpowiedź odpornościową gospodarza. W ten sposób bakterie mogą nierozpoznane przygotować zmasowany atak polegający na wyprodukowaniu czynników wirulencji, niszczących mechanizmy obronne gospodarza.

Odkrycie, że szeroka grupa patogennych mikroorganizmów używa mechanizmu *quorum sensing* do kontroli syntezy czynników wirulencji, czyni go atrakcyjnym celem terapii antybiotykowej. Wytypowano kilka możliwości zablokowania sygnału międzykomórkowego, np. poprzez użycie nieaktywnych biologicznie analogów autoinduktora blokujących receptory lub przerwanie szlaku biosyntezy autoinduktora [16].

Trwający wzrost oporności mikroorganizmów na konwencjonalne antybiotyki skłania do poszukiwań nowych strategii zwalczania infekcji bakteryjnych. Zrozumienie genetycznych systemów regulacji ekspresji czynników wirulencji może wskazać nowe docelowe miejsca działania dla nowych grup antybiotyków.

PODZIĘKOWANIA

Serdeczne podziękowania składamy Panu Arturowi Sabatowi, a także Panu prof. dr hab. Adamowi Dubinowi za cenne wskazówki oraz pomoc udzieloną przy opracowywaniu niniejszego artykułu.

LITERATURA

- [1] ABDELNOUR A, ARVIDSON S, BREMELL T, RYDÉN C, TARKOWSKI A. The accessory gene regulator (*agr*) controls *Staphylococcus aureus* virulence in a murine arthritis model. *Infect Immun* 1993; **61**(9): 3879–3885.
- [2] BALABAN N, NOVICK RP. Autocrine regulation of toxin synthesis by *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 1619–1623.
- [3] BALABAN N, NOVICK RP. Translation of RNAIII, the *Staphylococcus aureus agr* regulatory RNAIII molecule, can be activated by a 3-end deletion. *FEMS Microbiology Letters* 1995; **133**: 155–161.
- [4] BAYER MG, HEINRICHS JH, CHEUNG AL. The molecular architecture of the sar locus in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1996; **178**: 4563–4570.
- [5] BENITO Y, LINA G, GREENLAND T, ETIENNE J, VANDENESCH F. *trans*-complementation of a *Staphylococcus aureus agr* mutant by *Staphylococcus lugdunensis agr* RNAIII. *J Bacteriol* 1998; **180**(21): 5780–5783.
- [6] CHAN PF, FOSTER SJ. Role of SarA in virulence determinant production and environmental signal transduction in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1998; **180**: 6232–6241.
- [7] CHEUNG AL, BAYER MG, HEINRICHS JH. Sar genetic determinants necessary for transcription of RNAII and RNAIII in the *agr* locus of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1997; **197**: 3963–3971.
- [8] CHEUNG AL, EBERHARDT K, HEINRICHS JH. Regulation of protein A synthesis by *sar* and *agr* loci of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 1997; **65**(6): 2243–2249.
- [9] CHEUNG AL, EBERHARDT KJ, CHUNG E, YEAMAN MR, SULLAM PM, RAMOS M, BAYER AS. Diminished virulence of a *sar⁻/agr⁻* mutant of *Staphylococcus aureus* in the rabbit model of endocarditis. *J Clin Invest* 1994; **94**: 1815–1822.
- [10] CHEUNG AL, KOOMEY JM, BUTLER CA, PROJAN SJ, FISCHETTI VA. Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus *sar* distinct from *agr*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 6462–6466.
- [11] CHEUNG AL, SCHMIDT K, BATEMAN B, HANNA AC. SarS, a SarA homolog repressible by *agr*, is an activator of protein A synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 2001; **69**: 2448–2445.
- [12] CHIEN Y, CHEUNG AL. Molecular interactions between two global regulators, *sar* and *agr*, in *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 1998; **273**: 2645–2656.
- [13] CHIEN Y, MANNA AC, PROJAN SJ, CHEUNG AL. SarA, a global regulator of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*, binds to a conserved motif essential for *sar*-dependent gene regulation. *J Biol Chem* 1999; **274**: 37169–37176.
- [14] CHIEN Y, MANNA AC, CHEUNG AL. SarA level is a determinant of *agr* activation in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 1998; **30**(5): 991–1001.

- [15] DASSY B, HOGAN T, FOSTER TJ, FOURNIER J-M. Involvement of the accessory gene regulator (*agr*) in expression of type 5 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus*. *J General Microbiol* 1993; **139**: 1301–1306.
- [16] de KIEVIT TR, IGLEWSKI BH. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun* 2000; **68(9)**: 4839–4849.
- [17] FLUCKINGER U, WOLZ C, CHEUNG AL. Characterization of a *sar* homolog of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 1998; **66**: 2871–2878.
- [18] GILLASPY AF, HICKMON SG, SKINNER RA, THOMAS JR, NELSON CL, SMELTZER MS. Role of the accessory gene regulator (*agr*) in pathogenesis of staphylococcal osteomyelitis. *Infect Immun* 1995; **63(9)**: 3373–3380.
- [19] GIRAUDO AT, RASPANTI CG, CALZOLARI A. Characterization of a Tn551-mutant of *Staphylococcus aureus* defective in the production of several exoproteins. *Can J Microbiol* 1994; **40**: 677–681.
- [20] JANZON L, ARVIDSON S. The role of the δ -lysin gene (*hld*) in the regulation of virulence genes by the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *EMBO J* 1990; **9(5)**: 1391–1399.
- [21] JANZON L, LÖFDAHL S, ARVIDSON S. Identification and nucleotide sequence of the delta-lysin gene, *hld*, adjacent to the accessory gene regulator (*agr*) of *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet* 1989; **219**: 480–485.
- [22] JIG, BEAVIS R, NOVICK RP. Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science* 1997; **276**: 2027–2030.
- [23] JI G, BEAVIS RC, NOVICK RP. Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 12055–12059.
- [24] KREIKEMEYER B, BOYLE MDP, BUTTARO BA, HEINEMANN M, PODBIELSKI A. Group A streptococcal growth phase-associated virulence factor regulation by a novel operon (*Fas*) with homologies to two-component-type regulators requires a small RNA molecule. *Mol Microbiol* 2001; **39(2)**: 392–406.
- [25] LEBEAU CH, VANDENESCH F, GREENLAND T, NOVICK R, ETIENNE J. Coagulase expression in *Staphylococcus aureus* is positively and negatively modulated by an *agr*-dependent mechanism. *J Bacteriol* 1994; **176(17)**: 5534–5536.
- [26] LINA G, JARRAUD S, JI G, GREENLAND T, PEDRAZA A, ETIENNE J, NOVICK RP, VANDENESCH F. Transmembrane topology and histidine protein kinase activity of AgrC, the *agr* signal receptor in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 1998; **28(3)**: 655–662.
- [27] LIU Y, MANNA A, LI R, MARTIN WE, MURPHY RC, CHEUNG AL, ZHANG G. Crystal structure of the SarR protein from *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 6877–6882.
- [28] LYON GJ, MAYVILLE P, MUIR TW, NOVICK RP. Rational design of a global inhibitor of the virulence response in *Staphylococcus aureus*, based in part on localization of the site of inhibition to the receptor-histidine kinase, AgrC. *PNAS* 2000; **97(24)**: 13330–13335.
- [29] MANNA A, CHEUNG AL. Characterization of sarR, a modulator of sar expression in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 2001; **69**: 885–896.
- [30] MAYVILLE P, JI G, BEAVIS R, YANG H, GOGER M, NOVICK RP, MUIR TW. Structure-activity analysis of synthetic autoinducing thiolactone peptides from *Staphylococcus aureus* responsible for virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 1218–1223.
- [31] McNAMARA PJ, MILLIGAN-MONROE KC, KHALILI S, PROCTOR RA. Identification, cloning, and initial characterization of rot, a locus encoding a regulator of virulence factor expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2000; **182(11)**: 3197–3203.
- [32] MORFELDT E, TEGMARK K, ARVIDSON S. Transcriptional control of the *agr*-dependent virulence gene regulator, RNAlII, in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* 1996; **21(6)**: 1227–1237.

- [33] NOVICK RP, PROJAN SJ, KORNBLUM J, ROSS HF, JI G, KREISWIRTH B, VANDENESCH F, MOGHAZEH S. The *agr* P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet* 1995; **248**: 446–458.
- [34] NOVICK RP, ROSS HF, PROJAN SJ, KORNBLUM J, KREISWIRTH B, MOGHAZEH S. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J* 1993; **12**(10): 3967–3975.
- [35] OTTO M, ECHNER H, VOELTER W, GÖTZ F. Pheromone cross-inhibition between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 2001; **69**(3): 1975–1960.
- [36] OTTO M, SÜMUTH R, VUONG C, JUNG G, GÖTZ F. Inhibition of virulence factor expression in *Staphylococcus aureus* by the *Staphylococcus epidermidis* *agr* pheromone and derivatives. *FEBS Letters* 1999; **450**: 257–262.
- [37] OTTO M, SÜBMUTH R, JUNG G, GÖTZ F. Structure of the pheromone peptide of the *Staphylococcus epidermidis* *agr* system. *FEBS Letters* 1998; **424**: 89–94.
- [38] PENG HL, NOVICK RP, KREISWIRTH B, KORNBLUM J, SCHLIEVERT P. Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1988; **170**(9): 4365–4372.
- [39] PÖHLMANN-DIETZE P, ULRICH M, KISER KB, DÖRING G, LEE JC, FOURNIER J-M, BOTZENHART K, WOLZ CH. Adherence of *Staphylococcus aureus* to endothelial cells: influence of capsular polysaccharide, global regulator *agr*, and bacterial growth phase. *Infect Immun* 2000; **68**(9): 4865–4871.
- [40] RECHTIN TM, GILLASPY AF, SCHUMACHER MA, BREUNAN RG, SMELTZER MS, HURLBURT BK. Characterization of the SarA virulence gene regulator of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 1999; **33**: 307–316
- [41] RECSEI P, KREISWIRTH B, OREILLY M, SCHLIEVERT P, GRUSS A, NOVICK RP. Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by *agr*. *Mol Gen Genet* 1986; **202**: 58–61.
- [42] REGASSA LB, BETLEY MJ. Alkaline pH decreases expression of the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1992; **174**(15): 5095–5100.
- [43] REGASSA LB, NOVICK RP, BETLEY MJ. Glucose and nonmaintained pH decrease expression of the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 1992; **60**(8): 3381–3388.
- [44] SARAVIA-OTTEN P, MÜLLER H-P, ARVIDSON S. Transcription of *Staphylococcus aureus* fibronectin binding protein genes is negatively regulated by *agr* and an *agr*-independent mechanism. *J Bacteriol* 1997; **179**(17): 5259–5263.
- [45] SCHUMACHER MA, HURLBURT BK, BRENNAN RG. Crystal structures of SarA, a pleiotropic regulator of virulence genes in *S. aureus*. *Nature* 2001; **409**: 215–219.
- [46] TEGMARK K, KARLSSON A, ARVIDSON S. Identification and characterization of SarH1, a new global regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 2000; **37**: 398–409.
- [47] TEGMARK K, MORFELDT E, ARVIDSON S. Regulation of *agr*-dependent virulence genes in *Staphylococcus aureus* by RNAIII from Coagulase-Negative Staphylococci. *J Bacteriol* 1998; **180**(12): 3181–3186.
- [48] van LEEUWEN W, van NIEUWENHUIZEN W, GIJZEN CH, VERBRUGH H, van BELKUM A. Population studies of methicillin-resistant and -sensitive *Staphylococcus aureus* strains reveal a lack of variability in the *agrD* gene, encoding a staphylococcal autoinducer peptide. *J Bacteriol* 2000; **182**(20): 5721–5729.
- [49] van WAMEL WJ, van ROSSUM G, VERHOEF J, VANDENBROUCKE-GRAULS CM, FLUIT AC. Cloning and characterization of an accessory gene regulator (*agr*)-like locus from *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol Lett* 1998; **163**(1): 1–9.
- [50] VANDENESCH F, PROJAN SJ, KREISWIRTH B, ETIENNE J, NOVICK RP. *agr*-related sequences in *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiol Lett* 1993; **111**(1): 115–22.

- [51] VUONG C, GÖTZ F, OTTO M. Construction and characterization of an *agr* deletion mutant of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 2000; **68**(3): 1048–1053.
- [52] WOLZ CH, McDEVITT D, FOSTER TJ, CHEUNG AL. Influence of *agr* on fibrinogen binding in *Staphylococcus aureus* Newman. *Infect Immun* 1996; **64**(8): 3142–3147.

Redaktorzy prowadzący – M. Kapiszewska i J. Kawiak

Otrzymano: 09.2001 r.

Przyjęto: 30.10.2001 r.

Adres autora: ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków

e-mail: CHMIEL@mol.mol.uj.edu.pl

EUREKA@awe.mol.uj.edu.pl

RAK PIERSI: ZMIANY METYLACJI I EKSPRESJI GENÓW RECEPTORÓW JĄDROWYCH: ESTROGENOWEGO α ($ER\alpha$) I KWASU RETINOWEGO $\beta 2$ ($RAR\beta 2$)

**BREAST CANCER: ALTERATIONS OF METHYLATION
AND EXPRESSION GENES OF NUCLEAR RECEPTORS:
 α ESTROGEN ($ER\alpha$) AND $\beta 2$ RETINOIC ACID ($RAR\beta 2$)**

Krystyna FABIANOWSKA-MAJEWSKA

Zakład Amin Biogennych PAN w Łodzi oraz Zakład Chemii Medycznej IFiB
Akademii Medycznej w Łodzi

Streszczenie: We wczesnej fazie raka piersi ważnym elementem transformacji komórek są epigenetyczne zmiany genów kodujących białka, które uczestniczą w regulacji proliferacji i różnicowania komórek. Do białek pełniących taką rolę należą receptory jądrowe: estrogenowy α ($ER\alpha$) i kwasu retinowego $\beta 2$ ($RAR\beta 2$). Na podstawie badań genetycznych komórek raka piersi, niewrażliwych na działanie preparatów przeciwestrogennych i niewrażliwych na pochodne kwasu retinowego, stwierdzono, że oporność komórek na tego typu leki może wynikać z zahamowanej ekspresji, na poziomie transkrypcyjnym, genów wymienionych receptorów. Wyciszenie transkrypcji genów $ER\alpha$ i $RAR\beta 2$ często jest związane ze zmianami (hipermetylacją) wzoru metylacji regionów promotorowych tych genów. Zmiany te są podstawowym elementem złożonego procesu inaktywacji chromatyny, jaki towarzyszy transformacji nowotworowej komórek. Ocena zmian wzoru metylacji regionów promotorowych genów $ER\alpha$ i $RAR\beta 2$, jak i ocena możliwości reaktywacji genów powinny mieć ważne farmakologiczne znaczenie dla doboru skutecznej skojarzonej terapii w celu zahamowania rozrostu komórek raka piersi.

(*Postępy Biologii Komórki* 2002; 29: 121–139)

Słowa kluczowe: metylacja DNA, rak piersi, receptor estrogenowy α , receptor kwasu retinowego $\beta 2$.

Summary: Epigenetic alterations of genes coding proteins which contribute to regulation of cell proliferation and differentiation, are a significant element of early development of breast cancer. Two nuclear proteins (i.e. estrogen receptor α , $ER\alpha$, and retinoic acid receptor $\beta 2$, $RAR\beta 2$) play an important role in the regulation of cells function. Clinical and genetic studies of breast cancer cells resistant to antiestrogen and retinoid therapy, reveal that cell resistance results from the lack of $ER\alpha$ and $RAR\beta 2$

genes expression on transcriptional level. The transcriptional silence of genes, including also *ER α* and *RAR β 2*, is frequently associated with hypermethylation of promoter regions of these genes. Alterations of promoter methylation are the most significant element of a complex process which leads to chromatin inactivation. Estimation of methylation pattern changes of *ER α* and *RAR β 2* genes, and possibilities of gene reactivation should be important for the selection of effective therapy to inhibit development and invasion of breast cancer cells.

(*Advances in Cell Biology* 2002; 29: 121–139)

Key words: DNA methylation, breast cancer, estrogen receptor α , retinoic acid receptor β 2.

WSTĘP

W okresie ostatniego dziesięciolecia nastąpił gwałtowny rozwój badań obejmujących biologiczne i metaboliczne zmiany w komórkach nowotworowych. Jednak inicjacja transformacji nowotworowej nadal pozostaje najtrudniejszym do wyjaśnienia etapem. Do szeroko badanych procesów towarzyszących kancerogenezie należą zmiany epigenetyczne wielu genów, które uniemożliwiają prawidłową ekspresję genów przy zachowaniu niezmięnionej sekwencji nukleotydowej DNA [5,6,26]. Do najważniejszych epigenetycznych zmian, zakłócających prawidłową ekspresję genów, należy zaliczyć zmianę wzoru metylacji DNA [6,7,24,26,33,38,45,54]. W większości przypadków zmiany te obejmują geny, które kodują: białka uczestniczące w kontroli regulacji cyklu komórkowego, białka o funkcji czynników transkrypcyjnych i receptorów, białka przekazu sygnału komórka-komórka i sygnału apoptozy [5].

Komórki nowotworowe, w tym także komórki raka piersi, często charakteryzują się podwyższoną zawartością metylowanych cytozyn w sekwencjach dinukleotydowych CpG zlokalizowanych w regionach promotorowych genów. Zdaniem niektórych badaczy, zwiększona metylacja regionów promotorowych i ich sąsiedztwa jest procesem dominującym w mechanizmie deaktywacji chromatyny, obejmującej, poza metylacją, modyfikacje histonów oraz zmianę struktury chromatyny w formę skondensowaną, niedostępną dla białek kompleksu transkrypcyjnego [26,58,68].

Na podstawie badań zmian metylacji DNA, obserwowanych w komórkach krwi u pacjentów z ostrą białaczką szpikową (AML), sugeruje się, że w każdym typie nowotworu wzrost metylacji sekwencji dinukleotydowych CpG zlokalizowanych w regionach regulatorowych genów nie odnosi się do pojedynczego genu, lecz obejmuje specyficzny zbiór równocześnie metylowanych genów, kodujących białka związane wzajemną zależnością [52]. Wydaje się, że te sugestie są słuszne także w przypadku komórek raka piersi. W komórkach tych zmiany metylacji obserwowano m.in. w genach supresorowych, kodujących białka uczestniczące w regulacji cyklu komórkowego m.in. *BRCA1* [21,34,49,67], *p16* [37,72], *p53* [43] i cykliny *D2* [25]. Zwiększony poziom metylacji w komórkach raka piersi obserwowano także w genie

kodującym białko adhezyjne kadherynę E, białko odpowiedzialne za regulację inwazyjności komórek nowotworowych [22,57].

Ostatnia dekada to także okres intensyfikacji badań zmian ekspresji genów jądrowych receptorów: estrogenowego α (ER α) i kwasu retinowego β 2 (RAR β 2). Receptory te w kompleksie hormon-receptor stymulują transkrypcję wielu genów. Przyczyną szczególnego zainteresowania receptorami ER α i RAR β 2 było stwierdzenie oporności pewnych typów raka piersi na leczenie przeciwestrogenne i oporności na działanie metabolitów witaminy A. Ponieważ rak piersi jest typowym nowotworem hormono-zależnym, to zarówno w leczeniu paliatywnym, jak i w leczeniu jego przerzutów stosuje się często terapię przeciwestrogenną. Stosowane leki to syntetyczne niesteroidowe związki, takie jak: tamoksyfen i jego pochodne oraz inne związki przeciwestrogenne o symbolach: ICI 182,780 i ICI 164,384 [39, 55]. Dla 50–60% pacjentek leczenie wymienionymi preparatami jest skuteczne lub efektywne tylko w początkowym okresie, ponieważ dłuższe stosowanie może prowadzić do nabycia odporności [39]. Jednak dla prawie 40% pacjentek, u których obserwuje się niższy stopień zróżnicowania histologicznego guza i niekorzystne efekty rokownicze, terapia przeciwestrogenna jest nieskuteczna. W terapii raka piersi w celu zahamowania rozrostu tkanki nowotworowej stosuje się także naturalne metabolity witaminy A. Są to głównie: całkowicie *trans* kwas retinowy (ATRA, ang. *All Trans Retinoic Acid*) i 9-*cis*-kwas retinowy (9-*cis*-RA) lub ich syntetyczne analogi, np. fernetynid. Jednak wyniki klinicznych badań wskazują, że w zaawansowanym raku piersi efektywność retinoidów jako leków hamujących proliferację komórek jest często znikoma [92]. Badania biochemiczne pozwoliły ustalić, że ta niepodatność na terapię przeciwestrogenną, jak i retinoidową może być związana z zablokowaniem transkrypcji genów kodujących receptory: ER α [39,40,69,90] i/lub RAR β 2 [16,73,78,86,87,94]. Jedną z najczęstszych przyczyn wyciszenia transkrypcji tych genów jest zwiększona metylacja regionów promotorowych ER α [18,28,29,35,57,61,90] i RAR β 2 [1,10,56,79].

W niniejszej pracy zajmuję się postęпами w wyjaśnianiu roli zmian metylacji DNA w inaktywacji genów jądrowych receptorów hormonów lipofilnych: ER α i RAR β 2 w komórkach raka piersi.

METYLACJA DNA A DEAKTYWACJA GENÓW

Metylacja DNA następuje po replikacji DNA zarówno w komórkach prawidłowych [71], jak i w komórkach ze zmianami patologicznymi, związanymi z procesem starzenia [38] lub nowotworzenia [5,6,7,26,33,45,54,68]. Procesy te związane są z wyciszeniem transkrypcji genów. W komórkach ssaczych metylowana jest cytozyna i to głównie w dinukleotydocowych sekwencjach CpG, które stanowią 1–2% całego

DNMT1 [15,68,95]. Koniec N białka DNMT1 zawiera też domenę oddziałującą z jądrowym antygenem komórki proliferacyjnej, PCNA (ang. *Proliferating Cell Nuclear Antigen*) [94]. Brak obu tych domen odnotowano w pozostałych izoformach metylotransferazy DNA. Aktywność katalityczna, zlokalizowana na końcu C, regulowana jest przez oddziaływania z innymi białkami. Jednym z nich jest białko p23, wchodzące w skład białek kompleksu współpracującego z receptorem progesteronowym [93]. Na podstawie badań *in vitro* wiadomo natomiast, że aktywność DNMT1 może być zahamowana przez 5-aza-2'-deoksycytydynę (5-aza-dCyt, decitabina), silny kompetycyjny inaktywator metylotransferazy DNA [10,11,19,59]. Wielokrotnie w badaniach komórek raka piersi różnych fenotypów wykazano, że lek ten nie tylko hamuje aktywność enzymu, ale prowadzi do reaktywacji genów, np. genu receptora ER α [29] czy genu supresorowego p16(ink4A) [75]. Także wyniki naszych badań regulacji aktywności metylotransferazy DNA w komórkach L1210 i K562, potwierdzają właściwości inhibitorowe tego analogu deoksycytydyny [27]. Ponadto wyniki naszych badań wskazują, że aktywność DNMT1 może być pośrednio hamowana przez analogi adenozyne stosowane w leczeniu białaczek, kladrybinę i fludarabinę, w mechanizmie obejmującym cykl aktywnego metylu [81,82].

W mechanizmie inaktywacji genów ważną rolę przypisywano także procesowi deacetylacji histonów [14,24,62,66,77,88]. Badania genów *p15* i *p16* o zwiększonym poziomie metylacji izolowanych z komórek, które były poddane działaniu inhibitorów obu reakcji, metylacji DNA i deacetylacji histonów (tj. 5-aza-dCyt, inhibitora aktywności DNMT1 i trichostatyny A, TSA, inhibitora aktywności deacetylazy), wykazały jednak, że geny te były reaktywowane w komórkach wystawionych na działanie tylko 5-aza-dCyt lub obu związków razem 5-aza-dCyt i TSA. Zastosowanie obu związków pozwoliło na znaczne obniżenie stężenia obu inhibitorów [14]. W doświadczeniach z wymienionymi genami działanie samego inhibitora deacetylazy nie prowadziło do ich reaktywacji. Wyniki tych badań potwierdzają, że w mechanizmie inaktywacji genów, metylacja regionów promotorowych jest procesem dominującym lub synergicznym do deacetylazy histonów [6,14].

Molekularny mechanizm odpowiedzialny za nadekspresję genu *DNMT1* w komórkach nowotworowych nie jest jeszcze dobrze poznany. Prawdopodobnie regulacja ekspresji na poziomie transkrypcji jest wielokierunkowa i obejmuje tak hormonalną regulację, jak i aktywację promotora przez białka kompleksu AP-1, kontrolowane przez podstawowy komórkowy przekaz sygnału RAS-MAPK (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinase*) [20]. W regionie regulatorowym genu *DNMT1*, zawierającym około 2000 zasad, wyodrębniono cztery miejsca ważne dla inicjacji transkrypcji, P1-P4. Trzy z nich (P2-P4) podlegają aktywacji przez białko JUN; ta aktywacja może być zahamowana przez receptor glikokortykosteroidowy w sposób zależny od ligandu [9,70]. Z kolei, w nadekspresję białek onkogennych szlaku sygnałowego RAS-c-JUN, w hormono-zależnych komórkach raka piersi, zaangaż-

żowany jest aktywowany estrogenem receptor $ER\alpha$, który reguluje transkrypcję onkogenów *c-Ha-RAS* i *c-JUN* [31]. Natomiast miejsce inicjacji transkrypcji (P1) genu *DNMT1* znajduje się w obszarze bogatym w sekwencje CpG, podobnie jak w przypadku typowych genów metabolizmu podstawowego [9]. Ponieważ w komórkach nowotworowych z nadekspresją genu *DNMT1* obserwowano także zmniejszony poziom metylacji, to fakt ten sugeruje możliwość dodatkowej modulacji transkrypcji poprzez hipometylację promotora [13].

