

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

POLISH
ANATOMICAL
SOCIETY

POLISH SOCIETY
FOR CELL
BIOLOGY

VOL. 32, ISSUE 1/2005
(1-140)

Postępy
Biologii
Komórki

Advances
in Cell
Biology

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomycznego, 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:

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

Bożena KAMIŃSKA-KACZMAREK – 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*

Janusz KUBRAKIEWICZ – biologia rozwoju, embriologia, różnicowanie komórek, cytoskielet – developmental biology, embryology, cell differentiation, cytoskeleton – *Instytut Zoologiczny UW, 50-335 Wrocław, ul. Sienkiewicza 21*

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, hybridocytochemistry), 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, Szczepan BILIŃSKI, Mieczysław CHORAŻY, Leszek CIECIURA, 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, e-mail: jkawiak@cmkp.edu.pl.

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

Indexed in: National Library of Medicine, Bathesda, Biosis, Philadelphia, Ulrich's International Periodicals Directory, New Jersey.

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. 10,0. Ark. druk 9,0. Podpisano do druku i druk ukończono w styczniu 2005.



„Dispholidus typus”

Proliferacja komórek

Aktywność metaboliczna
**Cell Proliferation
Reagent WST-1**

Aktywność proliferacyjna
**Cell Proliferation
ELISA, BrdU**

Cytotoksyczność
**Cytotoxicity
Detection Kit (LDH)**

Apoptoza

Apoptoza vs. Nekroza
**Cell Death Detection
ELISA PLUS**

Aktywność kaspazy
**Homogeneous
Caspases Assay,
fluorimetric**

Sprawdź inne produkty do badań apoptozy
i proliferacji komórek

www.roche-applied-science.com/apoptosis

Roche Applied Science
**Zestawy do badań
apoptozy i proliferacji
komórek**

Delikatne zadania...
*...wymagają
precyzyjnych rozwiązań*

Sprawdź w Roche Applied Science świetne rozwiązania do badań apoptozy i proliferacji. Wiele lat doświadczeń stanowi podstawę dla szerokiego zakresu szybkich, niezawodnych zestawów. Nasze najlepsze produkty gwarantują dokładne wyniki, nawet w dużych laboratoriach.



Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o.
ul. Wybrzeże Gdynskie 6 B
01-531 Warszawa
Tel. (22) 481 55 67 Faks (22) 481 55 99

rcin.org.pl

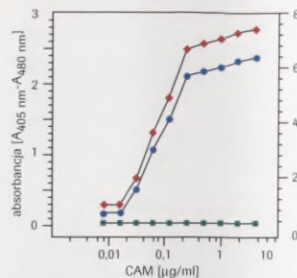
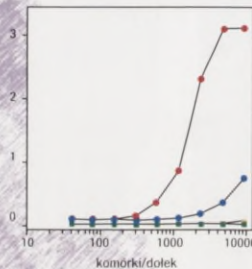
Zestaw - Cell Death Detection ELISA^{PLUS}

Nr kat. 1 774 425 – 96 testów

Nr kat. 1 920 685 – 10 x 96 testów

- Typ oznaczenia:** Jednostopniowa „kanapka“ ELISA, kolorymetryczny
- Zastosowanie:** Ilościowy pomiar apoptozy bez znakowania komórek, odróżnianie apoptozy od nekrozy
- Próbki:** Lizaty komórkowe, supernatanty z hodowli komórkowych, surowica lub osocze
- Specyficzność:** Specyficzne dla nukleosomów zawierających jedno i dwuniciowe DNA, gatunkowo niespecyficzne
- Metoda oznaczenia:** Liza komórek, następnie immunochemiczne oznaczenie fragmentów DNA związanych z histonami w płytce (oznaczenie nekrozy poprzez wykrywanie fragmentów DNA związanych z histonami bezpośrednio w supernatancie z hodowli, bez lizy komórek)
- Czas pomiaru:** 3 godziny
- Czułość:** < 600 komórek

Rysunek 1: Czułość zestawu Cell Death Detection ELISA^{PLUS} na komórkach U937.
Lizat z CAM (czerwony).
Lizat bez CAM (niebieski).
Supernatant z CAM (żółty).
Supernatant bez CAM (zielony).



Rysunek 2: Eksperyment analizowany z użyciem Cell Death Detection ELISA^{PLUS} na komórkach U937.
Lizat (czerwony). Supernatant (zielony). Czynniki wzbogacający lizat (niebieski).

- określanie poziomu apoptozy względem nekrozy
- wysoka czułość
- łatwość stosowania

Zestaw - In Situ Cell Death Detection Kits

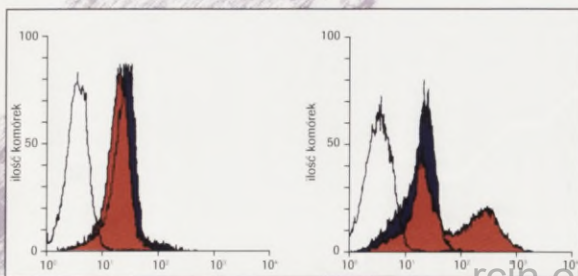
Nr kat. 1 684 809 – 50 testów (AP)

Nr kat. 1 684 795 – 50 testów (Fluoresceina)

Nr kat. 1 684 817 – 50 testów (POD)

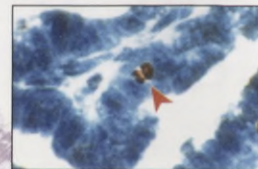
Nr kat. 2 156 792 – 50 testów (TMR red)

- Typ oznaczenia:** Bezpośrednie oznaczenie metodą TUNEL
- Zastosowanie:** Wykrywanie pęknięć nici DNA w komórkach apoptotycznych z zastosowaniem cytometru przepływowego lub mikroskopu fluorescencyjnego
- Próbki:** Komórki w zawiesinie, komórki przylegające do podłoża, rozmazy komórkowe, mrożeniowe lub parafinowe skrawki tkanek
- Specyficzność:** Ilość pęknięć nici DNA w komórkach apoptotycznych jest tak duża, że stopień wyznaczenia komórek pozwala na odróżnienie komórek apoptotycznych od nekrotycznych
- Metoda oznaczenia:** Znakowanie końców DNA przy użyciu dUDP związanego fluoresceiną następnie bezpośrednią analizę komórek wyznaczonych fluorescencyjnie
- Czas pomiaru:** 1 - 3 godzin

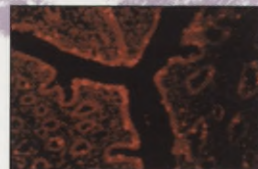


Rysunek 3: Wykrywanie apoptotycznych komórek HL60 z użyciem cytometru przepływowego z zestawem In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein. Mieszana reakcja TUNEL (niebieski) lub roztwór barwiący (biały) lub PBS dla autofluorescencji (pomarańczowy).

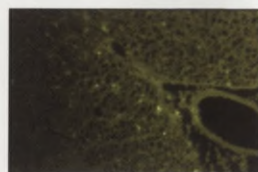
Rysunek 4: Wykrywanie komórek apoptotycznych (zielony) w mikroskopie fluorescencyjnym we fragmencie tkanki z rdzenia kręgowego szczura.



Rysunek 6: Wykrywanie komórek apoptotycznych z użyciem zestawu In Situ Cell Death Detection Kit i znakowanej peroksydazą w śródblonku królika.



Rysunek 5: Śródblonek królika, barwiony z użyciem In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red



W tym Zeszycie

Nagroda Nobla jest okazją do dyskusji zasług naukowych nagrodzonych. W roku 2004 Nagroda z Chemii dotyczy osiągnięć w zakresie kontrolowanej, zależnej od ubikwityny degradacji białek w komórkach. Na stronie 3 przedstawiono sylwetki laureatów oraz przypomniano opisane przez nich i przez innych autorów funkcje ubikwityny, "znakującej" białka przeznaczone w komórce do proteolizy w proteasomach.

Białka STAT są czynnikami transkrypcyjnymi biorącymi udział w przekazywaniu sygnałów w komórce, często z receptorów cytokin. W przebiegu raka jelita grubego szczególną rolę odgrywają białka STAT1 i STAT3. Więcej na ten temat znajdzie Czytelnik na stronie 23.

Przemiany nukleotydów podczas procesów morfogenetycznych u roślin: dojrzewania zarodków, kiełkowania nasion, rozwoju pędu i organów magazynujących opisano na stronie 37. Przedstawiono również wpływ czynników środowiska na ten metabolizm.

Czytelnik znajdzie dwa artykuły dotyczące leczenia nerwiaka zarodkowego, neuroblastoma (strony 59 i 97). Przedstawiono możliwości wykorzystania czynników molekularnych i cytogenetycznych w ustalaniu strategii leczenia i rokowania chorych na ten nowotwór. Omówiono również dane literaturowe dotyczące immunoterapii neuroblastoma.

Ludzki wirus cytomegalii (HCMV) ma zdolność do przetrwałego zakażenia (latencji) w komórkach gospodarza. Wirus może podlegać reaktywacji, podczas której upośledza odpowiedź układu immunologicznego, np. przez blokowanie prezentacji antygenów, wpływ na sieć cytokin, hamowanie aktywności komórek NK. Więcej informacji na ten temat jest na stronie 77.

Część obecnego zeszytu (strony od 111 do 138) zajmują doniesienia przedstawione podczas 32. Konferencji Biologii Komórki na temat Zaburzeń hematologicznych wieku podeszłego.

Prof. dr hab. M.Olszewska prosi o nie nadsyłanie prac w okresie maj-październik 2005 (remont Zakładu).

**WYKAZ RECENZENTÓW Z TOMU 31 Z ROKU 2004
REFEREES OF THE VOLUME 31, 2004**

Prof. dr hab. Barbara Gabara
Prof. dr hab. Lilla Hryniewiecka
Prof. dr hab. Anna Goździcka-Józefiak
Prof. dr hab. Grzegorz Jakiel
Prof. dr hab. Adam Jaworski
Prof. dr hab. Bożena Kamińska-
Kaczmarek
Prof. dr hab. Jerzy Kawiak
Prof. dr hab. Wincenty Kilarski
Prof. dr hab. Marek Kowalski
Prof. dr hab. Janusz Kubrakiewicz
Prof. dr hab. Stanisław Lewak
Prof. dr hab. Gabriela Lorenc-Plucińska
Dr hab. Marcin Majka
Prof. dr hab. Małgorzata Manteuffel
Prof. dr hab. Tomasz Motyl
Prof. dr hab. Antoni Ogorzałek
Prof. dr hab. Ryszard Oliński
Prof. dr hab. Maria Olszewska
Prof. dr hab. Barbara Płytycz

Prof. dr hab. Mariusz Ratajczak
Prof. dr hab. Janusz Siedlecki
Prof. dr hab. Ewa Sikora
Prof. dr hab. Ryszard Słomski
Prof. dr hab. Kazimierz Strzałka
Dr Paweł Surowiak
Prof. dr hab. Zofia Szczotka
Prof. dr hab. Adam Szewczyk
Prof. dr hab. Janusz Szymaś
Prof. dr hab. Krzysztof Selmaj
Prof. dr hab. Barbara Tomaszewska
Prof. dr hab. Kazimierz Trębacz
Prof. dr hab. Wiesław Trzeciak
Prof. dr hab. Maciej Ugorski
Prof. dr hab. Jacek Wachowiak
Prof. dr hab. Krzysztof Wąsowicz
Dr hab. Małgorzata Wierzbicka
Dr hab. Henryk W. Witas
Prof. dr hab. Przemysław Wojtaszek
Prof. dr hab. Maciej Zabel
Prof. dr hab. Jan Żeromski

NAGRODA NOBLA Z CHEMII ZA 2004 ROK – DOCENIENIE KONTROLOWANEJ, ZALEŻNEJ OD UBIKWITYNY, PROTEOLITYCZNEJ DEGRADACJI BIAŁEK

NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY FOR 2004 – APPRECIATION
OF CONTROLLED, UBIQUITIN-DEPENDENT PROTEIN DEGRADATION

Barbara GRZELAKOWSKA-SZTABERT

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

Streszczenie: W opracowaniu tym przedstawiono sylwetki i osiągnięcia laureatów nagrody Nobla w dziedzinie chemii w 2004 roku. Przypomniano pierwszą opisaną funkcję ubikwityny, czyli jej udział w kontrolowanej, zachodzącej przy udziale proteasomu 26S proteolizie białek. Zasygnalizowano też rolę tego wszechobecnego białka w regulacji innych procesów komórkowych.

Summary In the article three Nobel laureates in chemistry for 2004 and their achievements are presented. Their discovery of the first described function of ubiquitin, namely its participation in the controlled protein degradation is shortly reviewed. Moreover, the role of ubiquitin in the regulation of other cellular processes is shown.

Degradacja białek i ich synteza, to dwa procesy niezmiernie istotne dla prawidłowego funkcjonowania komórek. W 2004 roku doceniono wieloletnie badania licznych grup badawczych zajmujących się problemem kontrolowanej proteolizy białek komórkowych i uhonorowano nagrodą Nobla z dziedziny chemii trzech badaczy – Avrama Herszko i Aarona Ciechanovera z Izraela oraz Irwina Rose z USA – „za odkrycie zależnej od ubikwityny degradacji białek”, procesu ściśle regulowanego i specyficznego w stosunku do białkowego substratu, jego lokalizacji komórkowej i momentu, w którym ma nastąpić degradacja.

Irwin Rose urodzony w 1926 w Nowym Yorku w USA, pod koniec II wojny światowej służył jako radiomechanik w marynarce wojennej USA. Po wojnie kontynuował na Uniwersytecie w Chicago rozpoczęte wcześniej studia w *Washington*

State College. W 1952 roku uzyskał stopień doktora w dziedzinie biochemii, a następnie odbył staże podoktorskie w Zakładzie Medycyny *Case-Western Reserve University* w Cleveland i w Zakładzie Farmakologii Uniwersytetu w Nowym Yorku. W latach 1954–1963 pracował w Zakładzie Biochemii w *Yale Medical School*, a od 1963 roku aż do momentu przejścia na emeryturę w 1995 roku związany był z *Fox Chase Cancer Center* w Filadelfii. Obecnie kontynuuje swoje badania, jako emerytowany profesor, w Zakładzie Fizjologii i Biofizyki w *Medical College* na Uniwersytecie Kalifornijskim w Irvine. Od 1979 roku jest członkiem *National Academy of Sciences*, USA.

Avram Hershko urodzony w 1937 roku w Karcag na Węgrzech, od 1950 roku obywatel Izraela, doktoryzował się w dziedzinie medycyny (1965) i biochemii (1969) w *Hadassah Medical School* na Uniwersytecie Hebrajskim w Jerozolimie. Staż podoktorski odbył pod kierunkiem G. Tomkinsa w Zakładzie Biochemii i Biofizyki Uniwersytetu Kalifornijskiego w San Francisco, USA. Po powrocie do Izraela, od 1972 roku jest profesorem w Instytucie Badawczym Nauk Medycznych im. Rodziny Rappaportów w Izraelskim Instytucie Technologii (Technion) w Hajfie. W latach 1977–1978 pracował w laboratorium Rose'a w Filadelfii. Jest laureatem nagrody Weizmana (1987) oraz nagrody Izraela (1994), najwyższego cywilnego odznaczenia tego państwa. Wraz z A. Ciechanoverem i A. Varshavskim został w 2000 roku laureatem nagrody im. Alberta Laskera za pionierskie badania prowadzące do odkrycia zależnego od ubikwityny szlaku degradacji białek. Od 2003 roku jest członkiem *National Academy of Sciences*, USA.

Aaron Ciechanover urodzony w 1947 roku w Hajfie, uzyskał stopień doktora medycyny w 1981 roku pracując pod kierunkiem A. Hershko w Izraelskim Instytucie Technologii (Technion) w Hajfie. Staż podoktorski odbył w laboratorium H. Lodisha w *Massachusetts Institute of Technology*, USA, a od szeregu lat jest profesorem i dyrektorem Instytutu Badawczego Nauk Medycznych im. Rodziny Rappaportów w Izraelskim Instytucie Technologii w Hajfie. Od 1987 roku jest także wizytującym profesorem w Zakładzie Pediatrii w *Washington University* w St. Louis, USA. Jest laureatem nagrody Izraela oraz wraz z A. Hershko i A. Varshavskim nagrody im. Alberta Laskera.

Zasługą powyższych badaczy jest odkrycie i opisanie podstaw działania pozalizosomalnego proteolitycznego systemu degradacji białek, w którym ulegają proteolizie, poza białkami uszkodzonymi bądź o nieprawidłowej strukturze, białka biorące udział w bardzo wielu procesach komórkowych, w tym w regulacji cyklu komórkowego, transkrypcji, reperacji DNA czy też odpowiedzi immunologicznej. Elementem wspólnym łączącym prace tegorocznych Noblistów jest ubikwityna. Niemniej jednak badania każdego z nich są ściśle ukierunkowane, o czym najlepiej świadczą tytuły wykładów noblowskich wygłoszonych na uroczystej sesji 8 grudnia 2004 roku.

- ◆ Irwin Rose „*How ubiquitin chains are made and unmade*”,
- ◆ Avram Hershko „*The ubiquitin system for protein degradation and its roles in the control of cell division*”
- ◆ Aaron Ciechanover “*Intracellular proteolysis – from a vague idea into the patient bed*”

W końcu lat siedemdziesiątych i początku osiemdziesiątych ubiegłego wieku Hershko i Ciechanover, pracując w laboratorium kierowanym przez A. Rose w *Fox Chase Cancer Center* w Filadelfii wykazali, że w lizatach z retikulocytów zachodzi zależna od ATP proteoliza białek, w której uczestniczy termostabilne niewielkie białko globulame,

nazwane początkowo APF-1 (*ATP-dependent proteolytic factor 1*), które następnie okazało się identyczne z odkrytą kilka lat wcześniej ubikwityną. Ubikwityna, białko zbudowane z 76 aminokwasów jest, jak obecnie wiadomo, jednym z najbardziej konserwatywnych białek komórkowych i występuje w formie wolnej lub związanej z białkami we wszystkich organizmach eukariotycznych. W latach 1980–1983 Rose, Hershko i Ciechanover zaproponowali i udowodnili hipotezę o udziale ubikwityny w zależnej od ATP proteolizie białek [13, 14]. Udokumentowali konieczność kowalentnego dołączenia ubikwityny, a właściwie łańcucha zbudowanego z kilku ubikwityn, do białka mającego ulec degradacji oraz wyizolowali i scharakteryzowali trzy aktywności enzymatyczne E1, E2 i E3, których sekwencyjne działanie jest niezbędne do skierowania białka do proteasomu 26S, wieloskładnikowego kompleksu białkowego, w którym ulega ono proteolizie. W etapie pierwszym działa enzym E1, tzw. enzym aktywujący ubikwitynę, i wówczas w procesie wymagającym ATP zostaje utworzone wysokoenergetyczne wiązanie pomiędzy glicyną na C-końcu ubikwityny a cysteiną w centrum aktywnym E1 i powstaje intermediat E1-S- ubikwityna. Następnie zaktywowana w ten sposób ubikwityna zostaje przekazana na białko E2 zwane białkiem przenoszącym bądź koniugującym ubikwitynę. Z białka E2 bezpośrednio lub częściej przy udziale białka E3, tzw. ligazy ubikwitylowej, cząsteczka ubikwityny zostaje przeniesiona na właściwy białkowy substrat. Powstaje wówczas wiązanie izopeptydowe pomiędzy zaktywowanym C-końcem ubikwityny i ϵ -NH₂ jednej z lizyn obecnych w białku. Proces ten powtarza się aż do momentu, gdy białko zostanie naznaczone połączonymi w łańcuch wieloma cząsteczkami ubikwityny. Tak oznakowane białko jest następnie rozpoznawane przez proteasom 26S, w którym po odłączeniu ubikwityny, dochodzi do rozfałdowania i ostatecznej degradacji białka. Zagadnienia te były od szeregu lat i są nadal omawiane w wielu opracowaniach przeglądowych [np. 3, 5, 31], w tym także w polskich czasopismach biologicznych [10, 26, 21, 33].

Tak w szalenie uproszczonej postaci przedstawia się schemat ubikwitylacji białek, która w rzeczywistości jest jednak znacznie bardziej skomplikowana. Do dzisiaj bowiem poznano kilka enzymów E1, kilkanaście enzymów E2 i kilka klas ligaz ubikwitylowych E3, do których zalicza się już blisko tysiąc białek. W cząsteczce ubikwityny obecne są 4 reszty lizynowe, na których mogą formować się łańcuchy poliubikwitylowe. Jeśli następuje to poprzez Liz-48, a także niekiedy Liz-29, to pociąga za sobą skierowanie białek do proteasomu 26S. Natomiast utworzenie łańcucha poliubikwitylowego w połączeniu z Liz-63 ubikwityny sprawia, że w ten sposób oznakowane białka nie są degradowane, a biorą udział w regulacji reperacji DNA, modulacji transkrypcji i translacji, aktywacji różnych kinaz białkowych czy też wewnątrzkomórkowego transportu białek [31]. Co więcej wiadomo także, że podczas gdy do degradacji białka w proteasomie 26S konieczna jest obecność na nim łańcucha złożonego z co najmniej czterech reszt ubikwitylowych, to monoubikwitylacja białka lub modyfikacja przez białka ubikwityno-podobne skierowuje je do różnych kompartmentów komórkowych, w tym także do lizosomów, w których mogą być degradowane. Znane też są liczne enzymy deubikwitylujące, a co więcej wykryto w komórkach szereg białek pokrewnych ubikwitynie, zdolnych do modyfikowania białek i pełniących dzięki temu ważne funkcje regulacyjne [16, 23, 34].

1. UBIKWITYNO-ZALEŻNA DEGRADACJA BIAŁEK

Zainteresowanie zależną od ubikwityny degradacją białek zapoczątkowane ponad 20 lat temu trwa do dzisiaj. Wiele uwagi poświęca się poszukiwaniom i identyfikacji białek degradowanych w tym systemie. Szczególnie dużo badań, w których uczestniczą też omawiani Nobliści, dotyczy proteolizy białek regulatorowych cyklu komórkowego – cyklin, białkowych inhibitorów kinaz cyklino-zależnych, białek odpowiedzialnych za rozpoczęcie syntezy DNA czy też precyzyjną segregację chromatyd podczas mitozy. Ich nieodwracalna degradacja jest bardzo istotna, gdyż pociąga za sobą jednokierunkowość przebiegu cyklu [np. 9–11]. Równie intensywnie badana jest degradacja białek supresorowych, różnych czynników transkrypcyjnych czy też wielu białek sygnałowych. Wiadomo bowiem obecnie, że wszelkie zaburzenia funkcjonowania systemu ubikwityna/proteasom 26S mogą leżeć u podłoża wielu schorzeń i być często przyczyną nieefektywności stosowanych terapii. Utrata funkcji systemu może prowadzić do niepożądanego stabilizacji produktów onkogenów (np. c-Myc, c-Fos, c-Jun, Src, białko wirusowe E1A) i w efekcie promować transformację nowotworową. Natomiast podwyższona aktywność tego układu może powodować destabilizację białek kodowanych przez geny supresorowe (np. p53) czy inhibitory cyklu komórkowego (p21/WAF1, p27). Ostatnio opublikowany nawet został artykuł: „*The ubiquitin system: from basic mechanisms to the patient bed*” [4], w którym podsumowano dotychczasowe informacje o zaburzeniach tego układu w wielu nowotworach, chorobach neurodegeneracyjnych oraz chorobach o podłożu immunologicznym i infekcyjnym. Wyzwaniem zatem staje się opracowanie metod farmakologicznej interwencji w funkcjonowanie układu ubikwityna/proteasom 26S, między innymi polegających na zastosowaniu specyficznych, niskocząsteczkowych inhibitorów proteasomu 26S [30] i enzymów przeprowadzających ubikwitylację [np. 28]. Myśli się też o precyzyjnym kierowaniu wybranych białek na drogę proteolizy przy użyciu syntetyzowanych chimerycznych białek adaptorowych [12].

Precyzyjna regulacja poliubikwitylacji może zachodzić na poziomie białkowych substratów podlegających ubikwitylacji, efektywności „maszyny ubikwitylującej”, jak również zależeć od działania samego proteasomu 26S. W znakomitej większości białka degradowane w układzie ubikwityna/proteasom 26S charakteryzuje obecność na N-końcu cząsteczki tzw. degronów, czyli określonych sekwencji aminokwasowych pełniących funkcje destabilizujące i zawierających resztę/y lizynowe, do której dołączany jest łańcuch poliubikwitynowy. To zwrócenie uwagi na znaczenie składu aminokwasowego i struktury N-końca białek dla ich stabilności (tzw. reguła N-końca) jest zasługą A. Varshavskiego, jednego z współlaureatów nagrody Laskera w 2000 roku [27], bardzo zasłużonego badacza procesów ubikwitylacji, który zdaniem wielu biologów również powinien się znaleźć wśród laureatów nagrody Nobla.

Do precyzyjnego rozpoznania białkowych substratów przez enzymy ubikwitylujące przyczyniają się też liczne modyfikacje potranslacyjne, z których najczęściej opisywane są fosforylacja i hydroksylacja określonych reszt aminokwasowych. Ułatwia ona lub często jest wręcz niezbędna do ich rozpoznawania przez odpowiednie ligazy ubikwitylowe,

istotna jest także acetylacja lub metylacja reszt lizynowych. Inną modyfikacją białek przeznaczonych do degradacji w proteasomie może być też dołączanie do tych samych miejsc, z którymi wiąże się ubikwityna, białek pokrewnych ubikwitynie, takich jak np. SUMO (*small ubiquitin-related modifier*) [5, 23, 34]. W efekcie doprowadza to do zmniejszenia podatności na ubikwitylację tak modyfikowanych białek i powoduje wzrost ich stabilności. Z kolei o efektywności „maszyny ubikwitylującej”, czyli działaniu enzymów aktywujących ubikwitynę i dołączających ją do białkowych substratów decyduje poziom transkrypcji kodujących je genów, jak też różnego typu modyfikacje potranslacyjne, w tym również przez białka pokrewne ubikwitynie, np. RUB (*related to ubiquitin*, znane także jako NEDD8). Coraz lepiej też poznawana jest budowa i funkcjonowanie proteasomu 26S oraz czynniki decydujące o jego sprawnym funkcjonowaniu. Badania te są bardzo istotne ze względu na częste upośledzenie działania proteasomu 26S w wielu stanach chorobowych, a także podczas starzenia się organizmów [2].