Obecny stan wiedzy nie pozwala wyznaczyć miejsca dla reakcji metylacji regionów promotorowych w hierarchii ważności procesów uczestniczących w transformacji nowotworowej. Dzięki zastosowaniu nowych technik analizy DNA [60] w okresie ostatnich 10 lat wykazano zmiany wzoru metylacji DNA, jak i wzrost aktywności DNMT1 w komórkach wielu typów nowotworów. Ważność procesu metylacji w kancerogenezie podkreślają wyniki doświadczeń, w których komórki linii mysich fibroblastów NIH 3T3 ulegały transformacji nowotworowej po podaniu egzogennej mysiej metylotransferazy DNA [80]. Inaktywacja *Dnmt1* w mysich komórkach raka okrężnicy, dokonana w drodze rekombinacji genetycznej i działania farmakologicznego, korelowała z hamowaniem procesu nowotworzenia [44, 70]. Ponieważ nieznan jest komórkowy mechanizm inicjujący zmiany epigenetyczne w procesach kancerogenezy lub starzenia, to wyjaśnienie, czy zmiany metylacji DNA są następstwem kancerogenezy, czy są jednym z elementów złożonego procesu inicjacji nowotworowej transformacji komórek prawidłowych, jest nadal trudne [36]. Jest możliwe, że epigenetyczne zmiany są dziedziczną informacją genetyczną, gdyż i taka hipoteza została wysunięta [64].

Ponadto należy podkreślić, że metylacja DNA może być przyczyną wzrostu genetycznych zmian jako efekt mutacyjnych spontanicznych tranzycji metylocytozyny w tyminę. Fakt ten potwierdzają często występujące mutacyjne tranzycje C→T w sekwencjach CpG genu *p53* w komórkach wielu typów nowotworów [43].

METYLACJA GENÓW RECEPTORÓW JĄDROWYCH: $ER\alpha$ i $RAR\beta 2$

Receptor estrogenowy α ($ER\alpha$) i receptor kwasu retinowego $\beta 2$ ($RAR\beta 2$) należą do nadrodziny receptorów jądrowych dla lipofilnych hormonów, liczącej obecnie ponad 150 białek receptorowych. Wszystkie one po aktywacji swoistymi ligandami są silnymi regulatorami rozwoju i różnicowania komórek oraz regulatorami funkcji specyficznych białek. Zgodnie z modelem działania, zaproponowanym w 1985 roku przez Yamamoto [89], związanie hormonu (H) z receptorem (R) indukuje allosteryczne zmiany umożliwiające kompleksowi hormon-receptor (HR) rozpoznać właściwą dla danego kompleksu sekwencję DNA, warunkującą odpowiedź na hormon

(HRE, ang. *Hormon Response Element*) i jako czynnik transkrypcyjny modulować transkrypcję odpowiedniego genu. Aby kompleks ujawnił swoje właściwości w komórce, muszą być obecne: hormon i białko receptorowe; brak białka receptorowego jest często stwierdzany w komórkach raka piersi. I tak, brak receptora ER α obserwowano w komórkach raka piersi, które są niewrażliwe na działanie preparatów przeciwestrogennych. Natomiast, oporność na przeciwo proliferacyjne działanie retinoidów może być wynikiem braku receptora RAR β 2. W obu przypadkach brak białek receptorowych może wynikać z zahamowania, na poziomie transkrypcji, ekspresji genów kodujących te białka. Jedną z przyczyn tego zjawiska, często podawaną, był zwiększony poziom metylacji regionów regulatorowych genu ER α [35,57,90] i RAR β 2 [1,10,56,79].

Receptor estrogenowy α (ER α). Receptor ER α należy do rodziny receptorów hormonów steroidowych i w prawidłowych komórkach może być aktywowany przez naturalne estrogeny: 17 β -estradiol, estron i estriol. Do rodziny tej ponadto należą receptory: progesteronowy (PR), androgenowy (AR), glikokortykosteroidowy (GR) i mineralokortykosteroidowy (MR) [50]. Według innej klasyfikacji uwzględniającej strukturę kompleksu z aktywującym receptor ligandem oraz uwzględniającej budowę sekwencji DNA, warunkującą odpowiedź na hormon (HRE), receptory ER należą do I klasy. Receptor tej klasy tworzy z ligandem homodimeryczny kompleks, rozpoznający palindromową sekwencję AGGTCANNNTGACCT [50]. Zainteresowanych charakterystyką budowy receptorów estrogenowych podrodziny α i β odsyłam do artykułu przeglądowego [76].

W kancerogenezie i leczeniu raka piersi ważną rolę odgrywa oddziaływanie pomiędzy 17 β -estradiolem (E $_2$) a receptorem ER α [34]. Powszechnie wiadomo, że estrogen stymuluje rozwój pewnych typów nowotworów piersi i wynika to m.in. z faktu, że estrogen wraz z receptorem ER α uczestniczy w regulacji transkrypcji takich onkogenów, jak: *c-Ha-RAS* i *c-JUN* [31]. Geny te kodują białka uczestniczące w regulacji ekspresji genów, m.in. w regulacji ekspresji genu *DNMT1*, poprzez przekaz sygnału RAS-AP-1[70]. Kompleks E $_2$ -ER α reguluje także transkrypcję genu kadheryny E, białka adhezyjnego. Brak aktywności tego genu stwierdza się często wraz z nieaktywnym transkrypcyjnie genem ER α w komórkach raka piersi [57]. W badaniach *in vitro* wykazano, że estrogen aktywuje dwa geny supresorowe, ważne dla kancerogenezy komórek sutka: *BRCA1* i *p53*. Białko BRCA1 uczestniczy w naprawie oksydacyjnych uszkodzeń DNA i aktywuje transkrypcję genów zależną od białka p53 [34,41,92]. W komórkach raka piersi stwierdzono wzajemną zależność pomiędzy ekspresją genu ER α i metylacją genu *BRCA1*. Zwiększona metylacja regionu promotorowego genu *BRCA1* koreluje z brakiem ekspresji zarówno genu ER α , jak i genu receptora progesteronowego (PR)[34]. Najnowsze doniesienia wskazują, że w komórkach raka piersi MCF-7 estrogen indukuje także transkrypcję genów kodujących białka enzymatyczne, ważne dla metabolizmu puryn, pirymidyn i syntezy DNA, deaminazy adenozykowej (ADA)[84,85] i syntetazy tymidylanowej

(TS) [83]. W wymienionej aktywacji transkrypcji ważną rolę pełni interakcja pomiędzy E_2 -ER α i czynnikiem transkrypcyjnym Sp1 [63,83,84]. Jak wspomniałam w poprzednim rozdziale, czynnik Sp1 zaliczany jest do elementów zabezpieczających strukturę chromatyny przed metylacją *de novo* [12]. Ten kompleks E_2 -ER α /Sp1 działa w regionach promotorowych (bogatych w sekwencje CpG) obu genów ADA i TS; w obrębie tych regionów znajduje się sekwencja ERE (ang. *Estrogen Response Element*). Mechanizm indukowania transkrypcji przez kompleks E_2 -ER α /Sp1/wyspy CpG/ERE stwierdzono dla wielu genów kodujących białka: c-FOS, p27, RAR α 1, receptor dla progesteronu, katepsynę D, BCL-2 i białko wiążące IGF (ang. *Insulin-like Growth Factor*) [83].

W leczeniu raka piersi, aby zahamować stymulujące transkrypcję działanie estrogenu, stosowana jest terapia mająca na celu obniżenie poziomu estrogenu przez podawanie leków przeciwestrogennych [34,55], często wspomaganych naturalnymi lipofilnymi witaminami lub ich metabolitami, np. witaminą D₃ lub 9-*cis* RA [48]. Jednak dla wielu pacjentek terapia antagonistami estrogenów jest nieskuteczna i oporność ta, jak wykazały kliniczne i genetyczne obserwacje, może wynikać z braku białka receptorowego ER α . Brak ten, ujawniający się wraz z rozwojem choroby, najczęściej jest wynikiem wyciszenia genu na poziomie transkrypcji [35,39,40,90]. W świetle tych faktów, oznaczenie obecności receptora ER α w komórkach raka piersi staje się ważnym wskaźnikiem dla klasyfikacji nowotworu na podatny, ER α (+) lub niepodatny ER α (-), na terapię przeciwestrogenną [48]. Początkowo przypuszczano, że brak aktywności transkrypcyjnej genu *ER α* , związany z opornością na preparaty przeciwestrogenne, jest wynikiem mutacyjnych zmian genu w komórkach raka piersi. Jednak badania genetyczne komórek izolowanych z guzów nie wykazały znaczących zmian mutacyjnych genu *ER α* typu insercje, delecje, rearanżacje czy punktowe mutacje [39,69,90]. Zahamowanie ekspresji genu *ER α* następuje głównie na skutek zmian epigenetycznych, wśród których dominuje zwiększony poziom metylacji regionów regulatorowych genu *ER α* [18,28,29,-46,57,61,90].

Gen *ER α* jest zlokalizowany na chromosomie 6q25 [39]. Ma dwa regiony promotorowe rozdzielone intronem o długości około 2000 par zasad. Promotory te: dalszy B (PO, o długości 292 pary zasad) i bliższy A (P1, 294 pary zasad), różnią się aktywnością w poszczególnych fenotypach komórek raka piersi [40]. Na podstawie analizy gęstości sekwencji CpG i miejsc restrykcyjnych genu wrażliwych na metylację ustalono ważne dla aktywacji obu promotorów obszary z wyspami CpG, które decydują o włączeniu lub wyłączeniu danego promotora w proces transkrypcji. Dla promotora B, dalszego, obszar ten umiejscowiony jest w eksonie 1' w pobliżu -2085 zasady. Natomiast region regulatorowy bliższego promotora A zawiera w obszarze od +400 do +500 duże zagęszczenie sekwencji CpG i metylacja tego regionu ma zasadnicze znaczenie dla inicjacji ekspresji genu *ER α* [40,46]. (W obu przypadkach lokalizację miejsc wrażliwych na metylację liczono od startu

transkrypcji inicjowanej przez promotor bliższy A). Oba promotory A i B indukują transkrypcję genu dając, w drodze alternatywnego składania, produkty różniące się jedynie fragmentem na końcu 5'. Promotor B daje transkrypt o 44 zasady dłuższy i fragment ten nie podlega translacji, a jedynie pełni ważną rolę w mechanizmie nadekspresji białka ER α w komórkach raka piersi ER α (+). W prawidłowych komórkach gruczołu mlecznego i komórkach raka piersi linii MCF-7 i T-47-D, które są komórkami ER α (+), oba promotory są aktywne. W komórkach linii BT-20 i ZR-75-1 tylko promotor bliższy A inicjuje transkrypcję, natomiast w komórkach linii MDA-MB-231 aktywny jest jedynie promotor B [32]. Badania komórek raka piersi wskazują, że brak receptora ER α , związany ze zwiększonym poziomem metylacji obu promotorów lub tylko promotora bliższego A, często charakteryzuje niepodatność na leczenie przeciwestrogenne; tę grupę pacjentek określa się jako ER α (-) [39,40, 46]. Na uwagę zasługuje fakt, że metylacja obu promotorów A i B także jest negatywnie skorelowana z ekspresją genu receptora progesteronowego (PR) [39]. Znaczącą rolę metylacji regionów promotorowych w epigenetycznej inaktywacji genu ER α potwierdzają badania *in vitro*, które wskazują, że gen ten może być reaktywowany przez podanie 5-aza-dCyt, inhibitor metylotransferazy DNMT1 [28,29].

Wyniki najnowszych badań wskazują, że aktywność transkrypcyjna genu ER α regulowana jest nie tylko przez metylację jego regionów promotorowych, lecz może zależeć od białek należących do czynników transkrypcyjnych AP2, które aktywują promotor [51]. Promotor A jest transaktywowany przez białko ERT-1, identyfikowane także jako AP2 γ [51]. Natomiast aktywacja promotora B wymaga obecności białka o symbolu ERBF-1[90]. Brak tego ostatniego stwierdzono w fenotypie komórek raka piersi MDA-MB-231, także charakteryzujących się brakiem ekspresji genu ER α . Komórki linii MDA-MB-231, w których transkrypcję genu ER α inicjuje promotor B, o małej gęstości sekwencji CpG, są niewrażliwe na działanie 5-aza-dCyt. Reekspresja genu ER α następuje po podaniu TSA, inhibitora deacetylazy histonów [88]. Fakt ten może sugerować, że w komórkach MDA-MB-231 występuje tzw. przejściowa represja transkrypcji, w której kompleks białek na czele z HDAC1 i HDAC2 tworzą strukturę chromatyny niedostępną dla czynnika transaktywującego ERBF-1 [62,66].

Zatem można stwierdzić, że w komórkach raka piersi ER α (-) czynnikiem bezpośrednio regulującym mechanizm blokowania ekspresji receptora ER α , poprzez wyłączenie aktywności jednego lub obu promotorów jest zwiększona metylacja ich regionów promotorowych (np. w komórkach BT-20). W komórkach tych reaktywację genu ER α można osiągnąć poprzez zablokowanie procesu metylacji, tj. ograniczenie ekspresji DNMT1, ograniczenie dostępności SAM, dawcy grupy metylowej, albo inaktywację enzymu. W komórkach, w których transkrypcję inicjuje tylko promotor B (dalszy), czynnikiem deaktywującym gen jest brak obecności aktywatora dla tego promotora. W badaniach *in vitro* w celu przywrócenia aktyw-

ności promotora B stosowany jest inhibitor deacetylazy histonów podawany z inhibitorami DNMT1.

Na uwagę zasługują badania z komórkami ER α (+), które charakteryzuje nadekspresja ER α . Wyniki badań wskazują, że ekspresja ER α może być modulowana działaniem melatoniny, hormonu syntetyzowanego w szyszynce. Ponieważ wyniki tych badań nie dotyczą zmian metylacji, zainteresowanych efektem melatoniny na ekspresję receptora ER α i jego aktywację estrogenami odsyłam do cytowanych prac [53,65].

Receptor kwasu retinowego RAR β 2. Receptor kwasu retinowego RAR β 2 należy do rodziny receptorów jądrowych niesteroidowych, rodziny, w skład której wchodzi ponadto podrodziny: inne receptory kwasu retinowego typu RAR, jak i typu RXR, receptor dla witaminy D₃ (VDR), receptor dla hormonu tarczycy (TR) i receptory ejozanoidów [50]. RAR β 2 to jedna z dwóch poznanych izoform podtypu receptora RAR β , która może być aktywowana albo przez całkowicie *trans* kwas retinowy (ATRA, albo przez 9-*cis*-RA. Ten receptor zakwalifikowano do receptorów klasy II, którą charakteryzuje tworzenie heterodimerów z receptorami innych podrodzin, np. RAR/RXR, zaś element DNA odpowiedzi na hormon to powtórzona sekwencja AGGTCA N₅AGGTCA. Zainteresowanych systematyką, budową i funkcją receptorów RAR odsyłam do prac przeglądowych [17,30].

Retinoidy wywodzące się z witaminy A, tj. ATRA, AT-3-4-didehydro-RA, 9-*cis*-RA i 4-*oxo*-RA są znanymi związkami, które biorą udział w regulacji proliferacji i różnicowania komórek wielu typów. Retinoidy mogą hamować proliferację *in vitro* zarówno komórek prawidłowych, jak i komórek linii nowotworowych: MCF-7, T47D czy ZR-75-1 [16]. Działanie przeciwproliferacyjne retinoidów dotyczy głównie fenotypów komórek ER α (+) [1,17] i obejmuje trzy mechanizmy działania. Pierwszy mechanizm to stymulowanie transkrypcji przez bezpośrednie związanie heterodimeru RAR/RXR, aktywowanego RA, z elementem odpowiedzi RARE transkrybowanego genu. Przykładem udziału retinoidów w procesie transkrypcji jest omawiany gen receptora RAR β 2, którego promotor jest aktywowany przez kompleks RAR α /RXR. Zaś do genów, których transkrypcja jest regulowana przez RAR β 2, (tzn. których region promotorowy zawiera element odpowiedzi β 2RARE), należą: geny białek wiążących kwas retinowy (CRBP I i CRBPII, ang. *Cellular Retinoic acid Binding Proteins*), gen dehydrogenazy 3, a także geny białek receptorowych RAR α i γ [30]. Drugi mechanizm hamowania proliferacji komórek nowotworowych obejmuje transrepresję czynnika transkrypcyjnego AP-1 przez receptor RAR β 2 w drodze interakcji białko – białko. Trzeci mechanizm to współzawodnictwo receptora RAR β 2 z innymi receptorami jądrowymi (np. receptorem witaminy D₃ lub hormonu tarczycy) w tworzeniu heterodimeru z receptorem RXR [30].

W procesie transformacji nowotworowej komórek sutka, jednym z ważnych elementów zakłócających przeciwproliferacyjne działanie retinoidów jest zahamowanie ekspresji genu receptora RAR β 2. Gen RAR β , zaliczany do genów

supresorowych transformacji nowotworowej, zlokalizowany jest na chromosomie 3p24 [10]. Transkrypcję genu, mającego 12 eksonów, inicjują dwa promotory, P1 i P2 [74]. Promotor P1 uczestniczy w syntezie transkryptu RAR β 1, składanego z eksonów 1-4 i 6-12. Promotor P2, który jest zlokalizowany w 4. intronie, uczestniczy w alternatywnym składaniu transkryptu RAR β 2 z eksonów 5-12. Promotor P2 jest aktywowany przez kompleks RXR/RAR α -RA. Dodatkowo, związanie kompleksu RA-RAR α /RXR do DNA wymaga obecności białka transaktywującego. Tym aktywatorem jest receptor „sierota” (określenie to odnosi się do receptorów, których ligandy nie są znane), COUP-TF (ang. *Chicken Ovalbumin Up-stream Promoter-Transcription Factor*) [47]. Produktem ekspresji jest białko RAR β 2 o masie 50 kDa.

W większości przypadków raka piersi brak białka receptorowego RAR β 2 wykazują zarówno komórki izolowane z guzów, jak i komórki przylegające do guza bez zmian morfologicznych [2,78,79,86]. Najczęściej towarzyszy temu brak mRNA dla tego białka receptorowego [16,86]. Jaka jest lub jaka może być przyczyna wyciszenia transkrypcji genu RAR β 2? Może to być defekt w metabolizmie retinoidów, który prowadzi do spadku wewnątrzkomórkowego stężenia retinoidów. Podanie retinoidów, które w kompleksie z receptorami RAR i RXR aktywują promotor P2, często prowadzi do reaktywacji genu. Pozytywna odpowiedź na taką terapię wyraża się zahamowaniem rozwoju nowotworu [42]. Badania z ostatniego roku dokumentują wysoką efektywność hamowania wzrostu komórek nowotworowych MCF-7 przez likopen i jego acyklometabolity [8]. Związki te są naturalnymi karotenoidami występującymi w pomidorach. Wyciszenie transkrypcji genu RAR β 2 może także być efektem zmian mutacyjnych genu. Jednak badania wielu próbek DNA izolowanych z komórek raka piersi pozwoliły ustalić, że brak ekspresji RAR β 2 nie wynika ze zmian mutacyjnych regionu regulatorowego genu [94]. Aktywność genu może być także regulowana przez epigenetyczne czynniki *trans* i *cis* [87]. Na przykładzie komórek raka prostaty wykazano, że w 80% przypadków pierwotnego raka gruczołu krokowego występuje hipermetylacja regionu promotorowego P2 genu RAR β oraz deacetylacja histonów H3 i H4 [56]. Także w komórkach raka piersi ta *cis* modyfikacja regionu promotorowego jest główną przyczyną wyciszenia genu [73,79]. W DNA komórek MCF-7 (komórki ER(+)) zlokalizowano miejsca sekwencji CpG, których metylacja prowadzi do zmian uniemożliwiających transkrypcję genu RAR β 2 [1,10,73]. Regionem tym jest fragment DNA, w obszarze którego umiejscowiony jest element RARE. Pod działaniem 5-aza-dCyt i ATRA, w komórkach rakowych gruczołu krokowego następowało obniżenie poziomu metylacji, wzrost acetylacji histonów i znaczący wzrost ekspresji genu RAR β 2 [56]. Podobnie, reaktywacja genu w komórkach raka piersi linii T-47D, ZR-75-1 i MCF-7 następowała po podaniu 5-aza-dCyt [10] lub 5-aza-dCyt wraz z ATRA [73] lub 5-aza-dCyt i TSA [1]. Wyniki te są dowodem potwierdzającym ważność tak procesu metylacji regionów promotorowych, jak i deacetylacji histonów w wyciszeniu transkrypcji

genu *RARβ2*. Część badaczy sugeruje jednak, że zahamowanie ekspresji genu receptora *RARβ2* jest efektem braku czynnika transaktywującego COUP-TF. Istnieje bowiem wysoka pozytywna korelacja pomiędzy ekspresją *RARβ2* i COUP-TF, a także istnieją dowody, że przywrócenie ekspresji genu receptora COUP-TF przywraca komórkom zdolność do ekspresji *RARβ2*. Także reaktywacja obu genów *RARβ2* i *COUP-TF* przywraca komórkom wrażliwość na retinoidy. Wyraża się to jednoczesnym zahamowaniem proliferacji i indukcją apoptozy [47]. Natomiast zahamowanie ekspresji genu *COUP-TF* przez antysensowny RNA eliminuje wrażliwość komórek na działanie RA. Autorzy tych obserwacji nie wyjaśniają jednak, czy ekspresja genu receptora „sieroty” uczestniczącego w indukowaniu transkrypcji *RARβ2* jest wrażliwa na metylację czy nie. Brak też wyjaśnienia doświadczalnego, czy komórki raka piersi wykazujące brak białka COUP-TF, poddane działaniu 5-aza-dCyt, byłyby zdolne do reaktywacji zarówno genu *RARβ2*, jak i genu jego aktywatora, COUP-TF. Wątpliwości te potęguje fakt, że niektóre linie komórek raka piersi, takie jak: T-47D, ZR-75-1 i MCF-7, pomimo obecności białka transaktywującego, nie wykazują ekspresji genu *RARβ2*. Reaktywacja genu w tych komórkach następowała po zahamowaniu aktywności DNMT1. Natomiast fragment DNA zawierający element odpowiedzi RARE okazał się ważny zarówno dla zmian metylacji, jak i działania czynnika transkrypcyjnego COUP-TF.

PODSUMOWANIE

Liczne w ostatnich pięciu latach badania zmian metylacji regionów regulatorowych szeregu genów, kodujących białka uczestniczące w regulacji równowagi pomiędzy proliferacją i apoptozą, dostarczyły wielu dowodów ważności tego typu zmian epigenetycznych w procesie kancerogenezy. Ponieważ receptory jądrowe $ER\alpha$ i *RARβ2* są białkami regulującymi transkrypcję wielu genów, to ocena zmian metylacji regionów promotorowych genów tych receptorów i określenie aktywności genów lub określenie farmakologicznych możliwości jej przywrócenia powinno mieć duże znaczenie dla medycyny klinicznej w celu opracowania skutecznej skojarzonej terapii prowadzącej do zahamowania wzrostu i inwazyjności raka piersi.

PODZIĘKOWANIE

Dziękuję Panu Prof. dr hab. Markowi Gniazdowskiemu za cenne uwagi redakcyjne i korektę tekstu.