Czy poliubikwitylacja jest zawsze niezbędna do degradacji białek w proteasomie? Pytanie to staje się coraz bardziej aktualne w świetle wielu ostatnio pojawiających się danych, które wskazują, że w proteasomie 26S może również zachodzić degradacja białek nieoznaczonych uprzednio ubikwityną. Przez wiele lat sztandarowym przykładem takiego białka była dekarboksylaza ornitynowa, kluczowy enzym w biosyntezie poliamin [17, 29], ale wiadomo obecnie, że także dotyczy to np. inhibitora cyklu komórkowego (białka p21/WAF1), receptora limfocytów T ze zmutowanym (niezawierającym reszt lizynowych), polipeptydowym łańcuchem α , a także białka supresorowego p53, białka c-jun i wielu innych [19,29].

Pojawia się zatem pytanie o sposób rozpoznawania przez proteasom 26S białek przeznaczonych do degradacji. Badania tego zagadnienia są trudne przede wszystkim ze względu na niestabilność *in vivo* łańcuchów poliubikwitylowych ciętych przez obecne w ekstraktach komórkowych enzymy deubikwitylujące. Jak już wspomniano, łańcuch zbudowany z 4 reszt ubikwitylowych jest najkrótszym łańcuchem zdolnym do wiązania się z proteasomem 26S i stanowi wystarczający sygnał do proteolizy połączonego z nim białka. Sugeruje się, że odpowiednia trójwymiarowa struktura łańcucha i kombinacja hydrofobowych regionów w cząsteczkach tworzących go ubikwityn jest niezbędna do współdziałania z niezidentyfikowanymi jeszcze w pełni czynnikami rozpoznającymi (*cognate recognition factors*), obecnymi prawdopodobnie na podjednostce regulatorowej proteasomu 26S. Chociaż precyzyjnie nie wiadomo, w jaki sposób następuje rozpoznanie, to pewne jest, że łańcuch poliubikwitylowy jest czymś więcej niż sumą składowych ubikwityn. Niesiony przez niego sygnał jest bardziej trwały niż dawany przez pojedynczą ubikwitynę, a kolejne odszczepianie ubikwityn od łańcucha daje więcej czasu na rozfałdowanie „trudnych” białek czy też usunięcie przeszkód uniemożliwiających wejście polipeptydu do proteasomu. Zaczyna się doceniać enzymy deubikwitylujące i traktować je jako „czasowy regulator” degradacji [20].

Jak zatem są rozpoznawane i wiązane przez proteasom nieubikwitylowane białka? Problem ten jest szeroko dyskutowany i wysuwanych jest szereg przypuszczeń co do możliwych mechanizmów. Myśli się przede wszystkim o udziale specjalnych białek adaptorowych. W przypadku dekarboksylazy ornitynowej jest to dobrze poznane i scharakteryzowane białko – antyzym [6, 17]. Postuluje się też możliwość bezpo-

redniego oddziaływania nieubikwitylowanego białka z określoną podjednostką rdzenia proteasomu 26S (białko p21/WAF1), czy też sugeruje zmiany allosteryczne w obrębie samego proteasomu ułatwiające białku dotarcie do jego katalitycznego centrum [19]. Sprawa pozostaje nadal otwarta i jest przedmiotem intensywnych badań.

Ale dołączenie do białka ubikwityny nie zawsze oznacza, jak obecnie wiadomo, konieczność jej interakcji z proteasomem. Ten ubikwitynowy sygnał rozpoznaje też wiele innych białek, w których występują określone domeny – sekwencje aminokwasowe (*np.* UIM – *ubiquitin-associated motif*), poprzez które następuje bezpośrednie wiązanie mono- lub poliubikwitylowanych białek, przy czym zazwyczaj silniejsze jest ich powinowactwo do łańcucha poliubikwitylowego niż do pojedynczej ubikwityny. Do dziś opisano sześć takich domen o różnym składzie i strukturze, a sposób ich wiązania z ubikwityną jest przedmiotem licznych badań [22]. Pojawiają się też doniesienia o obecności w białkach specjalnych sekwencji aminokwasowych odpowiedzialnych za wiązanie SUMO.

2. NIESPODZIEWANE FUNKCJE UBIKWITYLACJI – REGULACJA TRANSKRYPCJI I ENDOCYTOZY

Udział ubikwityny w proteolizie białek zdominował dyskusję o jej innych funkcjach, a są one niezmiernie istotne dla prawidłowego funkcjonowania komórek. Dotyczą bowiem wielu ważnych procesów, w tym regulacji transkrypcji, endocytozy i różnego typu oddziaływań pomiędzy białkami. Niemożliwe jest omówienie w tym krótkim opracowaniu tak bardzo złożonych procesów, chcę tylko zwrócić uwagę na te etapy w ich przebiegu, w których dołączenie ubikwityny do określonych białek może mieć znaczenie regulacyjne.

Transkrypcja genów zachodzi w obrębie aktywnej euchromatyny, na stan której niebagatelny wpływ mają histony, o ubikwitylacji których wiadomo już od lat siedemdziesiątych ubiegłego wieku, a *de facto*, histon 2A był pierwszym opisanym ubikwitylowanym białkiem (1977). Jednak o znaczeniu ubikwitylacji w modulowaniu transkrypcji zaczęto myśleć później, gdy okazało się, że histon 2A występuje w nukleosomach w połączeniu z ubikwityną. Obecnie wiadomo, że i inne histony (H2B, H1) są ubikwitylowane i znajdują się w aktywnych transkrypcyjnie rejonach chromatyny [15]. Jest zatem niewątpliwe, że ubikwitylacja histonów może zmieniać ich strukturę i ich wzajemne oddziaływania, jak również oddziaływania z DNA i jest niezbędna do powstania i utrzymania właściwej, „rozluźnionej”, struktury chromatyny. W pewnych sytuacjach może także ułatwiać następczą metylację histonów i regulować w ten sposób wyciszenie niektórych genów.

Pośredni udział ubikwityny w regulacji transkrypcji wydaje się oczywisty, jeśli weźmie się pod uwagę jej wpływ na stabilność białek biorących udział w tym złożonym procesie [1, 8, 18]. Polega on na „proteolitycznej obróbce” prekursorów różnych aktywatorów i inhibitorów tego procesu, a także przede wszystkim na promowaniu ich degradacji po spełnieniu przez nie funkcji regulatorowych, aktywacji lub hamowania transkrypcji w odpowiedzi na sygnał przesyłany przez określony szlak sygnalizacyjny. Co więcej

badania ostatnich lat wykazały, że w cząsteczkach bardzo wielu czynników transkrypcyjnych domeny odpowiedzialne za interakcję z promotorami (*TAD* – *transcription activation domains*) pokrywają się w dużym stopniu z regionami decydującymi o proteolizie (degronami) tych czynników, a mutacje w domenie biorącej udział w aktywacji transkrypcji stabilizują je. Niewątpliwie fakt ten ma znaczenie funkcjonalne, chociaż jego mechanizm nie jest jeszcze dzisiaj w pełni zrozumiały. Spekuluje się, że ubikwitylacja czynnika transkrypcyjnego po jego związaniu z promotorem może stanowić nie tylko sygnał do jego degradacji, lecz jest także niezbędna do pełnienia przez niego funkcji regulacyjnych [7].

Ubikwitylacji i degradacji w proteasomie 26S ulega także, przynajmniej w komórkach z uszkodzonym DNA, duża podjednostka polimerazy RNA II, jeden ze składników kompleksu transkrypcyjnego. Jej eliminacja umożliwia rekrutację do uszkodzonego miejsca, a następnie działanie systemu naprawczego i zatrzymanie transkrypcji aż do ukończenia naprawy [8]. Oznakowanie białek ubikwityną nie zawsze jednak pociąga za sobą bezpośrednie skierowanie ich na drogę degradacji. Tyczy to także czynników transkrypcyjnych, których ubikwitylacja bądź sumoilacja decyduje w znacznym stopniu o ich cytoplazmatycznej lub jądrowej lokalizacji i dopiero późniejszej degradacji w tych subkompartamentach komórkowych [24].

Nie tylko ubikwityna, ale także niektóre podjednostki proteasomu 26S mogą brać udział w regulacji transkrypcji. Dotyczy to zwłaszcza podjednostek wykazujących aktywność ATP-az obecnych w podjednostce regulatorowej proteasomu 26S, które podejrzewa się o udział w regulacji funkcjonowania polimerazy RNA II. Wysuwane jest przypuszczenie, że mogą one brać udział w zaleźnym od ATP rozfałdowywaniu białek i wywoływać reorganizację kompleksu transkrypcyjnego w sposób ułatwiający jego działanie [7, 8].

Należy zdawać sobie sprawę, że udział ubikwityny w regulacji transkrypcji nie ogranicza się tylko do promowania proteolizy określonych białek. Przynajmniej w przypadku kilku czynników transkrypcyjnych udokumentowano bezpośrednią modulację przez ubikwitynę ich efektywności, dzięki czemu stało się możliwe ich wybiórcze ukierunkowanie na aktywację transkrypcji określonych genów, zależnie od składu środowiska hodowlanego. Klasycznym już przykładem tego typu regulacji jest modulacja przez ubikwitynę aktywacji transkrypcji przez drożdżowy czynnik Met4 [8]. Ponadto, aktywność PCNA, jądrowego antygenu proliferujących komórek, jest także związana z jego ubikwitylacją (poprzez Liz 63) bądź sumoilacją. W komórkach z uszkodzonym DNA jest on mono-, a następnie poliubikwitylowany i wchodzi w skład kompleksu reperacyjnego, natomiast w komórkach nieuszkodzonych jest sumoilowany i bierze udział w prawidłowej replikacji DNA [32].

Ubikwityna pełni także istotną rolę w **endocytozie**, złożonym procesie internalizacji wielu białek błonowych. Liczne ligazy ubikwitylowe przeprowadzają ubikwitylację wielu białek błonowych, w tym białek tworzących kanały jonowe czy też receptorów różnych sygnałów zewnątrzkomórkowych (czynników wzrostowych, hormonów) [12, 25]. Dołączenie do białek błonowych jednej lub dwóch cząsteczek ubikwityny (poprzez Liz 63) jest wystarczającym sygnałem do ich internalizacji w pęcherzykach endocytarnych.

W przypadku białek przeznaczonych do degradacji następny etap polega na skierowaniu ich do lizosomów, w których ulegają proteolizie, natomiast białka predestynowane do ponownego wbudowania w błonę komórkową pozostają w błonach endosomów. Szereg ostatnich badań wskazuje, że niektóre białka błonowe nie muszą być ubikwitylowane, żeby zostać przemieszczone do wnętrza komórki. Ich internalizacja staje się możliwa, dzięki interakcji z innymi ubikwitylowanymi białkami (np. epsynami czy arestynami) odpowiedzialnymi za prawidłowy przebieg endocytozy [15, 25]. Ten typ modyfikacji ma szczególnie duże znaczenie w przekazywaniu sygnałów z receptorów takich czynników wzrostowych, jak: np. naskórkowy czynnik wzrostu (EGF), czynnik wzrostu hepatocytów (HGF), płytkowy czynnik wzrostu (PDGF) czy też hormon wzrostu (GH). Częste występowanie w komórkach nowotworowych mutantów ligaz ubikwitylowych pozbawionych aktywności powoduje, że w takich komórkach receptory błonowe nie ulegają degradacji, a tym samym przedłużony zostaje sygnał z receptora, co może przyczynić się do niekontrolowanego wzrostu komórek.

Monoubikwitylacji ulegają też białka retrowirusów, jak również liczne antygeny, w tym białka głównego kompleksu zgodności tkankowej, MHC. Modyfikacja ta jest konieczna bądź do uwalniania wirusów z zakażonych komórek bądź też do usuwania białek antygenowych z błon komórkowych. Tak więc z każdym rokiem powiększa się liczba białek, których działanie regulowane jest przez ubikwitylację. Zagadnienie to jest bardzo skomplikowane i zasługuje na odrębne opracowanie.

PODSUMOWANIE

Kariera ubikwityny, jako jednego z istotnych regulatorów coraz większej liczby procesów komórkowych, rozpoczęła się niewiele ponad 20 lat temu. Okres ten przyniósł wiele odkryć, już pozwalających na docenienie znaczenia procesu ubikwitylacji, chociaż szereg zagadnień z tym związanych wymaga dalszych badań. Nie wiadomo na przykład dokładnie, jak dołączenie pojedynczej ubikwityny lub łańcucha poliubikwitylowego zmienia strukturę tak modyfikowanych białek, ich aktywność, współdziałanie z innymi białkami w kompleksach czy też lokalizację wewnątrzkomórkową. Zbyt mało też jeszcze wiadomo o procesach deubikwitylacji białek czy też o działaniu białek pokrewnych ubikwitynie. Nie mniej jednak wydaje się już niemal pewne, że ubikwitylacja stanowi równie ważną modyfikację białek jak ich fosforylacja lub metylacja.

PIŚMIENICTWO

Podano tylko podstawowe, na ogół przeglądowe pozycje piśmiennictwa wystarczające, aby zainteresowany czytelnik mógł znaleźć źródłowe informacje.

- [1] BACH I, OSTENDORFF HP. Orchestrating nuclear functions: ubiquitin sets the rhythm. *Trends Biochem Sci* 2003; **28**: 189–195.
- [2] CARRARD G, BULTEAU AL, PETROPOULOS I, FRIGUET B. Impairment of proteasome structure and function in aging. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; **34**: 1461–1474.
- [3] CIECHANOVER A. The ubiquitin – proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J* 1998, **17**: 71–7160.
- [4] CIECHANOVER A, IWAI K. The ubiquitin system: from basic mechanisms to the patient bed. *IUBMB Life* 2004; **56**: 193–201.
- [5] CIECHANOVER A, SCHWARTZ AL. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mechanism of recognition of the proteolytic substrate and involvement in the degradation of native cellular proteins. *FASEB J* 1994; **8**: 182–191.
- [6] COFFINO P. Regulation of cellular polyamines by antizyme. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2001; **2**: 188–194.
- [7] CONAWAY RC, BROWER CS, CONAWAY JW. Emerging role of ubiquitin in transcription regulation. *Science* 2002; **296**: 1254–1258.
- [8] FREIMAN RN, TJIAN R. Regulation the regulators: lysine modifications make their mark. *Cell* 2003; **112**: 11–17.
- [9] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Degradacja cyklin jako niezbędny element regulacyjny cyklu komórkowego. *Post Biochem* 1993; **39**: 16–25.
- [10] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Proteoliza białek regulujących przebieg cyklu komórkowego – udział ubikwitinacji. *Post Biochem* 2002; **48**: 34–47.
- [11] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Punkty kontrolne cyklu komórkowego – czy znamy ich molekularne podłoże? *Post Biol Kom* 2002; **29**: 157–175.
- [12] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Oligo- i monomeryczne ligazy ubikwitinowe E3 z domeną *RING finger* – budowa i działanie. *Post Biol Kom* 2004; **31**: 1–20.
- [13] HERSHKO A, CIECHANOVER A, HELLER H, HAAS AL, ROSE IA. Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of proteins with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; **77**: 1783–1786.
- [14] HERSHKO A, HELLER H, ELIAS S, CIECHANOVER A. Components of ubiquitin-protein ligase system. *J Biol Chem* 1983; **258**: 8206–8214.
- [15] HICKE L. Protein regulation by monoubiquitin. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2001; **2**: 19–201.
- [16] JENTSCH S, PYROWOLAKIS G. Ubiquitin and its kin: how close are the family ties? *Trends Cell Biol* 2000; **10**: 335–342.
- [17] MANTEUFFEL-CYMBOROWSKA M. Dekarboksylaza ornitynowa jedynym nieubikwitinowanym białkiem degradowanym przez 26S proteasomy? *Post Biochem* 1996; **42**: 113–120.
- [18] MURATANI M, TANSEY WP. How the ubiquitin – proteasome system controls transcription. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2003; **4**: 192–201.
- [19] ORLOWSKI M, WILK S. Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome. *Arch Biochem Biophys* 2003; **415**: 1–5.
- [20] PICKART CM. Ubiquitin in chains. *Trends Biochem Sci* 2000; **25**: 544–548.
- [21] PIOTROWSKA U. Struktura i funkcja ubikwityny. *Post Biochem* 1993; **39**: 8–16.
- [22] SCHNELL JD, HICKE L. Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem* 2003; **278**: 35857–35860.
- [23] SCHWARTZ DC, HOCHSTRASSER M. A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers. *Trends Biochem Sci* 2003; **28**: 321–328.
- [24] SHCHERBIK N, HAINES DS. Ub on the move. *J Cell Biochem* 2004; **93**: 11–19.
- [25] STROUS GJ, GENT J. Dimerization, ubiquitylation and endocytosis go together in growth hormone receptor function. *FEBS Lett* 2002; **529**: 102–109.
- [26] TOBIASZ A, ŻOŁĄDEK T. System ubikwitinacji i jego rola u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. *Post Biochem* 1997; **43**: 91–97.

- [27] VARSHAVSKY A. The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 12142–12149.
- [28] VASSILIEV LT, VU BT, GRAVES B, CARVAJAL D, PODLASKI F, FILIPOVIC Z, KONG N, KAMMLOT U, LUKACS C, KLEIN C, FOTOUHI N, LIU EA. *In vivo* activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 2004; **303**: 844–848.
- [29] VERMA R, DESHAIES RJ. A proteasome howdunit: the case of the missing signal. *Cell* 2000; **101**: 341–344.
- [30] VOORHEES PM, DEES EC, O'NEIL B, ORLOWSKI RZ. The proteasome as a target for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2003; **9**: 6316–6325.
- [31] WEISMANN AM. Themes and variations on ubiquitylation. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2001; **2**: 169–178.
- [32] WILKINSON CRM. New tricks for ubiquitin and friends. *Trends Cell Biol* **12**: 545–546.
- [33] WÓJCIK C. Proteasomy i szlak degradacji białek zależny od ubikwityny. *Post Biol Kom* 1995; **22**: 295–315.
- [34] YEH ETH, GONG L, KAMITANI T. Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles. *Gene* 2000; **248**: 1–14.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 15.12.2004 r.

Przyjęto: 20.12.2004 r.

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

e-mail: b.grzelakowska@nencki.gov.pl

AUTOFAGIA – NARZĘDZIE PRZEŻYCIA CZY ŚMIERCI KOMÓRKI NOWOTWOROWEJ?

AUTOPHAGY – THE TOOL OF CANCER CELL SURVIVAL OR DEATH?

Monika LAMPARSKA-PRZYBYSZ, Tomasz MOTYL

Katedra Nauk Fizjologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego

Streszczenie: Ostatnia dekada przyniosła znaczący postęp w poznaniu mechanizmów kontrolujących śmierć komórki. Zgromadzone wyniki sugerują, że apoptoza nie jest jedynym typem programowanej śmierci komórki (PCD). Komórki mogą ulegać procesowi autodestrukcji w różny sposób. Obecnie wyróżnia się trzy typy PCD: typ I lub apoptoza, który zależny jest od aktywacji kaspaz, typ II czyli autofagia oraz typ III, który polega na rozpadzie komórki i jest niezależny od procesu kondensacji chromatyny oraz aktywacji lizosomów. Autofagia jest filogenetycznie bardzo starym procesem mającym na celu degradację białek o długim okresie półtrwania oraz usuwanie organelli komórkowych. Wyróżnia się jej trzy główne formy: makroautofagię, mikroautofagię oraz tzw. autofagię zależną od chaperonów. W komórkach ssaków proces ten jest regulowany przez geny AUT i ATG. Beklina 1, homolog drożdżowego białka ATG6 jest zaangażowana w transport substratów do wakuoli autofagicznych. Z kolei homolog białka Atg8 jest lekkim łańcuchem białka związanego z mikrotubulami (MAP I LC3), które występuje na autofagosomach i jest obecnie uważane za jedyny wiarygodny biochemiczny marker autofagii. Autofagia jest z jednej strony procesem warunkującym zachowanie równowagi pomiędzy biosyntezą a rozkładem makrocząsteczek, a przez to decydującym o przeżyciu komórki. Z drugiej zaś strony autofagia jest narzędziem eliminacji komórek nowotworowych drogą programowanej śmierci komórki typu II, co wskazuje na jej rolę w hamowaniu nowotworzenia. Artykuł ten stanowi przegląd obecnej wiedzy na temat roli autofagii w komórkach nowotworowych oraz jej podwójnej funkcji jako narzędzia przetrwania lub śmierci komórki. Szczególną uwagę poświęcono molekularnym ogniom łączącym ścieżki apoptozy i autofagii w komórkach nowotworowych oraz możliwościom ich sterowania na potrzeby terapii onkologicznej.

Słowa kluczowe: apoptoza, autofagia, beklina 1, katepsyna, BID, MAP I LC3, komórki nowotworowe.

Summary: In the last decade a progress has been achieved in understanding the mechanisms which control the cell death. Accumulating evidence suggest that apoptosis is not the only one type of programmed cell death (PCD). Cells use different pathways to active self-destruction process. There are three types of programmed cell death (PCD): condensation prominent, type I or apoptosis, dependent on the activity of caspases, type II – autophagy prominent and type III occurring through disintegration of cells into fragments without condensation and involvement of lysosomal system. Autophagy is a philo-

genetically very old process, usually considered as a route of cellular proteins degradation and organelle turnover, comprising macroautophagy, microautophagy and chaperone-mediated autophagy. APG and AUT genes regulate this process in mammalian cells. Beclin 1, a homolog of the yeast autophagy protein Atg6 is required for vacuolar transport and can induce autophagy in human cells. Another one homolog of yeast Atg8 gene codes the microtubule-associated protein 1 (MAP 1) light chain 3 (LC3) which exists on the autophagosomes and is currently the only reliable biochemical marker of autophagosomes. Autophagy is beneficial for the maintenance of the balance between the biosynthesis and catabolism of macromolecules and cell survival. On the other hand, autophagy is also involved in elimination of cancer cells by triggering a non-apoptotic cell death program (PCD II), indicating its inhibitory role in tumor development. This article reviews current knowledge on the role of autophagy in cancer cells and its dual function as a tool of cell protecting or killing. Authors emphasized molecular links between apoptosis and autophagy in tumor cells and possibility of their control for progression in anticancer therapy.

Key words: apoptosis, autophagy, beclin1, cathepsin, BID, MAP 1 LC3, cancer cells.

WPROWADZENIE

Jedną z głównych przeszkód dla efektywnej radio- czy chemioterapii nowotworów są mutacje genów supresorowych nowotworu i genów proapoptotycznych, które bardzo często występują w komórkach nowotworowych, szczególnie nowotworów złośliwych. Nowe trendy w leczeniu onkologicznym, w postaci terapii genowej przywracającej funkcjonalność powyższych genów, wraz z wprowadzaniem nowych, mniej toksycznych dla zdrowych komórek leków cytostatycznych, budzą nadzieję skutecznej walki z nowotworami. Kolejną szansą w walce z rakiem jest poznawanie innych dróg, poza apoptozą, prowadzących do śmierci komórek nowotworowych. Alternatywną do apoptozy śmiercią komórki jest autofagia (autofagocytoza), tzw. programowana śmierć typu II [1–6]. Autofagia jest filogenetycznie starym procesem wykorzystywanym nie tylko jako narzędzie śmierci, ale również przeżycia. Proces autofagii jest znany przede wszystkim jako wewnątrzkomórkowy system degradacji składników cytoplazmy, szczególnie białek o długim okresie półtrwania przy udziale lizosomów. Efekt tego procesu jest zawsze ten sam – kompletna i nieodwracalna degradacja wielko-cząsteczkowych substratów do ich podstawowych składników przy udziale enzymów lizosomalnych [7–8]. Ponadto lizosomy w procesie autofagii biorą udział w usuwaniu organelli komórkowych, takich jak: mitochondria i peroksosomy czy też fragmentów aparatu Golgiego i siateczki śródplazmatycznej [9]. Proces ten może być także bezpośrednio zaangażowany w śmierć komórek [10]. Wydaje się, że rozmiar autofagii decyduje o jej życiodajnej bądź śmiertelnej roli w komórce.

Na podstawie różnych dróg kontaktu substratów z lizosomami wyróżniono trzy główne formy autofagii: makroautofagię, mikroautofagię oraz tzw. autofagię zależną od chaperonów [7]. W czasie makroautofagii, składniki cytoplazmy mające ulec degradacji zostają otoczone początkowo pojedynczą, a następnie podwójną, izolującą błoną, tworząc autofagosomy o 1 μm średnicy. Następnie autofagosomy ulegają fuzji z lizosomami, co prowadzi do powstania autofagolizosomów, w których zachodzi ostateczny proces niszczenia ich zawartości przy użyciu lizosomalnych hydrolaz [6, 1–12]. Natomiast w czasie mikroautofagii fragmenty cytoplazmy zostają bezpo-

średnio otoczone przez błonę lizosomalną i wnikają do ich wnętrza na zasadzie endocytozy. Trzeci typ autofagii wymaga obecności odpowiednich receptorów na błonie lizosomów, które to pośredniczą w transporcie cytozolowych białek do wnętrza lizosomów [1]. Selektywność wiązania z receptorem zależy od rozpoznania odpowiedniego fragmentu sygnałowego w sekwencji aminokwasowej białka poprzez cytozolowy chaperon. Kompleks chaperon-substrat wiąże się bezpośrednio z receptorem na błonie lizosomów. Natomiast drugi chaperon zlokalizowany wewnątrz lizosomu jest niezbędny do translatacji substratu [13].