LITERATURA

- [1] ARAPSHIAN A, KUPPUMBATTI YS, MIRA-Y-LOPEZ R. Methylation of conserved CpG sites neighboring the beta 2 retinoic acid response element may mediate retinoid acid receptor beta gene silencing in MCF-7 breast cancer cells. *Oncogene* 2000; **19**: 4066–4070.
- [2] ARIGA N, MORIYA T, SIZUKI T, KIMURA M, OHUCHI N, SASANO H. Retinoic acid receptor and retinoic X receptor in ductal carcinoma *in situ* and intraductal proliferative lesions of the human breast. *Jpn J Cancer Res* 2000; **91**: 1169–1176.
- [3] ANTEQUERA F, BIRD A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 11995–11999.
- [4] BALLESTAR E, WOLFFE AP. Methyl-CpG-binding proteins. Targeting specific gene repression. *Eur J Biochem* 2001; **268**: 1–6.
- [5] BAYLIN SB, ESTELLER M, ROUNTREE MR, BACHMAN KE, SCHUEBEL K, HERMAN JG. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet* 2001; **10**: 687–692.
- [6] BAYLIN SB, HERMAN JG. DNA hypermethylation tumorigenesis; epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 2000; **16**: 168–174.
- [7] BAYLIN SB, HERMAN JG, GRAFF JR, VERTINO PM, ISSA IP. Alteration in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 1998; **72**: 141–196.
- [8] BEN-DOR A, NAHUM A, DANILENKO M, GIAT Y, STAHL W, MARTIN HD, EMMERICH T, NOY N, LEVY J, SHARONI Y. Effects of acyclo-retinoid acid and lycopene on activation of receptor and proliferation of mammary cancer cells. *Arch Biochem Biophys* 2001; **391**: 295–302.
- [9] BIGEY P, RAMCHANDANI S, THEBERGE J, ARAUJO FD, SZYF M. Transcriptional regulation of the human DNA methyltransferase (dnmt1) gene. *Gene* 2000; **242**: 407–418.
- [10] BOVENZI V, LENLO, COTE S, SINNETT D, MOMPARLER LF, MOMPARLER RL. DNA methylation of retinoic acid receptor β in breast cancer and possible therapeutic role of 5-aza-2'-deoxycytidine. *Anti-Cancer Drugs* 1999; **10**: 471–476.
- [11] BOVENZI V, MOMPARLER RL. Quantitation of inhibition of DNA methylation of the retinoic acid receptor beta gene by 5-aza-2'-deoxycytidine in tumor cells using a single-nucleotide primer extension assay. *Anal Biochem* 2000; **281**: 55–61.
- [12] BRANDEIS M, FRANK D, KESHET I, SIEGFRIED Z, MENDELSON M, NEMES A, TEMPER V, RAZIN A, CEDAR H. Sp1 elements protect a CpG islands from *de novo* methylation. *Nature* 1994; **371**: 435–438.
- [13] BUTLER TL, KAY PH, JACOBSEN PF. Hypomethylation of cytosine methyltransferase in human neoplasms. *Anticancer Res* 2000; **20**: 1435–1438.
- [14] CAMERON EE, BACHMAN KE, MYOHANEN S, HERMAN JG, BAYLIN SB. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nature Genetics* 1999; **21**: 103–107.
- [15] CARDOSO MC, LEONHARDT H. DNA methyltransferase is actively retained in the cytoplasm during early development. *J Cell Biol* 1999; **147**: 25–32.
- [16] CHAKRAVARTI N, MATHUR M, BAHADUR S, SHUKLA NK, ROCHETTE-EGLY C, RALHAN R. Expression of RAR α and RAR β in human oral potentially malignant and neoplastic lesions. *Int J Cancer* 2001, **91**: 27–31.
- [17] CHAMBON P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 1996; **10**: 940–954.
- [18] CHEN Z, KO A, YANG J, JORDAN VC. Methylation of CpG island is not a ubiquitous mechanism for the loss of oestrogen receptor in breast cancer cells. *Br J Cancer* 1998; **77**: 181–185.

- [19] COTE S, SINNETT D, MOMPALER RL. Demethylation by 5-aza-2'-deoxycytidine of specific 5-methylcytosine sites in the promoter region of the retinoic acid receptor β gene in human colon carcinoma cells. *Anti-Cancer Drugs* 1998; **9**: 743–750.
- [20] DENG C, YANG J, SCOTT J, HANASH S, RICHARDSON BC. Role of the Ras-MAPK signaling pathway in the DNA methyltransferase response to DNA hypomethylation. *Biol Chem* 1998; **379**: 1113–1120.
- [21] DOBROVIC A, SIMPFENDORFER D. Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Cancer Res* 1997; **57**: 3347–3350.
- [22] DROUFAKOU S, DESHMANE V, ROYLANCER, HANBY A, TOMLINSON I, HART IR. Multiple ways of silencing E-cadherin gene expression in lobular carcinoma of the breast. *Int J Cancer* 2001; **92**: 404–408.
- [23] EL-DEIRY WS, NELKIN BD, CELANO P, YEN R-WC, FALCO JP, HAMILTON SR, BAYLIN SB. High expression of the DNA methyltransferase gene characterizes human neoplastic cells and progression stages of colon cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 3470–3474.
- [24] EL-OSTA A, WOLFFE AP. DNA methylation and histone deacetylation in the control of gene expression: basic biochemistry to human development and disease. *Gene Expr* 2000; **9**: 63–75.
- [25] EVRON E, UMBRICH CB, KORZ D, RAMAN V, LOEB DM, NIRANJAN B, BULUWELLA L, WEITZMAN SA, MARKS J, SUKUMAR S. Loss of cyclin D2 expression in the majority of breast cancers associated with promoter hypermethylation. *Cancer Res* 2001; **61**: 2782–2787.
- [26] FABIANOWSKA-MAJEWSKA K. Rola metylacji DNA w procesie kancerogenezy. *Acta Haematologica Polonica* 2000; **31**: 399–406.
- [27] FABIANOWSKA-MAJEWSKA K, WYCZECHOWSKA D, CZYŻ M. Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine correlates with induction of K562 cells differentiation. *Adv Exp Med Biol* 2000; **486**: 343–347.
- [28] FERGUSON AT, LAPIDUS RG, BAYLIN SB, DAVIDSON NE. Demethylation of the estrogen receptor gene in estrogen receptor-negative breast cancer cells can reactive estrogen receptor gene expression. *Cancer Res* 1995; **55**: 2279–2283.
- [29] FERGUSON AT, VERTINO PM, SPITZNER JR, BAYLIN SB, MULEER MT, DAVIDSON NE. Role of estrogen receptor gene demethylation and DNA methyltransferase. DNA adduct formation in 5-aza-2'-deoxycytidine-induced cytotoxicity in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1997; **272**: 32260–32266.
- [30] FISHER GJ, VOORHEES JJ. Molecular mechanisms of retinoid action in skin. *FASEB J* 1996; **10**: 1002–1013.
- [31] FUJIMOTO J, HIROSE R, SAKAGUCHI H, TAMAYA T. Estrogen dependency in uterine endometrial cancer. *Oncology* 1998; **55** (Supl.1): 53–59.
- [32] GRANDIEN K, BACKDAHL M, LJUNGGREN O, GUSTAFSSON J-A, BERKEN-STAM A. Estrogen target tissue determines alternative promoter utilization of the human estrogen receptor gene in osteoblasts and tumor cell lines. *Endocrinology* 1995; **136**: 2223–2229.
- [33] GRAY SG, ERIKSSON T, EKSTROM TJ. Methylation, gene expression and the chromatin connection in cancer. *Int J Mol Med* 1999; **4**: 333–350.
- [34] HILAKIVI-CLARKE L. Estrogens, BRCA1, and breast cancer. *Cancer Res* 2000; **60**: 4993–5001.
- [35] HORI M, IWASAKI M, YOSHIMI F, ASATO Y, ITABASHI M. Hypermethylation of the estrogen receptor alpha gene is related to lack of receptor protein in human breast cancer. *Breast Cancer* 1999; **6**: 79–86.
- [36] HSIEH C-L. Dynamics of DNA methylation patterns. *Curr Opin Genet Dev* 2000; **10**: 224–228.
- [37] HUSCHTSCHA LI, NOBLE JR, NEUMANN AA, MOY EL, BARRY P, MELKI JR, CLARK SJ, REDDEL RR. Loss of p16INK4 expression by methylation is associated with lifespan extension of human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 1998; **58**: 3508–3512.

- [38] ISSA J-P. Aging, DNA methylation and cancer. *Crit Rev Oncol Hemat* 1999; **32**: 31–43.
- [39] IWASE H, OMOTO Y, IWATA H, HARA Y, ANDO Y, KABAYASHI S. Genetic and epigenetic alterations of the estrogen receptor gene and hormone independence in human breast cancer. *Oncology* 1998; **55** (Supl.1): 11–16.
- [40] IWASE H, OMOTO Y, IWATA H, TOYAMA T, HARA Y, ANDO Y, ITO Y, FUJI Y, KOBAYASHI S. DNA methylation analysis at distal and proximal promoter regions of the oestrogen receptor gene in breast cancer. *Br J Cancer* 1999; **80**: 1982–1986.
- [41] JASIŃSKA A, KRZYŻOSIAK WJ. Funkcja genów *BRCA1* i *BRCA2* związanych z dziedziczną predyspozycją do raka piersi. *Post Biochemii* 2001; **47**: 146–159.
- [42] JING Y, ZHANG J, BLEIWEISS IJ, WAXMAN S, ZELENT A, MIRA-Y-LOPEZ R. Defective expression of cellular retinal binding protein type I and retinoic receptors $\alpha 2$, $\beta 2$, and $\gamma 2$ in human breast cancer cells. *FASEB J* 1996; **10**: 1064–1070.
- [43] KANG JH, KIM SJ, NOH DY, PARK IA, CHOE KJ, YOO OJ, KANG HS. Methylation in the p53 promoter is a supplementary route to breast carcinogenesis: correlation between CpG methylation of the p53 promoter and the mutation of the p53 gene in the progression from ductal carcinoma in situ to invasive ductal carcinoma. *Lab Invest* 2001; **81**: 573–579.
- [44] KATO K, SAKAMOTO T, WAKE N. Requirement of estrogen receptor expression and function for [125 I] K-Ras-mediated NIH3T3 cell transformation. *Oncology* 1998; **55**(Supl.1): 45–52.
- [45] LAIRD PW, JAENISH R. DNA methylation and cancer. *Hum Mol Genet* 1994; **3**: 1487–1495.
- [46] LAPIDUS RG, NASS SJ, BUTASH KA, PARL FF, WEITZMAN SA, GRAFF JG, HERMAN JG, DAVIDSON NE. Mapping of ER gene CpG islands methylation by methylation-specific polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1998; **58**: 2515–2519.
- [47] LIN B, CHEN G-Q, XIAO D, KOLLURI SK, CAO X, SU H, ZHANG X-K. Orphan receptor COUP-TF is required for induction of retinoic acid receptor β , growth inhibition, and apoptosis by retinoic acid in cancer cells. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 957–970.
- [48] LOVE-SCHIMENTI CD, GIBSON DF, RATNAM AV, BIKLE DD. Antiestrogen potentiation of antiproliferative effects of vitamin D₃ analogues in breast cancer cells. *Cancer Res* 1996; **56**: 2789–2894.
- [49] MAGDINIER F, RIBIERAS S, LENOIR GM, FRAPPART L, DANTE R. Down-regulation of *BRCA1* in human sporadic breast cancer; analysis of DNA methylation pattern of the putative promoter region. *Oncogene* 1998; **17**: 3169–3176.
- [50] MANGELSDORF DJ, THUMMEL C, BEATO M, HERRLICH P, SCHUTZ G, UMESONO K, BLUMBERG B, KASTNER P, MARK M, CHAMBON P, EVANS RM. The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell* 1995; **83**: 835–839.
- [51] McPHERSON LA, WEIGEL RJ. AP2 α and AP2 γ : a comparison of binding site specificity and trans-activation of the estrogen receptor promoter and single site promoter constructs. *Nucl Acids Res* 1999; **27**: 4040–4049.
- [52] MELKI JR, VINCENT PC, CLARK SJ. Concurrent DNA methylation of multiple genes in acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 1999; **59**: 3730–3740.
- [53] MOLIS TM, SPRIGGS LL, HILL SM. Modulation of estrogen receptor mRNA expression by melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 1994; **8**: 1681–1690.
- [54] MOMPARLER RL, BOVENZI V. DNA methylation and cancer. *J Cell Physiol* 2000; **183**: 145–154.
- [55] MOR G, KOHEN F, GARCIA-VELASCO J, NILSEN J, BROWN W, SONG J, NAFTOLIN F. Regulation of Fas ligand expression in breast cancer cells by estrogen functional differences between estradiol and tamoxifen. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000; **73**: 185–194.
- [56] NAKAYAMA T, WATANABE M, YAMANAKA M, HIROKAWA Y, SUZUKI H, ITO H, SHIRAIISHI T. The role of epigenetic modifications in retinoic acid receptor beta 2 expression in human prostate cancers. *Lab Invest* 2001; **81**: 1049–1057.

- [57] NASS SJ, HERMAN JG, GABRIELSON E, IVERSEN PW, PARL FF, DAVIDSON NE, GRAFF JR. Aberrant methylation of the estrogen receptor and E-cadherin 5'CpG islands increases with malignant progression in human breast cancer. *Cancer Res* 2000; **60**: 4346–4348.
- [58] NEWELL-PRICE J, CLARK AJL, KING P. DNA methylation and silencing of gene expression. *Trends Endocrinol Metab* 2000; **11**: 142–148.
- [59] NIITSU N, HAYASHI Y, SUGITA K, HONMA Y. Sensitization by 5-aza-2'-deoxycytidine of leukaemia cells with MLL abnormalities to induction of differentiation by all-trans retinoic acid and 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃. *Brit J Haematol* 2001; **112**: 315–326.
- [60] OAKELEY EJ. DNA methylation analysis: a review of current methodologies. *Pharmacol Therapeut* 1999; **84**: 389–400.
- [61] OTTAVIANO YL, ISSA J-P, PARL FF, SMITH HS, BAYLIN SB, DAVIDSON NE. Methylation of the estrogen receptor gene CpG islands marks of estrogen receptor expression in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1994; **54**: 2552–2555.
- [62] PAZIN MJ, KADONAGA JT. What's up and down with histone deacetylation and transcription? *Cell* 1997; **89**: 315–328.
- [63] PORTER W, SAVILLE B, HOIVIK D, SAFE S. Functional synergy between the transcription factor Sp1 and estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 1997; **11**: 1569–1580.
- [64] RAKYAN VK, PREIS J, MORGAN HD, WHITELAW E. The marks, mechanism and memory of epigenetics states in mammals. *Biochem J* 2001, **356**: 1–10.
- [65] RATO AG, PEDRERO JG, MARTINEZ MA, Del RIO B, LAZO PS, RAMOS S. Melatonin blocks the activation of estrogen receptor for DNA binding. *FASEB J* 1999; **13**: 857–868.
- [66] RAZIN A. CpG methylation, chromatin structure and gene silencing – a three-way connection. *EMBO J* 1998; **17**: 4905–4908.
- [67] RICE JC, OZCELIK H, MAXEINER P, ANDRULIS I, FUTSCHER BW. Methylation of the BRCA1 promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA levels in clinical breast cancer specimens. *Carcinogenesis* 2000; **21**: 1761–1765.
- [68] ROBERTSON KD, WOLFFE AP. DNA methylation in health and disease. *Nature Rev Genetics* 2000; **1**: 11–19.
- [69] ROODI N, BAILEY LR, KAO WY, VERRIER CS, YEE CJ, DUPONT WD, PARL FF. Estrogen receptor gene analysis in estrogen receptor-positive and receptor-negative primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1995; **87**: 446–451.
- [70] ROULEAU J, MacLEOD AR, SZYF M. Regulation of the DNA methyltransferase by the Ras-AP-1 signaling pathway. *J Biol Chem* 1995; **270**: 1595–1601.
- [71] SINGAL R, GINDER GD. DNA methylation. *Blood* 1999; **93**: 4059–4070.
- [72] SILVA JM, DOMINGUEZ G, VILLANUEVA MJ, GONZALEZ R, GARCIA JM, CORBACHO C, PROVENCIO M, ESPANA P, BONILLA F. Aberrant DNA methylation of the p16INK4a gene in plasma DNA of breast cancer patients. *Br J Cancer* 1999; **80**: 1262–1264.
- [73] SIRCHIA SM, FERGUSON AT, SIRONI E, SUBRAMANYAN S, ORLANDI R, SUKUMAR S, SACCHI N. Evidence of epigenetics changes affecting the chromatin state of the retinoic acid receptor beta 2 promoter in breast cancer cells. *Oncogene* 2000; **19**: 1556–1593.
- [74] SOMMER KM, CHEN LI, TREUTING PM, SMITH LT, SWISSELM K. Elevated retinoic acid receptor β 4 protein in human breast tumor cells with nuclear and cytoplasmic localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 8651–8656.
- [75] TIMMERMANN S, HINDS PW, MUNGER K. Re-expression of endogenous p16 ink4A in oral squamous cell carcinoma lines by 5-aza-2'-deoxycytidine treatment induces a senescence-like state. *Oncogene* 1998; **17**: 3445–3453.
- [76] TKACZYK M, KALITA K. Receptor estrogenowy β – budowa, regulacja i funkcja. *Post Biochem* 2001; **47**: 72–79.
- [77] URA K, KIRUMIZAKA H, DIMITROV S, ALMOUZNI G, WOLFFE AP. Histone acetylation: influence on transcription, nucleosome mobility and positioning and linker histone-dependent transcriptional repression. *EMBO J* 1997; **16**: 2096–2107.

- [78] WIDSCHWENDTER M, BERGER J, DAXENBICHLER G, MULLER-HOLZNER E, WIDSCHWENDTER A, MAYR A, MARTH C, ZEIMET AG. Lost of retinoic acid receptor beta expression in breast cancer morphologically normal adjacent but not in the normal breast tissue distant from the cancer. *Cancer Res* 1997; **57**: 4158–4161.
- [79] WIDSCHWENDTER M, BERGER J, HERMANN M, MULLER HM, AMBERGER A, ZESCHNIGK M, WIDSCHWENDTER A, ABENDSTEIN B, ZEIMET AG, DAXENBICHLER G, MARTH C. Methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta 2 gene in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000; **17**: 826–832.
- [80] WU J, ISSA J-P, HERMAN J, BASSETT DE, NELKIN BD, BAYLIN SB. Expression of an exogenous eukaryotic DNA methyltransferase gene induces transformation of NIH3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 8891–8895.
- [81] WYCZECHOWSKA D, CZYŻ M, FABIANOWSKA-MAJEWSKA K. Evidence of inhibition of DNA methylation by fludarabine. *Adv Exp Med Biol* 2000; **486**: 349–353.
- [82] WYCZECHOWSKA D, FABIANOWSKA-MAJEWSKA K. Does 2-chlorodeoxyadenosine contribute to alteration of DNA methyltransferase activity? *Adv Exp Med Biol* 1998; **431**: 595–598.
- [83] XIE W, DUAN R, CHEN I, SAMUDIO I, SAFE S. Transcriptional activation of thymidine synthetase by 17- β -estradiol in MCF-7 human breast cancer cells. *Endocrinology* 2000; **141**: 2439–2449.
- [84] XIE W, DUAN R, SAFE S. Estrogen induces adenosine deaminase gene expression in MCF-7 human breast cancer cells: role of estrogen receptor-Sp1 interactions. *Endocrinology* 1999; **140**: 219–227.
- [85] XIE W, DUAN R, SAFE S. Activation of adenosine deaminase in MCF-7 cells through IGF-estrogen receptor alpha cross talk. *J Mol Endocrinol* 2001; **26**: 217–228.
- [86] XU XC, SNEIGE N, LIU X, NANDAGIRI R, LEE JJ, LUKMANJI F, HORTOBAGYI G, LIPPMAN SM, DHINGRA K, LOTAN R. Progressive decrease in nuclear retinoic acid receptor β messenger RNA level during breast carcinogenesis. *Cancer Res* 1997; **57**: 4992–4990.
- [87] YANG Q, MORI I, SHAN L, NAKAMURA M, NAKAMURA Y, UTSUNOMIYA H, YOSHIMURA G, SUZUMA T, TAMAKI T, UMEMURA T, SAKURAI T, KAKUDO K. Biallelic inactivation of retinoic acid receptor beta2 gene by epigenetic change in breast cancer. *Am J Pathol* 2001; **158**: 299–303.
- [88] YANG X, FERGUSON AT, NASS SJ, PHILLIPS DL, BUTASH KA, WANG SM, HERMAN JG, DAVIDSON NE. Transcriptional activation of estrogen receptor α in human breast cancer cells by histone deacetylase inhibition. *Cancer Res* 2000; **60**: 6890–6894.
- [89] YAMAMOTO KR. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Ann Rev Genet* 1985; **19**: 209–252.
- [90] YOSHIDA T, EGUCHI H, NAKACHI K, TANIMOTO K, HIGASHI Y, SUEMASU K, IINO Y, MORISHITA Y, HAYASHI S. Distinct mechanisms of loss of estrogen α gene expression in human breast cancer: methylation of the gene and alteration of trans-acting factors. *Carcinogenesis* 2000; **21**: 2193–2201.
- [91] ZARDO G, CAIAFA P. The unmethylated state of CpG islands in mouse fibroblasts depends on the poly(ADP-ribosylation) process. *J Biol Chem* 1998; **273**: 16517–16520.
- [92] ZHANG H, SOMASUNDARAM K, PENG Y, TIAN H, BI D, WEBER BL, EL-DIERY WS. BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity. *Oncogene* 1998; **16**: 1713–1721.
- [93] ZHANG X, VERDINE GL. Mammalian DNA cytosine-5 methyltransferase interacts with protein. *FEBS Lett* 1996; **392**: 179–183.
- [94] ZHANG XK, LIU Y, LEE MO. Retinoid receptors in human lung cancer and breast cancer. *Mutat Res* 1996; **350**: 267–277.

- [95] ZIMMERMANN C, GUHL E, GRAESSMANN A. Mouse DNA methyltransferase (MTase) deletion mutants that retain the catalytic domain display neither *de novo* nor maintenance methylation activity *in vivo*. *Biol Chem* 1997; **378**: 393–405.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 18.10.2001 r.

Przyjęto: 06.11.2001 r.

Adres autora: Akademia Medyczna w Łodzi

ul Lindleya 6, 90-131 Łódź

e-mail: fabian@csk.am.lodz.pl

187. ...

188. ...

189. ...

190. ...

191. ...

192. ...

193. ...

194. ...

195. ...

196. ...

197. ...

198. ...

199. ...

200. ...

201. ...

202. ...

203. ...

204. ...

205. ...

206. ...

207. ...

208. ...

209. ...

210. ...

211. ...

212. ...

213. ...

214. ...

215. ...

216. ...

217. ...

218. ...

219. ...

220. ...

221. ...

222. ...

223. ...

224. ...

225. ...

226. ...

227. ...

228. ...

229. ...

230. ...

231. ...

232. ...

233. ...

234. ...

235. ...

236. ...

237. ...

238. ...

239. ...

240. ...

241. ...

242. ...

243. ...

244. ...

245. ...

246. ...

247. ...

248. ...

249. ...

250. ...

251. ...

252. ...

253. ...

254. ...

255. ...

256. ...

257. ...

258. ...

259. ...

260. ...

261. ...

262. ...

263. ...

264. ...

265. ...

266. ...

267. ...

268. ...

269. ...

270. ...

271. ...

272. ...

273. ...

274. ...

275. ...

276. ...

277. ...

278. ...

279. ...

280. ...

281. ...

282. ...

283. ...

284. ...

285. ...

286. ...

287. ...

288. ...

289. ...

290. ...

291. ...

292. ...

293. ...

294. ...

295. ...

296. ...

297. ...

298. ...

299. ...

300. ...

UDZIAŁ CYTOGENETYKI MOLEKULARNEJ W POSZUKIWANIU KLONALNEJ PROLIFERACJI KOMÓREK BIAŁACZKOWYCH*

THE ROLE OF MOLECULAR CYTOGENETICS IN B-CLL CELLS CLONAL PROLIFERATION ANALYSES

Dorota KOCZKODAJ, Danuta ROŻYŃKOWA

Zakład Genetyki Medycznej Akademii Medycznej w Lublinie

Streszczenie: Nieprawidłowości chromosomowe w komórkach białaczkowych powstałe w drodze ewolucji klonalnej u blisko połowy przebadanych pacjentów z przewlekłą białaczką limfatyczną są wykrywane przy użyciu cytogenetycznych metod analizy komórek metafazalnych po stymulacji *in vitro* komórek mitogenami lub molekularnych technik typu FISH na metafazalnych lub interfazalnych komórkach. Najczęstsze nieprawidłowości strukturalne w przewlekłej białaczce B limfocytowej dotyczą częściowej delecji chromosomu 13 w regionie subcentromerowym 13q14, częściowej delecji chromosomu 11 w regionie 11q23, trisomii chromosomu 12 oraz mono- lub biallelicznej utraty genu supresorowego *TP53* w chromosomie 17p13. Omówiono znaczenie wymienionych markerów anomalii chromosomów dla proliferacji klonalnej limfocytów B i/lub progresji PBL-B.

(*Postępy Biologii Komórki* 2002; 29: 141–156)

Słowa kluczowe: przewlekła białaczka limfocytowa B-komórkowa, klony cytogenetyczne

Summary: Clonal chromosomal abnormalities are present in leukemic cells of almost half of studied patients with chronic lymphocytic leukemia. B-CLL lymphocytes are characterized by low mitotic index *in vitro* despite mitogen stimulation, which makes conventional cytogenetics difficult. That is why the molecular techniques like FISH to interphase nuclei are often employed in cytogenetic analyses. The most frequent structural abnormalities in B-CLL involve the partial deletion of chromosome 13 in subcentromeric region 13q14, partial deletion of chromosome 11 in 11q23 region, trisomy 12, and mono or biallelic loss of tumor suppressor gene *TP53* in chromosome 17p13. The significance of above markers to clonal proliferation of B-lymphocytes and/or to B-CLL progression was assessed.

(*Advances in Cell Biology* 2002; 29: 141–156)

Key words: chronic lymphocytic leukemia-B lymphocytes, clone cytogenetics

*Praca wykonana w ramach projektu badawczego KBN nr 4P05AO4918.

Wykaz stosowanych skrótów: **ACAT1** (ang. *acetyl-Co acetyl-transferase 1*) – gen kodujący transferazę grup acetylowych, **APC** (ang. *adenomatous poliposis coli*) – antyonkogen ulegający mutacji w polipowatości jelita grubego, **ATM** (ang. *ataxia teleangiectasia mutated*) – gen ulegający mutacji w zespole *ataxia teleangiectasia* (AT), **BCL1** (ang. *B-cell leukemia/lymphoma*) – gen kodujący cyklinę D, **BCR** (ang. *Break Cluster Region*) – region częstych złamań, **BRCA 2** (ang. *breast cancer 2*) – gen kodujący białko supresorowe BRCA 2, **DBM** (ang. *deleted in B lymphocyte malignancy*) – region chromosomu 13 ulegający delecji w białaczkach, **DDX10** (ang. *death/H BOX 10*) – sekwencje aminokwasowe zwane domeną śmierci, **EST** (ang. *expressed sequence tags*) – małe sekwencje DNA reprezentujące fragmenty genów mające ekspresję, **FDX** (ang. *ferrodoxin*) – gen kodujący ferredoksynę, **HMG1-C** (ang. *high mobility group protein*) – członek rodziny genów kodujących grupę białek strukturalnych niehistonowych chromatyny, **MALT** (ang. *mucosa associated lymphoid tissue lymphoma*) – chłoniak tkanki limfatycznej związanej z błonami śluzowymi, **MCC** (ang. *mutated in colon cancer*) – gen ulegający mutacji w raku jelita grubego, **MDM2** (ang. *murine double minutes-2*) – gen kodujący białko destabilizujące P53, **NCAM** (ang. *neural cell adhesion molecule*) – gen kodujący białko adhezyjne komórek nerwowych, **NF2** (ang. *neurofibromatosis-type 2 gene*) – gen kodujący białko neurofibrominę, **RDX** (ang. *radixin*) – gen kodujący radiksynę, **RT-PCR** (ang. *reverse transcriptase-polymerase chain reaction*) – reakcja odwrotnej transkrypcji z następującą po niej polimerazową reakcją łańcuchową, **SSCP** (ang. *single-strand conformation polymorphism*) – analiza polimorfizmu konformacji jednoniciowych DNA, **TP53** (ang. *tumor suppressor gene*) – gen kodujący białko P53.

WSTĘP

W pracowniach klinicznych i doświadczalnych trwają poszukiwania genów, które mają kluczowe, krytyczne znaczenie w ewolucji białaczkowego klonu(ów) z linii limfocytów B. Sytuację komplikuje fakt, że klon nowotworowy może istnieć przez wiele lat przed ujawnieniem klinicznej progresji, a jego ewolucji może towarzyszyć toksyczny czynnik egzogeny. Na powstawanie i przebieg przewlekłej białaczki limfocytowej mogą oddziaływać geny zaangażowane w pierwotną transformację nowotworową limfocytów, białkowe produkty sprzyjające akumulacji stransformowanych komórek oraz geny biorące udział w procesie ewolucji klonalnej [58,67]. Herman Van den Berghe [66] skłania się do wniosku, że większość obserwowanych dzisiaj zmian chromosomów i towarzyszące im zmiany genomowe mogą być istotne w przebiegu i prognozie białaczki, lecz nie są zjawiskami inicjującymi proliferację klonalną i że do nieodwracalnej proliferacji klonalnej dochodzi, zanim pojawią się tzw. pierwotne zmiany chromosomów.

Nie ma też dostatecznej odpowiedzi na pytanie, czym są spowodowane pierwotne zmiany chromosomów i dlaczego miałyby być typowe i swoiste. Niewykluczone, że decyduje utrata jednego allelu w prawidłowym chromosomie lub amplifikacja i aktywacja prawidłowego allelu, jak na przykład *HMG1-C* w 12q13 w nowotworach mezenchymalnych. Przykładem są między innymi klonalne zmiany chromosomowe (nieprzypadkowe) w proliferujących białaczkowych limfocytach B. Ten cytogenetyczny genotyp monoklonalności zdaje się nie korelować z analizami rearanżacji

genu IgH, a także charakterystyką fenotypu białkowego łańcuchów lekkich kappa lub lambda [4,66].

Powstało pytanie, czy klonalne aberracje chromosomów pokrywają się z cechami nowotworowego rozrostu, czy może stanowią one wyznaczniki prognozy.

ABERRACJE CHROMOSOMOWE

Aberracje chromosomowe towarzyszące ekspansji klonu komórkowego można wykryć cytogenetycznymi analizami komórek metafazowych we wzorach prążkowych lub molekularnymi technikami typu FISH do chromosomów metafazowych lub komórek interfazowych.

Kryteria określające swoistą aberrację chromosomową komórek w metafazie jako przejaw klonu komórek nowotworowych były definiowane i modyfikowane przez Międzynarodowe Układy Nazewnictwa Cytogenetycznego w kolejnych latach 1985, 1991, 1995 [34,35,36]. Według nich zmiana chromosomów określana jako klonalna powinna być wykryta w co najmniej 3 komórkach, jeśli dotyczy takiej samej delecji liczby lub przynajmniej w 2 komórkach z takim samym naddatkiem liczby lub taką samą aberracją struktury chromosomów. Te wartości stanowią oczywiście dolny próg wykrywalności klonów komórkowych metodami cytogenetyki klasycznej chromosomów metafazowych. Klon nie musi być jednolity/homogeny, ponieważ podczas rozwoju nowotworu mogą powstawać subklony, tzw. klony z pokrewnymi kariotypami, gdzie występuje podstawowa zmiana klonalna z dodatkowymi aberracjami. Zgodnie z powyższymi kryteriami opisano klony z trisomią chromosomów 8, 10, 16 i 21 w ostrej białaczce limfoblastycznej, trisomie chromosomów 3, 8, 9, 11, 13 i 21 w ostrej białaczce mielodysplastycznej oraz trisomie chromosomów 7, 8 i 9 w zespole mielodysplazji [42].

Powszechnie znanym, niemal historycznym przykładem klonu białaczkowego z aberracją struktury jest klon białaczkowy w przewlekłej białaczce szpikowej z translokacją t(9;22)(q34;q11). W diagnostyce hematologicznej jest on sygnalizowany jako „mały” chromosom Philadelphia – Ph' wykryty w 1960 r. przez patologa Petera Nowella w Filadelfii [54]. Jak wiadomo, w części terminalnej tej delecji znaleziono *c-ABL*, czyli komórkowy homolog transformującego komponentu wirusa mysiej białaczki Abelsona, którego prawidłowe miejsce jest w 9q34. W miejscu nazwanym *BCR* (ang. *Break Cluster Region*) chromosomu 22 dochodzi do fuzji *BCR* i *ABL*, czyli utworzenia nowego genu fuzyjnego, który koduje nowy produkt o aktywności kinazy tyrozynowej, większy i aktywniejszy niż *c-ABL*. Działa on w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej i jest zdolny do transformacji *in vitro* macierzystych komórek hemopoetycznych [31,32]. Odcinek genomu człowieka, składający się z sekwencji cDNA *BCR-ABL* był pierwszą sondą FISH, używaną do molekularnego diagno-

zowania nowotworu [65]. Technika FISH przyczyniła się ponadto do wykrycia sporadycznych odstępstw od nakreślonej poprzednio powszechnej sytuacji genomowej w chromosomie Ph'. Klasyczna translokacja z chromosomem Ph' w 99% przypadków powstaje w wyniku rearanżacji w regionie M-BCR (ang. *Major Break Cluster Region*), natomiast w komórkach od chorych z ostrą białaczką mielomonocytową (AML) chromosom Ph' ma punkt złamania w m-BCR (ang. *Minor Break Cluster Region*). Sygnały genów fuzyjnych można odróżniać analizą FISH w komórkach meta- i interfazowych szpiku za pomocą odpowiedniej sondy DNA [69]. Ma to znaczenie prognostyczne w bardzo złośliwym przebiegu CML o komórkowym fenotypie myelo-monocytowym. Heterogenne transkrypty genów fuzyjnych wykrytych metodą FISH, mogą być następnie sprawdzone analizą RT-PCR jako p210 mRNA lub p190 mRNA, pierwszy dla M-BCR, drugi dla m-BCR. Transkrypt BCR/ABL był wykorzystany w próbach leczenia białaczki oligonukleotydami antysensownymi [63].

Inną, rzadko spotykaną odmianą cytogenetyczną klonu komórek białaczkowych CML jest lokalizacja genu fuzyjnego *ABL-BCR* w chromosomie 9, a nie 22 [30]. Nie znajdujemy typowego małego chromosomu 22 (Ph'), a sygnał przemieszczonego z chromosomu 22 locus *BCR* odnajduje sonda hybrydyzacyjna w chromosomie 9 [8].

Uzupełnieniem klasycznej cytogenetyki w badaniach klonalności jest molekularna **metoda FISH jąder interfazowych**. Sporadyczne aneusomie przy niskim indeksie podziałowym komórek białaczkowych *in vitro* mogą sugerować obecność klonu nowotworowego w mniejszości komórek lub klon mitotycznie nieaktywny. Zastosowanie swoistych sond molekularnych dla DNA wybranych regionów chromosomów pozwala prześledzić interesujące zmiany zarówno w płytkach metafazowych, jak i w jądrach interfazowych, gdy klon komórkowy, wykrywany w niskim procencie metafaz, przy niskim indeksie mitotycznym, jak np. w przewlekłej białaczce limfatycznej B-komórkowej (PBL-B), może być licznie reprezentowany w interfazie. Aneusomię (mono- lub tri-) danej pary chromosomów sprawdzamy za pomocą sondy hybrydującej do alfa satelitarne DNA centromeru, swoistych sekwencji powtórzeń nukleotydów dla każdego chromosomu [1].

Wraz z obserwacjami molekularnymi zmian cytogenetycznych w interfazie powstało pytanie, jaka liczba sygnałów pochodzących od specyficznych sekwencji DNA w jądrach interfazowych odpowiada definicji klonu.

Obecność klonu np. z trisomią w jądrze interfazowym określano przy użyciu FISH na podstawie wartości odsetka komórek z trzema sygnałami, jeśli była ona większa od średniej \pm dwa standardowe odchylenia wyników uzyskanych w preparatach kontrolnych (sygnały z jąder interfazowych) [24].

Klonalne aberracje chromosomów w metafazach komórek białaczkowych są wykrywane standardowymi metodami cytogenetycznymi tylko w 40–50% przypadków w porównaniu z fluorescencyjną hybrydyzacją *in situ* [40]. Badania PBL-B z wy-

korzystaniem tej metody wykazały ponadto, że częstość i spektrum aberracji chromosomów wykrytych dzięki FISH różnią się znacznie od wyników uzyskanych technikami prążkowymi [13,17,43].

Niezwykłe obiecujące staje się wykorzystanie mikroprocesorów DNA (ang. *DNA microarrays*). Pozwalają one w jednym doświadczeniu na analizę tysięcy genów oraz umożliwiają ich sekwencjonowanie, określenie polimorfizmu, a także szybkie badanie aktywności [62].

ZMIANY KLONALNE LIMFOCYTÓW B W PRZEWLEKŁEJ BIAŁACZCE B KOMÓRKOWEJ

W badaniach cytogenetycznych meta- i interfazowych klonalność białaczkowych limfocytów jest dokumentowana obecnością dodatkowej kopii chromosomu 12, która zdaniem niektórych autorów uczestniczy w prognozie progresji B-komórkowej białaczki limfocytowej [11]. **Trisomia chromosomu 12** jest najczęściej spotykaną zmianą liczby chromosomów we wszystkich badaniach metodą prążkową w PBL-B. Częstość występowania tej aberracji waha się od 7 do 25% badanych przypadków [38]. Sugeruje się, że patofizjologiczna rola trisomii 12 polega na obecności dodatkowej kopii niezidentyfikowanego dotychczas genu zlokalizowanego w tym chromosomie. Strukturalne nieprawidłowości chromosomu 12 mogą być związane ze złamaniem w punktach p11, q13, q22 lub dotyczą częściowej trisomii chromosomu 12 przypuszczalnie wskazującej na region krytyczny w tej aberracji [15,30]. W tego typu zmiany przeważnie zaangażowane są fragmenty długiego ramienia chromosomu 12, a ich mechanizmem może być duplikacja, jak i tworzenie markerów chromosomowych w obecności pozostałych dwóch kopii [28,38,39,68]. W badaniach Gharton [28] oraz Döhnera [15] we wszystkich badanych przypadkach częściowej trisomii zduplikowany segment zawierał prążki 12q13-q21.2 wskazujące, że ten obszar zawiera gen lub geny zaangażowane w patogenezę PBL-B. Opisywana jest w literaturze amplifikacja, która prowadziła do powstania czterech do pięciu kopii prążka q13-q15 w chromosomie 12, w tym także genu *MDM2* (ang. *murine double minutes-2*) [39,51]. Odkryto również, że w rearanżacji tego regionu uczestniczy gen *HMGI-C* (ang. *high mobility group protein*), członek rodziny genów kodujących białka grupy wysokiej ruchliwości. Jest to grupa białek strukturalnych, niehistonowych chromatyny. Funkcją tych białek jest utrzymanie aktywnego lub nieaktywnego stanu chromatyny w regionach promotorowych genów, stąd można przypuszczać, że ich mutacje mogą w decydujący sposób wpływać na stan zróżnicowania komórek i ich zdolność do proliferacji [67]. Klonalne nieprawidłowości chromosomu 12 są często obecne tylko w pewnym procencie komórek białaczkowych, średnio w 50% [39]. Powyższe dane często uważano za dowód na to,

że trisomia 12 (zarówno jak i inne nieprawidłowości) należy do drugorzędnych zmian.

W badaniach naszego zespołu trisomia chromosomu 12 w PBL-B występowała u 18% chorych. Wykonano FISH do jąder interfazowych z zastosowaniem sond telomerowych i centromerowych do chromosomu 12 (fot. 1) [45].

W badaniach Matutes i wsp. występowanie dodatkowego chromosomu 12 ogranicza się w dużej mierze do nietypowych postaci PBL, przebiegających ze zwiększonym odsetkiem prolimfocytów i aktywną czynnością proliferacyjną komórek, często w okresie progresji klinicznej choroby. Częstość występowania tej aberracji wynosi w tych przypadkach 60%, podczas gdy częstość trisomii 12 w postaciach typowych PBL wynosi ok. 4% [50].

Que i wsp. [56] obserwowali w PBL klon z trisomią 12 w zbieżności z pewną atypią morfologiczną typu prolimfocytów. Ten szczegół został też odnotowany w pracy Cano i wsp. [9] oraz Matutes i wsp. [49]. Autorzy zwracają przy tym uwagę w dyskusji na właściwą selekcję pacjentów z PBL z ewentualnym „odrzućciem” niehodgkinowskich chłoniaków w fazie leukemicznej z trisomią 12. W tym miejscu nasuwa się pytanie: czy w ogóle są jakieś granice dla klonów cytogenetycznych w zależności od progresji choroby, należącej do szerokiej grupy proliferacji nowotworowej limfocytów B? Jak wynika z licznych prac, aberracje liczby, ale też dowody niestabilności struktury chromosomu 12 (12p i 12q) zdarzają się zarówno w chłoniakach, zwłaszcza nieziarniczych B-komórkowych, jak też i guzach litych różnego pochodzenia.

Opisywane w minionym 25-leciu zmiany chromosomowe jako pierwotne i swoiste dla białaczek, chłoniaków i guzów litych wymagają obecnie skrupulatnego wyjaśnienia w badaniach molekularnych wskazanych przez translokacje i zmiany stabilności. Do nich należy np. delecja *TEL/ETV6* (*ets-linked transcription factor*) w t(12;21) chromosomu 12 i aktywacja genu *HMGI-C* w guzach mezenchymalnych z udziałem 12q13 [29].

Innym zjawiskiem klonalnej aberracji struktury chromosomu w białaczce limfocytowej przewlekłej jest **delecja 13q14.2-q14.3**, regionu zwanego DBM od *deleted in B lymphocyte malignancy*. Badania molekularne w międzynarodowym składzie ekspertów poszukują w tej okolicy przypuszczalnego genu supresorowego [12,33,41,53]. Wcześniej sądzono, że chodzi o sąsiadujący locus genu *RB* [14].

W tym samym czasie niektóre grupy cytogenetyków/hematologów badały, która zmiana w przewlekłej białaczce B-limfocytowej jest klonalna: delecja 13q14 czy trisomia 12 [37], biorąc pod uwagę pierwotność klonu. Oprócz zastosowania konwencjonalnej cytogenetyki metafaz i FISH do „oczyszczonej” populacji limfocytów B posłużono się w analizie DNA metodą Southerna. Jednym markerem hybrydującym była sonda D13S25, a kontrolą wewnętrzną – sonda do genu *APC* (ang. *adenomatous polyposis coli*). Uzyskano dowody na więcej niż 95% delecji *D13S25* u 42 chorych z PBL-B. Za marker DNA chromosomu 12 posłużył gen

RBTN3 (robotyna 3) hybrydujący do locus genu w 12p12-13. Ten marker molekularny wskazał, że trisomia 12 dotyczyła znamiennie niższej proporcji limfocytów w przewlekłej białaczce niż delecja 13q14. Autorzy uznali trisomię 12 za zjawisko subklonalne, a delecję 13q14 za zjawisko pierwotne, czyli pierwotny rozrost klonalny.

Międzynarodowa grupa Kalachikova i wsp. [41] pokryła obszar 600 Kb mapy fizycznej tego miejsca markerami typu Yac i Pac oraz kosmidowymi kontigami, co pozwoliło zawęzić miejsce przypuszczalnego „genu PBL” do mniej niż 300 kpz i zaproponować 23 transkrypcyjne sekwencje – EST (ang. *expressed sequence tags*) jako kandydujące egzony dla genu supresorowego utraconego w klonie PBL ze zmianą DBM.

W naszych badaniach regionu 13q14 przy zastosowaniu I-FISH z sondami do *D13S25*, *D13S319* i *RBI* delecja ta została wykryta u 68% chorych. Były to delecje mono- oraz bialleliczne [45]. Udział delecji genów *RBI* i *D13S25* w patogenezie PBL-B jest jeszcze przedmiotem badań i dyskusji. Dotyczy to również niestabilności genetycznej innych obszarów chromosomu 13. Rozważano sekwencje *LEU1* i *LEU2* uczestniczące w delecji regionu 13q14.3 jako geny supresorowe. Jednak późniejsze prace Liu [48] i Rondeau [57] wykluczyły te dwa geny jako istotne dla patogenezy PBL, ponieważ nie wykryto żadnej wewnętrznej mutacji.

Garcia-Marco i wsp. [23] wykorzystując metodę FISH obserwowali występowanie delecji fragmentu DNA w prążku 13q12.3, obejmującym gen *BRCA2* (ang. *breast cancer 2*) w jądrach komórek interfazalnych w 80% przypadków PBL-B, podczas gdy opisane wcześniejsze delecje fragmentów obejmujące loci dla *RBI* i *D13S25* w prążku 13q14 wykryto u 63% chorych. Wydaje się, że delecje w obszarze 13q12 i 13q14 powstają niezależnie od siebie, gdyż utrata materiału genetycznego obejmującego ten obszar chromosomu nie ma charakteru ciągłego [55,64].

Inny utracony gen, prawdopodobnie supresorowy, poszukiwany jest w regionie rearanżacji w **chromosomie 11** z punktami złamania w q23.

W badaniach naszego zespołu z zastosowaniem I-FISH sonda do regionu 11q23 wskazała tę delecję u 9% chorych [45]. Jak wynika z europejskiej konferencji poświęconej 11q23 [27], wymienia się 10 różnych miejsc innych chromosomów-partnerów translokowanych do tego regionu. Rok wcześniej Döhner i wsp. [18] przy pomocy klonu YAC 755611 z regionu 11q22.3-q23.1 opisali delecję tego miejsca u 43 z grupy 214 chorych z B-limfocytową białaczką przewlekłą. Tej delecji 11q towarzyszyła szybka progresja choroby u stosunkowo młodych pacjentów (poniżej 55 lat) i szczególna jej postać z zajęciem węzłów chłonnych obwodowych, brzusznych i śródpiersiowych. Aberrację tę uznano w Centrum Onkologicznym w Heidelbergu za ważny czynnik prognostyczny dla PBL-B.

Zhu i wsp. sugerują, że w tej aberracji/delecji struktury chromosomu 11q23 (w ich materiale obejmującym 30% chorych z PBL-B) może zostanie wykryty nowy gen (supresorowy?) uczestniczący w patogenezie PBL-B [70]. Od dawna prowadzone są badania mogące wyjaśnić znaczenie występowania zaburzeń cyto-

genetycznych w tym regionie. Döhner i wsp. podjęli próbę określenia krytycznego segmentu DNA, który najczęściej ulega delecji w regionie 11q [18]. Zidentyfikowany przez nich segment o wielkości 2 Mb w prążkach 11q22.3-q23.1 ulegający delecji we wszystkich badanych przypadkach PBL z zaburzeniami w obrębie 11q zawiera następujące geny: *NCAM* (ang. *neural cell adhesion molecule*), homologiczny do genu *MCC* (ang. *mutated in colon cancer*), gen *ATM* (ang. *ataxia teleangiectasia mutated*) istotny w procesach naprawczych DNA, a także gen *RDX* (radiksyny) z rodziny genu *NF2* (ang. *neurofibromatosis-type 2 gene*), geny *FDX* (ferredoksyny), *ACAT1* (ang. *acetyl-CoA acetyl-transferase1*), *NPAT* (ang. *nuclear protein, ataxia teleangiectasia locus*), *DDX10* (ang. *death/H BOX 10*) [64]. Geny *BCL1* (od *B-cell leukemia/lymphoma*) (11q13) oraz *MLL* (ang. *myeloid lymphoid leukemia*) (11q23.3) położone są poza powyższym krytycznym regionem.

Döhner zwrócił uwagę, że w niektórych przypadkach PBL z delecją w 11q dodatkowo zmutowany jest gen *ATM* [7,17]. Produkt tego genu jest glikoproteiną o aktywności kinazy białkowej oraz regulatorem genu *TP53*. Jego rola polega prawdopodobnie na przekazywaniu sygnału uszkodzonego DNA do *TP53*. Komórki ze zmutowanymi allelami *ATM* cechują się zredukowaną i opóźnioną reakcją na uszkodzenia. Fosforylacja P53 przez zahamowanie jego wiązania z onkogenem *MDM2* zapobiega degradacji tego białka. W komórkach eksponowanych na promieniowanie jonizujące białko *ATM* zwiększa wiązanie P53 z DNA i transaktywację genów. Białko *ATM* pełni kluczową rolę w odpowiedzi komórki na promieniowanie jonizujące przez rozpoznawanie złamania podwójnej nici DNA, jak również rolę kontrolną w cyklu komórkowym [59].

Odnotowano również liczne translokacje chromosomu 11. Jedną z nich jest translokacja t(11;22)(q23;q12), gdzie w pobliżu miejsc pęknięć obu par chromosomów znajdują się różne sekwencje o patologicznym znaczeniu między innymi w chłoniaku Burkitta, przewlekłej białaczce szpikowej oraz ostrej białaczce limfoblastycznej i ostrej białaczce nielimfocytowej [52]. Nosicielki zrównoważonej translokacji t(11;22)(q23;q11) stanowią grupę wysokiego ryzyka wystąpienia raka piersi [6,47].

Chromosom 11 bywa uwikłany w często spotykaną w chłoniaku B-komórkowym typu MALT translokację t(11;18)(q21;q21), z udziałem zlokalizowanego w 18q21 protoonkogenu *BCL-2* (od *B-cell leukemia/lymphoma*) [5]. Zidentyfikowanie genu zaangażowanego w patogenezę PBL, przebiegającą z delecją 11q mogłoby mieć duże znaczenie praktyczne, gdyż postaci PBL z delecją 11q występują zwykle w młodszym wieku, a przebieg choroby cechuje znaczna ekspansywność procesu nowotworowego [18].

Aberracje struktury chromosomu 14 występujące w PBL-B najczęściej dotyczą prążka q32, gdzie znajdują się geny kodujące ciężki łańcuch immunoglobulin (IgH), w których zachodzą liczne rearanżacje podczas wczesnego różnicowania się wszystkich komórek linii B. Nieprawidłowe rearanżacje mogą powodować translokacje chromosomowe, w które zaangażowany jest prążek 14q32. Prawie każdy chromosom

może być „donorem” materiału ulegającego translokacji do **14q+**. Naddatek długiego ramienia chromosomu 14 (14q+) występuje u ok. 15% chorych na przewlekłą białaczkę B-limfocytową i najczęściej wynika z translokacji t(11;14)(q13;q32) prowadzącej do aktywacji onkogen *BCL-1* (*CCND-1*, *PRAD-1*), pod wpływem sekwencji wzmacniającej IgH. Translokacja tego typu jest specyficzna i powszechna dla chłoniaków B-komórkowych z tzw. komórek płaszczka grudek chłonnych (MCL – *mantle cell lymphoma*). Inne nieprawidłowości chromosomu 14 spotykane w PBL-B to delecje długiego ramienia z punktami złamań w q21 i q24 [16,39].

W odróżnieniu od uprzednio wymienionych zmian chromosomów, niezdefiniowanych dotychczas jako loci genowe, jedynie zmiany genu **TP53** zostały jednoznacznie zidentyfikowane w B-białaczkowych limfocytach (w regionie 17p13.1). Produkt genu *TP53*-białko P53 jest jednym z istotnych regulatorów cyklu komórkowego.