ROLA AUTOFAGII

Proces ten spełnia trzy główne funkcje:

1. Autofagia jest mechanizmem adaptacyjnym w przypadku głodzenia. Usunięcie źródeł aminokwasów z pożywienia indukuje autofagię w różnych narządach, np. w wątrobie. Ten sam efekt można obserwować w hodowlach komórkowych [3]. Rozkład białek poprzez autofagię umożliwia podaż aminokwasów i innych składników niezbędnych do utrzymania metabolizmu. Dlatego też aminokwasy są głównymi regulatorami tego procesu. Po usunięciu aminokwasów z pożywki autofagia jest indukowana w ciągu kilku minut w komórkach wątroby. Po upływie zaledwie 7–8 min można już obserwować powstawanie wakuoli degradujących. Całkowity czas upływający od formowania autofagosomów do degradacji w autofagolizosomach wynosi ok. 20 min [3].
2. Autofagia umożliwia zachowanie homeostazy cytoplazmy, ponieważ kontroluje proces usuwania peroksysomów, mitochondriów oraz reguluje wielkość siateczki śródplazmatycznej [14].
3. Autofagia jest także zaangażowana w niektóre tkankowo-specyficzne procesy, takie jak: wewnątrzkomórkowa biogeneza surfaktantu na powierzchni pneumocytów II, biosynteza neuromelaniny w dopaminergicznych neuronach czy też w proces dojrzewania erytrocytów [3].

MOLEKULARNY MECHANIZM AUTOFAGII

Analiza ssaczych homologów białek drożdży o istotnym znaczeniu dla procesu autofagii (produkty genów *Aut* – *Autophagocytosis* i *Atg* – *Autophagy*), pozwoliła wyróżnić kilka białek bezpośrednio związanych z błonami, biorącymi udział w autofagii [7]. Formowanie autofagosomów jest zależne od dwóch skoniugowanych systemów, będących pozostałością po proteosomalnej ścieżce ubikwitynacji białek [5, 11]. Pierwszy z nich angażuje cztery białka Atg: 5, 7, 10, 12, gdzie Atg7 i Atg10 odgrywają rolę podobną do tej, jaką pełnią enzymy E1 i E2 podczas ubikwitynacji. Ostateczny kompleks jest formowany przez Atg5–Atg12, który jest niekowalentnie związany z białkiem Atg16.

Multimeryzacja Atg16 z kompleksem Atg5-Atg12 jest wymagana, aby proces autofagii mógł się rozpocząć [15]. Produkt drugiego systemu koniugacyjnego jest wynikiem połączenia kompleksu Atg8/Aut7 z fosfatydyloetanoloaminą [16]. Jednym z ludzkich homologów Atg8, który jest związany z systemem zależnym od Aut7, jest białko MAP I LC3 (*Microtubule-Associated Protein I Light Chain 3*). Białko to występuje na autofagosomach oraz błonach izolujących [7,17–19]. Lekki łańcuch białka LC3 ulega modyfikacji potranslacyjnej, która prowadzi do odcięcia przez proteazę Atg4 22-aminokwasowego fragmentu na C-końcu. Następnie reakcje katalizowane przez Atg7 oraz Atg3 prowadzą do przekształcenia tego białka z cząsteczki o masie 18 kDa (forma LC3-I) do 16 kDa formy LC3-II, która wiąże się z autofagosomami. Ilość LC3-II jest bezpośrednio skorelowana z liczbą autofagosomów, a proces przekształcania formy LC3-I do LC3-II ulega wzmocnieniu po indukcji autofagii. Dlatego też białko to jest obecnie jedynym wiarygodnym markerem tego procesu [17,20–21]. Wzrost koncentracji tego białka w komórkach ludzkiego raka sutka linii MCF-7 poddanych działaniu kamptotecyny przedstawiono na rycinie 1a.

Powstawanie autofagosomów jest także zależne od enzymu kinazy trifosforanu fosfatydyloinozytolu (PI3K klasa III). Kinaza ta pełni istotną rolę w czasie proliferacji komórek oraz wewnątrzkomórkowego przemieszczania elementów cytoszkieletu. Bierze także udział w sekwestracji materiału cytoplazmatycznego do wakuoli autofagicznych. Enzym ten jest hamowany przez 3-metyloadeninę (3-MA), co prowadzi do zablokowania tworzenia autofagosomów [22–23]. W komórkach ssaków PI3 kinaza jest również funkcjonalnie związana z białkiem beklina 1 [24–25]. Beklina 1 jest funkcjonalnym homologiem drożdżowego białka Atg6 i indukuje autofagię w kulturach komórkowych raka sutka. Ludzki gen *beclin 1* w 40–70% nowotworów sutka oraz jajnika ulega monoallelicznym delecjom, co prowadzi do zahamowania jego funkcji jako „genu autofagocytozy” [6,25]. Beklina 1 tworzy kompleksy z PI3 kinazą klasy III, które można odnaleźć w części *trans* aparatu Golgiego, co sugeruje, że kompleks ten kontroluje autofagię poprzez dostarczenie trifosforanu fosfatydyloinozytolu z aparatu Golgiego do błon izolujących [12].

Kontrolowanie poziomu trifosforanu fosfatydyloinozytolu poprzez fosfatazy, należące do rodziny MTM (*myotubularin family*), MTMR (*myotubularin family related proteins*) oraz homologi PTEN, może stanowić jeden z mechanizmów odpowiedzialnych za przebieg procesu autofagii [26]. Mutacje w obrębie genów *MTM* i *MTMR* powodują powstawanie miopatii miotubularnych [27]. Wykazano, że mutacje genu *MTMR3*, odpowiedzialnego za ekspresję białka hydrolizującego trifosforan fosfatydyloinozytolu, powodują akumulację wakuoli autofagicznych [28].

Formowanie i dojrzewanie wakuoli autofagicznych jest także związane z funkcją cytoszkieletu. Filamenty pośrednie tworzące sieć cytokeratynową w hepatocytach, prawdopodobnie pełnią istotną rolę w tworzeniu autofagosomów. Uszkodzenie sieci mikrofilamentów przez cytochalazynę D powoduje z kolei zmniejszenie liczby autofagosomów w komórkach nabłonkowych nerki [3]. To wskazuje, że różne elementy cytoszkieletu mogą być zaangażowane w formowanie autofagosomów.

Ostatnie badania wskazują, że ścieżka sygnałowa zależna od mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) odgrywa kluczową rolę w kontrolowaniu autofagii indukowanej przez deficyt aminokwasów, ATP oraz sygnały hormonalne [6]. Tworzenie autofago-

2. Autofagia w apoptozie

Formowanie autofagosomów może być związane z apoptozą zależną od $TNF\alpha$, co zostało zaobserwowane w ludzkich komórkach białaczkowych. Zablokowanie tworzenia autofagosomów przez 3-MA hamuje fragmentację DNA oraz lizę komórki. Natomiast inhibicja autofagii na późniejszym etapie nie daje efektu ochronnego, co wskazuje, że sekwestracja materiału cytoplazmatycznego jest konieczna w apoptozie indukowanej przez $TNF\alpha$. Komórki, które przeżywają mimo indukcji apoptozy przez $TNF\alpha$, wykazują obniżoną aktywność autofagiczną, co sugeruje, że redukcja autofagii przedłuża czas życia komórek nowotworowych [3].

Z drugiej strony selektywna sekwestracja mitochondriów w odpowiedzi na czynnik apoptogenny chroni komórki przed uwalnianiem czynników proapoptotycznych (cytochrom c, AIF, Smac/DIABLO, Omi/Htr2). W tym przypadku proces autofagii umożliwia komórkom ucieczkę przed apoptozą. Autofagię uważa się za wczesną i ochronną odpowiedź komórkową na czynniki apoptogenne i kiedy proces ten przestaje być skuteczny proapoptotyczne czynniki pochodzące z mitochondriów mogą aktywować apoptozę [30].

3. Autofagia – programowana śmierć komórki typu II

Autofagia jako programowana śmierć komórki typu II została po raz pierwszy opisana w komórkach ludzkiego raka sutka linii MCF-7 traktowanych tamoksyfenem, w których zaobserwowano powstawanie wakuoli autofagicznych [31]. Antyestrogen, jakim jest tamoksyfen, stymuluje ekspresję bekliny 1, co z kolei indukuje proces autofagii. Ten typ śmierci w komórkach MCF-7 charakteryzuje się redystrybucją cytoszkieletu, przy jednoczesnej ochronie mikrofilamentów i filamentów pośrednich, nawet w komórkach wykazujących fragmentację jądra [32]. Ten typ śmierci występuje także w komórkach, w których zablokowana zostaje aktywność kaspaz lub ekspresja białek z rodziny Bcl-2 ulega modyfikacji. Wykazano, że inhibicja kaspaz nie chroni komórek Jurkat T przed śmiercią indukowaną przez Bax, ponieważ komórki te przełączają się na śmierć drogą autofagii. Obecność Bax na powierzchni mitochondriów może sugerować udział tych organelli w śmierci typu II [3]. Obniżenie aktywności białka Bcl-2 w komórkach HL-60 indukuje autofagię, która nie wynika ze śmierci zależnej od mitochondriów. W tym przypadku proces ten może być zależny od aktywności bekliny 1, która kontroluje autofagię poprzez klasę III kinaz PI3 i oddziałuje z Bcl-2 [33].

Manipulowanie śmiercią autofagolizosomalną może stanowić strategię w walce z nowotworami poprzez aktywację ścieżki sygnałowej zależnej od białek Ras, ponieważ geny *ras* praktycznie nie ulegają mutacjom. Wprowadzenie mutacji w obrębie tych genów indukuje autofagię komórek raka żołądka oraz glioblastoma w drodze niezależnej od kaspaz i nadekspresji Bcl-2 [10]. Apoptoza i autofagia są prawdopodobnie ewolucyjnie powiązanymi ze sobą procesami. Wskazuje na to udział kinaz DAPk i DRP-1 w kontrolowaniu śmierci za pomocą autofagii, jak i regulowaniu procesu „pączkowania” błon komórkowych w czasie apoptozy [34]. Ponadto obydwa te procesy łączą podobne ścieżki aktywacji i inhibicji zależne od kinaz Akt/PKB i mTOR [35].

Autofagia jest procesem, który przebiega znacznie wolniej niż apoptoza. Własne obserwacje i dane literaturowe wskazują, że dominacja jednego bądź drugiego typu śmierci zależy od rodzaju czynnika, który działa na komórki. Apoptoza jest dominującym typem śmierci w komórkach linii MCF-7 po traktowaniu kamptotecyną [36,37], TNF- α lub TRAIL [31]. Natomiast autofagia w tej linii komórkowej dominuje po traktowaniu komórek antyestrogenem – tamoksyfenem [4,38] czy też seskwiterpenowymi analogami taksolu [36].

Programowana śmierć komórki typu I-apoptoza i typu II-autofagia są kontrolowane i regulowane przez odmienne zestawy genów. Do kluczowych genów regulujących apoptozę należy zaliczyć geny z nadrodziny *bcl-2*, kontrolujące uwalnianie mediatorów apoptozy (cytochrom *c*, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, AIF) z mitochondriów. Genami kontrolującymi autofagię są geny z rodziny ATG (*autophagy-related genes*). Wspólnym, funkcjonalnym ogniwem łączącym obydwa typy programowanej śmierci komórki wydaje się być aktywacja enzymów lizosomalnych – katepsyn (ryc. 1b). Ich aktywność jest w apoptozie niezbędna dla aktywacji kaspaz, kalpain oraz białek promotorowych, takich jak: Bax i Bid. W autofagii aktywność katepsyn jest konieczna do degradacji białek w obrębie autofagolizosomów. Hamowanie aktywności katepsyn przez specyficzny inhibitor (E64d) prowadzi do zablokowania apoptozy, natomiast zwiększa ekspresję białka MAP 1 LC3 – biochemicznego wskaźnika autofagii w komórkach raka sutka linii MCF-7 poddawanych oddziaływaniu leku cytostatycznego – kampto-tecyny [39]. Wyniki te wskazują, iż katepsyny lub produkty ich aktywacji np. proapo-ptotyczne białko Bid mogą stanowić molekularny „przełącznik” z apoptozy na autofagię w komórce nowotworowej. Alternatywność autofagii w stosunku do apoptozy w komórkach nowotworowych ma szczególnie duże znaczenie w przypadku mutacji genów promotorowych apoptozy, kiedy autofagia może kompensować deficyt apoptozy. Wykazaliśmy to wyciszając kluczowy gen proapoptotyczny *bid* w komórkach raka sutka linii MCF-7, powodując przez to całkowite zahamowanie aktywności kaspaz wykonawczych (enzymy kluczowe w apoptozie) oraz wzrost ekspresji Bekliny 1 i MAP 1 LC3, białka, charakterystycznego dla błon autofagosomalnych [39]. Rolę białka Bid jako molekularnego przełącznika pomiędzy apoptozą a autofagią komórki nowotworowej przedstawiono na rycinie 2. Na udział Bid w kontroli obydwu ścieżek PCD wskazują pośrednio ostatnie badania Yu i wsp. [40], którzy wykazali, że hamowanie kaspazy 8 (aktywatora Bid) indukuje autofagię poprzez aktywację genów *Atg7* i *bekliny1*. Kolejne własne obserwacje wykazały, iż autofagia jest nie tylko alternatywnym, lecz również komplementarnym w stosunku do apoptozy typem programowanej śmierci komórki, gdyż w tych samych komórkach raka sutka linii MCF-7 stymulowanych do apoptozy kamptotecyną występują charakterystyczne morfologiczne cechy zarówno apoptozy, jak i autofagii. Pomimo że procesy te zachodzą równolegle w komórkach raka sutka pod wpływem kamptotecyny, to wykazują one inną kinetykę. Apoptoza jest procesem szybkim, którego szczyt pojawia się już po 60 min ekspozycji na lek, natomiast autofagia narasta stopniowo przez 24 h w komórkach, które nie uległy apoptozie [39].

Biorąc pod uwagę powyższe spostrzeżenia oraz fakt różnej wrażliwości na apoptozę komórek rakowych, nawet w obrębie tego samego guza, skuteczniejszą może być terapia wykorzystująca kombinację leków cytotoksycznych, indukujących z jednej strony



RYCINA 2. Proapoptyczne białko Bid jako molekularny „przełącznik” pomiędzy ścieżką apoptozy i autofagii w komórce nowotworowej: a) aktywny Bid uruchamia mitochondrialną ścieżkę apoptozy; b) wyciszenie genu *bid* prowadzi do hamowania apoptozy i stymulacji autofagii

apoptozę a z drugiej autofagię, aby „sojusz” tych dwóch różnych typów śmierci przestoczył się w skuteczną walkę z rakiem.

PIŚMIENNICTWO

- [1] CUERVO AM. Autophagy: in sickness and in health. *Trends in Cell Biol* 2004; **14**: 70–77.
- [2] GOZUACIK D, KIMCHI A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 2004; **23**: 2891–2906.
- [3] OGIER-DENIS E, CODOGNO P. Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. *Biochem Biophys Acta* 2003; **1603**: 113–128.
- [4] LOCKSHIN RA, OSBORNE B, ZAKERI Z. Cell death in the third millennium. *Cell Death Differ* 2000; **7**: 2–7.
- [5] MIZUSHIMA N, YAMAMOTO A, MATSUI M, YOSHIMORI T, OSHUMI Y. *In vivo* analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 2003; **15**: 1101–1111.
- [6] MEIJER A, CODOGNO P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; **36**: 2445–2462.
- [7] KIM J, KLIONSKY DJ. Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Ann Rev Biochem* 2000; **69**: 303–342.
- [8] KIM J, HUANG WP, STROMHAUG PE, KLIONSKY DJ. Convergence of multiple autophagy and cytoplasm to vacuole targeting components to a perivacuolar membrane compartment prior to *de novo* vesicle formation. *J Biol Chem* 2002; **277**: 763–773.
- [9] LEMASTERS JJ, QIAN T, HE L, KIM JS, ELMORE SP, CASCIO WE, BRENNER DA. Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy. *Antioxid Redox Signal* 2002; **4**: 769–781.
- [10] KLIONSKY DJ, GREGG JM, DUNN Jr, EMR SD, SAKAI Y, Sandoval IV. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Develop Cell* 2003; **5**: 539–545.
- [11] OHSUMI Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; **2**: 211–216.
- [12] YOSHIMORI T. Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **313**: 453–458.
- [13] DICE JF. Lysosomal pathways of protein degradation. *Landes Bioscience* 2000; vol.11.
- [14] XUE L, FLETCHER GC, TOLKOVSKY AM. Mitochondria are selectively eliminated from eukaryotic cells after blockade of caspases during apoptosis. *Curr Biol* 2001; **11**: 361–365.
- [15] KUMA A, MIZUSHIMA N, ISHIIHARA N, OHSUMI Y. Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *J Biol Chem* 2002; **277**: 18619–18625.
- [16] ICHIMURA Y, KIRISAKO T, TAKAO T, SATOMI Y, SHIMONISHI Y, ISHIIHARA N, MIZUSHIMA N, TANIDA I, KOMINAMI E, OHSUMI M, NODA T, OHSUMI Y. An ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* 2000; **408**: 488–492.
- [17] KABEYA Y, MIZUSHIMA N, UENO T, YAMAMOTO A, KIRISAKO T, NODA T, KOMINAMI E, OHSUMI Y, YOSHIMORI T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J* 2000; **19**: 5720–5728.
- [18] NARA A, MIZUSHIMA N, YAMAMOTO A, KABEYA Y, OSHUMI Y, YOSHIMORI T, SKDI AAA. ATPase-dependent endosomal transport is involved in autolysosome formation. *Cell Struct and Function* 2002; **27**: 539–564.
- [19] ASANUMA K, TANIDA I, SHIRATO I, UENO T, TAKAHARA H, NISHITANI T. MAP1 LC3, a promising autophagosomal marker, is processed during differentiation and recovery of podocytes from PAN nephrosis. *FASEB J* 2003; **17**: 1165–1167.
- [20] MIZUSHIMA N. Methods for monitoring autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; **36**: 2491–2502.
- [21] HE H, DANG Y, DAI F, GUO Z, WU J, SHE X, PEI Y, CHEN Y, LING W, WU C, ZHAO S, LIU JO, YU L. Post-translational modifications of three members of the human MAP1LC3 family and detection of a novel type of modification for MAP1LC3B. *J Biol Chem* 2003; **278**: 29278–29287.
- [22] LUZIO JP, ROUS BA, BRIGHT NA, PRYOR PR, MULLOCK BM, PIPER RC. Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *J Cell Sci* 2000; **113**: 1515–1524.

- [23] KATSO R, OKKENHAUG K, AHMADI K, WHITE S, TIMMS J, WATERFIELD MD. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; **17**: 615–675.
- [24] KIHARA A, KABEYA Y, OHSUMI Y, YOSHIMORI T. Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep* 2001; **2**: 330–335.
- [25] LIANG XH, JACKSON S, SEAMAN M, BROWN K, KEMPKES B, HIBSHOOSH H, LEVINE B. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 1999; **402**: 672–676.
- [26] ARICO S, PETIOT A, BAUVY C, DUBBELHUIS PF, MEIJER AJ, CODOGNO P, OGIER-DENIS E. The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Biol Chem* 2001; **276**: 35243–35246.
- [27] BLONDEAU F, LAPORTE J, BODIN S, SUPERTI-FURGA G, PAYRASTRE B, MANDEL JL. Myotubularin, a phosphatase deficient in myotubular myopathy, acts on phosphatidylinositol 3-kinase and phosphatidylinositol 3-phosphate pathway. *Hum Mol Genet* 2000; **9**: 2223–2229.
- [28] WALKER DM, URBE S, DOVE SK, TENZA D, RAPOSO G, CLAGUE MJ. Characterization of MTMR3, an inositol lipid 3-phosphatase with novel substrate specificity. *Curr Biol* 2001; **11**: 1600–1605.
- [29] PAGLIN S, HOLLISTER T, DELOHERY T, HACKETT N, MCMAHILL M, SPHICAS E, DOMINGO D, YAHALOM J. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res* 2001; **61**: 439–444.
- [30] TAKANO-OHMURO H, MUKAIDA M, KOMINAMI E, MORIOKA K. Autophagy in embryonic erythroid cells: its role in maturation. *Eur J Cell Biol* 2000; **79**: 759–764.
- [31] KLIONSKY DJ. Autophagy. Gorgetown, 2004; TX: Landes Bioscience.
- [32] BURSCH W, HOCHEGGER K, TOROK L, MARIAN B, ELLINGER A, HERMANN RS. Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments. *J Cell Sci* 2000; **113**: 1189–1198.
- [33] SAEKI K, YUO A, OKUMA E, YAZAKI Y, SUSIN SA, KROEMER G, TAKAKU F. Bcl-2 down-regulation causes autophagy in a caspase-independent manner in human leukemic HL60 cells. *Cell Death Differ* 2000; **7**: 1263–1269.
- [34] INBAL B, BIALIK S, SABANAY I, SHANI G, KIMCHI A. DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death. *J Cell Biol* 2002; **157**: 455–468.
- [35] CASTEDO M, FERRI KF, KROEMER G. Mammalian target of rapamycin (mTOR): pro- and anti-apoptotic. *Cell Death Differ* 2002; **9**: 99–100.
- [36] GÓRKA M, GODLEWSKI MM, GAJKOWSKA B, WOJEWÓDZKA U, MOTYL T. Kinetics of Smac/DIABLO release from mitochondria during apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. *Cell Biol. Int* 2004 paper in press.
- [37] MOTYL T, GAJKOWSKA B, GÓRKA M, GODLEWSKI MM, LAMPARSKA-PRZYBYSZ M. Kinytyka oraz regulacja uwalniania Smac/DIABLO z mitochondriów komórek nowotworowych pod wpływem stymulacji apoptogennej. *Post Biol Kom* 2004; **31**: 219–233.
- [38] GOMPEL A, SOMAI S, CHAOUAT M, KAZEM A, KLOOSTERBOER HJ, BEUSMAN I, FORGEZ P, MIMOUN M, ROSTENE W. Hormonal regulation of apoptosis in breast cells and tissues. *Steroids* 2000 **65**: 593–598.
- [39] LAMPARSKA-PRZYBYSZ M, GAJKOWSKA B, MOTYL T. Cathepsins and BID are involved in molecular switch between apoptosis and autophagy in breast cancer MCF-7 cells exposed to camptothecin. *Cell Death Differ* 2004; paper in press
- [40] YU L, ALVA A, SU H, DUTT P, FREUNDT E, WELSH S, BAEHRECKE EH, LENARDO MJ. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science* 2004; **304**: 1500–1502.

Redaktor prowadzący – M. Zabel

Otrzymano: 24.11. 2004 r.

Przyjęto: 02.12.2004 r.

Adres autora: ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

ROLA BIAŁEK STAT W CHOROBAH ZAPALNYCH I KARCYNOGENEZIE JELITA GRUBEGO

ROLE OF STAT PROTEINS IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASES AND COLON CARCINOGENESIS

Andrzej WINCEWICZ, Mariola SULKOWSKA, Mariusz KODA,
Bogusław MUSIATOWICZ, Stanisław SULKOWSKI

Zakład Patomorfologii Ogólnej, Akademia Medyczna w Białymstoku

Streszczenie: Mediatorzy STAT stanowią rodzinę siedmiu białek, które odgrywają kluczową rolę w przekazywaniu sygnałów wewnątrz komórek. Kontrolują one główne procesy zachodzące w komórkach, związane z ich różnicowaniem się, proliferacją i śmiercią. W artykule opisano budowę i funkcję białek STAT oraz ich udział w patologii układu pokarmowego, a w szczególności w procesach zapalnych i karcynogenezie w obrębie jelita grubego. W stanach zapalnych jelit dominującą rolę wydają się odgrywać białka STAT1, STAT3 i STAT4. W przebiegu raka jelita grubego szczególną rolę odgrywają białka STAT1 i STAT3. Stwierdzono że STAT1 blokuje proliferację w liniach komórkowych raka, a zwiększona ekspresja STAT3 koreluje z wyższym stopniem zaawansowania klinicznego i zajęciem węzłów chłonnych. Przedstawione w pracy sugestie, że białka STAT mogą spełniać w raku jelita grubego analogiczne funkcje do tych, jakie opisano w innych nowotworach, powinny być poddane weryfikacji w przyszłych badaniach. Zablockowanie funkcji białek STAT otwiera nowe perspektywy terapii przeciwnowotworowej. Zestawienie dotychczasowych osiągnięć i odkryć dowodzi, że białka STAT mogą współdziałać z innymi czynnikami w rozwoju raka jelita grubego. Jakkolwiek dokładna charakterystyka tych reakcji jest kwestią przyszłości.

Słowa kluczowe: STAT, choroby zapalne jelit, karcynogeneza.

Summary: STAT mediators comprise a family of seven proteins, that play a key role in intracellular signaling. They are involved in cell differentiation, proliferation and cell death. This article presents a description of STAT proteins with a focus on their probable role in pathology of alimentary system, particularly inflammatory bowel disease and colon carcinogenesis. In inflammatory bowel disease action of STAT3, STAT1, STAT 4 predominates. STAT1 and STAT3 play remarkable roles in colon carcinoma. It was discovered that STAT1 blocks cell proliferation in cell lines of colorectal cancer. An increased expression of STAT3 correlates with clinical staging and nodal involvement. In other malignancies there are described actions of STATs, that analogously might occur in colorectal carcinoma, but that sort of suggestions should be verified in the future studies of this neoplasm. By means of inhibition of STATs proteins, new possibilities of anticancer therapy emerge. This review shows that STAT can interact with other factors in development of colorectal cancer. However, a precise definition of these reactions belongs to the future.