W wyniku klinicznych prognostycznych porównań przebiegu choroby u ponad 100 pacjentów z trisomią chromosomu 12 w porównaniu z delecją genu supresorowego *TP53* (I-FISH) okazało się, że nie trisomia chromosomu 12, lecz delecja *TP53* sprawia, że nowotworowa proliferacja B-limfocytowa ma niekorzystny, groźny przebieg [61]. Mutacje tego genu wykrywane metodami cytogenetyki interfazowej lub PCR-SSCP, nie są rzadkie w (10–15% przypadków) PBL-B, w tym przede wszystkim w okresie transformacji prolimfocytowej białaczki (58%) i rzadziej w przebiegu zespołu Richtera (28%).

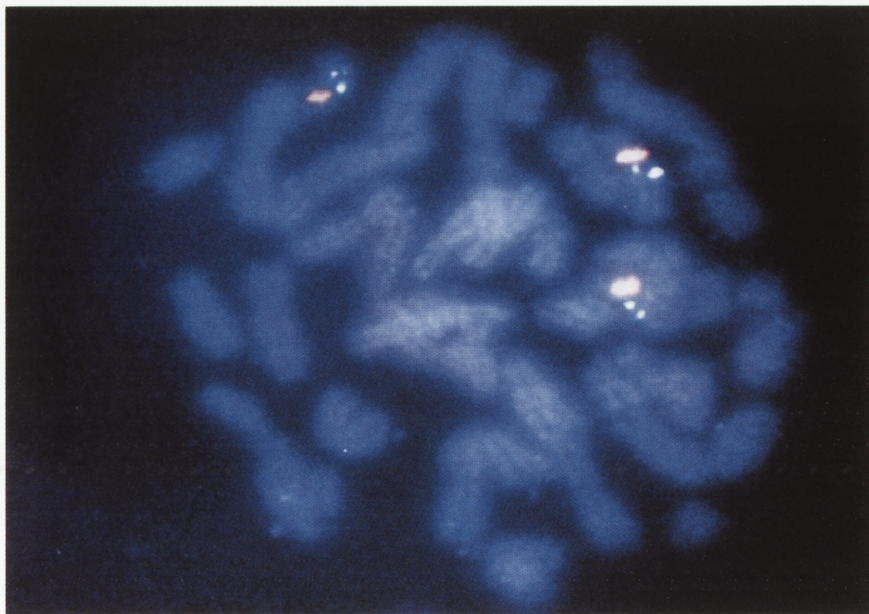
Według nowych badań Amiel i wsp. [3] szczególnie często spotyka się delecje monoalleliczne genu *TP53* (25% przypadków, delecje w 12–100% komórek).

W naszych badaniach z zastosowaniem sondy do locus *TP53* wykryliśmy tę delecję u 10 na 53 chorych z PBL-B (fot. 2) [45].

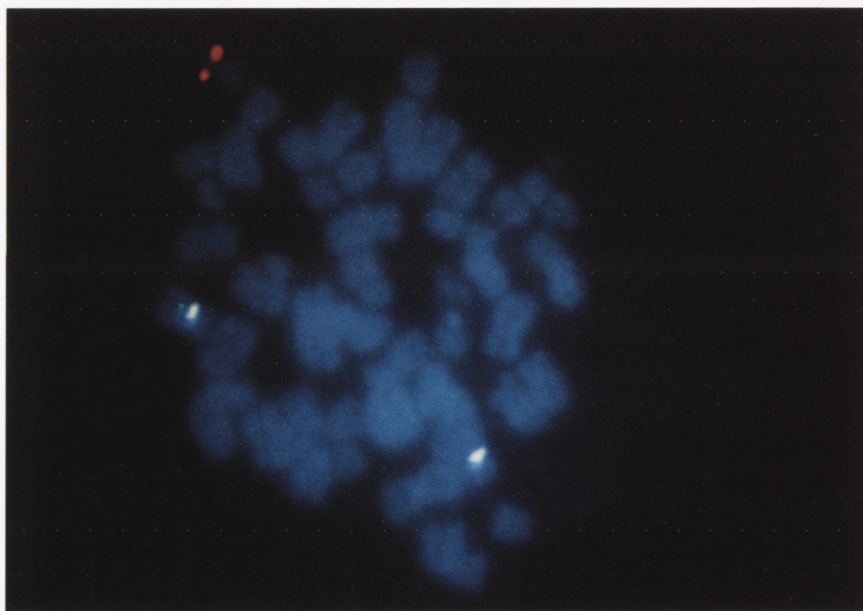
Gaidano i wsp. [21] wykazali mutacje *TP53* w 5 z 40 analizowanych przypadków PBL-B metodą SSCP i sekwencjonowaniem DNA. Kolejne trzy doniesienia, gdzie zastosowano SSCP w wykrywaniu mutacji *TP53* w PBL-B, określiły zasięg występowania tej zmiany na 9–15% przypadków [19,22]. Döhner i wsp. [17] w badaniach z zastosowaniem techniki FISH w grupie 90 chorych z PBL-B, zaobserwowali monoalleliczne delecje *TP53* u 12% chorych.

Ostatnio ustalonymi miejscami minimalnej delecji w B-limfocytowej białaczce przewlekłej jest region **6q21-q23** oraz **6q25-q27**. Wśród 285 pacjentów delecje powyższe znaleziono w 21 przypadkach (7%) przy pomocy 2 klonów YAC mapujących do podanych miejsc jako sondy FISH. Te delecje identyfikują podgrupę chorych z PBL-B o rozległym zajęciu węzłów chłonnych [26]. Genem-kandydatem, sklonowanym z krytycznego regionu 6q21 przez Sherratta i wsp. jest *TLX*, ludzki homolog genu *Drosophila tailless*, składnika nadrodziny jądrowego receptora steroidowego [60].

Badania Amiel i wsp. [2] potwierdziły częste występowanie delecji 6q27 w przewlekłej białaczce limfatycznej i szpiczaku mnogim (*Multiple Myeloma*). Po



FOTOGRAFIA 1. FISH do chromosomów metafazowych z sondą dla sekwencji satelitarnych centromerowych chromosomu 12 (sygnał czerwony) i sondami unikatowymi: 142H1 i 27E12 dla *HMGIC* (sygnał zielony)



FOTOGRAFIA 2. FISH do chromosomów metafazowych z sondą dla sekwencji satelitarnych centromerowych chromosomu 8 (sygnał zielony) i sondą unikatową dla genu *TP53* (sygnał czerwony)

zastosowaniu sondy specyficznej dla tego regionu wykryto tę delecję u 21% pacjentów z PBL i 28% pacjentów z MM.

UWAGI KOŃCOWE

Opisane aberracje należą do grupy czynników uznanych obecnie za istotne prognostycznie. Wprawdzie złe rokowania dla pacjentów białaczkowych z 17p- albo z mutacją *TP53* opisano w niewielu pracach [25], jednak El Rouby i wsp. [19] stwierdzili, że bardzo istotna prognostycznie jest mutacja *TP53*. U niektórych chorych z białaczką wykryto klony z trisomią chromosomu 12 i delecją *TP53*, jest to dość rzadkie zjawisko. Inne jest znaczenie prognostyczne wystąpienia obu aberracji: chorzy z trisomią chromosomu 12 żyją dłużej od chorych z mutacją *TP53*, a najkrótszy czas przeżycia mają chorzy z podwójną aberracją (trisomią 12 i delecją *TP53*) [46].

Znaczenie prognostyczne trisomii 12 jest kontrowersyjne [20,39]. Wyniki grupy Döhnera świadczą o krótszym czasie przeżycia pacjentów z trisomią 12 niż pacjentów tylko z delecją 13q jako pojedynczą zmianą [17]. Podobne wnioski przedstawił Juliusson [40]. Postacie PBL z delecją 11q występują zwykle w młodszym wieku, a przebieg ich cechuje znaczna ekspansywność procesu nowotworowego. Chorzy wymagają szybszego rozpoczęcia leczenia, a czas przeżycia jest krótszy niż w typowych postaciach choroby [18,52].

Mała skuteczność leczenia PBL przebiegająca z delecją 11q dotyczy głównie osób młodszych, poniżej 55 roku życia. Doniesienia grupy kierowanej przez Catovskiego wskazują, że agresywny przebieg PBL z delecją 11q może zależeć od pierwotnej oporności klonu białaczkowego na cytostatyki [10].

Klonalne aberracje genomowe w PBL-B są niezależnymi, ważnymi wyznacznikami progresji choroby i czasu przeżycia.

LITERATURA

- [1] ACAR H, CONNOR MJ. Detection of trisomy 12 and centromeric alterations in CLL by interphase- and metaphase-FISH. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; **100**: 148–151.
- [2] AMIEL A, MULCHANOVA I, ELIS A, GABER E, MANOR Y, FEJGIN M, LISHNER M. Deletion of 6q27 in Chronic Lymphocytic Leukemia and Multiple Myeloma detected by fluorescence *in situ* hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 1999; **112**: 53–56.
- [3] AMIEL A, LISHNER M, ARBOV L, MANOR Y, FEJGIN M, ELIS A, GABER E. Monoallelic p53 deletion in chronic lymphocytic leukemia detected by interphase cytogenetics. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; **97**: 97–100.

- [4] ANTOSZ H, KOCZKODAJ D, ROŻYŃKOWA D. Non correlation of cell surface immunophenotypes and trisomy 12 in B-CLL ? *Folia Histochem Cytobiol* 1999; **37**(1): 7.
- [5] BAENS M, STEYLS A, DIERLAMM J, De WOLF-PEETERS C, MARYNEN P. Structure of the MTL gene and molecular characterization of the genomic breakpoint junctions in the t(11;18)(q21;q21) of marginal zone B-cell lymphomas of MALT type. *Genes Chromosome Cancer* 2000; **29**(4): 281–291.
- [6] BEKRI S, ADELAIDE J, MERSCHER S, GROSGEORGE J, CORROLI-BASC F, PERUCA-LOSTANLEN D, KELLEY PM, PEBUSQUE M, THEILLET C, BIRNBAUM D, GAUDRAY P. Detailed map of region commonly amplified at 11q13-q14 in human breast carcinoma. *Cytogenet Cell Genet* 1997; **79**: 125.
- [7] BEVAN S, CATOVSKY D, MAROSSOV A, MATUTES E, POPAT S, ANTONOVIC P, BERREBI A, BELL A, GAMINARA E.J, QUABECK K, RIBEIRO I., MAURO FR, SYKES H, STARK P, DONGEN J, WIMPERIS J, WRIGHT S, YUILLE MR, HOULSTON RS. Linkage analysis for ATM in familial B cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 1999; **13**: 1497–1500.
- [8] BRUNEL V, SAINTY D, COSTELLO R, MOZZICONACCI MJ, SIMONETTI J, ARNOULET C, COIGNET L, BOUABDALLAH R, GASTAUT JA, GABERT J. Translocation of BCR to chromosome 9 in a Philadelphia-negative chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1995; **85**(1): 82–84.
- [9] CANO I, MARTINEZ J, QUEVEDO E, PINILLA J, MARTIN-RECIO A, RODRIGUEZ A, CASTANEDA A, LOPEZ R, PEREZ-PINO T, HERNANDEZ-NAVARRO F. Trisomy 12 and P53 deletion in chronic lymphocytic leukemia detected by fluorescence *in situ* hybridization: association with morphology and resistance to conventional chemotherapy. *Cancer Genet Cytogenet* 1996; **90**: 118–124.
- [10] CATOVSKY D. The search for genetic cluse in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Cell Ther* 1997; **39**: 5–11.
- [11] CROSSEN PE. Genes and chromosomes in chronic B-cell leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; **94**: 44–51.
- [12] DEVILDER MC, FRANCOIS S, BOSIC C, MOREAU A, MELLERIN MP, LE PASLIER D, BATAILLE R, MOISAN JP. Deletion cartography around the D13S25 locus in B cell chronic lymphocytic leukemia and accurate mapping of the involved tumor suppressor gene. *Cancer Research* 1995; **55**: 1355–1357.
- [13] DIERLAMM J, WŁODARSKA I, MICHAUX L, VERMEESCH JR, MEEUS P, STUL M, CRIEL A, VERHOEF G, THOMAS J, DELANNOY A, LOUWAGIE A, CASSIMAN JJ, MECUCCI C, HAGEMEIJER A, Van den BERGHE H. FISH identifies different types of duplications with 12q13-15 as the commonly involved segment in B-cell lymphoproliferative malignancies characterized by partial trisomy 12. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; **20**: 155–166.
- [14] DÖHNER H, PILZ T, FISHER K. Molecular cytogenetic analysis of RB1 deletions in chronic B-cell leukemias. *Leuk Lymph* 1994; **16**: 97–103.
- [15] DÖHNER H, POHL S, BULGAY-MORSCHER M, STILGENBAUER S, BENTZ M, LICHTER P. Deletion of trisomy 12 in chronic lymphoid leukemias using fluorescence *in situ* hybridization. *Leukemia* 1993; **7**: 844–847.
- [16] DÖHNER H, STILGENBAUER S, BENNER A, LENPOLT E, KROBER A, BULLINGER L, DÖHNER K, BENTZ M, LICHTER P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Eng J Med* 2000; **343** (26): 1910–1916.
- [17] DÖHNER H, STILGENBAUER S, DÖHNER K, BENTZ M, LICHTER P. Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis. *J Mol Med* 1999; **77**: 266–281.
- [18] DÖHNER H, STILGENBAUER S, JAMES MR, BENNER A, WEILGUNI T, BENTZ M, FISCHER K, HUNSTEIN W, LICHTER P. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic

- lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood* 1997; **89**(7): 2516–2522.
- [19] EI ROUBY S, THOMAS A, COSTIN D, ROSENBERG CR, POTMESIL M, SILBER R, NEWCOMB EW. p53 gene mutation in B-cell chronic lymphocytic leukemia is associated with drug resistance and is independent of MDR1/MDR3 gene expression. *Blood* 1993; **82**: 3452–3459.
- [20] ESCUDIER SM, PEREIRA-LEAHY JM, DRACH JW, WEIER HU, GOODACRE AM, CORK MA, TRUJILLO JM, KEATING MJ, ANDREEFF M. Fluorescent *in situ* hybridization and cytogenetic studies of trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1993; **81**(10): 2702–2707.
- [21] GAIDANO G, BALLERINI P, GONG JZ, INGHIRAMI G, NERI A, NEWCOMB EW, MAGRATH JT, KNOWLES DM, DALLA-FAVERA R. p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 5413–5417.
- [22] GAIDANO G, NEWCOMB EW, GONG JZ, TASSI V, NERI A, CORTELEZZI A, CALORI R, BALDINI L, DALLA-FAVERA R. Analysis of alterations of oncogenes and tumor suppressor genes in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Pathol* 1994; **144**: 1312–1319.
- [23] GARCIA-MARCO JA, CALDAS C, PRICE CM, WIEDEMANN LM, ASHWORTH A, CATOVSKY D. Frequent somatic deletion of 13q12.3 locus encompassing BRCA2 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1996; **88**: 1568–1575.
- [24] GEBHART E, LIEHR T, HARRER P, REICHARDT S, SCHMITT G, THOMA K, GRAMATZKI M, TRAUTMANN U. Interphase-FISH of the clonality of aberrant karyotype in human hematopoietic neoplasias. *Leukemia and Lymphoma* 1995; **17**: 295–302.
- [25] GEISLER CH, PHILIP P, CHRISTENSEN BE. In B-cell chronic lymphocytic leukaemia chromosome 17 abnormalities and not trisomy 12 are the single most important cytogenetic abnormalities for the prognosis: a cytogenetic and immunophenotypic study of 480 unselected newly diagnosed patients. *Leuk Res* 1997; **21**: 1011–1023.
- [26] GERANDER D, DETFOFSSON R, RASOL O, LIU Y, SODERHALL S, JULIUSSON G, GHARTON G, EINHOM S. 6q deletions in acute lymphoblastic leukemia and non Hodgkins lymphoma. *Blood* 1998; **91**(8): 3397–400.
- [27] General Report on the European Union Concerted Action Workshop on 11q23, London, UK, 1997 (L.M. Secker-Walker on behalf of the European 11q23 Workshop participants). *Leukemia* 1998; **12**(5): 776–840.
- [28] GHARTON G, FIBERG K, ROBERT KH, JULIUSSON G, BIBERFELD P, ZECH L. Cytogenetic mapping of the duplicated segment of chromosome 12 in lymphoproliferative disorders. *Nature* 1992; **297**: 513–514.
- [29] GISSELSSON D, HOGLUND M, MERTENS F, MITELMAN F, MANDAHL N. Chromosomal organization of amplified chromosome 12 sequences in mesenchymal tumors detected by fluorescent *in situ* hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; **23**(3): 203–212.
- [30] HAGEMEIJER A, BUYS A, SMITH E, JANSSEN B, CREEMERS GJ, VAN DER PLAS D, GROSVELD G. Translocation of BCR to chromosome 9; a new cytogenetic variant detected by FISH in two Ph⁻-negative, BCR-positive patients with chronic myeloid leukemia. *Genes* 1993; (8) **4**: 237–245.
- [31] HAUS O. Cytogenetyka przewlekłej białaczki szpikowej. II. Cytogenetyczne podtypy przewlekłej białaczki szpikowej (CML); Ph⁻-ujemna CML, mozaikowość Ph⁻, warianty translokacyjne Ph⁻. *Post Biol Kom* 1996; **23** (2): 183–195.
- [32] HAUS O. Cytogenetyka przewlekłej białaczki szpikowej. I. Przewlekła białaczka szpikowa Ph⁻-dodatnia [Ph⁺(+) CML]. *Post Biol Kom* 1996; **23** (2): 169–182.
- [33] HOGAN WJ, TEFFERI A, BORELL TJ, JENKINS R, LI C-Y, WITZIG TE. Prognostic relevance of monosomy at the 13q14 locus detected by fluorescence *in situ* hybridization in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1999; **110**: 77–81.

- [34] ISCN (1985): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. In: Harnden D.G. and Klinger H.P. (Eds); published in collaboration with Cytogenet Cell Genet; Karger, Basel, 1985.
- [35] ISCN (1991): Guidelines for Cancer Cytogenetics, Supplement to An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Mitelman F.(ed); Karger, Basel 1991.
- [36] ISCN (1995): An International System for Human Genetic Nomenclature. Mitelman F. (ed.) Karger, Basel 1995.
- [37] JABBAR SA, GANESHAGURU K, WICKREMASINGHE RG, HOFFBRAND AV, FORONIL L. Deletion of chromosome 13 (band q14) but not trisomy 12 is a clonal event in B-chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Br J Haematol* 1995; **90**(2): 476–478.
- [38] JULIUSSON G, GHARTON G. Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: pathogenetic and clinical implications. *Cancer Genet Cytogenet* 1990; **45**(2): 143–160.
- [39] JULIUSSON G, MERUP M. Cytogenetics in chronic lymphocytic leukemia. *Seminars in Oncology* 1998; **25**(1): 19–26.
- [40] JULIUSSON G, OSCIER DG, FITCHETT M. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N Engl J Med* 1990; **323**: 720–724.
- [41] KALACHIKOV S, MIGLIAZZA A, CAYANIS E, FRACCHIOLLA N, BONALDO M, LAWTAON AL, JELENC P, YE X, QU X, CHIEN M, HAUPTSCHIEIN R, GAIDANO G, VITOLO U, SAGLIO G, RESEGOTTI L, BRODJANSKY V, YANKOVSKY N, ZHANG P, SOARES M, RUSSO J, EDELMAN J, EFSTRATIADIS A, DALLA-FAVERA R, FISCHER S. Cloning and gene mapping of the chromosome 13q14 region deleted in chronic lymphocytic leukemia. *Genomics* 1997; **42**: 369–377.
- [42] KASPRZYK A, METHA AB, SECKER-WALKER LM. Single cell trisomy in hematologic malignancy. Random change or tip of the iceberg? *Cancer Genet Cytogenet* 1995; **85**: 37–42.
- [43] KOBAYASHI H, ESPINOSA R, FERNALD A, BEGY C, DIAZ M, Le BEAU M, ROWLEY J. Analysis of deletions of the long arm of chromosome 11 in hematologic malignancies with fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1993; **8**: 246–252.
- [44] KORNBLAU SM, KONOPLEVA M, ANDREEFF M. Apoptosis regulating proteins as target of therapy for haematological malignancies. *Expert Opin Investig Drugs* 1999; **8**(12): 2027–2057.
- [45] KOCZKODAJ D. Badania molekularno-cytogenetyczne w przewlekłej białaczkce B-limfocytowej metodą fluorescencyjnej *in situ* hybrydyzacji. *Praca doktorska. Lublin 2001*.
- [46] LENS D, DYER MJS, GARCIA-MARCO JM, SCHOUWER PJ, HAMOUDI RA, JONES D, FARAHAT N, MATUTES E, CATOVSKY D. p53 abnormalities in CLL are associated with excess of prolymphocytes and poor prognosis. *Br J Haematol* 1997; **99**: 848–857.
- [47] LEVINE EG, CIRINCIONE CT, SZATROWSKI TP, CANELLAS G, NORTON L, HENDERSON IC. Phase II trial of topotecan in advanced breast cancer: a cancer and leukemia group B study. *Am J CL In Oncol* 1999; **22**(3): 218–222.
- [48] LIU Y, CORCORAN M, RASOOL O, IVANOVA G, IBBOTSON R, GRANER D, IYENGAR A, MERUP M, WU X, GARDINER A, MULLENBACH R, POLTARAUS A, HULTSTROM AL, JULIUSSON G, CHAPMAN R, TILLER M, GAHRTON G, OSCIER D, COTTER F, YANKOVSKY N, ZABOROVSKY E, EINHORN S. Cloning of two candidate tumor suppressor genes within a 10/kb region on chromosome 13q14, frequently deleted in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene* 1997; **15**: 2463–2473.
- [49] MATUTES E, CARRERA P, COIGNET L, BRITO-BABAPULLE V, VILLAMOR N, WOTHERSPOON A, CATOVSKY D. FISH analysis for BCL-1 rearrangements and trisomy 12 helps the diagnosis of atypical B cell leukaemias. *Leukemia* 1999; **13**(11): 1721–1726.

- [50] MATUTES E, OSCIER D, GARCIA-MARCO J, ELLIS J, COPPLESTONE A, GELLINGHAM R, HAMBLIN T, LENS D, SWANSBURY GJ, CATOVSKY D. Trisomy 12 defines group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic clinical and laboratory features in 544 patients. *Br J Haematol* 1996; **92**: 382–388.
- [51] MERUP M, JULIUSSON G, WU X, JANSSON M, STELLAN B, RASOOL O, ROIJER E, STENMANG, GHARTONG, EINHORM S. Amplification of multiple regions of chromosome 12, including 12q13-15, in chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Haematol* 1997; **58**: 174–180.
- [52] NEILSON JR, AUER R, WHITE D, BICUZ N, WATERS JJ, WHITTAKER JA, MILLIGAN DW, FEGAN CD. Deletions at 11q identify a subset of patients with typical CLL who show consistent disease progression and reduced survival. *Leukemia* 1997; **11**(11): 1929–1932.
- [53] NEWCOMB EB, EL ROUBY S, THOMAS A. A unique spectrum of p53 mutations in B-cell chronic lymphocytic leukemia different from that of other lymphoid malignancies. *Molecular Carcinogenesis* 1995; **14**: 227–232.
- [54] NOWELL PC, HUNGERFORD DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960; **132**: 1487.
- [55] PANAYIOTIDIS P, GANESHAGURU K, ROWNTREE C, JABBAR S, HOFFBRAND VA, FORONI L. Lack of clonal BRCA2 gene deletion on chromosome 13 in chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol* 1997; **97**: 844–847.
- [56] QUE TH, GARCIA MARCO J, ELLIS J, MATUTES E, BRITO-BABAPULLE V, BOYLE S., CATOVSCY D. Trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia detected by fluorescence *in situ* hybridization: analysis of leukemia by stage, immunophenotype, and morphology. *Blood* 1993; **82**: 571–575.
- [57] RONDEAU G, MOREAU J, BEZIEAU S, CADORET E, MOISAN JP, DEVILDER MC. Exclusion of Leu1 and Leu2 genes as tumor suppressor genes in 13q14.3-deleted B-CLL. *Leukemia* 1999; **13**: 1630–1632.
- [58] ROŻYŃKOWA D, RUPNIEWSKA ZM, STĘPIEŃ J, DRABIK B, ANTOSZ H, KOCKI J, GÓRSKI G. Clonal chromosome abnormalities in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Genetica Polonica* 1991; **32**(3): 157–164.
- [59] RYBCZYŃSKA M, PAWLAK AL. Budowa i funkcje białka ATM. *Post Biol Kom* 2000; sup. 14: 39–51.
- [60] SHERRATT T, MORELLI C, BOYLE JM, HARRISON CJ. Analysis of chromosome 6 deletions in lymphoid malignancies provides evidence for a region of minimal deletion within a 2-megabase segment of 6q21. *Chromosome Res* 1997, **5**(2): 118–24.
- [61] SHAW GR, KORNBERGER DL. TP 53 deletions but not trisomy 12 are adverse in B-cell lymphoproliferative disorders. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; **119**: 146–154.
- [62] SHOEMAKER D, SCHADT E, ARMOUR C, HE Y, GARRETT-ENGELE P, McDonagh P, LOERCH P, LEONARDSON A, LUM P, CAVET G et al. Experimental annotation of the human genome using microarray technology. *Nature* 2001; **409** (6822): 922–927.
- [63] SKÓRSKI T, NIEBOROWSKA-SKÓRSKA M, WŁODARSKA P, PERROTTI G, HOSER G, KAWIAK J, MAJEWSKI M, CHRISTENSEN L, IOZZO RV, CALABRETTA B. Treatment of Philadelphia leukemia severe combined immunodeficient mice by combination of cyclophosphamide and bcr/abl antisense oligodeoxynucleotides. *J National Cancer Institute* 1997; **89**: 124–133.
- [64] STILGENBAUER S, NICKOLENKO J, WILHELM J, WOLF S, WEITZ S, DOHNER K, BOHM T, DÖHNER H, LICHTER P. Expressed sequences as candidates for novel tumor suppressor gene at band 13q14 in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma. *Oncogene* 1998; **16**: 1891–1897.
- [65] TKACHUK DC, PINKEL D, KUO WL, WEIER HU, GRAY JW. Clinical applications of fluorescence *in situ* hybridization. *Genet Anal Technol Appl* 1991; **8**: 67–74.
- [66] Van den BERGHE H. Sixth European Conference on Cytogenetics and Molecular Genetics of Human Solid Tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1999; **112**: 102–103.

- [67] WOJCIEROWSKI J. Zmiany struktury i funkcji genomu komórek B-CLL. *Acta Haematologica Polonica* 1998; sup.1: 25–34.
- [68] XIAO H, BLOCK AW, ROMANO J, DADLEY B, HAN T, SANDBERG AA. i(12q) in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1990; **50**: 171–172.
- [69] YAMAGUCHI H, INOKUCHI K, SHINOHARA T, DAN K. Extramedullary presentation of chronic myelogenous leukemia with p190 *BCR/ABL* transcripts. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; **102**: 74–77.
- [70] ZHU Y, MONNI O, EL-RIFAI W, SIITONEN SM, VILPO J, KNUUTILA S. Discontinuous deletions at 11q23 in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1999; **13**: 708–712.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 12.10.2001 r.

Przyjęto: 08.11.2001 r.

*Adres autora: Zakład Genetyki Medycznej AM
20-950 Lublin, ul. Radziwiłłowska 11*

PUNKTY KONTROLNE CYKLU KOMÓRKOWEGO CZY ZNAMY ICH MOLEKULARNE PODŁOŻE?

CELL CYCLE CHECKPOINTS DO WE KNOW THEIR MOLECULAR BACKGROUND?

Barbara GRZELAKOWSKA-SZTABERT

Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego,
PAN, Warszawa

Streszczenie: Przedstawiono sylwetki naukowe nagrodzonych w 2001 roku nagroda Nobla z dziedziny fizjologii i medycyny – Lelanda Hartwella, Paula Nurse’a i Timothy Hunta, pionierów badań molekularnych mechanizmów regulujących przebieg cyklu komórkowego. Ich badaniom zawdzięcza się wykrycie białkowych kinaz serynowo-treoninowych, nazywanych kinazami cyklinozależnymi, ze względu na regulację ich aktywności przez specyficzne białka – cykliny. Kinazy te okazały się następnie być niezbędne dla prawidłowego przebiegu cyklu komórkowego. Klasyczne już stały się wprowadzone przez Hartwella pojęcia START i punkty kontrolne cyklu. Wskazują one na znaczenie w regulacji proliferacji komórek konieczności zintegrowania wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych sygnałów i precyzyjnego monitorowania gotowości komórek do przejścia ich w kolejną fazę cyklu po prawidłowym zakończeniu fazy poprzedzającej. W artykule omówiono podstawowe białka i regulowane przez nie procesy w punktach kontrolnych cyklu aktywowanych w wyniku uszkodzeń DNA (punkty kontrolne w fazach G1/S, S i G2), bądź uszkodzeń lub nieprawidłowości w tworzeniu wrzeciona mitotycznego (punkty kontrolne w mitozie).

(*Postępy Biologii Komórki* 2002; 29: 157–175)

Słowa kluczowe: cykl komórkowy, punkty kontrolne cyklu, kinazy cyklinozależne, kinaza ATM, białko supresorowe p53, fosfataza Cdc25.

Summary: Nobel prize laureates in physiology and medicine in 2001 were three researchers – Leland Hartwell, Paul Nurse and Timothy Hunt, honoured for their pioneering studies on molecular mechanisms regulating cell cycle progression. They discovered that cell cycle is controlled through cooperation of some serine-threonine kinases and specific proteins – cyclins. These kinases, later named cyclin-dependent kinases, appeared to be indispensable for progression of cells through every phase of the cell cycle. The classic nowadays concepts of START and cell cycle checkpoints, introduced by Hartwell, point on importance in the regulation of cell proliferation of intra- and extracellular signals integration and on precise monitoring of cell readiness to pass to the next phase of cell cycle, after successful completion of

the previous one. In the article the information is given about main proteins and processes in which they participate in various cell cycle checkpoints, activated by DNA damage (in phases G1/S, S and G2) or perturbations in the mitotic spindle formation (during mitosis).

(*Advances in Cell Biology* 2002; 29: 157–175)

Key words: cell cycle, cell cycle checkpoints, cyclin-dependent kinases, ATM kinase, Cdc25 phosphatase, suppressor protein p53

Wykaz skrótów: **AT** (*ataxia-telangiectasia*) – choroba dziedziczna, której towarzyszy m.in. promieniowrażliwość; **ATM** (*ataxia-telangiectasia-mutated*) – produkt genu ATM, zmutowanego w większości przypadków syndromu *Ataxia telangiectasia*, kinaza białkowa; **ATR** (*ataxia and rad 3 related protein*) – kinaza białkowa; **BRCT** – domena aminokwasowa występująca w C-końcu białka BRC; **BUB1,2,3** (*budding uninhibited by benzimidazole*) – białka kodowane przez geny z rodziny BUB i działające w punkcie kontrolnym wrzeciona; **Chfr** (*checkpoint with FHA and RING finger*) – białko działające w punkcie kontrolnym w profazie; **CENP** (*centromere protein*) – białko centromerowe; **Cut1** (*cell untimely torn*) – separtyna z *S. pombe*; **Cut2** (*cell untimely torn*) – sekuryna, inhibitor rozdziału chromatyd w *S. pombe*; **FHA** (*forkhead associated*) – domena aminokwasowa w czynnikach transkrypcyjnych; **GADD45** (*growth arrest DNA damage inducible*) – białko indukowane przez uszkodzenia DNA, uczestniczy w bloku komórek w fazie G1, tworzy kompleksy z PCNA; **Esp1** – separtyna z *S. cerevisiae*; **Kinazy cdk** – kinazy cyklinozależne; **MAD1,2,3** (*mitotic arrest deficient*) – białka kodowane przez białka z rodziny MAD i działające w punkcie kontrolnym wrzeciona; **MPS1** (*monopolar spindle*) – kinaza serynowo-treoninowa w *S. cerevisiae*, fosforyluje białko MAD1; **NBS1** – nibryna, produkt genu NBS1 w chorobie dziedzicznej *Nijmegen breakage syndrom*; **PCNA** (*proliferating cell nuclear antigen*) – antygen jądrowy proliferujących komórek; **Pds1** (*precocious dissociation of sister chromatids*) – sekuryna, inhibitor rozdziału chromatyd w komórkach *S. cerevisiae*; **Pimple** – sekuryna w komórkach *Drosophila*; **PTTG** – sekuryna w komórkach kręgowców; **RFC** (*replication factor C*) – czynnik replikacyjny C; **RPA** (*replication protein A*) – białko replikacyjne A; **SPB** (*spindle pole body*) – ciało biegunowe wrzeciona w komórkach drożdży.

1. WPROWADZENIE – BADACZE CYKLU KOMÓRKOWEGO UHONOROWANI NAGRODĄ NOBLA

W 2001 roku nagrodę Nobla z dziedziny fizjologii i medycyny przyznano trzem uczonym, którym zawdzięcza się wykrycie i poznanie podstawowych molekularnych mechanizmów regulujących przebieg cyklu komórkowego. Laureaci nagrody Nobla – Amerykanin Leland Hartwell oraz Brytyjczycy Paul Nurse i Timothy Hunt – są pionierami badań w tej dziedzinie. Przyznanie im tej nagrody było więc od dawna oczekiwane i nie zaskoczyło biologów, gdyż ich dokonania były już także wielokrotnie wcześniej wyróżniane przyznaniem im wielu prestiżowych nagród, w tym członkostwem Akademii Nauk USA.

Stosując w swych badaniach podejście genetyczne, metody biochemiczne i biologii molekularnej z użyciem prostych komórek eukariotycznych, jakimi są drożdże czy też jaja morskich jeżowców, badacze ci wykryli szczegółowe mechanizmy sterujące cyklem komórkowym, których uniwersalność została następnie potwierdzona w komórkach wyższych organizmów eukariotycznych, także w komórkach ludzkich.

Poznanie tych mechanizmów przyczyni się z pewnością do zrozumienia ich zaburzeń w nowotworach.

Leland Hartwell (ur. w 1939 r.) po studiach w *California Institute of Technology*, kontynuowanych następnie w *Massachusetts Institute of Technology*, uzyskał doktorat w 1964 roku. W latach 1964–1968 przebywał na Uniwersytecie Kalifornijskim, a od 1968 roku związany jest, jako profesor, z Uniwersytetem Waszyngtońskim i z Centrum Badań Nowotworów – *Fred Hutchison Cancer Research Center* w Seattle i jest tam dyrektorem od 1997 roku. Jego badania cyklu podziałowego drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, zapoczątkowane już w latach sześćdziesiątych, zaowocowały otrzymaniem bardzo licznych mutantów o określonych zaburzeniach w przebiegu cyklu. Pozwoliło to wykryć ponad 100 genów niezbędnych dla prawidłowego przebiegu poszczególnych faz cyklu (geny *cdc* – *cell division cycle*). Kluczowym osiągnięciem Hartwella była identyfikacja genu *CDC28*, kodującego w *S. cerevisiae* kinazę białkową, której działanie jest niezbędne, aby komórki mogły przekroczyć w określonym momencie cyklu tzw. punkt START. W tym punkcie, zachodzą w komórce procesy umożliwiające integrację zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych sygnałów i zezwalające na rozpoczęcie syntezy DNA i przejście w dalsze etapy cyklu. Odpowiednikiem punktu START jest w komórkach wyższych eukariota tzw. punkt progowy R (*restriction point*). Inne pojęcie wprowadzone przez Hartwella, to tak zwane punkty kontrolne cyklu, wskazujące na współzależności „wydarzeń” w komórce. W punktach kontrolnych cyklu (ich omówienie stanowi przedmiot tego opracowania) następuje jego zatrzymanie po wykryciu przez bardzo różne białka regulatorowe pojawiających się nieprawidłowości w procesach komórkowych. Wznowienie cyklu podziałowego komórek staje się możliwe dopiero po naprawieniu błędów. Działanie punktów kontrolnych cyklu jest więc istotne dla utrzymania integralności genomu i zapobiega powielaniu w komórkach potomnych zaistniałych błędów. Hartwell zajmuje się również badaniem różnych leków przeciwnowotworowych, stosując między innymi drożdże jako organizm testowy.

Paul Nurse (ur. w 1949 r.) uzyskał doktorat w 1973 roku na *University of East Anglia* w Norwich, zaś staże podoktorskie odbywał między innymi na Uniwersytetach w Bernie i w Edynburgu. W latach 1984–1987 pracował w *Imperial Cancer Research Found* (ICRF) w Londynie, a potem, jako profesor, na Uniwersytecie w Oksfordzie (1987–1993). Od 1993 roku Nurse jest kierownikiem Laboratorium Cyklu Komórkowego w ICRF, a od 1996 także kierownikiem tej placówki. Badania Nurse’a doprowadziły do wykrycia w komórkach *Schizosaccharomyces pombe* genu *cdc2*, a w komórkach wyższych eukariota także i innych genów homologicznych z genem *CDC28* zidentyfikowanym przez Hartwella. Geny te kodują kinazy serynowo-treoninowe (nazwane później kinazami cyklinozależnymi, cdk), o aktywności których decyduje w dużym stopniu, jak wykazał to Nurse, ufosforylowanie określonych reszt aminokwasowych. Zainteresowania badawcze jego zespołu to również mechanizmy odpowiedzialne za inicjację replikacji DNA,

mechanizmy działające w różnych punktach kontrolnych cyklu, kontrola podziału mejotycznego i morfogenezy komórek.

Tim Hunt (ur. w 1943 r.) doktoryzował się w 1968 roku na uniwersytecie w Cambridge, a staże podoktorskie odbył w *Albert Einstein College of Medicine* w Nowym Jorku oraz na uniwersytecie w Cambridge. Od 1991 pracuje w *Imperial Cancer Reserch Found* w Londynie i jest kierownikiem Laboratorium Kontroli Cyklu Komórkowego. Badając wpływ zapłodnienia jaj morskich jeżowców na uruchamianie w nich syntezy białek wykazał, że określone białka, nazwane przez niego cyklinami, są syntetyzowane i degradowane podczas każdego cyklu komórkowego. Cykliny okazały się następnie niezbędnymi podjednostkami regulatorowymi wszystkich wykrytych przez Hartwella i Nurse'a kinaz cdk. Niektóre z cyklin (cyklina D1 i E) mogą także regulować działanie białek nieenzymatycznych, takich jak np. receptory steroidów. Przedmiotem zainteresowań i badań zespołu Hunta są prawidłowości decydujące o specyficzności substratowej kinaz cdk, struktura kompleksów kinaz cdk z cyklinami, a także mechanizmy odpowiedzialne za degradację cyklin.

Z powyższego krótkiego omówienia widać, że wszyscy tegoroczni laureaci nagrody Nobla są autorami kariery kinaz cyklinozależnych i cyklin, a ich badania są w dużym stopniu komplementarne. Można więc żartobliwie powiedzieć za K. Nasmyth i J. Ruderman, cytowanymi w komentarzu *Science* (19.10.2001), że to tak naprawdę kinaza cdc2/cyklina otrzymała nagrodę Nobla.

2. PUNKTY KONTROLNE CYKLU KOMÓRKOWEGO

Komórki eukariotyczne wypracowały mechanizmy, nazywane za Hartwellem punktami kontrolnymi cyklu komórkowego, które monitorują ich przygotowanie i gotowość do przejścia w kolejną fazę cyklu podziałowego po prawidłowym zakończeniu fazy poprzedzającej [34]. Pojęcie „punkt kontrolny” wprowadzone w 1989 roku, już po kilku latach uzyskało „poparcie molekularne”. Wykryto bowiem i opisano liczne procesy komórkowe i uczestniczące w nich białka, działające w różnych momentach cyklu, odpowiedzialne za precyzyjną kontrolę wierności powielania i przekazywania do komórek potomnych materiału genetycznego, a także za prawidłowy podział komórek. Znakomitą większość informacji uzyskano badając przede wszystkim komórki drożdży, u których możliwe było otrzymanie mutantów „upośledzonych” w przebiegu cyklu komórkowego. Obecnie mamy już wiele informacji o punktach kontrolnych także i w komórkach wyższych organizmów eukariotycznych. W artykule omówię podstawowe procesy działające w tych punktach.

3. PUNKTY KONTROLNE WYWOŁANE USZKODZENIEM DNA

W komórkach eukariotycznych poddanych działaniu promieniowania jonizującego czy też pewnych związków cytotoksycznych pojawiają się zaburzenia przebiegu cyklu manifestujące się zatrzymaniem komórek pod koniec fazy G1, przed rozpoczęciem syntezy DNA w fazie S oraz w fazie G2, przed wkroczeniem komórek w mitozę.

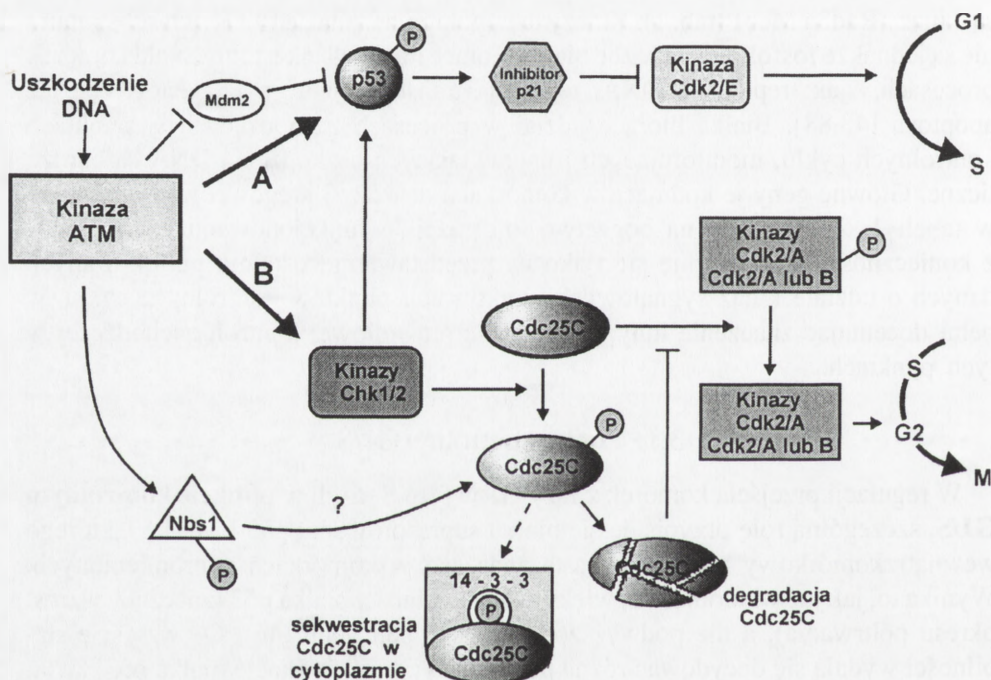
W efekcie uszkodzenia DNA w komórkach zostają uaktywniane specyficzne białka, które rozpoznają stopień i rodzaj uszkodzenia, a następnie uruchamiają liczne szlaki sygnalizacyjne prowadzące do zatrzymania komórek w określonej fazie cyklu lub skierowania ich na drogę śmierci, o ile uszkodzenia są zbyt duże. Pozwala to komórkom na podjęcie reperacji DNA, a następnie wznowienie cyklu. Do białek rozpoznających uszkodzenia DNA, zwłaszcza pęknięcia nici, zalicza się w komórkach kręgowców polimerazę ADP-rybozy, kinazę DNA-PK oraz kinazy ATM i ATR [43,64,72,73]. W komórkach drożdży homologicznymi kinazami „sygnalowymi” są kinazy Rad3 i Mec1 (tab. 1). Kinazy te są pokrewne kinazie PI3 K, ich substratami nie są jednakże fosfolipidy, a różne białka biorące udział w tak istotnych dla komórek procesach, jak: replikacja DNA, regulacja transkrypcji licznych genów czy też apoptoza [43,88]. Białka biorące udział w procesach zachodzących w punktach kontrolnych cyklu, monitorujących i naprawiających uszkodzenia DNA są bardzo liczne. Główne geny je kodujące w komórkach drożdży i kręgowców wymieniono w tabeli 1. Ze względu na bogactwo informacji o funkcjonowaniu tych białek, z konieczności skoncentruję się tylko na przedstawieniu ostatnio publikowanych danych o udziale kinaz sygnalowych w aktywacji punktów kontrolnych cyklu, w pełni doceniając znaczenie innych białek dla prawidłowej kontroli zachodzącej w tych punktach.

3.1. Punkt kontrolny G1/S

W regulacji przejścia komórek z fazy G1 w fazę S, czyli w **punkcie kontrolnym G1/S**, szczególną rolę przypisuje się białku supresorowemu p53 (ryc. 1A), którego wewnątrzkomórkowy poziom wzrasta znacząco w komórkach napromienionych. Wynika to, jak już wiadomo, ze zwiększonej stabilności białka p53 (znaczy wzrost okresu półtrwania), a nie podwyższonej transkrypcji genu [46]. O wzroście stabilności wydają się decydować różne potranslacyjne modyfikacje białka p53, zwłaszcza ufosforylowanie kilku reszt serynowych znajdujących się w jego N-końcowej domenie transaktywacyjnej. Modyfikowane są seryny w pozycji 15 oraz 20, fosforylowane odpowiednio przez kinazy ATM/ATR i niektóre z tak zwanych białkowych kinaz efektorowych, (kinaz Chk), aktywowanych przez kinazę ATM (ryc. 1A) bądź kinazę ATR [10,43]). Wysuwano sugestię, że ufosforylowanie seryn w

TABELA 1. Główne geny w komórkach drożdży i komórkach ludzkich kodujące białka działające w punktach kontrolnych cyklu po uszkodzeniach DNA (z danych [59,82,88])

Klasa/Funkcja	<i>S. pombe</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Komórki ludzkie
Kinazy białkowe pokrewne kinazie PI3 K	Rad3 Tel1	Mec1 Tel1	ATR ATM
Homolog czynnika replikacyjnego (RFC) Podjednostka czynnika replikacyjnego C (RFC)	Rad17 RFC3	Rad24 RFC2-5	Rad17 RFC2-5
Białka pokrewne jądrowemu antygenowi proliferujących komórek (PCNA)	Rad1 Rad9 Hus1	Rad17 Ddc1 Mec3	Rad17 Rad9 Hus1
Białka z motywem BRCT	Rhp9 Cut5	RAD9 DPB11	BRCA1,53 BP1?
Efektorowe kinazy białkowe	Chk1 Cds1	Chk1 Rad53	Chk1 Cds1/Chk2



RYCINA 1. Schemat podstawowych mechanizmów odpowiedzialnych za zatrzymanie komórek w punktach kontrolnych cyklu G1/S (A) i G2 (B) po uszkodzeniu DNA (z danych [24, 43])

N-końcu cząsteczki p53 może utrudniać jego powiązania z białkiem MDM2, w znacznej mierze decydującym o aktywności p53, jego jądrowej lub cytoplazmatycznej lokalizacji, a zwłaszcza o proteolitycznej degradacji w proteasomie 26S. Obecnie wydaje się raczej, że fosforylacja ta ułatwia dalszą aktywację p53, tym razem przez acetylację, dzięki promowaniu jego powiązań z aktywatorem transkrypcji, białkiem CPB/300 o aktywności acetylotransferazy [10]. Podnosi się także znaczenie w aktywacji p53 defosforylacji seryny w pozycji 376, (obecnej w C-końcu cząsteczki), w której pośredniczy kinaza ATM, dzięki której dochodzi do powiązań p53 z białkiem 14-3-3 i efektywnego łączenia się takiego kompleksu z DNA [80]. Kinaza ATM fosforyluje również wspomniane białko MDM2, co utrudnia jego kompleksowanie z białkiem p53 i tym samym przeciwdziała jego degradacji [43].

Działanie p53 w przekazaniu sygnału do zatrzymania cyklu w końcu fazy G1 wiąże się z jego rolą aktywatora transkrypcji wielu genów kodujących białka biorące udział w regulacji cyklu komórkowego. Są nimi: białko p21, „uniwersalny” inhibitor kinaz cyklino-zależnych, działających we wszystkich fazach cyklu komórkowego [22,30], białko GADD45, wiążące się z PCNA, niezbędnym składnikiem kompleksu replikacyjnego czy też białka 14-3-3, rozpoznające i wiążące białka z ufosforylowanymi resztami serynowymi [56]. Rezultatem działania wymienionych białek jest zahamowanie aktywności cyklinozależnych kinaz cdk, których podjednostkami regulatorowymi są cykliny z rodziny D oraz cyklina E. Nie dochodzi wówczas do fosforylacji, a więc inaktywacji białka supresorowego Rb, uruchomienia transkrypcji genów, których produkty są konieczne do rozpoczęcia syntezy DNA w fazie S i w efekcie komórki pozostają w fazie G1 [33].

Możliwe jest także zatrzymanie komórek w fazie G1 w wyniku działania i innych niż transkrypcyjne mechanizmów. Szczególne zainteresowanie wzbudza proteolityczna inaktywacja cykliny D1, obserwowana w komórkach MCF-7 szybko, bo po około 2 godzinach, po uszkodzeniach w nich DNA w wyniku napromienienia lub po podaniu cisplatyny [2]. Z powodu braku cykliny D1 spada aktywność regulowanych przez nią kinaz cdk, następuje także uwolnienie z kompleksu z kinazami cdk4/6 i cyklina D1 inhibitora p21. Uwolniony inhibitor hamuje następnie aktywność kinazy cdk2 aktywowanej przez cyklina E i nie dochodzi w komórkach do rozpoczęcia fazy S i zatrzymania cyklu. Zdaniem autorów powyższych badań, degradację cykliny D1 można traktować jako pierwszą odpowiedź komórek na promieniowanie i inicjującą blok G1, jako późniejszą zaś „odpowiedź transkrypcyjną” białka p53, odpowiedzialną za utrzymanie komórek w fazie G1.