Key words: STAT proteins, inflammatory bowel diseases, carcinogenesis.

Wykaz stosowanych skrótów: **ASON** (ang. *Antisense Oligonucleotides*) – antysensowne oligonukleotydy; **Ba/F3** (*murine pro-B cell-derived cell line*) – linia mysich komórek różnicujących się w kierunku limfocytów B; **Bcl-2** (*B-cell leukemia/lymphoma-2*) – gen *Bcl-2*; **Bcl-xl** (*B-cell leukemia/lymphoma-xl*) – białko Bcl-xl; **BL41, BL30** (*Burkitt's Lymphoma*) – linie komórkowe chłoniaka Burkitta; **BCR/ABL** (*Break Point Cluster Region/Abelson*) – gen fuzyjny BCR i ABL, którego białkowy produkt warunkuje konstytutywną aktywność kinazy tyrozynowej białka ABL; **C3** (*Complement 3*) – składowa dopełniacza C3; **cdk** (*cyclin dependent kinases*) – kinazy zależne od cyklin; **EGFR** (*Epidermal Growth Factor Receptor*) – receptor dla nabłonkowego czynnika wzrostu; **ERK1,2** (*Extracellular Regulated Kinase-1 vel Extracellular signal-Regulated Kinase*) – zewnątrzkomórkowo regulowana kinaza; **G-CSF** (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*) – czynnik wzrostu granulocytów; **GM-CSF** (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*) – czynnik wzrostu granulocytów i makrofagów; **H7-SK** (*H-7-Sensitive Kinase*) – kinaza wrażliwa na H7; **HGF** (*Hepatocyte Growth Factor*) – wątrobowokomórkowy czynnik wzrostu; **ICAM-1** (*Intercellular Adhesion Molecule*) – międzykomórkowa cząstka adhezyjna typu 1; **IL-4-R** (*Interleukin-4 Receptor*) – receptor dla interleukiny 4; **IRF-1** (*Interferon Regulatory Factor 1*) – czynnik regulujący interferon typu 1; **IRF 9** (*Interferon Regulatory Factor 9, formerly called p48*) – czynnik regulujący interferon typu 9 wcześniej określany jako białko p48; **IRS** (*Insulin Receptor Substrate*) – substrat receptora insuliny; **JAB proteins** (*JAK Binding proteins*) – białka wiążące kinazy JAK; **JAK** (*Janus Kinases*) – kinazy typu Janus; **JAK-P** – fosforylowana forma kinazy JAK, **JNK** (*c-Jun N-terminal/stress-activated protein Kinase*) – kinaza Jun, **LPS** (*Lipopolysaccharide*) – liposacharyd, **MAPK** (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) – kinazy aktywowane przez miogeny; **Mcl-1** (*Myeloid cell leukemia differentiation protein-1*) – białko różnicowania komórkowego białaczki szpikowej, **NF-kappaB** (*Nuclear Factor-kappaB*) – czynnik jądrowy kappa B; **NIH 3T3** – nazwa linii komórkowej fibroblastów; **p21** (*protein 21*) – białko 21aktywujące szlak kinaz MAP; **p21WAF1/CIP1** – inhibitor cykliny D1 i białka p21; **p53** (*protein 53*) – białko 53; **PDGFR** (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor*) – receptor dla płytkowego czynnika wzrostu; **PIAS** (*Protein that Inhibit Activated STAT*) – białka, które blokują aktywne STAT; **pim-1** – gen kodujący jedną z kinaz serynowo-treoninowych; **PTP** (*Protein Tyrosine Phosphatase*) – białkowa fosfataza tyrozynowa; **SH2** (*Src Homogy 2domain*) – domena homologiczna do domeny aktywnej białek Src; **SOCS** (*Suppressor Of Cytokine Signaling*) – supresor sygnalowania cytokinowego; **Src** (*Rous sarcoma oncogene*) – onkogen mięsaka Rousa; **v-Src** (*viral Src*) – onkogen wirusa RSV (*Rous Sarcoma Virus*); **c-Src** (*cellular Src*) – ludzki homolog wirusowego onkogeny mięsaka Rousa v-Src, wysoce aktywny w raku jelita grubego; **STAT** (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) – przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji; **StIP1** (*Stress-Induced-Phosphoprotein 1, formerly called Hsp70/Hsp90-organizing protein*) – fosfoproteina 1 indukowana stresem inaczej białko organizujące białka szoku termicznego 70 i 90; **T-bet** – czynnik transkrypcyjny T-box, specyficzny dla limfocytów Th1; **TNF α** (*Tumour Necrosis Factor α*) – czynnik nekrotyzujący guza alfa; **Tyk2** – nazwa jednej z kinaz typu Janus; **VEGF** (*Vascular Endothelial Growth Factor*) – naczyniowy śródbłonkowy czynnik wzrostu.

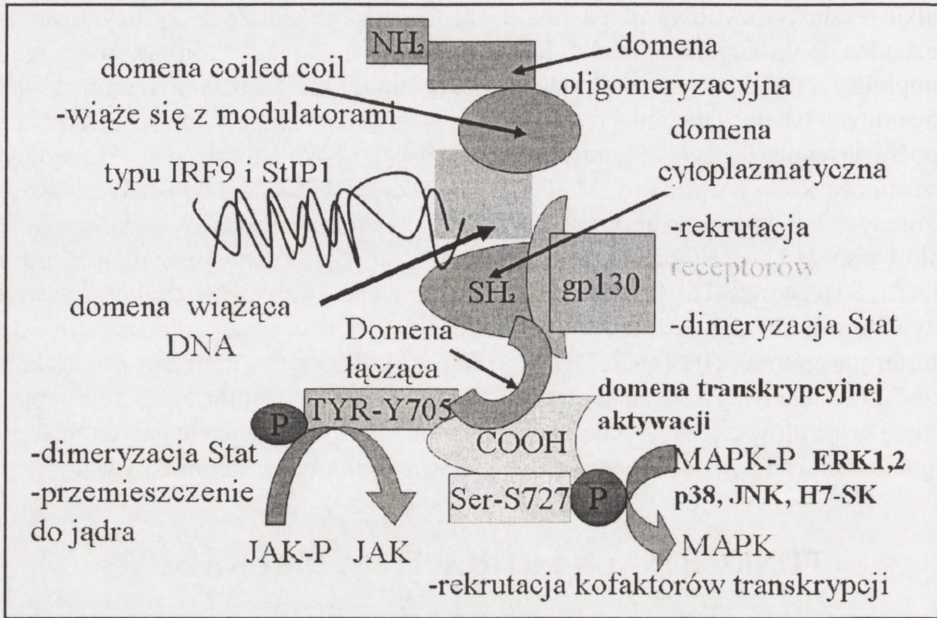
WPROWADZENIE

Białka STAT stanowią ważne ogniwo przekaźnictwa wewnątrzkomórkowego. Nazwa (ang. *signal transducer and activator of transcription*) określa funkcje tych białek jako przekaźników sygnalowania i aktywatorów transkrypcji DNA w jądrze komórkowym. Dotychczas opisano siedmiu przedstawicieli białek STAT (STAT1, STAT2, STAT3, STAT5a i 5b, STAT6) [50]. Ich nieaktywne formy występują w cytoplazmie w postaci monomerów. Po stymulacji receptora błonowego dochodzi do aktywacji białek STAT przez kinazy typu Janus (JAK) lub przez sam pobudzony receptor, jeśli wykazuje on aktywność kinazy tyrozynowej. W strukturze omawianego

białka reszta tyrozynowa ulega fosforylacji. Fosforylacja reszty tyrozynowej jest niezbędna do dimeryzacji białek STAT i ich wędrówki do jądra komórkowego, gdzie kompleksy STAT łączą się z odpowiednimi promotorami i uruchamiają transkrypcję określonych genów. Dochodzi również do fosforylacji reszty serynowej. Ta aktywacja umożliwia regulację czynności transkrypcyjnej w jądrze. W fosforylacji reszty serynowej uczestniczą kinazy z rodziny MAP [23]. Białka STAT wykazują ścisły związek z różnicowaniem komórek, apoptozą i przekazywaniem za pomocą czynników wzrostu. Calo i wsp. [12] dzielą białka STAT na dwie grupy. Do pierwszej z nich zaliczono STAT2, STAT4, STAT6. Tę grupę wyróżnia niewielka liczba zewnątrzkomórkowych aktywatorów, udział w różnicowaniu limfocytów T oraz w przekazywaniu z udziałem interferonu gamma (IFN- γ). STAT1, STAT3, STAT5 tworzą odrębną grupę, której przedstawiciele wpływają na kontrolę cyklu komórkowego, embriogenezę, apoptozę, rozwój gruczołów tarczycy, piersi i grasicy. Ponadto spełniają wiele innych funkcji w sygnalowaniu za pomocą szerszej gamy cytokin, hormonów i czynników wzrostu.

FUNKCJONALNA STRUKTURA BIAŁKA STAT

Począwszy od końca aminowego białka STAT wyróżniamy w nim domenę oligomeryzacyjną, która umożliwia tetrameryzację białek STAT [7, 50]. Kolejną domeną w kierunku do końca karboksylowego jest domena *coiled coil* [12]. Jej funkcja polega na przyłączaniu modulatorów typu IRF9 i StIP1. Sąsiaduje z nią domena wiążąca DNA, która łączy się z jądrowym DNA. Następną domenę SH2 nazwano cytoplazmatyczną ze względu na funkcje, jakie pełni w cytozolu. Za jej pomocą białko STAT kontaktuje się z błonowymi receptorami. Ta domena zawiera też miejsca przyczepu dla innych części białek z tej samej rodziny, odpowiadając za tworzenie dimerów STAT po uprzedniej fosforylacji [12, 50]. Następnie w strukturze białka występuje domena łącząca. Przy końcu karboksylowym znajduje się domena aktywacji transkrypcyjnej oraz dwa aminokwasy w łańcuchu polipetydowym cząsteczki STAT, które ulegają fosforylacji. Tyrozyna w pozycji Tyr 701 w STAT1, Tyr 690 w STAT2, Tyr 705 w STAT3, Tyr 693 w STAT4, Tyr 694 w STAT5 oraz Tyr 641 w STAT6 zostaje ufosforylowana, co jest równoznaczne z aktywacją przekazywającą i transkrypcyjną białka STAT [12]. Ta fosforylacja jest niezbędna do dimeryzacji białek STAT i ich wędrówki do jądra komórkowego [7, 12]. W procesie przyłączania reszt fosforanowych biorą udział kinazy typu Janus: JAK1-3 i TYK2. W przeciwieństwie do tego typowego sygnalowania przez cytokiny, receptory z wewnętrzną aktywnością kinazy tyrozynowej, np. aktywne receptory dla czynnika wzrostu, takie jak: EGFR i PDGFR, mogą pomijać etap aktywacji białek JAK i bezpośrednio fosforylować białko STAT [7, 48]. Przy końcu karboksylowym białka STAT dochodzi również do fosforylacji reszty serynowej z tym, że nie występuje ona w przypadku białek STAT2 i STAT6 [12]. W fosforylacji serynowej białka STAT uczestniczą kinazy z rodziny MAP (ERK1, ERK2, P38, JNK, H7-SK) [25]. Aktywna fosfoseryna, która należy do domeny aktywacji transkrypcyjnej, rekrutuje kofaktory transkrypcji.



RYCINA 1. Budowa białka STAT

ROLA STAT W ZAPALENIACH

W zapalnych chorobach jelita (*colitis ulcerosa*, *ileitis terminalis* – choroba Crohna) odgrywają rolę szlaki IFN- γ /STAT-1/T-bet, IL-12/STAT-4 i IL-6/STAT3, które mogą stać się celem terapii tego rodzaju schorzeń [33]. W przebiegu zapalenia dochodzi do aktywacji komórek odpornościowych i ich rozrostu. Efekty działania białek STAT na procesy proliferacji mogą być odmienne i przeciwne w różnych typach komórek immunokompetentnych. Udział STAT3 w procesach zapalnych jest najszerzej opisany w porównaniu z innymi przedstawicielami rodziny białek STAT. STAT3 pobudza rozrost limfocytów B w drodze aktywacji antyapoptycznego genu *bcl-2*, natomiast w monocytach odpowiada za przeciwstawne działanie w postaci obniżenia ekspresji *C-myc* i *C-mycb* oraz rekrutacji *JunB* i *IRF-1*, co prowadzi do różnicowania monocytów i zahamowania podziałów tych komórek [18]. STAT3 jest także niezbędna do zahamowania produkcji TNF α w odpowiedzi na LPS po zadziałaniu IL-10 [45]. Stwierdzono, że myszy z ekspresją niefunkcyjnych białek STAT3 były podatne na wstrząs endotoksyczny i wykazywały wzmogoną produkcję prozapalnych cytokin, takich jak: TNF- α , IL-1 i IFN- γ [2]. Produkcja tych związków przez makrofagi wykazujące niedobór STAT3 zwielokrotnia się pod wpływem liposacharydów LPS. Białko STAT3 wywiera zróżnicowany pod względem natężenia wpływ na indukcję białek ostrej fazy w wątrobie [4]. We wcześniejszych pracach wykazano, że STAT3 pod wpływem IL-6 lub przy jednoczesnej ekspozycji na IL-6 i IL-1, wzbudza syntezę białka C-reaktywnego CRP [39]. IL-6, silna, prozapalna cytokina, aktywuje białko STAT3.

Receptory dla IL-6 występują w nabłonku jelitowym w spolaryzowanym ułożeniu. Podstawnoboczne receptory i w mniejszym stopniu szczytowe receptory błonowe dla IL-6 pobudzają centralny mediator zapalenia jelitowego NF-kappaB. IL-6 wyzwała spolaryzowaną ekspresję ICAM-1, ważnej cząsteczki adhezyjnej z racji wzajemnych oddziaływań między neutrofilami i nabłonkiem w przebiegu *ileitis terminalis*. Indukcja ICAM-1 przez IL-6 wymaga aktywacji NF-κB. Śluzówkowe limfocyty T u pacjentów z chorobą Crohna wykazują aktywację STAT3 i produkcję białek Bcl-2 i Bcl-lx [55]. Przypuszcza się, że STAT3 odgrywa kluczową rolę w patogenezie zapalnych chorób jelit, co potwierdzają obserwacje przeprowadzone na myszach pozbawionych białka STAT3, u których wraz z wiekiem rozwija się przewlekłe *enterocolitis* [2].

W chorobie Crohna stwierdza się stałą ekspresję STAT4 i supresora białka STAT SOCS, przy braku obecności tych białek w komórkach zdrowych ochotników [26]. IL-12 (induktor STAT4) hamuje apoptozę limfocytów T w nacieku zapalnym przez znoszenie aktywności kaspazy typu 3, ale nie wiadomo, czy STAT4 pośredniczy w tym procesie [42]. Przeciwciała przeciw IL-12 poważnie ograniczyły odczyn zapalny w chorobie Crohna, który zależy od odpowiedzi ze strony limfocytów pomocniczych Th1 [49]. W miejscu tym należy przypomnieć, że STAT4 odgrywa rolę w patogenezie chorób autoimmunologicznych przez modulację odpowiedzi Th1 komórkowych [2]. Zahamowanie szlaku STAT4 JAK przez lowastatynę, doprowadziło do spowolnienia różnicowania się limfocytów T0 do Th1, co z kolei wpłynęło na obniżenie produkcji IFN-γ i TNF-α z następczym wzrostem poziomów cytokin (IL-4, IL-5 i IL-11) produkowanych przez limfocyty pomocnicze Th2. Statyny (inhibitory hydroksymetylo-glutarylo-koenzymu A – HMG-CoA) zahamowały rozwój stwardnienia rozsianego u myszy (*sclerosis multiplex* – SM) [35]. Wobec tego pojawia się pytanie, czy statyny mogą mieć wpływ na ograniczanie stanu zapalnego w chorobie Crohna.

Białko STAT1 warunkuje odporność antywirusową i antybakteryjną, a myszy ze znokautowanym genem STAT1 (STAT1 KO) ujawniają wybiórcze defekty sygnalowania w odpowiedzi na interferony zarówno typu I, jak i II. Przejawia się to zwiększoną podatnością na infekcje [2]. Równowaga między pro- i przeciwzapalnymi cytokinami pochodzenia limfocytarnego reguluje także zapoczątkowanie, jak i progresję zapalnych chorób jelit. We wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego i chorobie Crohna czynny udział biorą TNF-α, interleukina 6 i IFN-γ. W monocytach i neutrofilach błony śluzowej okrężnicy w nadmiarze występuje NFκB oraz fosforylowane białko STAT1, którego poziom spada po podaniu glikokortykosteroidów [2, 47]. W szczególności równowaga między IFN-γ i IL-4 oraz TGF-β reguluje przebieg choroby Crohna. TGF-β blokuje ekspresję T-bet swoistego dla limfocytów Th1 czynnika transkrypcyjnego rodziny T box. O jego kluczowej roli w tym schorzeniu świadczy to, że wprowadzenie genu *t-bet* za pomocą retrowirusa do komórek CD62L- i CD4-dodatnich zaostrzyło proces zapalny w przebiegu *ileitis terminalis*. Natomiast u myszy z niedoborem T-bet nie można było eksperymentalnie wywołać choroby Crohna, u której podstaw leży aktywacja limfocytów Th1 z nadmierną ekspresją białka T-bet. Rozwój komórek Th-1 wiąże się z przekazywaniem bodźców przez IFN-γ poprzez STAT1 i interleukinę 12 w drodze aktywacji STAT4. Ekspresja białka T-bet zależy od IFN-γ i aktywacji STAT1 [1, 33].

Mazarella i wsp. [29] wykazali, że ilość STAT1 zwiększa się w enteropatiach glutenezależnych. Blokada STAT1 zapobiegła wywołaniu gliadyno-zależnej ekspresji cząsteczek adhezyjnych ICAM-1 i B7-2, co sugeruje, że nieprzerwana aktywacja STAT może przyczynić się do powstawania i rozszerzania się miejscowego stanu zapalnego w przebiegu glutenezależnej enteropatii [29].

Białko STAT6 ulega aktywacji w przebiegu różnych procesów zapalnych. W jelitowej puli limfocytów IL-4 indukuje fosforylację JAK1, JAK2, JAK 3 i TYK z następczą aktywacją STAT6 i zwiększeniem przepuszczalności błony podstawnej nabłonka jelitowego [28, 33]. Zatem i ten przekaźnik sygnałowania uczestniczy w rozwoju odczynu zapalnego w jelicie. Brak STAT6 owocuje gwałtownym spadkiem liczby limfocytów Th2 produkujących IL-4 oraz w zastępstwie promuje odpowiedź ze strony limfocytów Th1 [33]. Białko STAT2 w limfocytach B dimeryzuje z białkiem STAT6 w odpowiedzi na IFN- α [17]. STAT2 pośredniczy w aktywacji białka STAT6 przez receptor dla IFN- α , a uszkodzenie białka STAT2 podobnie jak STAT1 uniemożliwia odpowiedź komórek na interferony typu I u zwierząt [2, 17].

ROLA BIAŁEK STAT W ONKOGENEZIE

Z całej rodziny białek STAT, STAT5 i STAT3 są głównymi białkami, które biorą udział w nowotworowych procesach rozrostowych. Białko STAT5 aktywują (poprzez JAK2) IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, GH, GM-CSF, erytropoetyna, trombopoetyna, prolaktyna. Głównym genem docelowym białka STAT5 jest onkostatyna M, regulator produkcji G-CSF i GM-CSF, której nadmiar u myszy odpowiada za choroby rozrostowe krwi. Ponadto STAT5 indukuje ekspresję Bcl-x, warunkując przeżycie komórek i blokadę apoptozy [50]. W hodowlach komórek prekursorowych erytrocytów STAT5 wywołuje transformację nowotworową (erytroleukemię) po stymulacji przez zmutowane receptory dla erytropoetyny [22]. W linii komórek, różnicujących się w kierunku limfocytów B, Ba/F3 dochodzi do stałej aktywacji STAT5 z następczą proliferacją przez ekspresję pim-1 [38]. Natomiast gdy IL-3 pobudza te komórki, dochodzi do hiperfosforylacji STAT5 i uruchamiają się procesy przeciwstawne do rozrostu, w trakcie których działa białko p21 WAF1/CIP1 i zachodzi apoptoza pod działaniem białek JAB [38]. STAT5a warunkuje tworzenie światła pęcherzyków gruczołowych przez indukcję kotransportera Na-Pi Npt2b i koneksyny 32 w gruczole piersiowym [31]. Eliminacja STAT5a owocuje brakiem jamek w nabłonku gruczołowym, w których przejściowo gromadzi się wydzielina tego nabłonka przy zachowaniu drożności przewodów wyprowadzających [31]. Nie jest natomiast poznany udział tego białka w zapewnieniu właściwej architektoniki krypt jelitowych. Wobec tego interesujące wydaje się pytanie, czy zwłaszcza w przebiegu nisko zróżnicowanych raków jelita grubego, w których nie obserwuje się tworzenia struktur gruczołowych, może dochodzić do zaburzenia ekspresji STAT5a. W przebiegu każdego nowotworu również raka jelita grubego niezwykle istotna jest prawidłowa funkcja limfocytów NK, które spontanicznie zabijają złośliwe komórki. STAT5b uczestniczy w proliferacji, różnicowaniu oraz zawiaduje cytolityczną zdolnością komórek NK zarówno w wymiarze podstawowym, jak i po indukcji przez IL-2 i IL-15 [21].

W trakcie badań nad udziałem STAT3 w onkogenezie zwrócono szczególną uwagę na jego konstytutywną aktywację w komórce podczas transformacji v-Src oraz na indukcję przez STAT3 genów, takich jak: bcl-2, bcl-x, mcl-1, cyclin D1, myc, VEGF, które warunkują przeżycie komórek [55, 9, 43]. Białko STAT3 podlega aktywacji w komórkach z odblokowaną ekspresją onkogenów src, eyk, ret, lck, G_αo, Npm-alk, co w efekcie przejawia się transformacją nowotworową i powstawaniem raka piersi, głowy i szyi, gruczołu krokowego, tarczycy oraz czerniaka i szpiczaka [10]. Te nowotwory zawierają stale aktywowane STAT3 i ich rozwój zależy od obecności tego białka. Gdy białko STAT3 bez sprawnych domen wbudowane jest w złośliwy klon komórkowy, spowalniają się procesy metaboliczne. Ponadto wiele przemian wewnątrzkomórkowych nie zachodzi wcale, a komórka nowotworowa ulega apoptozie [2]. Pomimo braku białka STAT3 normalne, dzielące się komórki z jego niedoborem (limfocyty T, komórki nabłonkowe naskórka i sutka, makrofagi, fibroblasty) zachowują swoją żywotność [3].

Neuregulina-1 (NRG-1) jest mitogenem, który zlokalizowano w nabłonku płucnym i odpowiada przypuszczalnie za autokrynną regulację wzrostu komórek nabłonkowych i ich różnicowania. Wspomniany czynnik wzrostu potęguje proliferację i warunkuje przeżycie komórek nabłonka płucnego w drodze aktywacji JAK3, TYK2, STAT3 i STAT5 przez swój receptor o wysokim powinowactwie (heterodimer HER2/HER3), który należy do rodziny receptorów dla substancji EGF-podobnych [25]. Białka HER2 i HER3 zawierają w swojej strukturze wewnątrzkomórkową domenę kinazy tyrozynowej (TK), która współdziała z kinazami typu Janus. Białka HER występują w rakach płuca. Warto podkreślić, że w płucu człowieka przekazywanie sygnałów, indukujących rozrost komórkowy, objawia się głównie tworzeniem heterodimerów HER2/HER3 [25]. Podobnie w raku jelita grubego wykryto stale fosforylowane kompleksy białkowe HER2/HER3, które gęsto występują w błonach złośliwych komórek nowotworowych [24, 53]. Dotychczas nie potwierdzono, czy białka z grupy neuregulin działają na procesy rozrostowe jelita grubego w analogiczny sposób, w jaki oddziałują na nabłonek płucny.