3.2. Punkt kontrolny replikacji DNA

Kolejny punkt kontrolny cyklu występuje w **fazie S** i nazywany jest jej wewnętrzny punkt kontrolny (*intra-S phase checkpoint* [27]), punktem kontrolnym replikacji DNA (*DNA replication checkpoint* [52]), punktem kontrolnym

integralności genomu (*genome integrity checkpoint* [10,25]) czy też punktem kontrolnym *Mec1/Rad53* (*Mec1/Rad53 checkpoint* [76]). W wyniku uszkodzeń DNA wywołanych różnymi czynnikami chemicznymi, jak też promieniowaniem jonizującym, dochodzi do spowolnienia jego syntezy (na skutek zahamowania inicjacji replikacji i wydłużania syntetyzowanego łańcucha), ale także do uruchomienia mechanizmów naprawczych. W tej fazie cyklu niezmiernie istotne jest utrzymanie odpowiedniej struktury replikującego DNA, zwłaszcza struktury widełek replikacyjnych. Prawdopodobnie sygnał o uszkodzeniu DNA jest podobnie jak w fazie G1, generowany przy udziale kinaz typu ATM/ATR [64], a być może także przy udziale nibryny, białka kodowanego przez gen *NBS1*, który bywa zmutowany lub nieobecny w komórkach osobników z zespołem *Nijmegen breakage* [40]. Nibryna tworzy kompleksy z kilkoma białkami obecnymi w punkcie kontrolnym S (*Mre11* i *Rad50*), a co więcej obecne są w niej domeny aminokwasowe, FHA i BRCT, o których wiadomo, że mogą uczestniczyć w detekcji i przekazywaniu sygnałów o uszkodzeniach DNA [46].

W odpowiedzi komórek eukariotycznych na uszkodzenia DNA bierze udział wiele białkowych składników punktu kontrolnego S. W uszkodzonych komórkach działają one zapewne podobnie jak białko PCNA [11] i czynnik replikacyjny C. Tak na przykład w komórkach *S. pombe* w tej odpowiedzi uczestniczy sześć białek Rad i kinaza efektorowa Cds1 zaktywowana (ufosforylowana przez kinazę ATM) w wyniku uszkodzenia DNA [51], w komórkach *S. cerevisiae* zaś kinaza efektorowa Rad53 [52]. Postuluje się, że utrzymują one właściwą konformację widełek replikacyjnych w warunkach chwilowego zaprzestania replikacji. W komórkach HeLa podobne działanie wywiera kinaza Chk1 [27].

W punkcie kontrolnym w fazie S dochodzi również do inaktywacji fosfatazy Cdc25A [24], enzymu odpowiedzialnego za defosforylację tyrozyny w pozycji 15 we wszystkich kinazach cdk i tym samym aktywację tych enzymów. Przypuszczalne mechanizmy inaktywacji fosfatazy Cdc25A, w których biorą udział kinaza ATM i kinazy Chk, zostaną przedstawione poniżej przy omawianiu bloku komórek w fazie G2.

Kinaza ATM fosforyluje również podjednostki kompleksu białka RPA, niezbędnego w procesach replikacji, rekombinacji i naprawy DNA. Nie ma to jednak wpływu, jak się sądzi, na regulacyjne funkcje RPA [46].

3.3. Punkt kontrolny w fazie G2

Zatrzymanie komórek po uszkodzeniu DNA w **fazie G2** cyklu (*G2 damage checkpoint*) nie wymaga bezwzględnej obecności białka supresorowego p53. Może się ono jednak przyczyniać do zatrzymywania komórek w tym punkcie kontrolnym, dzięki indukowaniu przez nie transkrypcji genów kodujących inhibitor kinaz cdk, białko p21, białka GADD45 i różne izoformy białka 14-3-3 [8, 14,15,20,84], tak

jak ma to miejsce w komórkach zatrzymanych w fazie G1. Podstawowe znaczenie dla zablokowania komórek w tym punkcie kontrolnym mają jednak głównie po-translacyjne modyfikacje (zachodzące bez udziału p53) wspomnianej już fosfatazy Cdc25, jednego z głównych regulatorów cyklu komórkowego (ryc. 1B). Jej różne izoformy (A, B i C) działają w określonych fazach cyklu komórkowego i aktywują: w fazach G1 i S kinazę cdk2/cyklinaE (fosfataza Cdc25A), w fazie G2 przede wszystkim kinazy cdk2 i cdk1, których aktywność regulują cykliny mitotyczne A i B (fosfataza Cdc25B i fosfataza Cdc25C [28,41]).

Fosforylację fosfatazy Cdc25 – następującą pod wpływem uszkodzeń DNA i poprzedzającą spadek jej wewnątrzkomórkowego poziomu [54] – wykrywa się we wszystkich komórkach eukariotycznych [66]. Czynne w tym procesie są kinazy efektorowe Chk/Cks (tab. 1), aktywowane przez kinazy ATM/ATR [7,55,86,87]. Kinazy Chk/Csk są strukturalnie różnymi kinazami serynowo-treoninowymi, fosforylującymi podobne substraty, mianowicie białka regulatorowe cyklu – fosfataze Cdc25 i przynajmniej w komórkach drożdży, kinazę wee1 [61]. W tym ostatnim przypadku ufosforylowanie kinazy wee1 aktywuje ją, a to z kolei powoduje zahamowanie aktywności kinazy cdk.

Nie jest jeszcze wiadomo, na czym polega aktywacja kinaz Chk pod wpływem uszkodzeń DNA. Ich fosforylacja przez kinazy ATM/ATR nie zmienia bowiem znacząco ich aktywności enzymatycznej [59]. Sądzi się natomiast, że może to mieć wpływ na tworzenie kompleksów tych kinaz z białkami 14-3-3, których znaczenie w regulacji cyklu jest coraz bardziej doceniane [14,53]. Ufosforylowana przez kinazy Chk fosfataza cdc25 szybko ulega proteolizie w proteasomie 26S, a ponadto w wyniku skompleksowania z białkami 14-3-3, pozostaje w cytoplazmie (sekwestracja) w odizolowaniu od swoich białek docelowych – kinaz cdk rezydujących w jądrze komórkowym. W rezultacie utrzymująca się niska aktywność kinaz cdk nie zezwala na rozpoczęcie podziału mitotycznego.

4. PUNKTY KONTROLNE W MITOZIE

Podczas mitozy występuje kilka punktów kontrolnych: w późnej profazie, kiedy rozpoczyna się tworzenie wrzeciona mitotycznego, na granicy metafazy anafazy oraz, przynajmniej w komórkach drożdży, pomiędzy anafazą i telofazą [19]. We wszystkich tych punktach konieczne jest prawidłowe uformowanie i funkcjonowanie wrzeciona mitotycznego, struktury komórkowej odpowiedzialnej za wszelkie ruchy chromosomów w komórce. Wyczerpujące informacje o powstawaniu bardzo złożonej struktury wrzeciona i działaniu podczas mitozy związanych z nim licznych białek motorycznych, niekiedy zwanych „motorami molekularnymi”, zawarte są w publikowanych w ostatnich latach artykułach [5,42,45,69].

4.1 Punkt kontrolny profaza/metafaza

Na początku mitozy, w późnej profazie, obecny jest **Chfr** punkt kontrolny opisany w 2000 roku w ludzkich komórkach prawidłowych i nowotworowych traktowanych nokodazolem, związkiem wywołującym depolimeryzację mikrotubul [67]. Procesy zachodzące w tym punkcie kontrolnym, takie jak ruch centrosomów ku biegunom komórki oraz kondensację chromosomów, monitoruje białko kodowane przez gen *Chfr*, zawierające domeny FHA (*Forkhead-Associated*) i *RING-finger*, stąd jego nazwa punkt kontrolny *Chfr* (*checkpoint with FHA and Ring finger*). Gen *Chfr* występuje praktycznie w komórkach wszystkich przebadanych tkanek ludzkich, brak natomiast jego ekspresji lub obecność zmutowanych form, wykryto w komórkach niektórych linii nowotworowych (np. DLD1, HCT 116, IMRS [67]). Komórki bez genu i białka *Chfr* są bardziej wrażliwe na działanie związków wpływających na integralność mikrotubul, cechuje je też zmieniona morfologia jąder (wynikająca prawdopodobnie z opóźnionej kondensacji chromosomów) i przedwczesne rozpoczynanie metafazy, nawet przy nie w pełni uformowanym wrzecionie. Sposób działania białka *Chfr* nie jest jeszcze poznany i nie wiadomo, jak zaburzenia polimeryzacji mikrotubul wpływają na kondensację chromosomów, a także czy brak punktu kontrolnego *Chfr* może mieć związek z transformacją nowotworową. Niewątpliwie jednak obecność białka *Chfr* opóźnia rozpoczęcie metafazy w komórkach „wystawionych” na stres mitotyczny.

4.2. Punkt kontrolny wrzeciona mitotycznego

Drugi punkt kontrolny w mitozie występuje **między metafazą a anafazą** i nazywany jest punktem kontrolnym powstawania wrzeciona (*spindle assembly checkpoint*, [65,83]), mitotycznym punktem kontrolnym (*mitotic checkpoint* [48]), czy też punktem kontrolnym wrzeciona (*spindle checkpoint* [29,36,37,81]), którą to nazwę będę stosować w artykule. Kontrola przebiegu cyklu w tym punkcie uniemożliwia rozpoczęcie anafazy i rozdzielenie chromatyd w efekcie wykrycia błędów w strukturze i orientacji wrzeciona w komórce lub także w ułożeniu chromosomów i ich powiązaniu z mikrotubulami wrzeciona czy wreszcie w białkach motorycznych odpowiedzialnych za przemieszczenia chromatyd do biegunów komórki. Przykłady czynników i „defektów genetycznych”, które uaktywniają określone białka i katalizowane przez nie procesy zachodzące w punkcie kontrolnym wrzeciona zestawiono w tabeli 2.

Szczególny udział w działaniu punktu kontrolnego wrzeciona mają kinetochory – dynamiczne, wielobiałkowe kompleksy uformowane na centromerowym DNA chromosomów [62]. Są one miejscami łączenia chromatyd z mikrotubulami (jedną w komórkach drożdży, wieloma w komórkach wyższych eukariota), co umożliwia następnie ruch chromatyd do przeciwległych biegunów komórki. Co więcej, kinetochory, o ile nie są wszystkie połączone z mikrotubulami lub gdy wrzeciono

TABELA 2. Przykłady czynników i efektów genetycznych, które aktywują punkt kontrolny wrzeciona (z danych [65,78,83])

Czynnik/Defekt genetyczny	Organizm	Efekt
Związki depolimeryzujące mikrotubule (kolcemid, nokodazol, benzimidazol)	<i>S. cerevisiae</i> , owady, kręgowce	zahamowanie mitozy
Taksol	ssaki (komórki <i>in vitro</i>)	stabilizacja mikrotubul, opóźnienie rozpoczęcia anafazy
Mutacje genów kodujących tubuliny	<i>S. cerevisiae</i>	zahamowanie mitozy
Mutacje genów kodujących białka z rodziny kinezyn	<i>S. cerevisiae</i> , embriony morskich jeżowców, ssaki (komórki <i>in vitro</i>)	opóźnienie rozpoczęcia mitozy
Mutacje w centromerowym DNA	<i>S. cerevisiae</i>	opóźnienie rozpoczęcia metafazy
Obecność pojedynczego kinetochoru, niezwiązanego z mikrotubulami	ssaki (komórki <i>in vitro</i>),	opóźnienie rozpoczęcia anafazy
Iniekcja przeciwciał skierowanych przeciwko białkom strukturalnym – składnikom kinetochoru (np. CENP-C)	ssaki (komórki <i>in vitro</i>),	opóźnienie rozpoczęcia anafazy
Nadekspresja białka Cdc34 (koniugującego ubikwitynę)	ssaki (komórki <i>in vitro</i>),	opóźnienie metafazy na skutek hamowania powiązań białka centromerowego CENP-E z kinetochorem

jest uszkodzone, generują sygnał uniemożliwiający rozdział chromatyd i wówczas komórki zostają zatrzymane w metafazie [62,68].

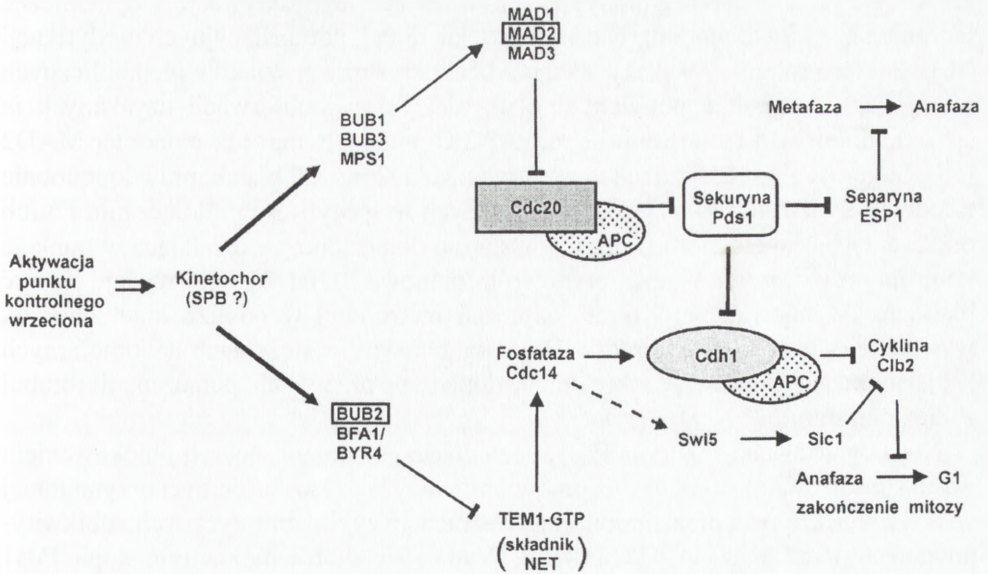
Czym, pod względem biochemicznym, jest sygnał uniemożliwiający rozpoczęcie anafazy, jeszcze nie wiadomo, chociaż w wyniku analizy genetycznej mutantów drożdży *S. cerevisiae* [33,38,50] zidentyfikowano liczne białka działające w tym punkcie kontrolnym. Wykrywają one położenie chromosomów w komórce i ich powiązanie z mikrotubulami, a następnie przekazują tę informację do *basic cell cycle machinery*. Homologi tych białek wykryto także w komórkach innych eukariota [16,17,48,74,75]. Są one niezbędne do precyzyjnego następowania po sobie kolejnych etapów podczas prawidłowej mitozy. Komórki, w których geny kodujące te białka są zmutowane, nie odpowiadają zatrzymaniem cyklu po uszkodzeniach wrzeciona mitotycznego. Główne białka przekazujące sygnały z punktu kontrolnego wrzeciona występujące i w *S. cerevisiae* i w komórkach kręgowców wymieniono w tabeli 3. W komórkach kręgowców białka homologiczne z białkami MAD2, BUB1 i BUB3 drożdży są połączone z kinetochorami jeszcze przed ułożeniem chromosomów w płycie metafazalnej. Nie wykrywa się ich natomiast w tej strukturze po utworzeniu

TABELA 3. Podstawowe białka działające w punkcie kontrolnym wrzeciona (z danych [4,29,32] pogrubioną czcionką zaznaczono białka o aktywności kinazy serynowo-treoninowej)

<i>S. cerevisiae</i>	Komórki kręgowców	Właściwości i funkcje
MAD1	?	białko hiperfosforylowane przez kinazę MPS1 po aktywacji punktu kontrolnego; tworzy kompleksy z białkiem MAD2 i białkiem Cdc20, regulatorem działania ligazy APC/C
MAD2	hMad2 xMad2	tworzy kompleksy z białkiem MAD1, a także z białkiem Cdc20 i ligazą APC/C.; powoduje zahamowanie działania ligazy APC/C; w komórkach kręgowców występuje w kompleksie z wolnymi kinetochorami
MAD3	?	tworzy kompleksy z białkami MAD1 i MAD2
BUB1	hBUB1 hBUBR1	kinaza serynowo-treoninowa fosforylująca białko BUB3 (po utworzeniu kompleksu); w komórkach kręgowców połączona z wolnymi kinetochorami
BUB2	?	białko aktywujące GTPazę i uczestniczące w regulacji aktywności TEM1, białka wiążącego GTP i będącego inhibitorem jądrowej fosfatazy Cdc14
BUB3	HBUB3	tworzy kompleks z fosforylującą go kinazą BUB1; w komórkach kręgowców połączone z wolnymi kinetochorami
MPS1	?	kinaza serynowo-treoninowa fosforylująca białko MAD1; w komórkach drożdży niezbędna przy duplikacji ciała biegunowego (SPB)

połączeń kinetochorów z mikrotubulami wrzeciona i prawidłowym ułożeniu chromosomów w płaszczyźnie równikowej komórki [16,17,48,75].

Białka z rodzin MAD i BUB są zdolne do tworzenia przejściowych wieloskładnikowych kompleksów, przy czym niektóre z nich przejawiają aktywność enzymatyczną (BUB1 i MPS1 są kinazami serynowo-treoninowymi [1,13]) lub regulatorową (BUB2 jest aktywatorem GTPazy). Co więcej, wydaje się mieć miejsce pewna „hierarchiczność” ich działania [65,83], i tak np. białka BUB1, BUB3 i MPS1 działają na tylko na białka MAD1 i MAD2 (ryc. 2). Ich podstawowe (ale być może nie jedyne działanie) wydaje się polegać na regulacji funkcjonowania kompleksu ligazy ubikwitynowej APC/C. Przeprowadza ona ubikwitynację i doprowadza do proteolizy w proteasomie 26S białek z rodziny sekuryń – Pds1/Cut2 w komórkach drożdży, białka *Pimple* w komórkach *Drosophila*, białka PTTG w komórkach kręgowców. W okresie przed rozdziałem chromatyd sekuryń tworzą kompleks z separynami (białka Esp1 w *S. cerevisiae* i Cut1 w *S. pombe*). Degradacja sekuryń Pds1 uwalnia separyny z kompleksu, a one powodują oddysocjowanie od chromatyd spajających je białek – kohezyn [57,58,79], co sprawia, że może



RYCINA 2. Schemat udziału białek z rodzin BUB I MAD, po aktywacji punktu kontrolnego wrzeciona, w regulacji przejścia komórek z metafazy w anafazę i zakończenia podziału mitotycznego (z danych [3, 29, 37])

nastąpić ich rozdzielenie. Dokładniej omówiono to zagadnienie w artykułach przeglądowych [31,85].

Powyższy proces rozdzielenia chromatyd jest nieodwracalny i jest precyzyjnie monitorowany przez białka punktu kontrolnego wrzeciona. Po jego uaktywnieniu (patrz tab. 2 i ryc. 2) dochodzi do utworzenia przejściowego kompleksu białek MAD2 i MAD3 z białkiem Cdc20, regulatorem aktywności ligazy ubikwitynowej APC/C [26,32,39,49]. Możliwy jest także udział w tworzeniu takiego kompleksu białek BUB3 i BUBR1 [71], co znaleziono w komórkach HeLa. Natomiast w komórkach *S. pombe* MAD2 łączy się z białkiem Cdc20 prawdopodobnie za pośrednictwem białka Slp1, które także jest aktywatorem ligazy APC/C [23,44]. Kompleks Cdc20-APC-MAD2 jest nieaktywny i nie przeprowadza ubikwytynacji sekuryny Pds1, w efekcie w komórkach nagromadza się Pds1, co powoduje ich zatrzymanie w metafazie [4,35]. Blok taki nie występuje w komórkach ze zmutowanym białkiem Cdc20, niezdolnym do wiązania MAD2 [39].

Wywołane aktywacją punktu kontrolnego wrzeciona hamujące działanie MAD2 (i towarzyszących mu białek) na funkcjonowanie ligazy ubikwitynowej APC/C jest już dosyć dobrze poznane. O jego istotności dla prawidłowego rozwoju organizmów świadczy fakt, że myszy bez genu kodującego MAD2 giną podczas rozwoju embrionalnego [21]. Nie wiemy jednak, jak działa MAD2 w nieuszkodzonej

komórce i na czym polegają sygnały powodujące jego aktywację i dynamiczne łączenie się z kinetochorami. Nie wykryto, jak dotąd, potranslacyjnych modyfikacji MAD2, które mogłyby wskazywać na udział określonych szlaków metabolicznych w jego aktywacji. Nie potwierdzono również *in vivo* obserwacji uzyskanych *in vitro* o silniejszym hamowaniu ligazy APC/C przez tetramer niż monomer MAD2 [39]. Sugeruje się raczej udział w aktywacji MAD2 innych białek, prawdopodobnie z rodziny dynein lub kinezyn, uczestniczących w specyficznym dołączaniu go lub odłączaniu od kinetochoru [np.1,13]. Ostatnio doniesiono, że działająca w punkcie kontrolnym wrzeciona kinaza serynowo-treoninowa BUB1/BUBR1 wydaje się być białkiem „wyczuwającym” utratę naprężeń mikrotubul w pobliżu kinetochorów, wywołaną działaniem na komórki HeLa winblastyny w stężeniach nanomolarnych [70]. Białko MAD2 zostaje uaktywnione dopiero po przerwaniu połączeń mikrotubul z kinetochorami.

Niezdegradowana sekuryna Pds1, poza unieczynnianiem separyn i blokowaniem w ten sposób anafazy, jak to już omówiono powyżej, okazała się być, przynajmniej w *S. cerevisiae*, również inhibitorem degradacji cyklin mitotycznych, ubikwitynowanych przez ligazę APC/C [18,29]. Wydaje się, że również w tym etapie Pds1 działa pośrednio (ryc. 2), hamując w nieznanym jeszcze sposób, aktywację drugiego białka regulującego ligazę APC/C, a mianowicie białka Cdh1 [18,77]. Białko Cdh1 rozpoznaje i wiąże cykliny mitotyczne tylko wówczas, gdy występuje w formie aktywnej, tzn. zdefosforylowanej w wyniku działania jąderekowej fosfatazy Cdc14. Na aktywność tej fosfatazy i jej uwolnienie z jąderka wywiera wpływ jedno z białek punktu kontrolnego wrzeciona, a mianowicie białko BUB2 [3,29]. Działając jako aktywator GTPazy, hamuje ono funkcjonowanie niektórych białek obecnych w tzw. sieci MEN (*mitotic exit network*) i odpowiedzialnych, między innymi, za aktywację fosfatazy Cdc14 i zakończenie mitozy [12,37]. Ten złożony problem jest w artykule tylko zasygnalizowany. Postuluje się także, że fosfataza Cdc14, przynajmniej w komórkach drożdży [3], ryc. 2) może uaktywniać czynnik transkrypcyjny Swi5 i indukować pośrednio syntezę białka Sic1, inhibitora kinaz cdk. Tak więc widać, jak białka z jednego tylko punktu kontrolnego mogą wpływać na przebieg kilku szlaków metabolicznych i decydować zarówno o rozdziale chromatydu, jak i końcu mitozy.

5. GDY PUNKTY KONTROLNE ZAWODZĄ.....

Tak zatytułowane są rozważania Hartwella i współpracowników [60] o konsekwencjach dla komórek zaburzeń procesów zachodzących w różnych punktach kontrolnych cyklu. Konsekwencje te są bardzo istotne, gdyż w wyniku zakłóceń prawidłowości procesów transkrypcji, replikacji i replikacji DNA, jak również regulacji podziału mitotycznego, może dochodzić do poważnych uszkodzeń materiału genetycznego, pojawiania się mutacji, a nawet utraty części chromosomów i nie-

prawidłowego ich przekazywania komórkom potomnym. Dalszym efektem może być skierowywanie komórek na drogę apoptozy lub też przyspieszenie selekcji klonów komórek nowotworowych.

Obecnie coraz więcej wiadomo o mechanizmach molekularnych działających w różnych punktach kontrolnych cyklu i uczestniczących w nich białkach. Poznawane są też przyczyny leżące u podstaw zaburzeń działania punktów kontrolnych. Tak na przykład w punkcie G1/S wynikają one przede wszystkim z mutacji w genie supresorowym p53 [47] powodujących zakłócenia transkrypcji genów kodujących różne białka regulatorowe cyklu komórkowego. Zmutowane białko p53 nie jest również zdolne do tworzenia kompleksów z jedną z aktywujących go kinaz, kinazą Chk2 [25]. Nieprawidłowości w punkcie kontrolnym G1/S i wynikająca z nich zwiększona promieniowrażliwość komórek i łatwość ulegania transformacji nowotworowej, może też wynikać z mutacji genów kodujących kinazy ATM lub Chk2, tak jak wykrywane to jest w komórkach pacjentów z zespołami *Ataxia-Telangiectasia* i *Li-Fraumeni* [6,25].

Pojawiają się też doniesienia o występowaniu w komórkach różnych nowotworów zmutowanych genów kodujących takie białka działające w punktach kontrolnych podczas mitozy jak Chfr [67] czy też BUBR1 [9]. Opisano również komórki nowotworu piersi charakteryzujące się obniżoną ekspresją genu kodującego białko MAD2 [48]. Można więc przypuszczać, że wyłączenie działania białek istotnych dla przebiegu procesów w punktach kontrolnych cyklu może mieć związek z rozwojem procesu nowotworowego.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ABRIEU A, MAGNAGHI-JAULIN L, KAHANA JA, PETER M, CASTRO A, VIGNERON S, LORCA T, CLEVELAND DW, LABBE JC. Mps1 is a kinetochore-associated kinase essential for the vertebrate mitotic checkpoint. *Cell* 2001; **106**: 83–93.
- [2] AGAMI R, BERNARDS R. Distinct initiation and maintenance mechanisms cooperate to induce G1 cell cycle arrest in response to DNA damage. *Cell* 2000; **102**: 55–56.
- [3] ALEXANDRU G, ZACHARIAE W, SCHLEIFFER A, NASMYTH K. Sister chromatid separation and chromosome re-duplication are regulated by different mechanisms in response to spindle damage. *EMBO J.* 1999; **18**: 2707–2721.
- [4] AMON A. The spindle checkpoint. *Curr Opin Gen Dev* 2000; **9**: 69–75.
- [5] ANDERSEN SSL. Spindle assembly and the art of regulating microtubule dynamics by MAPs and Stathmin/Op18. *Trends Cell Biol* 2000; **10**: 261–267.
- [6] BELL DW, VARLEY JM, SZYDLO TE, KANG DH, WAHRER DCR, SHANNON KE, LUBRATOVICH M, VERSELIS SJ, ISSELBACHER KJ, FRAUMENI JF, BIRCH JM, LI FP, GARBER JE, HABER DA. Heterozygous germ line *hCHK2* mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science* 1999, **286**: 2528–2531.
- [7] BLASINA A, de WEYER IV, LAUS MC, LUYTEN WH, PARKER AE, MCGOWAN CH. A human homologue of the checkpoint kinase Cds1 directly inhibits Cdc25 phosphatase. *Curr Biol* 1999; **9**: 1–10.

- [8] BUNZ F, DUTRIAUX A, LENGAUER C, WALDMAN T, ZHOU S, BROWN JP, SEDIVY JM, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 1998; **282**: 1497–1501.
- [9] CAHILL DP, LENGAUER C, Yu J, RIGGINS GJ, WILLSON JKV, MARKOWITZ SD, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 1998; **392**: 300–303.
- [10] CASPARI T. Checkpoints: How to activate p53. *Curr Biol* 2000; **10**: 315–317.
- [11] CASPARI T, DAHLEN M, KANTER-SMOLER G, LINDSAY HD, HOFMANN K, PAPA-DIMITRIOU K, SUNNERHAGEN P, CARR AM. Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* Hus1: a PCNA-related protein that associates with Rad1 and Rad9. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 1254–1262.
- [12] CERUTTI L, SIMANIS V. Controlling the end of the cell cycle. *Curr Opin Gen Dev* 2000; **9**: 65–69.
- [13] CHAN GKT, JABLONSKI SA, SUDAKIN V, HITTLE JC, YEN TJ. Human BUBR1 is a mitotic checkpoint kinase that monitors CENP-E functions at kinetochores and binds the cyclosome/APC. *J Cell Biol* 1999; **146**: 941–954.
- [14] CHAN TA, HERMEKING H, LENGAUER C, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* 1999; **401**: 616–620.
- [15] CHAN TA, HWANG PM, HERMEKING H, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Cooperative effects of genes controlling the G2/M checkpoint. *Genes Dev* 2000; **14**: 1584–1588.
- [16] CHEN R-H, WATERS JC, SALMON ED, MURRAY AW. Association of spindle assembly checkpoint component XMad2 with unattached kinetochores. *Science* 1996; **274**: 242–246.
- [17] CHEN R-H, SHEVCHENKO A, MANN M, MURRAY AW. Spindle checkpoint protein Xmad1 recruits Xmad2 to unattached kinetochores. *J Cell Biol* 1998; **143**: 283–295.
- [18] COHEN-FIX O, KOSHLAND D. Pds1p of budding yeast has dual roles: inhibition of anaphase initiation and regulation of mitotic exit. *Genes Dev* 1999; **13**: 1950–1959.
- [19] CORTEZ D, ELLEDGE SJ. Conducting the mitotic symphony. *Nature* 2000; **406**: 354–356.
- [20] CRAWFORD DF, PIWNICA-WORMS H. The G₂ DNA damage checkpoint delays expression of genes encoding mitotic regulators. *J Biol Chem* 2001; **276**: 37166–37177.
- [21] DOBLES M, LIBERAL V, SCOTT ML, BENEZRA R, SORGER PK. Chromosome missegregation and apoptosis in mice lacking the mitotic checkpoint protein Mad2. *Cell* 2000; **101**: 635–645.
- [22] DOTTO GP. p21^{WAF1/Cip1}: more than a break to the cell cycle? *Biochim Biophys Acta* 2000; **1471**: M43–M56.
- [23] ELLEDGE SJ. Mitotic arrest: Mad2 prevents sleepy from waking up the APC. *Science* 1998; **279**: 999–1000.
- [24] FALCK J, MAILAND N, SYLJUASEN RG, BARTEK J, LUKAS J. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* 2001; **410**: 842–847.
- [25] FALCK J, LUKAS C, PROTOPOPOVA M, LUKAS J, SELIVANOVA G, BARTEK J. Functional impact of concomitant versus alternative defects in the Chk2-p53 tumour suppressor pathway. *Oncogene* 2001; **20**: 5503–5510.
- [26] FANG G, YU H, KIRSCHNER MW. The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. *Genes Dev* 1998; **12**: 1871–1883.
- [27] FEIJOO C, HALL-JACKSON C, WU R, JENKINS D, LEITCH J, GILBERT DM, SMYTHE C. Activation of mammalian Chk1 during DNA replication arrest: a role for Chk1 in the intra-S phase checkpoint monitoring replication origin firing. *J Biol Chem* 2001; **154**: 913–923.
- [28] FORREST ARR, McCORMACK AK., DeSOUZA CPC, SINNAMON JM, TONKS ID, HAYWARD NK, ELLEM KAO, GABRIELLI BG. Multiple splicing variants of cdc 25B regulate G2/M progression. *Biochim Biophys Res Commun* 1999; **260**: 510–5150.

- [29] GARDNER RD, BURKE DJ. The spindle checkpoint: two transitions, two pathways. *Trends Cell Biol* 2000; **10**: 154–158.
- [30] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Regulacja cyklu komórkowego – udział białkowych inhibitorów kinaz cyklinozależnych. *Post Biochem* 1995; **41**: 80–93.
- [31] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Proteoliza białek regulatorowych cyklu komórkowego. *Post Biochem* 2002; w druku.
- [32] HARDWICK K, JOHNSTON RC, SMITH DL, MURRAY AW. MAD3 encodes a novel component of the spindle checkpoint which interacts with Bub3p, Cdc20p, and Mad2p. *J Cell Biol* 2000; **148**: 871–882.
- [33] HARRINGTON EA, BRUCE JL, HARLOW E, DYSON N. pRB plays an essential role in cell cycle arrest induced by DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 11945–11950.
- [34] HARTWELL LH, WEINERT TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 1989; **246**: 629–634.
- [35] HOWELL BJ, HOFFMAN DB, FANG G, MURRAY AW, SALMON ED. Visualisation of Mad2 dynamics at kinetochores, along spindle fibers, and at spindle poles in living cells. *J Cell Biol* 2000; **150**: 1233–1249.
- [36] HOYT MA. A new view of the spindle checkpoint. *J Cell Biol* 2001; **154**: 909–911.
- [37] HOYT MA. Exit from mitosis: Spindle pole power. *Cell* 2000; **102**: 267–270.
- [38] HOYT M A, TOTIS L, ROBERTS BT. *S.cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell* 1991; **66**: 507–517.
- [39] HWANGLH, LAULF, SMITHDL, MISTROTCA, HARDWICK.G, HWANGES, AMAON A, MURRAY AW. Budding yeast Cdc20: A target of the spindle checkpoint. *Science* 1998; **279**: 1041–1044.
- [40] JONGMANS W, VUILLAUME M, CHRZANOWSKA K, SMEETS D, SPERLING K, HALL J. Nijmegen breakage syndrome cells fail to induce the p53-mediated DNA damage response following exposure to ionizing radiation. *Mol Cell Biol* 1997; **17**: 5016–5022.
- [41] KARLSSON C, KATICH S, HAGTING A, HOFFMANN I, PINES J. Cdc25B and Cdc25C differ markedly in their properties as initiators of mitosis. *J Cell Biol* 1999; **146**: 573–584.
- [42] KARSENTI E, VERNOS I. The mitotic spindle: A self-made machine. *Science* 2001; **294**: 543–547.
- [43] KHANNA KK, LAVIN MF, JACKSON SP, MULHERN TD. ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage. *Cell Death Diff* 2001; **8**: 1052[1065].
- [44] KIM SH, LIN DP, MATSUMOTO S, KITAZONO A, MATSUMOTO T. Fission yeast Slp1: An effector of the Mad2-dependent spindle checkpoint. *Science* 1999; **279**: 1045[1047].
- [45] KRAUZE K, MAKUCH R. Rola białek motorycznych w mitozie. *Monografie Biochemiczne* 1998; **42**: 1[48].
- [46] LAKIN ND, JACKSON SP. Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene* 1999; **18**: 7644–7655.
- [47] LEVINE AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; **88**: 323–331.
- [48] LI Y, BENEZRA R. Identification of a human mitotic checkpoint gene: hsMAD2. *Science* 1996; **274**: 246–248.
- [49] LI Y, GORBEA C, MAHAFFEY D, RECHSTEINER M, BENEZRA R. MAD2 associates with the cyclosome/anaphase-promoting complex and inhibits its activity. *J Cell Biol* 1997; **94**: 12431–12436.
- [50] LI R, MURRAY AW. Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* 1991; **66**: 519–531.
- [51] LINDSAY HD, GRYFFITHS DJ, EDWARDS RJ, CHRISTENSEN PU, MURRAY J.M, OSMAN F, WALWORTH N, CARR AM. S-phase-specific activation of Cds1 kinase defines a subpathway of the checkpoint response in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev* 1998; **12**: 382–395.

- [52] LOPES M, COTTA-RAMUSINO C, PELLICOLI A, LIBERI G, PLEVANI P, MUZI-FALCONI M, NEWLON CS, FOIANI M. The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks. *Nature* 2001; **412**: 557–561.
- [53] LOPEZ-GIRONA A, FURNARI B, MONDESERT O, RUSSEL P. Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. *Nature* 1999; **397**: 172–175.
- [54] MAILAND N, FALCK J, LUKAS C, SYLJUASEN RG, WELCKER M, BARTEK J, LUKAS J. Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science* 2000; **388**: 1425–1429.
- [55] MATSUOKA S, ROTMAN G, OGAWA A, SHILOH Y, TAMAI K, ELLEDGE SJ. Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 10389–10394.
- [56] MUSLIN AJ, TANNER JW, ALLEN PM, SHAW AS. Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* 1996; **84**: 889–897.
- [57] NASMYTH K. Separating sister chromatids. *Trends Biochem* 1999; **24**: 98–104.
- [58] NASMYTH K, PETERS J-M, UHLMANN F. Splitting the chromosome: Cutting the ties that bind sister chromatids. *Science* 2000; **288**: 1379–1384.
- [59] OCONNELL M, WALWORTH NC, CARR A.M. The G2-phase DNA-damage checkpoint. *Trends Cell Biol* 2000; **10**: 296–303.
- [60] PAULOVICH AG, TOCZYSKI DP, HARTWELL LH. When checkpoints fail. *Cell* 1997; **88**: 315–321.
- [61] RALEIGH JM, OCONNELL MJ. The G2 Dna damage checkpoint targets both Wee1 and Cdc25. *J Cell Sci* 2000; **113**: 1727–1736.
- [62] RIEDER CL, COLE RW, KHODJAKOW A, SLUDER G. The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *J Cell Biol* 1995; **130**: 941–948.
- [63] RIEDER CL, SALMON ED. The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis. *Trends Cell Biol* 1998; **8**: 310–318.
- [64] ROTMAN G, SHILOH Y. ATM: a mediator of multiple responses to genotoxic stress. *Oncogene* 1999; **18**: 6135–6144.
- [65] RUDNER AD, MURRAY AW. The spindle assembly checkpoint. *Curr Opin Gen Dev* 1996; **8**: 773–780.
- [66] RUSSELL P. Checkpoints on the road to mitosis. *Trends Biochem Sci* 1998; **23**: 399–402.
- [67] SCOLNICK DM, HALAZONETIS TD. Chfr defines a mitotic stress checkpoint that delays entry into metaphase. *Nature* 2000; **406**: 430–435.
- [68] SHAH JV, CLEVELAND DW. Waiting for anaphase: Mad2 and the spindle assembly checkpoint. *Cell* 2000; **103**: 997–1000.
- [69] SHARP DJ, ROGERS GC, SCHOLEY JM. Microtubule motors in mitosis. *Nature* 2000; **407**: 41–47.
- [70] SKOUFIAS DA, ANDREASSEN PR, LACROIX FB, WILSON L, MARGOLIS RL. Mammalian mad2 and bub1/bubR1 recognize distinct spindle-attachment and kinetochore tension checkpoints. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 4492–4497.
- [71] SUDAKIN V, CHAN GKT, YEN TJ. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol* 2001; **154**: 925–936.
- [72] SZUMIEL I. Monitoring and signaling of radiation-induced damage in mammalian cells. *Radiat Res* 1998; **150**: 92–101.
- [73] SZUMIEL I. The importance of the nuclear and cytoplasmic signaling in the cellular response to ionizing radiation. *Nukleonika* 2000; **45**: 215–220.
- [74] TAYLOR SS, HA E, MCKEON F. The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase. *J Cell Biol* 1998; **142**: 1–11.
- [75] TAYLOR SS, HA E, MCKEON F. Kinetochore localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage. *Cell* 1997; **89**: 727–735.

- [76] TERCERO JA, DIFFLEY FX. Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint. *Nature* 2001; **412**: 553–557.
- [77] TINKER-KULBERG RL, MORGAN DO. Pds1 and Esp1 control both anaphase and mitotic exit in normal cells and after DNA damage. *Genes Dev* 1999; **13**: 1936–1949.
- [78] TOPPER LM, BASTIANS H, RUDERMAN JV, GORBSKY GJ. Elevating the level of Cdc34/Ubc3 ubiquitin-conjugating enzyme in mitosis inhibits association of CENP-E with kinetochores and blocks the metaphase alignment of chromosomes. *J Cell Biol* 2001; **154**: 707–717.
- [79] UHLMANN F, LOTSPEICH F, NASMYTH K. Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature* 1999; **400**: 37–42.
- [80] WATERMAN MJF, STAVRIDIS ES, WATERMAN JLF, HALAZONETIS TD. ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nature Genetics* 1998; **19**: 175–178.
- [81] WATERS JC, CHEN R-H, MURRAY AW, SALMON ED. Localization of Mad2 to kinetochores depends on microtubule attachment, not tension. *J Cell Biol* 1998; **141**: 1181–1191.
- [82] WEINERT T. DNA damage and checkpoint pathways: molecular anatomy and interactions with repair. *Cell* 1998; **94**: 555–558.
- [83] WELLS WAE. The spindle-assembly checkpoint: aiming for a perfect mitosis, every time. *Trends Cell Biol* 1996; **6**: 228–234.
- [84] WIDŁAK P. Wpływ uszkodzeń DNA na regulację cyklu komórkowego. *Post Bioch* 1997; **43**: 85–90.
- [85] ZACHARIAE W, NASMYTH K. Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev* 1999; **13**: 2039–2058.
- [86] ZENG Y, FORBES KC, WU Z, MORENO S, PIWNICA-WORMS H, ENOCH T. Replication checkpoint requires phosphorylation of the phosphatase Cdc25 by Cds1 or Chk1. *Nature* 1998; **395**: 507–510.
- [87] ZHAO H, PIWNICA-WORMS H. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 4129–4139.
- [88] ZHOU BS, ELLEDGE SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 2000; **408**: 433–439.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 13.12.2001 r.

Przyjęto: 13.12.2001 r.

Adres autora: Pasteura 3, 02-093 Warszawa

The first part of the document is a list of names and titles, including:

 1. The Hon. J. J. [Name]

 2. The Hon. J. J. [Name]

 3. The Hon. J. J. [Name]

 4. The Hon. J. J. [Name]

 5. The Hon. J. J. [Name]

 6. The Hon. J. J. [Name]

 7. The Hon. J. J. [Name]

 8. The Hon. J. J. [Name]

 9. The Hon. J. J. [Name]

 10. The Hon. J. J. [Name]

 11. The Hon. J. J. [Name]

 12. The Hon. J. J. [Name]

 13. The Hon. J. J. [Name]

 14. The Hon. J. J. [Name]

 15. The Hon. J. J. [Name]

 16. The Hon. J. J. [Name]

 17. The Hon. J. J. [Name]

 18. The Hon. J. J. [Name]

 19. The Hon. J. J. [Name]

 20. The Hon. J. J. [Name]

 21. The Hon. J. J. [Name]

 22. The Hon. J. J. [Name]

 23. The Hon. J. J. [Name]

 24. The Hon. J. J. [Name]

 25. The Hon. J. J. [Name]

 26. The Hon. J. J. [Name]

 27. The Hon. J. J. [Name]

 28. The Hon. J. J. [Name]

 29. The Hon. J. J. [Name]

 30. The Hon. J. J. [Name]

 31. The Hon. J. J. [Name]

 32. The Hon. J. J. [Name]

 33. The Hon. J. J. [Name]

 34. The Hon. J. J. [Name]

 35. The Hon. J. J. [Name]

 36. The Hon. J. J. [Name]

 37. The Hon. J. J. [Name]

 38. The Hon. J. J. [Name]

 39. The Hon. J. J. [Name]

 40. The Hon. J. J. [Name]

 41. The Hon. J. J. [Name]

 42. The Hon. J. J. [Name]

 43. The Hon. J. J. [Name]

 44. The Hon. J. J. [Name]

 45. The Hon. J. J. [Name]

 46. The Hon. J. J. [Name]

 47. The Hon. J. J. [Name]

 48. The Hon. J. J. [Name]

 49. The Hon. J. J. [Name]

 50. The Hon. J. J. [Name]

 51. The Hon. J. J. [Name]

 52. The Hon. J. J. [Name]

 53. The Hon. J. J. [Name]

 54. The Hon. J. J. [Name]

 55. The Hon. J. J. [Name]

 56. The Hon. J. J. [Name]

 57. The Hon. J. J. [Name]

 58. The Hon. J. J. [Name]

 59. The Hon. J. J. [Name]

 60. The Hon. J. J. [Name]

 61. The Hon. J. J. [Name]

 62. The Hon. J. J. [Name]

 63. The Hon. J. J. [Name]

 64. The Hon. J. J. [Name]

 65. The Hon. J. J. [Name]

 66. The Hon. J. J. [Name]

 67. The Hon. J. J. [Name]

 68. The Hon. J. J. [Name]

 69. The Hon. J. J. [Name]

 70. The Hon. J. J. [Name]

 71. The Hon. J. J. [Name]

 72. The Hon. J. J. [Name]

 73. The Hon. J. J. [Name]

 74. The Hon. J. J. [Name]

 75. The Hon. J. J. [Name]

 76. The Hon. J. J. [Name]

 77. The Hon. J. J. [Name]

 78. The Hon. J. J. [Name]

 79. The Hon. J. J. [Name]

 80. The Hon. J. J. [Name]

 81. The Hon. J. J. [Name]

 82. The Hon. J. J. [Name]

 83. The Hon. J. J. [Name]

 84. The Hon. J. J. [Name]

 85. The Hon. J. J. [Name]

 86. The Hon. J. J. [Name]

 87. The Hon. J. J. [Name]

 88. The Hon. J. J. [Name]

 89. The Hon. J. J. [Name]

 90. The Hon. J. J. [Name]

 91. The Hon. J. J. [Name]

 92. The Hon. J. J. [Name]

 93. The Hon. J. J. [Name]

 94. The Hon. J. J. [Name]

 95. The Hon. J. J. [Name]

 96. The Hon. J. J. [Name]

 97. The Hon. J. J. [Name]

 98. The Hon. J. J. [Name]

 99. The Hon. J. J. [Name]

 100. The Hon. J. J. [Name]

KOMUNIKATY

Uprzejmie informujemy, że w dniach 4–7 września 2002 roku w Międzyzdrojach odbędą się:

XXXVIII SYMPOZJUM POLSKIEGO TOWARZYSTWA HISTOCHEMIKÓW I CYTOCHEMIKÓW

oraz

III KRAJOWY ZJAZD TOWARZYSTWA BIOLOGII ROZRODU

na temat:

Fizjologia i patologia rozrodu w technikach biologii komórkowej i molekularnej

Proponowana tematyka:

- Zagrożenia środowiskowe procesu rozrodu
- Endokrynologia rozrodu: podwzgórze, przysadka, szyszynka, jajnik, jądro
- Indukcja jajczkowania
- Zapłodnienie pozaustrojowe, hodowla pęcherzyków jajnikowych i zarodków
- Zamrażanie komórek jajowych i nasienia
- Biotechnologia rozrodu
- Zmiany genetyczne jako przyczyna niepłodności
- Techniki biologii molekularnej w ocenie morfologii i funkcji komórek żeńskiego i męskiego układu płciowego
- Varia

Organizatorami wspólnego dla obu towarzystw spotkania są: Oddział Szczeciński Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików oraz Oddział Szczeciński Towarzystwa Biologii Rozrodu

Informacje:

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii PAM,
al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin
Tel/fax: 0prefiks91466 16 77
e-mail: tbrpth@sci.pam.szczecin.pl
WWW: www.pam.szczecin.pl/tbr2002

*W imieniu Komitetu Organizacyjnego
Prof. dr hab. n. med. Lidia Wenda-Różewicka
Prof. dr hab. n. rol. Jan Udała*

Wskazówki przygotowania rysunków 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 rysunki, 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		j. angielski
Podstawy zagadnienia:	jedno zdanie	Background:
Podtytuły:	do każdego podtytułu 3–5 zdań	Subtitles:
Wnioski:	2 zdania	Conclusions:
Słowa kluczowe:	do 8 słów	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 2002 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.

Warunki prenumeraty kwartalnika PBK

Prenumerata na rok 2002

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 2002 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 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A.,

IV O/Warszawa 12401053-40006576-2700-401112-001. Cena prenumeraty rocznika na rok 2002

dla instytucji (bibliotek) wynosi 90 zł, a dla odbiorców indywidualnych 30 zł.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 2002 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.

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. układki), 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 koniecznie 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 przesyłać 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 przysłana 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, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następna strona 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 rozdziały oraz podrozdziały. Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawiać alfabetycznie według następującego wzoru:

[1] 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. Poprawiona po recenzji wersja pracy należy zwrócić do redakcji koniecznie w ciągu 30 dni. Redakcja zrzeczuje 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 kopie pracy wraz z rycinami na dyskietce z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego		
Jest zgoda osób, których informacje niepublikowane są zamieszczone w tekście artykułu	tak	nie	z komputera IBM	tak	nie
			Odpowiadam za całość pracy opisaną w zał. maszyn.	tak	nie

Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w "Postęпах 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 PKB	1
PIEŃKOWSKA-GRELA B.: Badania cytogenetyczne w diagnostyce chłoniaków B-komórkowych	
The use of cytogenetic analysis in B-cell lymphoma diagnosis	3
KOZIAK K.: CD39 (NTPDaza 1) – Charakterystyka enzymu oraz jego rola w regulacji krzepnięcia i procesów zapalnych	
CD39 (NTPDase 1) – Characteristics of the enzyme and its role in regulating coagulation and inflammation processes	15
SŁOMCZYŃSKA M.: Dynamika rozmieszczenia receptorów hormonów steroidowych w jajniku	
The dynamic of the steroid hormone receptors distribution in the ovary	27
SZADEL A., LORENC-PLUCIŃSKA G.: Metabolizm sacharozy u roślin oraz jego regulacja w warunkach stresów środowiskowych	
Sucrose metabolism in plants and its regulation under environmental stresses	47
MATUSZYK J., STRZAŁAŁA L.: Regulacja ekspresji i funkcji receptorów jądrowych rodziny Nur77 i ich udział w kontrolnych punktach szlaków sygnałowych prowadzących do apoptozy, różnicowania i produkcji hormonów steroidowych	
Regulation of expression and function of Nur77 family of nuclear receptors and their role in the control points of signaling pathways leading to apoptosis, differentiation and synthesis of steroid hormones	61
CICHY J.: Profilowanie ekspresji genów komórek nowotworowych	
Gene expression profiling of tumor cells	81
MURZYN K.: Woda w symulacjach dynamiki molekularnej	
Methods for representing water in molecular dynamics simulation studies	87
CHMIEL D., MICKOWSKA B.: Systemy regulatorowe <i>agr</i> i <i>sar</i> u <i>Staphylococcus aureus</i>	
Regulatory elements <i>agr</i> and <i>sar</i> in <i>Staphylococcus aureus</i>	103
FABIANOWSKA-MAJEWSKA K.: Rak piersi: zmiany metylacji i ekspresji genów receptorów jądrowych: estrogenowego α ($ER\alpha$) i kwasu retinowego $\beta 2$ ($RAR\beta 2$)	
Breast cancer: alterations of methylation and expression genes of nuclear receptors: α estrogen ($ER\alpha$) and $\beta 2$ retinoic acid ($RAR\beta 2$)	121
KOCZKODAJ D., ROŻYŃKOWA D.: Udział cytogenetyki molekularnej w poszukiwaniu klonalnej proliferacji komórek białaczkowych	
The role of molecular cytogenetics in B-CLL cells clonal proliferation analyses	141
GRZELAKOWSKA-SZTABERT B.: Punkty kontrolne cyklu komórkowego – Czy znamy ich molekularne podłoże?	
Cell cycle checkpoints – Do we know their molecular background?	157
Komunikaty	177
Wskazówki przygotowania rycin i streszczeń do publikacji w PBK	178