Procesy regeneracyjne polegają na rozroście komórek odnawianej tkanki. Dochodzi wówczas do zwiększenia puli dzielących się komórek danego narządu, który ulega odbudowie. Analizowano, czy podobne białka uczestniczą zarówno w rozroście nowotworowym, jak i w proliferacji związanej z odnową tkanek po ich częściowym zniszczeniu. Po odkryciu roli STAT3 w regeneracji wątroby [15], w doświadczalnie wywołanym raku wątrobowo-komórkowym stwierdzono stałą aktywację białka STAT3 i cytokiny A oraz podniesiony poziom TGF α , co sugerowałoby związek między tymi białkami [46]. Zauważono także, że intensywnie przeobrażone otoczenie guza wątrobowego zawiera więcej STAT3 niż sam nowotwór. Podanie deksametazonu zahamowało ekspresję białka STAT3 i w konsekwencji proliferację nowotworowych hepatocytów, przy czym nie wpłynęło na poziom TGF α [46]. Ponadto stwierdzono, że po stymulacji przez HGF, STAT3 wpływa na architektonikę nabłonka przez udział w tubulogenezie cytoszkieletu komórkowego [8]. Spośród wszystkich warstw naskórka największą ekspresję białka STAT3 wykazują komórki podstawne naskórka, co może wskazywać na rolę STAT3 w ich rozroście lub zahamowaniu różnicowania płaskonabłonkowego w komórkach bazalnych [14]. STAT3 uczestniczy w oddziaływaniach między naskórkiem a skórą właściwą w procesach regeneracyjnych, podczas gdy

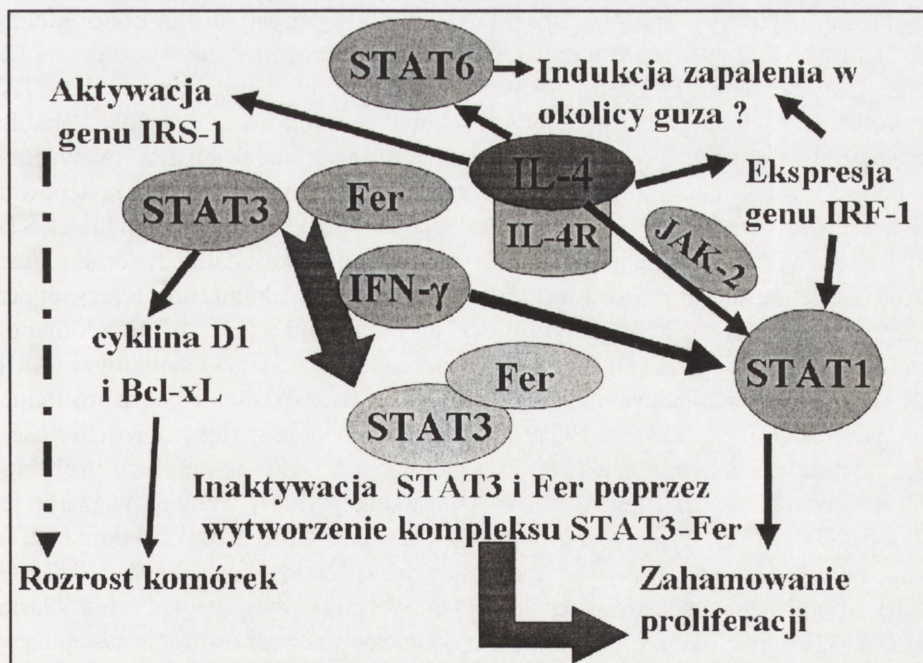
inaktywacja STAT3 upośledza gojenie się ran i migrację komórek nabłonka płaskiego [2]. Prawidłowa struktura cytoszkieletu komórki prawdopodobnie warunkuje migrację komórek nabłonka płaskiego do ubytków naskórka. Nie wiadomo, czy białko STAT3 uczestniczy w podobnych procesach reperacyjnych w jelicie grubym. Nie ustalono również, czy aktywność STAT3 jest potrzebna do przemieszczania się komórek raka okrężnicy w trakcie naciekania podścieliska, naczyń, nerwów i okolicznych tkanek. W raku okrężnicy STAT3 i produkty jego genów docelowych włącznie z cykliną D1 i bcl-xl występowały częściej w guzie niż okolicznej śluzówce [27]. Nadmierna ekspresja STAT3 korelowała z wyższym stopniem zaawansowania klinicznego i wzrostem produkcji cykliny D1 w komórkach raka okrężnicy. Na tej podstawie uznano, że jednym ze wskaźników złośliwości może być podwyższona ekspresja STAT3 i genów docelowych dla jego działania w gruczolakoraku jelita grubego [27]. Złą ze względu na rokowanie funkcję STAT3, która polega na stymulacji rozrostu komórkowego, potwierdzają badania interakcji tego białka z kinazą typu Fer po zadziałaniu IFN- γ na komórki HT-29. IFN- γ odpowiadał za spadek aktywności kinazy Fer następujący po przejściowym nasileniu działania tego enzymu w gruczolakoraku okrężnicy. To enzymatyczne białko promuje rozrost linii komórkowych nowotworów złośliwych. Wzrost i spadek aktywności Fer współistniał z aktywacją i inaktywacją STAT3. IFN- γ powodował powstawanie kompleksów STAT3 i Fer, których trwałość była największa przy jednoczesnym spadku aktywności tych białek. Wskutek wytworzenia nieaktywnego kompleksu STAT3 i Fer dochodziło do zwolnienia cyklu komórkowego i wzrostu liczby komórek zatrzymanych w fazie G1 cyklu komórkowego [40].

STAT3 pośrednio przez onkostatynę M aktywuje transkrypcję VEGF [43]. Warunkuje powstawanie nowych naczyń krwionośnych i wspomaga wzrost guzów szyjki macicy po pobudzeniu przez IL-6 [56]. Należałoby się spodziewać podobnego wpływu białka STAT3 na angiogenezę w przebiegu gruczolakoraka okrężnicy. Jednak brak jest opracowań dotyczących tego zagadnienia. Wyniki przedstawionych badań świadczą o częstej aktywacji białka STAT3 w onkogenezie nabłonkowych guzów złośliwych. Pytanie, czy istnieją jakieś swoiste mechanizmy towarzyszące jego funkcji transkrypcyjnej w poszczególnych typach nowotworów, pozostaje nadal otwarte.

Wzrost guzów pierwotnych i przerzutów jest spowolniony w komórkach bez STAT6 [41]. Proces ten zachodzi przede wszystkim w drodze modulacji immunologicznej. STAT6 działa w komórce pod wpływem IL-4 i pełni wielorakie funkcje w regulacji systemu odpornościowego. Trzeba jednocześnie podkreślić, że STAT 6 bierze udział w powstawaniu odczynów zapalnych w każdym stanie związanym z wzmożonym działaniem IL-4. W liniach komórkowych gruczolakoraka okrężnicy (HT-29 i WiDr) IL-4 pobudzała JAK1, JAK2, Tyk2, ale w przeciwieństwie do komórek odpornościowych nie powodowała aktywacji JAK3 [7, 13]. W badaniu *in vitro* IL-4 hamowała wzrost komórek w linii komórkowej raka okrężnicy niezależnie od współistniejącego pobudzenia STAT6 [13]. IL-13 prowadziła do fosforylacji kinaz aktywowanych przez IL-4 oraz IRS-1, z wyjątkiem kinazy JAK3. Wskutek tego dochodziło do aktywacji białka STAT6 w komórkach nowotworowych [34]. Warto nadmienić, że w limfocytach B powstają połączenia podobne do ISGF-1, które składają się z STAT6, STAT2 i p48. Limfocyty B odporne na działanie IFN- α wykazują obniżenie aktywacji STAT6 [17].

Białko STAT1 hamuje proliferację i powoduje apoptozę w liniach komórkowych raka jelita grubego: HT29 i WiDr po stymulacji przez IL-4 i IFN- γ prawdopodobnie w drodze nasilenia czynności kaspaz i wzrostu aktywności inhibitora cdk -p21WAF1/CIP1 [2, 13]. Gdy występują razem w komórce zmutowane białka STAT1 i p53, ryzyko nowotworu gwałtownie rośnie [51]. Dowiedziono, że białko STAT1 bez reszty tyrozynowej w pozycji 701 – STAT1 CYF nie hamowało proliferacji komórkowej oraz nie indukowało ekspresji IRF-1 [13]. Indukcja genu IRF-1 jest niezależna od JAK3 i może również spowalniać wzrost komórek. Poziom ekspresji STAT1 wzrasta razem z produkcją p21WAF1/CIP1, co prowadzi do zahamowania proliferacji. IL-4 wywiera odwrotny efekt w komórkach chłoniaka Burkitta BL30 i 41, ponieważ tam wzmaga rozrost komórkowy przez aktywację IRS [13]. Gdy wprowadzono białko STAT1 pozbawione domeny (Y701F), STAT1-CYF do komórek HT29, IL-4 nie wywierała hamującego wpływu na komórki HT29 przy braku funkcjonalnych egzemplarzy białka STAT1. Zatem aktywność STAT1 wiąże się bezpośrednio z działaniem IL-4.

Chociaż ostatnie badania [13] wykazały, że STAT1 może wywierać efekty przeciwrostowe, to spotyka się też doniesienia sugerujące, iż białko to może brać udział w nieśmiertelnianiu komórek. Wykazano mianowicie, że wirus Epsteina-Barra poprzez ukryte białko błonowe 1 (LMP1 – *latent membrane protein*) wywołuje ekspresję STAT1, jego przyłączanie do DNA i aktywność transkrypcyjną skutkującą nasileniem procesów proliferacji i wydłużeniem czasu przeżycia transformowanych nowotworowo hepatocytów [44].



RYCINA 2. STAT1 i STAT3 w raku jelita grubego

PERSPEKTYWY TERAPII

W terapii schorzeń związanych z nadmierną aktywacją STAT rozważa się zastosowanie antagonistów cytokin i czynników wzrostu, które nie dopuszczają do fosforylacji tej grupy białek. IL-13E13K jest cząsteczką IL-13, w której zamieniono glutaminę w pozycji 13 na lizynę, co zahamowało aktywację STAT6 w komórkach nowotworowych i odpornościowych. Ponadto użycie tej przekształconej odmiany IL-13 odblokowało ekspresję CD14 na ludzkich monocytach, a więc wywarło odwrotny efekt do działania IL-13. Ograniczenie działania IL-13 jest ważne w terapii chorób z nadmiernym udziałem tej cytokiny, która jest głównym produktem zróżnicowanych i aktywowanych limfocytów Th2. Do grupy tych schorzeń należą astma, atopowe zapalenie skóry, alergiczny nieżyt nosa, zakażenia niektórymi pasożytami i rak [2, 10, 28]. Sant-7 antagonistą IL-6 blokuje fosforylację STAT3 w komórkach szpiczaka oraz rozwój nowotworu [19]. Przeciwciała neutralizujące swoiste epitopy na receptorach również blokują dokomórkowe sygnałowanie. Godnymi uwagi są przeciwciała C225 – anty-EGF-R skierowane przeciwko receptorowi nabłonkowego czynnika wzrostu oraz przeciwciała antyherceptynowe, które swoiście blokują receptor herceptynowy (HER) [5, 6]. Inhibitory kinaz tyrozynowych zapobiegają fosforylacji reszty tyrozynowej w białku STAT. Ich przedstawiciel – PD0169414-kwinazolanilina – inhibitor kinazy tyrozynowej receptora EGF znalazł eksperymentalne zastosowanie w liniach komórkowych raka jajnika, niedrobnokomórkowym raku płuc i raku piersi [54]. Inhibitory kinazy ErbB1 PD 153035 lub PD168393 blokują wzrost komórek raka piersi i zapobiegają rekrutacji STAT3 przez zahamowanie ich wiązania się z Erb-1 [24]. AG490-tyrofostryna – inhibitor kinazy 2 typu Janus (JAK2) wywołuje apoptozę w ostrej białaczkę limfoblastycznej (ALL) w drodze hamowania STAT3 [30]. Antysensowne oligonukleotydy przeciwko STAT3 sprawdziły się jako inhibitory proliferacji w liniach komórkowych raka płaskonabłonkowego głowy i szyi [16]. Niestety, ich zastosowanie ogranicza ich duża toksyczność, możliwość nieswoistego wiązania z innymi częściami genomu oraz szybkie ustępowanie efektu terapeutycznego po pojedynczej dawce [7]. Podjęto się modyfikacji białek STAT przez różnego rodzaju mutacje i zmiany struktury ich funkcjonalnych domen. Forma STAT3 β bez kilku aminokwasów na końcu C-terminalnego blokuje proliferację poprzez zahamowanie ekspresji bcl-x1 i cykliny D1 w raku jajnika [11, 20]. Bezdomenowa kopia STAT5b w białaczkach typu ostrej i przewlekłej białaczki szpikowej (AML i CML) z ekspresją onkogenowej kinazy tyrozynowej BCR-ABL upośledza proliferację, zmniejsza żywotność blastów BCR-ABL dodatnich oraz zwiększa wrażliwość na hydroksymocznik i cytarabinę [37, 50]. Metylacja STAT1 – supresora proliferacji komórkowej poprzez transferazę PMRT-1 po indukcji IFN- γ wzmaga wiązanie tego białka do DNA [32]. Syntetyczne peptydy, które upośledzają funkcje domen STAT reprezentuje fosfotyrozyllopeptyd wbudowujący się w przekaźnikową domenę SH2 białka STAT3, co zapobiegało, transformacji nowotworowej pod wpływem v-src w fibroblastach NIH 3T3 (52). Funkcje białek STAT można modulować przez zastosowanie następujących białkowych inhibitorów szlaku JAK-STAT: PTP, PIAS, SOCS [57]. SMRT wygaszający mediator dla receptora kwasu retinowego i receptora hormonów tarczycy hamował indukcję przez IL-3 genów docelowych dla białka STAT5 [36].

Rosnąca liczba zachorowań na raka jelita grubego skłania do poszukiwania nowych wykładników złośliwości tego nowotworu, jak również nowych sposobów terapii tego schorzenia. Coraz dokładniej poznajemy krąg wewnątrzkomórkowych białek biorących udział w karcynogenezie. Zmutowane białka STAT mogą zaburzać tworzenie się cytoszkieletu komórkowego, a przez to upośledzać gojenie się owrzodzeń w chorobach zapalnych jelita. Wpływają one na rozrost komórek oraz na ich różnicowanie. Ponadto mogą zmniejszać liczbę połączeń między transformowanymi komórkami nabłonka jelitowego poprzez upośledzenie produkcji białek tworzących te połączenia, takich jak koneksyny. Wobec tego, zmutowane białka STAT lub występujące w nadmiarze hiperaktywne, prawidłowe egzemplarze białek STAT pobudzane przez swoje zmutowane induktory prawdopodobnie mogą ułatwiać powstawanie nowotworu i warunkować szybki rozwój raka okrężnicy. Wyniki przedstawionych badań sugerują, iż białka STAT mogą współdziałać z innymi znanymi czynnikami w rozwoju gruczolakoraka jelita grubego. Tym niemniej dokładna charakterystyka tych interakcji jest kwestią przyszłości.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AFKARIAN M, SEDY JR, YANG J, JACOBSON NG, CEREB N, YANG SY, MURPHY TL, MURPHY KM. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4⁺ T cells. *Nat Immunol* 2002; **3**: 549–557.
- [2] AKIRA S. Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice. *Stem Cells* 1999; **17**: 138–146.
- [3] AKIRA S. Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting. *Oncogene*. 2000; **19**: 2607–2611.
- [4] ALONZI T, MARITANO D, GORGONI B, RIZZUTO G, LIBERT C, POLI V. Essential role of STAT3 in the control of the acute-phase response as revealed by inducible gene inactivation in the liver. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 1621–1632.
- [5] BASELGA J. Current and planned clinical trials with trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol* 2000; **27**: 27–32.
- [6] BASELGA J. New therapeutic agents targeting the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* 2000; **18**: 54S–59S.
- [7] BAŚKIEWICZ-MASIUK M, MACHALIŃSKI B. Rola białek STAT5 w schorzeniach układu krwiotwórczego. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 9–30.
- [8] BOCCACCIO C, ANDO M, TAMAGNONE L, BARDELLI A, MICHIELI P, BATTISTINI C, COMOGLIO PM. Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. *Nature* 1998; **391**: 285–288.
- [9] BOWMAN T, GARCIA R, TURKSON J, JOVE R. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000; **19**: 2474–2488.
- [10] BROMBERG J. Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest* 2002; **109**: 1139–1142.
- [11] BURKE WM, JIN X, LIN HJ, HUANG M, LIU R, REYNOLDS RK, LIN J. Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses growth of human ovarian and breast cancer cells. *Oncogene* 2001; **20**: 7925–7934
- [12] CALO V, MIGLIAVACCA M, BAZAN V, MACALUSO M, BUSCEMI M, GEBBIA N, RUSSO A. STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. *J Cell Physiol* 2003; **197**: 157–168.
- [13] CHANG TL, PENG X, FU XY. Interleukin-4 mediates cell growth inhibition through activation of Stat1. *J Biol Chem* 2000; **275**: 10212–10217.
- [14] CLIFFORD JL, MENTER DG, YANG X, WALCH E, ZOU C, CLAYMAN GL, SCHAEFER TS, ELNAGGAR AK, LOTAN R, LIPPMAN SM. Expression of protein mediators of type I interferon signaling in human squamous cell carcinoma of the skin. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; **9**: 993–997.
- [15] CRESSMAN DE, DIAMOND RH, TAUB R. Rapid activation of the Stat3 transcription complex in liver regeneration. *Hepatology* 1995; **21**: 1443–1449.
- [16] GRANDIS JR, DRENNING SD, CHAKRABORTY A, ZHOU MY, ZENG Q, PITT AS, TWEARDY DJ. Requirement of Stat3 but not Stat1 activation for epidermal growth factor receptor-mediated cell growth *in vitro*. *J Clin Invest* 1998; **102**: 1385–1392.

- [17] GUPTA S, JIANG M, PERNIS AB. IFN-alpha activates Stat6 and leads to the formation of Stat2:Stat6 complexes in B cells. *J Immunol* 1999; **163**: 3834–3841.
- [18] HEINRICH PC, BEHRMANN I, MULLER-NEWEN G, SCHAPER F, GRAEVE L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 1998; **334**: 297–314.
- [19] HONEMANN D, CHATTERJEE M, SAVINO R, BOMMERT K, BURGER R, GRAMATZKI M, DORKEN B, BARGOU RC. The IL-6 receptor antagonist SANT-7 overcomes bone marrow stromal cell-mediated drug resistance of multiple myeloma cells. *Int J Cancer* 2001; **93**: 674–680.
- [20] HUANG M, PAGE C, REYNOLDS RK, LIN J. Constitutive activation of stat 3 oncogene product in human ovarian carcinoma cells. *Gynecol Oncol* 2000; **79**: 67–73.
- [21] IMADA K, BLOOM ET, NAKAJIMA H, HORVATH-ARCIDIACONO JA, UDY GB, DAVEY HW, LEONARD WJ Stat5b is essential for natural killer cell-mediated proliferation and cytolytic activity. *J Exp Med* 1998; **188**: 2067–2074.
- [22] IWATSUKI K, ENDO T, MISAWA H, YOKOUCHI M, MATSUMOTO A, OHTSUBO M, MORI KJ, YOSHIMURA A. STAT5 activation correlates with erythropoietin receptor-mediated erythroid differentiation of an erythroleukemia cell line. *J Biol Chem* 1997; **272**: 8149–8152.
- [23] LEVY DE, LEE CK. What does Stat3 do? *J Clin Invest* 2002; **109**: 1143–1148.
- [24] LI L, SHAW PE. Autocrine-mediated activation of STAT3 correlates with cell proliferation in breast carcinoma lines. *J Biol Chem* 2002; **277**: 17397–17405.
- [25] LIU J, KERN JA. Neuregulin-1 activates the JAK-STAT pathway and regulates lung epithelial cell proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; **27**: 306–313.
- [26] LOVATO P, BRENDER C, AGNHOLT J, KELSEN J, KALTOFT K, SVEJGAARD A, ERIKSEN KW, WOETMANN A, ODUM N. Constitutive STAT3 activation in intestinal T cells from patients with Crohn's disease. *J Biol Chem* 2003; **278**: 16777–16781.
- [27] MA XT, WANG S, YE YJ, DU RY, CUI ZR, SOMSOUK M. Constitutive activation of Stat3 signaling pathway in human colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; **10**: 1569–1573.
- [28] MADDEN KB, YEUNG KA, ZHAO A, GAUSE WC, FINKELMAN FD, KATONA IM, URBAN JF JR, SHEA-DONOHUE T. Enteric nematodes induce stereotypic STAT6-dependent alterations in intestinal epithelial cell function. *J Immunol* 2004; **172**: 5616–5621.
- [29] MAZZARELLA G, MACDONALD TT, SALVATI VM, MULLIGAN P, PASQUALE L, STEFANILE R, LIONETTI P, AURICCHIO S, PALLONE F, TRONCONE R, MONTELEONE G. Constitutive activation of the signal transducer and activator of transcription pathway in celiac disease lesions. *Am J Pathol* 2003; **162**: 1845–1855.
- [30] MEYDAN N, GRUNBERGER T, DADI H, SHAHAR M, ARPAIA E, LAPIDOT Z, LEEDER JS, FREEDMAN M, COHEN A, GAZIT A, LEVITZKI A, ROIFMAN CM. Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a Jak-2 inhibitor. *Nature* 1996; **379**: 645–648.
- [31] MIYOSHI K, SHILLINGFORD JM, SMITH GH, GRIMM SL, WAGNER KU, OKA T, ROSEN JM, ROBINSON GW, HENNIGHAUSEN L. Signal transducer and activator of transcription (Stat) 5 controls the proliferation and differentiation of mammary alveolar epithelium. *J Cell Biol* 2001; **155**: 531–542.
- [32] MOWEN KA, TANG J, ZHU W, SCHURTER BT, SHUAI K, HERSCHMAN HR, DAVID M. Arginine methylation of STAT1 modulates IFNalpha/beta-induced transcription. *Cell* 2001; **104**: 731–741.
- [33] MUDTER J, NEURATH MF. The role of signal transducers and activators of transcription in T inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2003; **9**: 332–337.
- [34] MURATA T, NOGUCHI PD, PURI RK. IL-13 induces phosphorylation and activation of JAK2 Janus kinase in human colon carcinoma cell lines: similarities between IL-4 and IL-13 signaling. *J Immunol* 1996; **156**: 2972–2978.
- [35] NATH N, GIRI S, PRASAD R, SINGH AK, SINGH I. Potential targets of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor for multiple sclerosis therapy. *J Immunol* 2004; **172**: 1273–1286.
- [36] NAKAJIMA H, BRINDLE PK, HANDA M, IHLE JN. Functional interaction of STAT5 and nuclear receptor co-repressor SMRT: implications in negative regulation of STAT5-dependent transcription. *EMBO J* 2001; **20**: 6836–6844.
- [37] NIEBOROWSKA-SKORSKA M, HOSER G, KOSSEV P, WASIK MA, SKORSKI T. Complementary functions of the antiapoptotic protein A1 and serine/threonine kinase pim-1 in the BCR/ABL-mediated leukemogenesis. *Blood* 2002; **99**: 4531–4539.
- [38] NOSAKA T, KAWASHIMA T, MISAWA K, IKUTA K, MUI AL, KITAMURA T. STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells. *EMBO J* 1999; **18**:

4754–4765.

- [39] OCHRIETOR JD, HARRISON KA, ZAHEDI K, MORTENSEN RF. Role of STAT3 and C/EBP in cytokine-dependent expression of the mouse serum amyloid P-component (SAP) and C-reactive protein (CRP) genes. *Cytokine* 2000; **12**: 888–899.
- [40] ORLOVSKY K, THEODOR L, MALOVANI H, CHOWERS Y, NIR U. Gamma interferon down-regulates Fer and induces its association with inactive Stat3 in colon carcinoma cells. *Oncogene* 2002; **21**: 4997–5001.
- [41] OSTRAND-ROSENBERG S, GRUSBY MJ, CLEMENTS VK. Cutting edge: STAT6-deficient mice have enhanced tumor immunity to primary and metastatic mammary carcinoma. *J Immunol* 2000; **165**: 6015–6019.
- [42] PALMER EM, FARROKH-SIAR L, MAGUIRE VAN SEVENTER J, ET AL. IL-12 decreases activation-induced cell death in human naive Th cells costimulated by intercellular adhesion molecule-1: IL-12 alters caspase processing and inhibits enzyme function. *J Immunol* 2001; **167**: 749–758.
- [43] REPOVIC P, FEARS CY, GLADSON CL, BENVENISTE EN. Oncostatin-M induction of vascular endothelial growth factor expression in astrogloma cells. *Oncogene* 2003; **22**: 8117–8124.
- [44] RICHARDSON C, FIELDING C, ROWE M, BRENNAN P. Epstein-Barr virus regulates STAT1 through latent membrane protein 1. *J Virol* 2003; **77**: 4439–4443.
- [45] RILEY JK, TAKEDA K, AKIRA S, SCHREIBER RD. Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. *J Biol Chem* 1999; **274**: 16513–16521.
- [46] SANCHEZ A, NAGY P, THORGEIRSSON SS. STAT-3 activity in chemically-induced hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer* 2003; **39**: 2093–2098.
- [47] SCHREIBER S, ROSENSTIEL P, HAMPE J, NIKOLAUS S, GROESSNER B, SCHOTTELIUS A, KUH-BACHER T, HAMLING J, FOLSCH UR, SEEGERT D. Activation of signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 in human chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 2002; **51**: 379–385.
- [48] SPENCER KS, GRAUS-PORTA D, LENG J, HYNES NE, KLEMKE RL. ErbB2 is necessary for induction of carcinoma cell invasion by ErbB family receptor tyrosine kinases. *J Cell Biol* 2000; **148**: 385–397.
- [49] SIMPSON SJ, SHAH S, COMISKEY M, DE JONG YP, WANG B, MIZOGUCHI E, BHAN AK, TERHORST C. T cell-mediated pathology in two models of experimental colitis depends predominantly on the interleukin 12/Signal transducer and activator of transcription (Stat)-4 pathway, but is not conditional on interferon gamma expression by T cells. *J Exp Med* 1998; **187**: 1225–1234.
- [50] STERNBERG DW, GILLILAND DG. The role of signal transducer and activator of transcription factors in leukemogenesis. *J Clin Oncol* 2004; **22**: 361–371.
- [51] TOWNSEND PA, SCARABELLI TM, DAVIDSON SM, KNIGHT RA, LATCHMAN DS, STEPHANOOU A. STAT-1 interacts with p53 to enhance DNA damage-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2004; **279**: 5811–5820.
- [52] TURKSON J, RYAN D, KIM JS, ZHANG Y, CHEN Z, HAURA E, LAUDANO A, SEBTI S, HAMILTON AD, JOVE R. Phosphotyrosyl peptides block Stat3-mediated DNA binding activity, gene regulation, and cell transformation. *J Biol Chem* 2001; **276**: 45443–45455.
- [53] VADLAMUDI R, MANDAL M, ADAM L, STEINBACH G, MENDELSON J, KUMAR R. Regulation of cyclooxygenase-2 pathway by HER2 receptor. *Oncogene* 1999; **18**: 305–314.
- [54] VINCENT PW, BRIDGES AJ, DYKES DJ, FRY DW, LEOPOLD WR, PATMORE SJ, ROBERTS BJ, ROSE S, SHERWOOD V, ZHOU H, ELLIOTT WL. Anticancer efficacy of the irreversible EGFR tyrosine kinase inhibitor PD 0169414 against human tumor xenografts. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000; **45**: 231–238.
- [55] WANG L, WALIA B, EVANS J, GEWIRTZ AT, MERLIN D, SITARAMAN SV. IL-6 induces NF-kappa B activation in the intestinal epithelia. *J Immunol* 2003; **171**: 3194–3201.
- [56] WEI LH, KUO ML, CHEN CA, CHOU CH, LAI KB, LEE CN, HSIEH CY. Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. *Oncogene* 2003; **22**: 1517–1527.
- [57] WORMALD S, HILTON DJ. Inhibitors of cytokine signal transduction. *J Biol Chem* 2004; **279**: 821–824.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 28.06.2004 r.

Przyjęto: 03.11.2004 r.

Adres autora: Waszyngtona 13, 15-269 Białystok

e-mail: sulek@zeus.amb.edu.pl

METABOLIZM NUKLEOTYDÓW U ROŚLIN WYŻSZYCH

NUCLEOTIDE METABOLISM IN HIGHER PLANTS

Adriana SZMIDT-JAWORSKA, Krzysztof JAWORSKI, Jan KOPCEWICZ

Zakład Fizjologii i Biologii Molekularnej Roślin,
Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

Streszczenie: Nukleotydy są związkami o ogromnym znaczeniu dla wszystkich żywych organizmów. Biorą one udział w wielu przemianach biochemicznych, są monomerycznymi prekursorami kwasów nukleinowych, źródłem energii, a także prekursorami lub komponentami pierwotnych i wtórnych produktów metabolicznych. Tak więc metabolizm nukleotydów odgrywa niezwykle istotną rolę w procesach wzrostu i rozwoju każdego żywego organizmu. W niniejszej pracy przedstawiono przemiany, jakim podlegają nukleotydy purynowe i pirymidynowe oraz znaczenie tych przemian podczas różnych procesów morfogenetycznych u roślin, tj. dojrzewania zarodków, kiełkowania nasion, rozwoju pędu i organów magazynujących oraz wzrostu kultur komórkowych. Przedstawiono także badania dotyczące wpływu czynników środowiska na metabolizm nukleotydów.

Słowa kluczowe: metabolizm, nukleotydy, puryny, pirymidyny, rośliny wyższe, rozwój roślin.

Summary: Nucleotides are among the most important compounds in all living organisms. They participate in many biochemical processes in cells. They are precursors for nucleic acid synthesis, an energy source and precursors for components of primary and secondary metabolic products. Therefore, the metabolism of nucleotides are crucial for the growth and development of all organisms. In the present review we have concentrated on nucleotides' metabolism and physiological aspects of these processes during different morphogenetic processes, including embryo maturation and seed germination, storage organ development, sprouting and growth of cultured plant cells. The effects of environmental factors on nucleotide metabolism are also described.

Key words: higher plants, metabolism, nucleotides, plant development, purines, pyrimidines.

Wykaz skrótów: AMP – adenylan, ATP – adenozylo-5'-trifosforan, CMP – cytydylan, dNDP – deoksyrybonukleozydodifosforan, GMP – guanylan, GTP – guanozylo-5'-trifosforan, IMP – inozynian, NAD – nukleotyd nikotynoamidoadeninowy, NADP – fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowy, NDP – rybonukleozydodifosforan, PRA – 5-fosforybozyloamina, PRPP – 5-fosforybozylo-1-pirofosforanu, TMP – tymidylan, UMP – urydylan.

WSTĘP

Nukleotydy są związkami o ogromnym znaczeniu dla wszystkich żywych organizmów. Najlepiej poznana jest rola nukleotydów purynowych i pirymidynowych jako monome-rycznych prekursorów DNA i RNA. Jednak nukleotydy purynowe to także wszech-obecne źródła energii (ATP, GTP), sygnały regulatorowe (cykliczny AMP i cykliczny GMP), a także komponenty koenzymów FAD, NAD⁺, NADP⁺, koenzym A, zaś S-adenozylometionina jest donorem grup metylowych. Nukleotydy pirymidynowe są składnikami związków, takich jak: CDP-acyloglicerol uczestniczący w syntezie tłuszczów oraz UDP- i GDP-monosacharydy, będące prekursorami biosyntezy polisacharydów ścian komórkowych.

W przeciwieństwie do mikroorganizmów [48] czy zwierząt [25], stosunkowo niewiele badań dotyczyło metabolizmu i roli nukleotydów purynowych i pirymidynowych u roślin. Od kilku lat coraz częściej pojawiają się doniesienia dotyczące metabolizmu tej grupy związków podczas wzrostu komórek w kulturach komórkowych czy procesach morfogenetycznych roślin nago- i okrytonasiennych [13, 68].

W niniejszej pracy omówiono badania dotyczące przemian metabolicznych, jakim podlegają nukleotydy w komórkach roślin wyższych oraz rolę, jaką odgrywają te przemiany w wybranych procesach morfogenetycznych, takich jak: dojrzewanie i kiełkowanie zarodków zygocytynych i somatycznych, organogeneza pędu, rozwój organów magazynujących. Przedstawiono także badania dotyczące wpływu czynników środowiskowych na metabolizm nukleotydów.

1. OBECNOŚĆ ZASAD, NUKLEOZYDÓW I NUKLEOTYDÓW

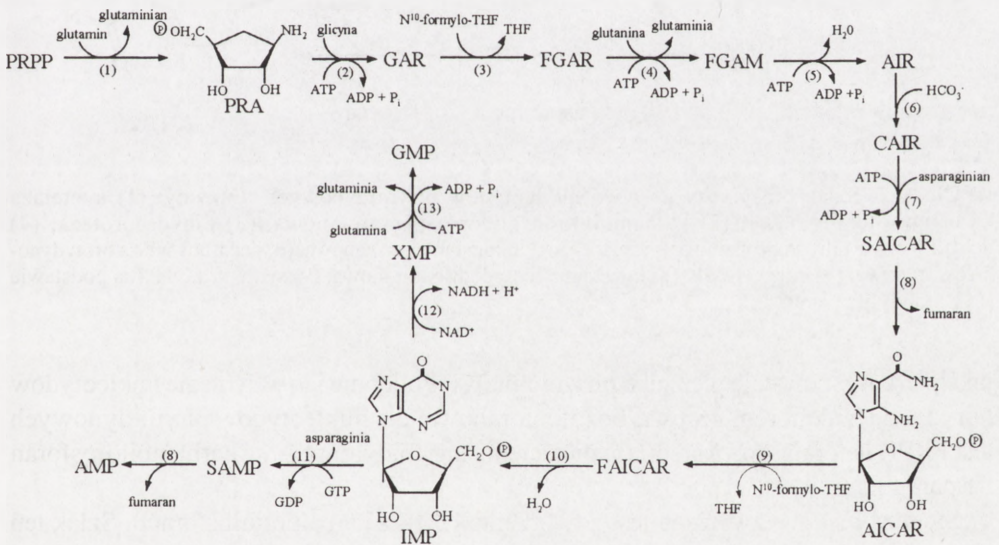
Obecność nukleotydów w materiale roślinnym wykazano wykorzystując wysoko-sprawną chromatografię cieczową [5, 78]. Stwierdzono, że w komórkach najwięcej jest nukleotydów adeninowych, a suma ATP, ADP i AMP jest zwykle na poziomie 80–200 nmoli/g świeżej masy.

Stężenie nukleozydów i wolnych zasad jest zwykle na bardzo niskim poziomie. W komórkach barwinka różowego (*Catharanthus roseus*) ilość adenozyiny waha się w granicach 2–9 nmoli/g świeżej masy, podczas gdy wolna adenina jest niewykrywalna [84]. Istnieją jednak wyjątki, np. w liściach zbóż zaobserwowano wysoki poziom zarówno adeniny, jak i adenozyiny [62]. Poziom urydyny, adenozyiny, guanozyiny i adeniny w liściach jęczmienia wynosi odpowiednio 56, 69, 27 i 43 nmole/g świeżej masy i jest wyższy od poziomu ATP. Różnice w poziomie nukleozydów u różnych gatunków roślin mogą wynikać ze zmian w aktywności enzymów i/lub być związane z różnicami w procesach katabolicznych.

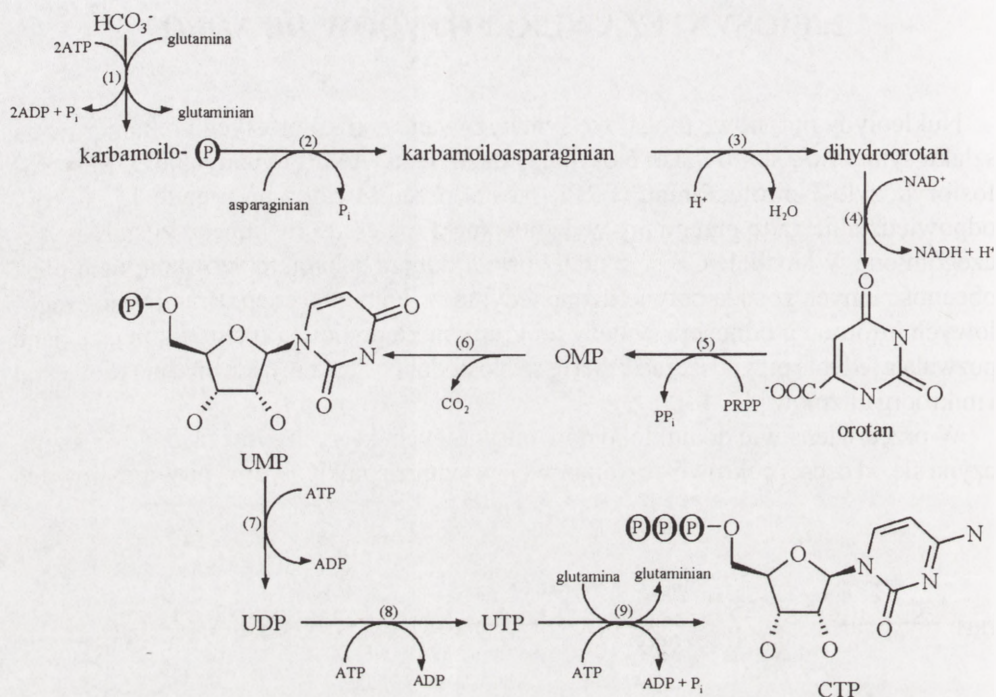
2. BIOSYNTETA NUKLEOTYDÓW *DE NOVO*

Nukleotydy purynowe mogą być syntetyzowane z kilku prostych prekursorów na szlaku syntezy *de novo*. Szlak biosyntezy adenylanu (AMP) i guanylanu (GMP) z 5-fosforybozylo-1-pirofosforanu (PRPP) został przedstawiony na rycinie 1. Enzymy odpowiedzialne za te przemiany wyizolowane z materiału roślinnego zostały wyszczególnione w tabeli 1. Część z nich została dobrze scharakteryzowana, natomiast obecność innych została potwierdzona jedynie w homogenatach. Brak jest szczegółowych informacji odnośnie syntezy tej grupy nukleotydów u roślin. Istniejące dane pozwalają jedynie przypuszczać, że są to szlaki podobne do tych, jakie opisano u zwierząt i mikroorganizmów [47, 48].

W przeciwieństwie do nukleotydów purynowych, których synteza *de novo* rozpoczyna się od części cukrowo-fosforanowej, w syntezie nukleotydów pirymidynowych



RYCINA 1. Schemat ilustrowujący przebieg kolejnych etapów biosyntezy *de novo* nukleotydów purynowych. Metabolity: PRA – 5'-fosforybozylo-1-amina; GAR – rybonukleotyd glicynoamidowy; FGAR – rybonukleotyd formyloglicynoamidowy; FGAM – rybonukleotyd formyloglicynoamidowy; AIR – rybonukleotyd 5'-aminoimidazolu; CAIR – rybonukleotyd 5'-aminoimidazolo-4-karboksylowy; SAICAR – rybonukleotyd 5'-aminoimidazolo-4-N-bursztyniło-karboksyamidowy; AICAR – rybonukleotyd 5-aminoimidazolo-4-karboksyamidowy; FAICAR – rybonukleotyd 5-formamidoimidazolo-4-karboksyamidowy; IMP – inozynian; SAMP – adenylobursztynian; AMP – adenylan; XMP – ksantylan; GMP – guanylan. Enzymy: (1) aminofosforybozylotransferaza; (2) syntetaza GAR; (3) formylotransferaza GAR; (4) syntetaza FGAM; (5) syntetaza AIR; (6) karboksylaza AIR; (7) syntetaza SAICAR; (8) liaza adenylobursztynianowa; (9) formylotransferaza AICAR; (10) hydrolaza IMP; (11) syntetaza SAMP; (12) dehydrogenaza IMP; (13) syntetaza GMP (na podstawie [69], zmodyfikowane)



RYCINA 2. Szlak biosyntezy *de novo* nukleotydów pirymidynowych. Enzymy: (1) syntetaza karbamoilofosforanowa; (2) karbamoilotransferaza asparaginianowa; (3) dihydroorotaza; (4) dehydrogenaza dihydroorotanowa; (5) fosforybozylotransferaza orotanowa; (6) dekarboksylaza orotydyno-5-fosforanowa; (7) kinaza UMP; (8) kinaza nukleotydodifosforanowa; (9) syntetaza CTP (na podstawie [69], zmodyfikowane)

jako pierwszy powstaje pierścień pirymidynowy. Podobnie jak w syntezie nukleotydów purynowych, donorem grupy rybozofosforanowej dla nukleotydów pirymidynowych jest PRPP, natomiast prekursorami pierścienia pirymidynowego są karbamoilofosforan i asparaginian.

Synteza *de novo* związana jest z tworzenie UMP z karbamoilofosforanu. Szlak ten obejmuje sześć reakcji, które zostały przedstawione na rycinie 2. Enzymy odpowiedzialne za te przemiany wyizolowane z materiału roślinnego zostały wyszczególnione w tabeli 1.

U ssaków i wielu innych organizmów eukariotycznych pierwsze trzy enzymy, tj. syntetaza karbamoilofosforanowa (ang. *Carbamoylphosphate synthetase*), karbamoilotransferaza asparaginianowa (ang. *Aspartate transcarbamoylase*) i dihydro-orotaza (ang. *Dihydroorotase*) działają jako wielofunkcyjne białka tzw. białka CAD [17]. Jednakże do tej pory nie stwierdzono występowania takiego kompleksu u roślin [43].

U większości organizmów eukariotycznych opisano dwie różne syntetazy karbamoilofosforanowe, które dostarczają substratów dla syntezy pirymidyn i arginy. U roślin stwierdzono obecność jednego z tych enzymów, który prawdopodobnie dostarcza karbamoilofosforanu dla obu szlaków [78].

TABELA 1. Enzymy związane z biosyntezą *de novo* nukleotydów purynowych i pirymidynowych opisane u roślin wyższych.

Enzym	Numer EC	Źródło	Literatura
Synteza <i>de novo</i> nukleotydów purynowych			
Amidofosforybozylotransferaza	2.4.2.14	<i>Glycine max</i> (brodawki)	[59]
Liaza SAICAR	4.3.2.2	<i>Triticum aestivum</i> (zarodki)	[24]
Formylotransferaza AICAR	2.1.2.3	<i>Pisum sativum</i> (siewki)	[27]
Syntetaza SAMP	6.3.4.4	<i>Arabidopsis thaliana</i> (siewki) <i>Triticum aestivum</i> (siewki)	[55] [55]
Dehydrogenaza IMP	1.1.1.205	<i>Vigna inguiculata</i> (brodawki) <i>Camellia sinensis</i> (liście) <i>Catharanthus roseus</i> (komórki)	[13] [50] [50]
Synteza <i>de novo</i> nukleotydów pirymidynowych			
Syntetaza karbamoilofosforanowa	6.3.5.5	<i>Phaseolus aureus</i> <i>Pisum sativum</i> (pędy)	[53] [52]
Karbamoilotransferaza asparaginianowa	2.1.3.2	<i>Phaseolus aureus</i> (siewki)	[58]
Dihydroorotaza	1.3.99.11	<i>Lycopersicon esculentum</i> (komórki)	[42]
Fosforybozylotransferaza orotanowa	2.4.2.10	<i>Phaseolus mungo</i> (siewki)	[85]
Dekarboksylaza orotydylofosforanowa	4.1.1.23	<i>Lycopersicon esculentum</i> (kultury komórkowe)	[80]
Kinaza UMP/CMP	2.7.4.14	<i>Arabidopsis thaliana</i>	[85]

Czwarty z enzymów – dehydrogenaza dihydroorotanowa nie został dobrze poznany. Badania prowadzone na komórkach pomidora wskazały jedynie na obecność tego enzymu w mitochondriach [42].

Piąty i szósty enzym, tzn. fosforybozylotransferaza orotanowa oraz dekarboksylaza orotydylo-5-fosforanowa występują w komórkach zwierzęcych i roślinnych jako pojedyncze białko, tzw. syntaza UMP [61].

Substratami w syntezie deoksyrybonukleotydów są rybonukleozydodifosforany (NDP), w których grupę 2'-hydroksylową reszty cukrowej zastępuje atom wodoru, a ostatecznym reduktorem jest NADPH. Redukcja rybozy w NDP jest katalizowana przez pojedynczy enzym reduktazę rybonukleotydotową, w wyniku czego powstają dNDP (deoksyrybonukleozydodifosforany) [78]. Z wyjątkiem dUDP pozostałe dNDP są fosforylowane, co prowadzi do powstania odpowiednio dCTP, dATP i dGTP, prekursorów w syntezie DNA. U roślin dUDP ulega przemianie do dUTP, a następnie podlega defosforylacji do dUMP [54].

TABELA 2. Enzymy związane ze szlakiem rezerwowym nukleotydów purynowych i pirymidynowych opisane u roślin wyższych

Enzym	Numer EC	Źródło	Literatura
Szlak rezerwowego puryn			
Fosforybozylotransferaza adeniny	2.4.2.7	<i>Helianthus tuberosus</i> (pędy) <i>Catharanthus roseus</i> (komórki) <i>Lycopersicon esculentum</i> (korzenie, liście) <i>Arabidopsis thaliana</i> (liście)	[34] [26] [15] [32]
Fosforybozylotransferaza hypoksantyny/guaniny	2.4.2.8	<i>Helianthus tuberosus</i> (pędy)	[36]
Kinaza adenozyliny	2.7.1.20	<i>Arabidopsis thaliana</i>	[45]
Kinaza inozyliny/guanozyliny	2.7.1.73	<i>Helianthus tuberosus</i> (bulwy)	[18]
Fosfotransferaza nukleotydów	2.7.1.77	<i>Hordeum vulgare</i> (siewki)	[56]
Szlak rezerwowego pirymidyn			
Fosforybozylotransferaza uracylu	2.4.2.9	<i>Pisum sativum</i> (epikotyle)	[14]
Kinaza urydyny/cytydyny	2.7.1.48	<i>Zea mays</i> (nasiona)	[20]
Deaminaza deoksycytydyny	3.5.4.14	<i>Zea mays</i> (liście)	[33]

Nukleotyd tymidynowy (dTMP) jest syntetyzowany z dUMP przez syntetazę tymidylanową. W reakcji tej N^5, N^{10} -metylenotetrahydrofolian powstający pod wpływem reduktazy dihydrofolianu działa zarówno jako donator grup metylowych, jak i czynnik redukujący. U roślin wykryto bifunkcyjne białko, którego działanie odpowiada syntetazie tymidynowej oraz reduktazie dihydrofolianu [31]. Konwersja dTMP do dTTP następuje w wyniku serii reakcji katalizowanych przez kinazę nukleozydomonofosforanu i kinazę nukleozydodifosforanu.

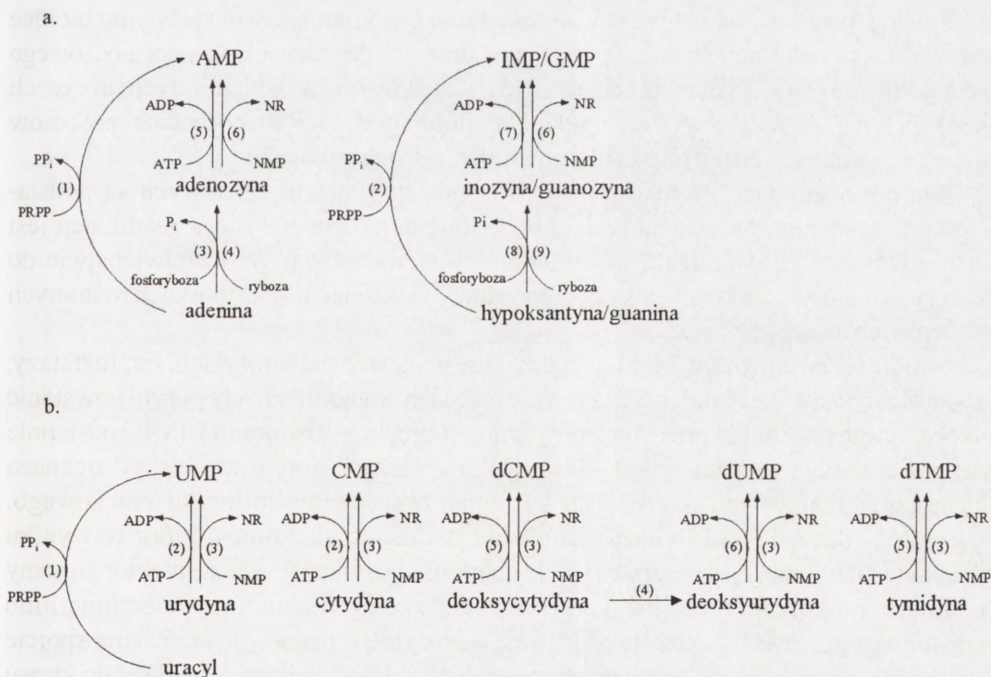
3. SZLAKI REZERWOWE

Wykorzystanie wcześniej wytworzonych zasad oraz nukleozydów do syntezy nukleotydów odbywa się w wyniku reakcji rezerwowej, która jest prostsza i znacznie mniej kosztowna niż reakcje syntezy *de novo*.

Zasady oraz nukleozydy purynowe pojawiają się w wyniku wewnątrzkomórkowego rozkładu niestabilnego RNA i nukleotydów oraz w pewnych przypadkach z egzogennych źródeł jako produkt katabolizmu kwasów nukleinowych i nukleotydów niszczonej komórki. Trzy zasady purynowe: adenina, guanina i hypoksantyna są odpowiednio

źródłem dla powstania AMP, GMP i IMP, a w regulacji tych szlaków biorą udział fosforybozylotransferaza adeninowa i fosforybozylotransferaza hypoksantynowo/guaninowa (ryc. 3a). Katalizują one łączenie PRPP z odpowiednią zasadą purynową. Pośrednio fosforylaza adenozyiny i fosforylaza inozyny/guanozyny przemieniają adeninę, hypoksantynę i guaninę do odpowiadających im rybonukleozydów z wykorzystaniem rybozo-1-fosforanu. Jednakże, aktywność tych enzymów u roślin wyższych jest bardzo niska [5, 43, 78]. Wydaje się więc, że powstawanie rybonukleotydu w wyniku takich przemian nie odgrywa większej roli.

Nukleotydy purynowe są jednocześnie odzyskiwane dzięki bezpośredniej fosforylacji rybonukleozydów purynowych przez kinazy nukleotydu. Kinaza adenozyinowa występuje powszechnie, a jej aktywność jest przeważnie bardzo wysoka, podczas gdy kinazy inozyny/guanozyny stwierdzono tylko u niewielu roślin (tab. 2). U pewnych roślin, inozyna i guanozyna są wykorzystywane głównie do syntezy IMP/GMP w wyniku działania niespecyficznego fosfotransferazy nukleotydu [5, 78].



RYCINA 3. Szlaki rezerwowe nukleotydu purynowego (a) i pirymidynowego (b). Enzymy: (a) – (1) fosforybozylotransferaza adeniny; (2) fosforybozylotransferaza hypoksantyny/guaniny; (3) fosforylaza adenozyiny; (4) nukleotyda adenozyiny; (5) kinaza adenozyiny; (6) niespecyficzna fosfotransferaza nukleotydu; (7) kinaza inozyny/guanozyny; (8) fosforylaza inozyny/guanozyny; (9) nukleotyda inozyny/guanozyny; (b) – (1) fosforybozylotransferaza uracylu; (2) kinaza urydyny/cytydyny; (3) niespecyficzna fosfotransferaza nukleotydu; (4) deaminaza deoksycytydyny; (5) kinaza deoksycytydyny; (6) kinaza tymidyny; (na podstawie [69], zmodyfikowane)

Także zasady pirymidynowe i nukleozydy powstające jako produkty degradacji nukleotydów i kwasów nukleinowych są ponownie wykorzystywane do tworzenia nukleotydów pirymidynowych [78]. W tabeli 2 zostały przedstawione enzymy biorące udział w odzyskiwaniu pirymidyn opisane do tej pory u roślin.

Nukleozydy pirymidynowe: urydyna, cytydyna, deoksycytydyna i tymidyna są odzyskiwane z odpowiadających im nukleotydów UMP, CMP, dCMP i dTMP (ryc. 3b). Kinaza urydyny/cytydyny, która jest obecna u wszystkich przebadanych roślin, fosforyluje urydynę i cytydynę. U roślin nie wykryto dotychczas szlaku rezerwowego cytozyny.

4. KATABOLIZM NUKLEOTYDÓW

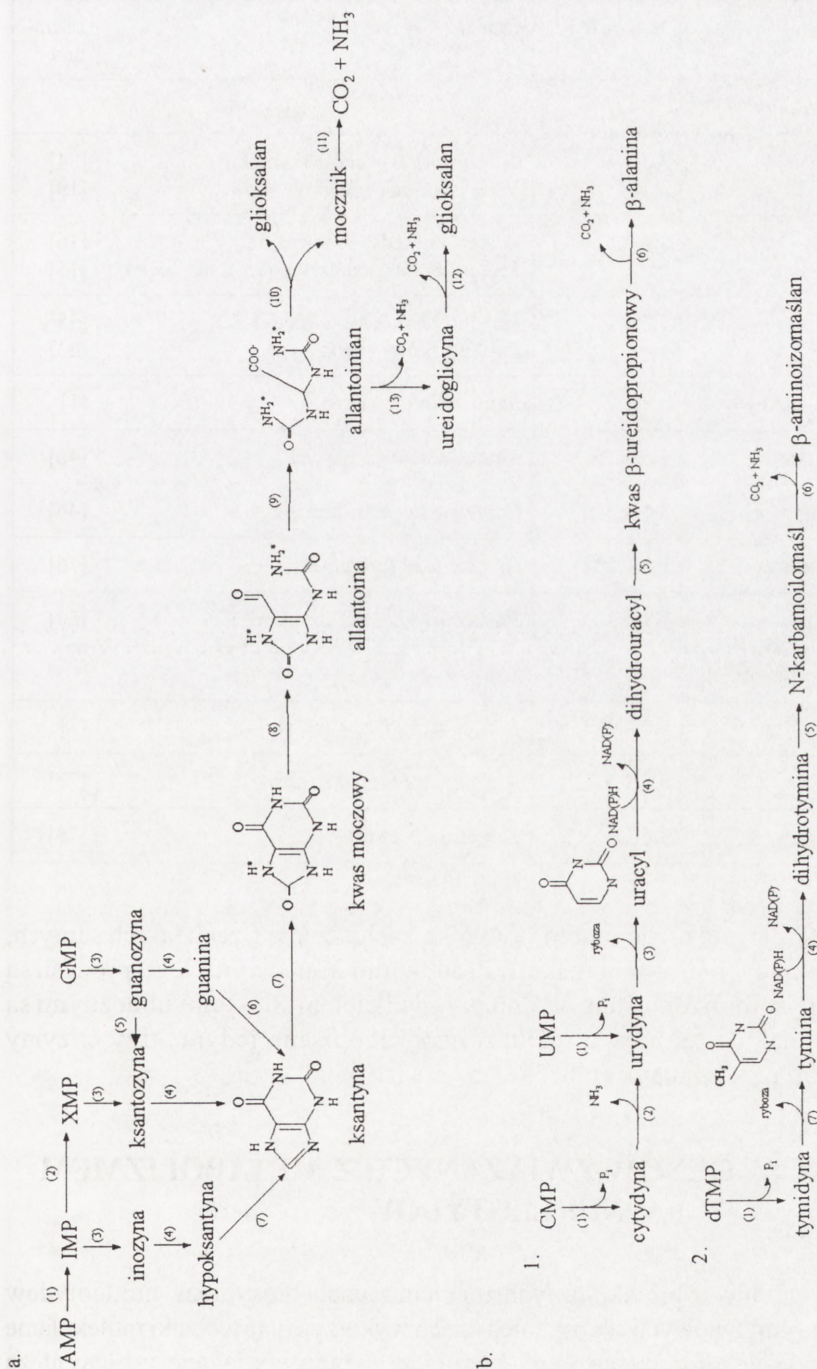
Jak już wspomniano, nukleotydy ulegają w komórkach stałym przemianom. Nukleotydyazy rozkładają nukleotydy do nukleozydów. Fosforylasy nukleozydowe katalizują rozszczepienie nukleozydów na wolne zasady i rybozo-1-fosforan. Niektóre z zasad zostają ponownie wykorzystane do tworzenia nukleotydów przez rezerwowe szlaki metaboliczne.

Rośliny, podobnie jak zwierzęta, są zaopatrzone w kompleksy oksydacyjne biorące udział w procesach katabolicznych puryn, powodując ich degradację do kwasu moczowego i alantoiny oraz CO_2 i NH_3 (ryc. 4a, tab. 3) [5]. Kluczowym związkem w tych procesach jest ksantyna, tak więc wszystkie nukleotydy purynowe przed rozpoczęciem procesów rozszczepienia pierścienia muszą ulec przemianie do tego związku.

Procesy deaminacji, defosforylacji i rozpadu wiązań glikozydowych są podstawowymi reakcjami prowadzącymi do rozkładu nukleotydów. Proces deaminacji jest prowadzony przez deaminazę adenylanową i guanylanową. W przeciwieństwie do zwierząt, u których enzymy te występują w dużych ilościach, w komórkach roślinnych stężenie ich jest niskie [5].

Istnieje wiele enzymów biorących udział w reakcjach defosforylacji, np. fosfatazy, 3'-nukleotydyazy i 5'-nukleotydyazy. W procesach katabolicznych puryn powstanie hypoksantyny zachodzi przez hydrolityczne usunięcie 5'-fosforanu z IMP i następnie rozszczepienie wiązania glikozydowego. Oksydaza ksantynowa (dehydrogenaza ksantyny) utlenia hypoksantynę do ksantyny, a następnie do kwasu moczowego. Oksydaza moczanowa (urykaza) katalizuje tworzenie alantoiny, która w wyniku działania alantoinazy przekształca się do alantoinianu. Okazało się, że niektóre organy roślinne, np. korzenie tropikalnych roślin strączkowych akumulują alantoinę i/lub alantoinian, ponieważ związki te odgrywają ważną rolę w magazynowaniu i transporcie azotu [63]. W znanych układach zwierzęcych związek ten podlega degradacji do kwasu glioksalowego i mocznika, a ten następnie do CO_2 i NH_3 . Dla roślin zaproponowano jednak alternatywny szlak, w którym alantoinian jest początkowo przekształcany do ureidoglicyny, CO_2 i NH_3 . NH_3 jest bezpośrednio uwalniany, a zamiast mocznika powstaje glioksalan (ryc. 4a).

U roślin poznano katabolizm urydylanu i deoksytymidylanu, nie opisano jednak szlaku degradacji cytydylanu [81]. Tak więc jest wielce prawdopodobne, że katabolizm CMP musi odbywać się po jego przekształceniu do urydyny (ryc. 4b).



RYCINA 4. Schematy ilustrujące przebieg kolejnych etapów katabolizmu nukleotydów purynowych (a) i pirymidynowych (b). Enzymy: (a) - (1) deaminaza AMP; (2) dehydrogenaza IMP; (3) 5'-nukleotydaza; (4) nukleotydaza inozyny/guanozyny; (5) deaminaza guanozyny; (6) deaminaza guaniny; (7) dehydrogenaza ksantyny (oksydaza ksantynowa); (8) urikaza; (9) allantoinaza; (10) allantoinaza; (11) ureaza; (12) deaminaza allantoinianu; (13) liaza ureidoglicyny; (b) - (1) 5'-nukleotydaza (fosfataza); (2) deaminaza cytydyny; (3) nukleotydaza urydyny; (4) dehydrogenaza dihydrotymidynu; (5) dihydropropionaza; (6) β -urydynopropionaza; (7) fosforylaza tymidyny (nukleotydaza tymidyny) (na podstawie [69], zmodyfikowane

TABELA 3. Enzymy związane z procesami katabolicznymi nukleotydów purynowych i pirymidynowych opisane u roślin wyższych

Enzym	Numer EC	Źródło	Litera- tura
Szlaki kataboliczne puryn			
Deaminaza AMP	3.5.4.6	<i>Catharanthus roseus</i> (komórki) <i>Pisum sativum</i> (siewki)	[84] [19]
5'-nukleotydaza	3.1.3.5	<i>Zea mays</i> (pędy siewek) <i>Lycopersicon esculentum</i> (korzenie, liście)	[16] [15]
Nukleotydaza inozyny/guanozyny	3.2.2.2	<i>Helianthus tuberosus</i> (pędy) <i>Lupinus luteus</i> (nasiona)	[35] [23]
Nukleotydaza adeozyny	3.2.2.7	<i>Lupinus luteus</i> (nasiona)	[1]
Deaminaza guanozyny	3.5.4.15	<i>Camellia sinensis</i> (liście)	[46]
Deaminaza guaniny	3.5.4.3	<i>Camellia sinensis</i> (liście)	[46]
Dehydrogenaza ksantyny	1.1.1.204	<i>Glycine max</i> (brodawki)	[76]
Urykaza	1.7.3.3	<i>Phaseolus vulgaris</i> (brodawki)	[60]
Szlaki kataboliczne pirymidyn			
Nukleotydaza cytydyny	3.2.2.3	<i>Phaseolus radiatus</i> (siewki)	[2]
Deaminaza cytydyny	3.5.4.5	<i>Arabidopsis thaliana</i> (siewki)	[77]
β -ureidopropionaza	3.5.1.6	<i>Zea mays</i> (siewki)	[79]

UMP i dTMP ulegają przemianom w wyniku zachodzenia trzech takich samych, kolejno następujących po sobie reakcji. Produktami końcowymi tego procesu są β -alanina lub β -aminoizomaślan. W obu przypadkach produktami ubocznymi są CO_2 i NH_3 . Jednak do tej pory u roślin wyższych opisano jedynie trzy enzymy związane z tymi przemianami (tab. 3).

5. SELEKCJA GENÓW ZWIĄZANYCH Z METABOLIZMEM NUKLEOTYDÓW

Niewiele wiadomo o molekularnych mechanizmach biosyntezy nukleotydów purynowych i pirymidynowych. W ostatnich latach wykorzystując techniki molekularne i genetyczne wyselekcjonowano geny kodujące enzymy związane z biosyntezą nukleotydów [30, 43, 44, 83].

PRPP jest podstawowym prekursorem syntezy *de novo*, jak również syntezy rezerwowej nukleotydów purynowych, jak i pirymidynowych. Obecność genu kodującego syntetazę PRPP stwierdzono we wszystkich przebadanych roślinach. Krath i Hove-Jensen [30] wyizolowali 4 odcinki cDNA kodujące tę syntetazę z tkanek szpinaku, jak również stwierdzili, że dwa spośród czterech odcinków reprezentują nową klasę syntetaz PRPP.

U zwierząt aminofosforybozylotransferaza (ATPaza) jest ważnym enzymem biorącym udział w początkowych etapach biosyntezy *de novo* nukleotydów purynowych. Dwie sekwencje ATPazy, oznaczone jako *AtATaza1* i 2 uzyskano z genomu rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*). Ekspresja *AtATazy1* zachodzi przede wszystkim w młodych pąkach kwiatowych, podczas gdy zawartość *AtATazy2* jest największa w kwiatach i korzeniach [30].

Istnieją także dane dotyczące innych genów kodujących enzymy związane z syntezą nukleotydów purynowych. Senecoff i Meagher [65] opisali gen kodujący syntetazę rybonukleotydu 5-aminoimidazolu (AIR). Gen ten charakteryzuje się wysoką homologią do wielu innych znanych genów syntetazy AIR z bakterii. Ci sami autorzy [64] opisali kilka genów z rzodkiewnika kodujących syntetazę rybonukleotydu 5-aminoimidazolo-4-N-bursztynilo-karboksyamidu (SAICAR). Jeden z tych genów, oznaczony jako *PUR7*, ulega ekspresji w liściach i łodygach.

W genomie rzodkiewnika istnieje 5 sekwencji kodujących enzymy podobne do fosforybozylotransferazy adeniny, oznaczone jako *APT1-5* [43]. U roślin transgenicznnych, zawierających konstrukt GUS pod promotorem *apt1*, zaobserwowano szczególnie wysoką aktywność *APT1* podczas przyrostu wtórnego pędu i korzenia [43]. Podobne wyniki uzyskano u topoli [74].

Spośród enzymów biorących udział w syntezie *de novo* pirymidyn scharakteryzowano gen kodujący syntetazę karbamoilofosforanową, która u rzodkiewnika składa się z dwu podjednostek kodowanych przez odrębne geny [82]. Analiza aminokwasowa tych podjednostek wykazała obecność tzw. sekwencji skierowującej do chloroplastów, co jest zgodne z dowodami biochemicznymi o występowaniu tego enzymu w chloroplastach [48].

U grochu znaleziono odcinki kodujące dwie różne izoformy karbamoilotransferazy asparaginianowej [83]. Odcinki te także kodują peptyd posiadający sekwencje kierujące do chloroplastów. Konwersja orotanu do UMP jest prowadzona przez pojedynczy polipeptyd nazwany syntazą UMP, która ma aktywność fosforybozylotransferazy orotanowej i dekarboksylazy orotydylo-5-fosforanowej. Kilka sekwencji cDNA kodujących ten enzym zostało wyizolowanych z tytoniu (*Nicotiana tabacum*) i ryżu (*Oryza sativa*) [43].

W przeciwieństwie do procesu syntezy jak do tej pory nie ma bliższych informacji dotyczących degradacji puryn i pirymidyn.

6. METABOLIZM NUKLEOTYDÓW A PROCESY FIZJOLOGICZNE

6.1. Dojrzewanie zarodków

Badania dotyczące metabolizmu nukleotydów podczas embriogenezy prowadzone były głównie na zarodkach somatycznych, ponieważ ich zygotypyczne odpowiedniki osadzone

w tkance macierzystej są trudne do wyizolowania. W badaniach jako rośliny modelowe wykorzystywano świerk biały (*Picea glauca*) oraz marchew siewną (*Daucus carota*).

Zaobserwowano, że enzymy zarówno szlaku rezerwowego, jak i te związane z procesami degradacji są aktywne podczas rozwoju zarodków somatycznych świerka [10,11]. Wydaje się jednocześnie, że zmiany aktywności enzymów szlaku rezerwowego mogą być metabolicznym włącznikiem niezbędnym do zakończenia podziału komórek i zapoczątkowania rozwoju zarodka.

Podczas intensywnych podziałów komórkowych zaobserwowano wysoką aktywność fosforybozylotransferazy adeniny (APRT) i kinazy adenylanowej (AK), co świadczy może o wykorzystywaniu adeniny i adenozyiny do syntezy nukleotydów i kwasów nukleinowych. W przeciwieństwie do fazy początkowej, w fazie popodziałowej następuje spadek ilości odzyskiwanych nukleozydów [11]. Wydaje się również, że zmiany w metabolizmie puryn są istotne podczas procesu odwadniania, któremu podlega większość nasion. Zaobserwowano, że wzrasta wtedy aktywność APRT, spada natomiast ilość adeniny i adenozyiny włączanych do szlaku [71].

Badania prowadzone na dojrzewających somatycznych zarodkach świerka, a dotyczące metabolizmu pirymidyn wykazały, że synteza *de novo* zachodzi bardzo intensywnie w procesach embriogenezy, kiedy to ponad 80% dostarczonego kwasu orotanowego jest wykorzystywane do syntezy nukleotydów i kwasów nukleinowych na różnych etapach rozwoju zarodka [7].

W zarodkach zygotycznych świerka izolowanych z suchych nasion zaobserwowano spadek ilości uracylu spowodowany głównie niską aktywnością fosforybozylotransferazy uracylu (UPRT) oraz bardzo wysoką aktywnością β -ureidopropionazy [7]. Ponieważ aktywności tych enzymów nie towarzyszy ubytek odpowiednich prekursorów, istnieje sugestia, że inne dokładnie kontrolowane mechanizmy, np. zmiany w poziomie substratów i/lub efektorów, mogą brać udział w kontroli mechanizmu przemian pirymidyn podczas rozwoju zarodka.

Szlak syntezy pirymidyn *de novo*, określony na podstawie wykorzystywania orotanu do syntezy nukleotydów i kwasów nukleinowych, jest aktywny zarówno w zarodkach somatycznych [71], jak i zygotycznych [70] świerka, jednak nie funkcjonuje w nasionach fasoli mungo (*Phaseolus mungo*) [6]. Początkowo zakładano, że u fasoli sytuacja ta jest związana z niską zawartością PRPP, jednakże późniejsze badania wykazały, że ilość PRPP nie jest czynnikiem ograniczającym, ponieważ aktywność syntetazy PRPP podwaja się podczas wzrostu gęstości protoplazmy i spadku ilości wody w somatycznych zarodkach świerka [71].

6.2. Kiełkowanie nasion

Do tej pory ukazało się niewiele prac dotyczących metabolizmu puryn i pirymidyn oraz syntezy kwasów nukleinowych podczas kiełkowania nasion. Dane wskazują, że dostępność nukleotydów podczas początkowych faz pęcznienia odgrywa istotną rolę w procesie kiełkowania.

Procesy metaboliczne dotyczące puryn w powyższym procesie można podzielić na 3 oddzielne fazy: fazę niemetaboliczną, fazę rezerwową, fazę tworzenia ureidów [4].

W początkowych etapach kiełkowania pobieranie prekursorów puryn, jak również ich włączanie do różnych frakcji komórkowych są na niskim poziomie [72]. W liścieniach fasoli mungo ponad 5% adeniny i adenozyiny oraz 30% guanozyiny i hypoksantyny dostarczanej do tkanek nie ulega przemianom [4]. Podobny efekt zaobserwowano w przypadku kiełkujących zarodków świerka [72]. Takie zjawisko może wynikać z niepełnej hydratacji tkanki w pierwszych godzinach pęcznienia.

W miarę zaawansowania procesu kiełkowania uruchomione zostają szlaki rezerwowe. W przypadku odzyskiwania adenozyiny opisano jednoetapową reakcję kierowaną przez kinazę adenozyiny (AK) oraz reakcję dwuetapową katalizowaną przez nukleotydzę adenozyiny (ARN) i aminofosforybozylotransferazę (APRT). Oba szlaki są uruchamiane podczas kiełkowania, lecz ich aktywacja zachodzi w różnych etapach. Istnieją sugestie, że w początkowych fazach kiełkowania odzyskiwanie adenozyiny jest prowadzone głównie przez AK. Aktywność tego enzymu oznaczono w ekstraktach z liścieni łubinu (*Lupinus albus*) i fasoli [21, 51], jak również w kiełkujących zarodkach somatycznych świerka [72]. W przypadku kiełkujących zarodków pszenicy aktywność AK pozostaje na stałym poziomie [57]. Reakcja kierowana przez ARN i APRT jest uruchamiana dopiero w końcowych etapach kiełkowania, gdyż nie wykryto aktywności tych enzymów ani w suchych, ani pęczniejących nasionach łubinu [21]. U świerka aktywność ARN i APRT była wykrywalna dopiero w czwartym dniu pęcznienia [72], podczas gdy w liścieniach kiełkujących nasion łubinu aktywność ARN pojawiła się drugiego dnia, osiągając najwyższy poziom około czwartego dnia [22].

Podczas kiełkowania zaobserwowano także intensywne odzyskiwanie guaniny i guanozyiny, które zachodzi dzięki aktywności fosforybozylotransferazy guaninowej (GPRT) występującej zarówno w liścieniach, jak i stożkach wzrostu fasoli [4].

Trzeci etap w metabolizmie puryn, następujący po fazie odzyskiwania związany jest z tworzeniem ureidów, które stanowią ważne źródło azotu we wczesnych etapach kiełkowania, szczególnie u roślin strączkowych. W siewkach fasoli 60% radioaktywnej hypoksantyny jest włączane do frakcji ureidów po kilku dniach [8]. Silna degradacja tego związku jest prawdopodobnie spowodowana niską aktywnością fosforybozylotransferazy hypoksantyny (HPRT) w porównaniu z innymi enzymami szlaku rezerwowego [51], co stwierdzono podczas kiełkowania ziarniaków pszenicy (*Triticum vulgare*) [57] i nasion łubinu [21].

Ustalono także, że zmiany w metabolizmie pirymidyn są ściśle związane z etapem kiełkowania zarodka. Wyróżniono dwa odrębne etapy w metabolizmie pirymidyn: syntezę na szlaku rezerwowym zachodzącą w początkowych etapach kiełkowania oraz syntezę *de novo* w późniejszych etapach kiełkowania. W liścieniach fasoli mungo wykorzystanie uracylu i urydyny do syntezy RNA i nukleotydów zwiększa się znacząco podczas pierwszych 24 godzin kiełkowania, a obniża w późniejszych etapach [6]. Podobna sytuacja ma miejsce w kiełkujących somatycznych i zygotycznych zarodkach świerka [73]. W procesach tych odzyskiwanie urydyny jest katalizowane głównie przez kinazę urydyny (UK) jak również, w mniejszym stopniu, przez niespecyficzną fosfotransferazę, której aktywność stwierdzono także w ziarniakach kukurydzy (*Zea mays*) i pszenicy [73].

W miarę postępującego procesu kiełkowania udział szlaku rezerwowego w tworzeniu ogólnej puli nukleotydów obniża się. Mechanizm tego zjawiska nie został w pełni wyjaśniony, chociaż wiadomo, że jako końcowy etap zachodzi konwersja UMP do UDP. Zmiana tempa konwersji zasad pirymidynowych i nukleozydów do nukleotydów może wynikać ze zmiany aktywności enzymów związanych ze szlakiem rezerwowym. W kiełkujących somatycznych i zygotycznych zarodkach świerka obniżenie ilości urydyny wynika z postępującego zmniejszania się aktywności UK [70].

Spadkowi aktywności enzymów na szlaku rezerwowym w miarę zaawansowania procesu kiełkowania towarzyszy wzrost aktywności enzymów na szlaku syntezy *de novo*. Wykorzystanie orotanu do syntezy nukleotydów i kwasów nukleinowych stwierdzono w nasionach grochu (*Pisum sativum*) i kiełkujących nasionach fasoli, w kiełkujących zarodkach somatycznych świerka, jak również w kiełkujących łagiewkach pyłkowych u sosny (*Pinus silvestris*) [69]. Pojawienie się szlaku syntezy *de novo* wydaje się mieć na celu zabezpieczenie ilości nukleotydów wystarczającej do syntezy kwasów nukleinowych.

Uruchomienie mechanizmu syntezy *de novo* jest spowodowane zwiększeniem aktywności wielu enzymów włączanych w ten szlak. Zaobserwowano, iż aktywność fosforybozylotransferazy orotanowej (OPRT) niska na początku kiełkowania, wzrasta w miarę pęcznienia nasion [73]. Poza OPRT opisano także wzrost aktywności innych enzymów biorących udział w tworzeniu pierścieni pirymidynowych, takich jak: syntetaza karbamoilofosforanowa i karbamoilotransferaza asparaginianowa [39].

6.3. Rozwój pędu i organów magazynujących

Badania dotyczące metabolizmu nukleotydów oraz aktywności enzymów w organach magazynujących były prowadzone na bulwach słonecznika bulwiastego (*Helianthus tuberosus*) oraz ziemniaka (*Solanum tuberosum*). Wyizolowano i scharakteryzowano kluczowe enzymy metabolizmu nukleotydów purynowych: deaminazę AMP [38] i kinazę guanylanową [37]. W aktywnie rosnących bulwach ziemniaka synteza nukleotydów purynowych i pirymidynowych jest utrzymywana na wysokim poziomie. Podobna sytuacja ma miejsce w szlaku rezerwowym. Wydaje się, że tak wysoka aktywność enzymów szlaku rezerwowego w tworzących się bulwach jest spowodowana gwałtownymi przemianami nukleotydów i przyczynia się do dostarczania energii, jak również elementów budulcowych niezbędnych do podziałów komórkowych, czy syntezy skrobi. Chociaż nie istnieją na to bezpośrednie dowody jednak prawdopodobne jest, że niektóre nukleotydy wytwarzane w liściach mogą być transportowane do rosnących bulw. Jeżeli faktycznie taki proces ma miejsce, to występowanie i aktywność szlaku rezerwowego jest wydajnym mechanizmem tworzenia potrzebnych nukleotydów bez zbędnych nakładów energetycznych.

Po rozpoczęciu kiełkowania materiały zapasowe bulw zostają wykorzystane do wzrostu pędu i korzenia. Dotychczas nie opisano szczegółowych zmian w poziomie nukleozydów podczas kiełkowania bulw u ziemniaka, stwierdzono jedynie, że [2-¹⁴C] urydyna, [2-¹⁴C] cytydyna i [2-¹⁴C] uracyl wstrzyknięte do bulw są transportowane do pędu i w ciągu trzech dni wykorzystywane do tworzenia kwasów nukleinowych.

6.4. Hodowle komórkowe

Kultury komórkowe zawieszinowe stanowią wartościowy materiał do badania wzrostu i różnicowania się komórek roślinnych. Są one także z powodzeniem wykorzystywane do badania zmian w poziomie nukleotydów podczas wzrostu kultury komórkowej [67, 78]. Namnażanie komórek w zawieszinie zachodzi szybko w porównaniu ze wzrostem kalusa i można w nim wyróżnić kilka faz:

- (a) faza początkowa (faza lag), która trwa od przeniesienia komórek do świeżej pożywki do rozpoczęcia podziałów komórkowych,
- (b) faza wzrostu wykładniczego (eksponencjalna), w której wzrost liczby komórek jest bardzo szybki,
- (c) faza wzrostu liniowego, w której tempo wzrostu jest stałe, a przyrost liczby komórek liniowy,
- (d) faza stacjonarna (głodowa), w której komórki przestają się dzielić i rozpoczyna się okres starzenia kultury.

W każdej z tych faz zachodzą ściśle sprecyzowane procesy metaboliczne i morfologiczne [78].

Badania biochemiczne prowadzone na kulturach komórkowych różnych gatunków roślin wykazały, że zmiany stężenia nukleotydów w poszczególnych fazach mogą być sygnałem do przejścia komórek do kolejnej fazy [78]. Następujący po przeniesieniu „głodujących” komórek do świeżej pożywki, wyraźny wzrost poziomu nukleotydów był zaobserwowany u wielu badanych roślin, m.in. u barwinka różowego (*Catharanthus roseus*) [66] czy bielunia surmikwiatu (*Datura innoxia*) [40]. Wzrost ilości nukleotydów w fazie początkowej wydaje się być warunkiem rozpoczęcia fazy wykładniczej, kiedy zachodzi bardzo intensywny wzrost ilości DNA i RNA, a zapotrzebowanie na nukleotydy jest znacznie większe.

Ustalono, że ładunek energetyczny ($[ATP]+1/2[ADP] / ([ATP]+[ADP]+[AMP])$), podobnie jak aktywność oddechowa zwykle zwiększają się w pierwszych godzinach fazy początkowej; później następuje spadek aż do ustalenia się równowagi podczas fazy wzrostu liniowego i fazy stacjonarnej [40, 67]. Podczas samych podziałów komórkowych, poziom nukleotydów obniża się, podobnie jak ładunek energetyczny, co może być spowodowane wykorzystaniem ATP. W kulturach komórkowych tytoniu i soi (*Glycine max*) nie zaobserwowano jednak znaczącego spadku ilości ATP. W końcowej fazie wzrostu liniowego i fazy stacjonarnej zawartość nukleotydów osiąga niski, lecz stały poziom. Wydaje się więc, że w tych etapach nie zachodzi synteza, a jedynie degradacja nukleotydów do nukleozydów.

Podczas wzrostu kultury komórkowej pojawiają się różnice jakościowe w ogólnej puli nukleotydów. Porównanie nukleotydów w komórkach uzyskanych z różnych gatunków, np. bielunia [40] czy tytoniu [41], pozwala zaobserwować pewną prawidłowość. Najmniej liczną frakcją stanowi pula cytozyny (mniej niż 3%), a największą uracylu (więcej niż 50%) z kompleksem UDP-glukoza jako główną frakcją [78]. Wysoka ilość UDP-glukozy, a także dodatkowe zwiększanie się jego ilości w fazie wykładniczej, może mieć istotne znaczenie podczas tworzenia ściany komórkowej. Kolejne badania wykazały stały stosunek ilości uracylu względem adeniny. Taka zależność wskazuje na

istnienie mechanizmu regulacyjnego, który kontroluje endogenne poziomy nukleotydów purynowych i pirymidynowych.

Jak wspomniano, najwyższe nasilenie syntezy nukleotydów występuje w fazie początkowej. Pomiar poziomu nukleotydów w komórkach bielunia, co 6 godzin po inokulacji do nowej pożywki, pozwolił stwierdzić, że synteza nukleotydów zachodzi w dwóch etapach. Pierwszy z nich związany jest z odzyskiwaniem nukleotydów podczas fazy początkowej, natomiast w fazie wykładniczej zachodzi właściwa synteza polegająca na aktywacji enzymów szlaków biosyntezy *de novo* [40].

Opóźnienie w pojawieniu się syntezy *de novo* może być związane z początkowym brakiem aktywności enzymów biorących udział w syntezie puryn i pirymidyn. Aktywność syntetazy PRPP, syntetazy karbamoilofosforanowej i fosforybozylotransferazy orotanowej (OPRT) jest największa podczas fazy podziałów komórkowych barwinka [28]. Podobny efekt zaobserwowano w przypadku aktywności enzymów syntezy puryn, np. syntetazy rybonukleotydu glicynoamidu w komórkach marchwi [9].

7. METABOLIZM NUKLEOTYDÓW A CZYNNIKI ŚRODOWISKOWE

U wielu gatunków roślin, np. kukurydzy, papryki (*Capsicum annuum*), krokosza (*Carthamus tinctorius*) czy mangrowców, np. *Sonneratia alba* [3, 49], następują zmiany w syntezie i wykorzystaniu nukleotydów, szczególnie ATP, w odpowiedzi na wysokie stężenie soli w środowisku. Wydaje się, że warunki stresowe powodują obniżenie ogólnej puli nukleotydów oraz wzrost ładunku energetycznego. U *Sonneratia* ładunek ten wynosił 0,82 przy stężeniu NaCl 100 mmol/L, podczas gdy u roślin kontrolnych 0,72 [3]. Wyniki te wskazują na obecność aktywnej kinazy adeninowej, która jest odpowiedzialna za zwiększanie wewnątrzkomórkowego stężenia ATP. Wysoki poziom ATP może być potrzebny do usuwania NaCl z cytozolu na zewnątrz komórki i/lub do wakuoli.

Jednocześnie wykazano, że w kulturach komórkowych *Sonneratia* traktowanych NaCl niski poziom degradacji puryn pozwala na akumulację zasad i nukleotydów oraz wykorzystanie ich do syntezy nukleotydów. Taka strategia może być wydajnym mechanizmem adaptacji do stresu solnego [3].

Utrzymanie równowagi jonowej i osmotycznej w całej komórce wymaga sprawnej wymiany substancji między wakuolą a cytoplazmą. Uczestniczą w niej osmoprotektanty. Są to różne łatwo rozpuszczalne związki, tj. cukry i ich pochodne czy substancje zawierające azot (prolina oraz betaina). W przeciwieństwie do roślin mangrowych, u których poziom sorbitolu czy mannitolu jest wysoki, *Avicennia maina* gromadząca betainę glicyny wykazuje inny sposób metabolizmu adenozyliny. Szlak biosyntezy betainy glicyny z fosfoetanoloaminy obejmuje trzy etapy metylacji, a SAM (S-adenozyl-L-metionina) jest wykorzystywana jako donator grup metylowych. W procesie tym SAM ulega przemianom do SAH (S-adenozyl-L-homocysteiny), która następnie jest hydrolizowana do L-homocysteiny i adenozyliny. Hydrolaza SAH katalizuje zarówno

syntezę, jak i hydrolizę SAH. Ponieważ SAH jest potencjalnym inhibitorem reakcji, usunięcie go jest istotnym etapem w biosyntezie betainy glicyny. Prawdopodobnie z tego powodu, bardzo aktywna nukleotyda adenozyne jest obecna w komórkach *Avicennia marina*, a 16–50% egzogennie dostarczonej [8-¹⁴C] adenozyne jest odzyskiwane jako adenina. Odzyskiwanie adenozyne jest bardzo efektywne u drzew mangrowych, co może być wydajnym sposobem pozyskiwania ATP. Ponadto wysoka aktywność nukleotyda adenozyne może być związana u roślin mangrowych, produkujących betainę glicyny, z ciągłym dostarczaniem grup metylowych niezbędnych do biosyntezy osmotyków cytoplazmatycznych [12].

Istnieją także dane wskazujące, że aktywacja kinazy adenozyne i nukleotyda adenozyne następuje w odpowiedzi na stres solny [75]. Zaobserwowano, że u szpinaku (*Spinacia oleracea*) i buraka cukrowego (*Beta vulgaris*), poddanych stresowi solnemu, akumulacja transkryptu, podobnie jak aktywność kinazy adenozyne, znacznie wzrastają. Ten wzrost był połączony z syntezą betainy glicyny w odpowiedzi na wysokie stężenie soli. Wydaje się zatem, że usunięcie adenozyne jest niezbędne do podtrzymania zależności od SAM aktywności metylotransferazy, a kinaza adenozyne i/lub nukleotyda adenozyne odgrywają w tym istotną rolę [43, 75].

Poprzez analogię do reakcji wywoływanych przez stres solny jest wielce prawdopodobne, że w warunkach deficytu wodnego także następują zmiany w zawartości nukleotydów i aktywności enzymów.

Różnice w regulacji biosyntezy pirymidyn wywołane stresem wodnym stwierdzono jedynie w siewkach manneczki łękowatej (*Eleusine coracana*). Zahamowanie aktywności enzymu karbamoiltransferazy asparaginianowej przez UMP u roślin kontrolnych ustępowało w siewkach poddanych stresowi wodnemu [29]. Jednakże fizjologiczne znaczenie tej zmiany nie jest znane.

PODSUMOWANIE

Nie ulega wątpliwości, że nukleotydy odgrywają doniosłą rolę w metabolizmie wszystkich komórek. Ostatnie lata przyniosły znaczący postęp w badaniach nad metabolizmem nukleotydów w komórkach roślinnych. Wydaje się, że układy generujące przemiany nukleotydów u roślin są podobne do tych, jakie scharakteryzowano w układach zwierzęcych i u mikroorganizmów. Pojawiające się różnice są związane jedynie z syntezą nukleotydów na szlakach rezerwowych.

Pomimo nasilenia tych badań, wciąż wiele elementów szlaków metabolicznych pozostaje nieznanych – szczególnie dotyczy to enzymów biorących udział w głównych przemianach. Posiadana przez nas wiedza pozwala jednak zauważyć, iż prawidłowe funkcjonowanie komórki roślinnej wymaga ciągłej przemiany nukleotydów, a układy generujące przemiany nukleotydów są aktywowane na poszczególnych etapach wzrostu i rozwoju.

LITERATURA

- [1] ABUSAMHADNEH E, McDONALD NE, KLINE PC. Isolation and characterization of adenosine nucleosidase from yellow lupin (*Lupinus luteus*). *Plant Sci* 2000; **153**: 25–32.
- [2] ACHAR BS, VAIDYANATHAN CS. Purification and properties of uridinehydrolase from mung-bean (*Phaseolus radiatus*) seedlings. *Arch Biochem Biophys* 1967; **119**: 356–362.
- [3] AKATSU M, HOSOI Y, SASAMOTO H, ASHIHARA H. Purine metabolism in cells of a mangrove plant, *Sonneratia alba*, in tissue culture. *J Plant Physiol* 1996; **149**: 133–137.
- [4] ASHIHARA H. Changes in activities of purine salvage and ureide synthesis during germination of black gram (*Phaseolus mungo*) seeds. *Z Pflanzenphysiol* 1983; **113**: 47–60.
- [5] ASHIHARA H, CROZIER A. Biosynthesis and metabolism of caffeine and related purine alkaloids in plants. *Adv Bot Res* 1999; **30**: 118–205.
- [6] ASHIHARA H, KAMEYAMA Y. Biosynthesis of pyrimidines during germination of black gram seeds: Changes in the level of participant enzymes. *Curr Sci* 1989; **58**: 889–891.
- [7] ASHIHARA H, LOUKANINA N, STASOLLA C, THORPE TA. Pyrimidine metabolism during somatic embryo development in white spruce (*Picea glauca*). *J Plant Physiol* 2001b; **158**: 613–621.
- [8] ASHIHARA H, NOBUSAWA E. Metabolic fate of [8-¹⁴C]adenine and [8-¹⁴C]hypoxanthine in higher plants. *Z Pflanzenphysiol* 1981; **104**: 443–458.
- [9] ASHIHARA H, NYGAARD P. Purine nucleotide synthesis and RNA synthesis in suspension cultured cells of carrots. *Physiol Plant* 1989; **75**: 31–36.
- [10] ASHIHARA H, STASOLLA C, LOUKANINA N, THORPE TA. Purine and pyrimidine metabolism in cultured white spruce (*Picea glauca*) cells: Metabolic fate of ¹⁴C-labeled precursors and activity of key enzymes. *Physiol Plant* 2000; **108**: 25–33.
- [11] ASHIHARA H, STASOLLA C, LOUKANINA N, THORPE TA. Purine metabolism during white spruce somatic embryo development: salvage of adenine, adenosine, and inosine. *Plant Sci* 2001a; **160**: 647–657.
- [12] ASHIHARA H, WAKAHARA S, SUZUKI M, KATO A, SASAMOTO H, BABA S. Comparison of adenosine metabolism in leaves of several mangrove plants and a poplar species. *Plant Physiol Biochem* 2003; **41**: 133–139.
- [13] ATKINS CA, SHELPH BJ, STORER PJ. Purification and properties of inosine monophosphate oxidoreductase from nitrogen-fixing nodules of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Arch Biochem Biophys* 1985; **236**: 807–814.
- [14] BRESSAN RA, MURRY MG, GALE JM, ROSS CW. Properties of pea seedling uracil phosphoribosyltransferase and its distribution in other plants. *Plant Physiol* 1978; **61**: 442–446.
- [15] BURCH LR, STUCHBURY T. Metabolism of purine nucleotides in the tomato plant. *Phytochemistry* 1968; **25**: 2445–2449.
- [16] CARTER SG, TIPTON CL. Purification and characterization of a 5'-nucleotidase from *Zea mays* microsomes. *Phytochemistry* 1985; **25**: 33–37.
- [17] CHRISTOPHERSON RI, SZABADOS E. Nucleotide biosynthesis in mammals. [w] Agius L, Sherratt HSA [red.] Channelling in Intermediary Metabolism. London, Portland Press, 1997: 315–335.
- [18] COMBES A, LAFLRURIEL J, LeFLOC'H F. The inosine-guanosine kinase activity of mitochondria in tubers of Jerusalem artichoke. *Plant Physiol Biochem* 1989; **27**: 729–736.
- [19] DANCER JE, HUGHES RG, LINDELL SD. Adenosine-5'-phosphate deaminase. A novel herbicide target. *Plant Physiol* 1997; **114**: 119–129.
- [20] DENG QI, IVES DH. Non-allosteric regulation of the uridine kinase from seeds of *Zea mays*. *Biochim Biophys Acta* 1975; **377**: 84–94.
- [21] GURANOWSKI A, BARANKIEWICZ J. Purine salvage in cotyledons of germinating lupin seeds. *FEBS Lett* 1979; **104**: 95–98.
- [22] GURANOWSKI A, PAWELKIEWICZ J. Adenosylhomocysteinase and adenosine nucleosidase activities in *Lupinus luteus* cotyledons during seed formation and germination. *Planta* 1978; **139**: 245–247.
- [23] GURANOWSKI A. Purine catabolism in plants. Purification and some properties of inosine nucleosidase from yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) seeds. *Plant Physiol* 1982; **70**: 344–349.
- [24] HATCH MD. Adenylosuccinate synthetase and adenylosuccinate lyase from plant tissues. *Biochem J* 1966; **98**: 198–203.
- [25] HENDERSON JF, PATERSON ARP. Nucleotide Metabolism – An Introduction, Academic Press, New York, 1973.

- [26] HIROSE F, ASHIHARA H. Adenine phosphoribosyltransferase of *Catharanthus roseus* cells: purification, properties and regulation. *Z Pflanzenphysiol* 1983; **110**: 135–145.
- [27] IWAI K, FUJISAWA Y, SUZUKI N. The accumulation of 5'-phosphoribosyl-5-aminoimidazole-carboxamide in folate-deficient pea seedlings and enzymatic reaction in which the compound is involved. *Agric Biol Chem* 1972; **36**: 398–408.
- [28] KANAMORI I, ASHIHARA H, KOMAMINE A. Changes in the activities of the pentose phosphate nucleotide biosynthesis during growth of *Vinca rosea* in suspension culture. *Z Pflanzenphysiol* 1979; **93**: 437–448.
- [29] KANDPAL RP, RAO A. Water stress-induced desensitization of aspartate transcarbamylase from ragi (*Eleusine coracana*) seedlings. *Biochem Int* 1984; **9**: 307–314.
- [30] KRATH BN, HOVE-JENSEN B. Organellar and cytosolic localization of four phosphoribosyl diphosphate isoenzymes in spinach. *Plant Physiol* 1999; **119**: 497–505.
- [31] LAZAR G, ZHANG H, GOODMAN HM. The origin of the bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase isogenes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 1993; **3**: 657–668.
- [32] LEE D, MOFFATT BA. Purification and characterization of adenine phosphoribosyl transferase from *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 1993; **87**: 483–492.
- [33] LeFLOC'H F, GUILLOT A. La desoxycytidine amimohydrolase des feuilles de *Zea mays*. *Phytochemistry* 1974; **13**: 2503–2509.
- [34] LeFLOC'H F, LAFLEURIEL J. L'adeninephosphoribosyltransferase des pousses de topinambour *Helianthus tuberosus*. *Phytochemistry* 1978; **17**: 643–646.
- [35] LeFLOC'H F, LAFLEURIEL J. The purine nucleosidases of Jerusalem artichoke shoots. *Phytochemistry* 1981; **20**: 2127–2129.
- [36] LeFLOC'H F, LAFLEURIEL J. L' hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase des pousses de Topinambour *Helianthus tuberosus* L. *Z Pflanzenphysiol* 1983; **104**: 331–340.
- [37] LeFLOC'H F, LAFLEURIEL J. Purification and properties of guanylate kinase of mitochondria from tubers of Jerusalem artichoke. *Plant Physiol Biochem* 1990; **28**: 191–201.
- [38] LeFLOC'H F, LAFLEURIEL J. The particulate AMP aminohydrolase of Jerusalem artichoke tubers: partial purification and properties. *Physiol Veg* 1983; **21**: 15–27.
- [39] MAZUS B, BUCHOWICZ J. Activity of the enzymes involved in pyrimidine metabolism in germinating wheat grains. *Phytochemistry* 1972; **11**: 77–82.
- [40] MEYER R, WAGNER KG. Nucleotide pools in suspension-cultured cells of *Datura innoxia* I. Changes during growth of the batch culture. *Planta* 1985a; **166**: 439–445.
- [41] MEYER R, WAGNER KG. Analysis of the nucleotide pool during growth of suspension cultured cells of *Nicotiana tabacum* by high performance liquid chromatography. *Physiol Plant* 1985b; **65**: 439–445.
- [42] MIERSCH J, KRAUSS GJ, METZGER U. Properties and subcellular localization of dihydroorotate dehydrogenase in cells of tomato suspension culture. *J Plant Physiol* 1986; **122**: 55–66.
- [43] MOFFATT BA, ASHIHARA H. Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and metabolism. *Arabidopsis* Book. 2nd Edition, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD 2002.
- [44] MOFFATT BA, SOMERVILLE CR. Positive selection for male-sterile mutants of *Arabidopsis* lacking adenine phosphoribosyltransferase activity. *Plant Physiol* 1988; **86**: 1150–1154.
- [45] MOFFATT BA, WANG L, ALLEN MS, STEVENS YY, QIN W, SNIDER J, VON SCGWARTZENVERG K. Adenosine kinase of *Arabidopsis*. Kinetic properties and gene expression. *Plant Physiol* 2000; **124**: 1775–1785.
- [46] NAGISHI O, OZAWA T, IMAGAWA H. Guanosine deaminase and guanine deaminase from tea leaves. *Biosci Biotech Biochem* 1994; **58**: 1277–1281.
- [47] NEUHARD J, KELLN RA. Biosynthesis and conversion of pyrimidines. [w] Neidhardt J [red.] *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* Cellular and Molecular Biology, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1996: 580–599.
- [48] NEWMAN T, deBRUIJN FJ, GREEN P, KEEGSTRA K, KENDE H, McINTOSH L, OHLROGGE J, RAIKHEL N, SOMERVILLE S, THOMASHOW M, RETZEL E, SOMERVILLE C. Genes galore: a summary methods for accessing results from large-scale partial sequencing *Arabidopsis* cDNAs clones. *Plant Physiol* 1994; **106**: 1241–1255.
- [49] NIEMAN RH, CLARK RA, PAP D, OGATA G, MASS EV. Effects of salt stress on adenine and uridine nucleotide pools, sugar and acid-soluble phosphate in shoot of pepper and safflower. *J Exp Bot* 1988; **39**: 301–309.
- [50] NISHIMURA K, ASHIHARA H. IMP dehydrogenase from tea leaves and suspension-cultured *Catharanthus roseus* cells. *Phytochemistry* 1993; **34**: 613–615.

- [51] NOBUSAWA E, ASHIHARA H. Purine metabolism in cotyledons and embryonic axes of black gram (*Phaseolus mungo* L.) seedlings. *Int J Biochem* 1983; **15**: 1059–1065.
- [52] O'NEAL T, NAYLOR AW. Some regulatory properties of pea carbamoyl phosphate synthetase. *Plant Physiol* 1976; **57**: 23–28.
- [53] ONG BL, JACKSON JF. Pyrimidine nucleotide biosynthesis in *Phaseolus aureus*. Enzymic aspects of the control of carbamoyl phosphate synthesis and utilization. *Biochem J* 1972; **129**: 583–593.
- [54] PARDO EG, GUTIERREZ C. Cell cycle- and differentiation stage-dependent variation of dUTPase activity in higher plant cells. *Exp Cell Res* 1990; **186**: 90–98.
- [55] PRADE L, COWAN-JACOB SW, CHEMLA P, POTTER S, WARD E, FONNE-PFISTER R. Structures of adenylosuccinate synthetase from *Triticum aestivum* and *Arabidopsis thaliana*. *J Mol Biol* 2000; **296**: 569–577.
- [56] PRASHER DC, CARR MC, IVES DH, TSAI TC, FREY PA. Nucleoside phosphotransferase from barley. Characterization and evidence for ping pong kinetics involving phosphoryl enzyme. *J Biol Chem* 1982; **257**: 4931–4939.
- [57] PRICE CE, MURRAY AW. Purine metabolism in germinating wheat embryos. *Biochem J* 1969; **115**: 129–133.
- [58] RAO GSJ, SAVITHRI HS, SEETHALAKSHMI S, RAO NA. Plant aspartate transcarbamylase: An affinity chromatographic method for the purification of the enzyme from germinated seedlings. *Anal Biochem* 1979; **95**: 401–405.
- [59] REYNOLDS PH, BLEVINS DG, RANDAL DD. 5-phosphoribosylpyro-phosphate amidotransferase from soybean root nodules: kinetic and regulatory properties. *Arch Biochem Biophys* 1984; **229**: 623–631.
- [60] SANCHEZ F, CAMPOS F, BONNEVILLE J-M, ENRIQUEZ C, CAPUT D. Purification, cDNA cloning, and development expression of the nodule-specific uricase from *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol* 1987; **84**: 1143–1147.
- [61] SANTOSO D, THORNBURG R. Uridine 5'-monophosphate synthase is transcriptionally regulated by pyrimidine levels in *Nicotiana glauca*. *Plant Physiol* 1998; **116**: 815–821.
- [62] SAWERT A, BACKER AI, WAGNER KG. Age-dependent decrease of nucleoside pools in cereal leaves. *Plant Cell Physiol* 1988; **29**: 61–65.
- [63] SCHUBERT KR, BOLAND MJ. The ureides. [w] Stump PK, Conn EE [red.] *The Biochemistry of Plants*. Vol 6, Academic Press, San Diego 1990: 197–282.
- [64] SENECOFF FJ, MCKINNEY EC, MEAGHER RB. *De novo* purine synthesis in *Arabidopsis thaliana* II. The *PUR7* gene encoding 5'-phosphoribosyl-(N-succinocarboxamide)-5-aminoimidazole synthetase is expressed in rapidly dividing tissues. *Plant Physiol* 1996; **112**: 905–917.
- [65] SENECOFF FJ, MEAGHER RB. Isolating the *Arabidopsis thaliana* gene for the *de novo* purine synthesis by suppression of *Escherichia coli* mutants. I. 5'-phosphoribosyl-5-aminoimidazole synthetase. *Plant Physiol* 1993; **102**: 387–399.
- [66] SHIMAZAKI A, ASHIHARA H. Adenine and guanine salvage in cultured cells of *Catharanthus roseus*. *Ann Bot* 1982; **50**: 531–534.
- [67] SHIMAZAKI A, HIROSE F, ASHIHARA H. Changes in adenine nucleotide levels and adenine salvage during growth of *Vinca rosea* cells in suspension culture. *Z Pflanzenphysiol* 1982; **106**: 191–198.
- [68] STASOLLA C, KATAHIRA R, THORP TA, ASHIHARA H. Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants. *J Physiol Plant* 2003; **160**: 1271–1295.
- [69] STASOLLA C, LOUKANINA N, ASHIHARA H, YEUNG EC, THORP TA. Pyrimidine deoxyribo-nucleotide metabolism during maturation and germination of white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos: metabolic fate of ¹⁴C-labeled cytidine, deoxycytidine and thymidine. *Physiol Plant* 2003; **118**: 499–506.
- [70] STASOLLA C, LOUKANINA N, ASHIHARA H, YEUNG EC, THORP TA. Pyrimidine nucleotide biosynthesis and nucleic acid metabolism in embryos and megagametophytes of white spruce (*Picea glauca*) during germination. *Physiol Plant* 2002; **115**: 155–165.
- [71] STASOLLA C, LOUKANINA N, ASHIHARA H, YEUNG EC, THORPE TA. Purine and Pyrimidine metabolism during the partial drying treatment of white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. *Physiol Plant* 2001a; **111**: 93–101.
- [72] STASOLLA C, LOUKANINA N, ASHIHARA H, YEUNG EC, THORP TA. Ascorbic acid changes the pattern of purine metabolism during germination of white spruce somatic embryos. *Tree Physiol* 2001b; **21**: 359–367.
- [73] STASOLLA C, LOUKANINA N, ASHIHARA H, YEUNG EC, THORP TA. Changes in pyrimidine nucleotide biosynthesis during germinating of white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 2001c; **37**: 285–292.

- [74] STERLY F, REGAN S, KARLSSON J, HERTZBERG M, ROHDE A, HOLMBERG A, AMINI B, BHALE-RADO R, LARSSON M, VILLARROEL R, VAN MONTAGU M, SANDBERG G, OLSSON O, TERRIT, BOERJAN W, GUSTAFSSON P, UHLEN M, SUNDBERG B, LUNDEBERG J. Gene discovering in the wood-forming tissue of poplar: analysis of 5,692 expressed sequenced tags. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **95**: 13330–13335.
- [75] SUZUKI T, YASUMOTO E, BABA S, ASHIHARA H. Effect of salt stress on the metabolism of ethanolamine and choline in leaves of the betaine-producing mangrove species *Avicennia marina*. *Phytochemistry* 2003; **64**: 941–948.
- [76] TRIPLETT EW, BLEWINS DG, RANDALL DD. Purification and properties of soybean nodule xanthine dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* 1982; **219**: 39–46.
- [77] VINCENZETTI S, CAMBI A, NEUHARD J, SCHNORR K, GRELLONI M, VITA A. Cloning, expression, and purification of cytidine deaminase from *Arabidopsis thaliana*. *Protein Express Puri* 1999; **15**: 8–15.
- [78] WAGNER KG, BACKER AI. Dynamics of nucleotides in plants studied on a cellular basis. [w]: Jeon KW, Friedlander M [red.] International Review of Cytology. Vol 134, Academic Press, San Diego 1992: 1–84.
- [79] WALSH TA, GREEN SB, LARRINUA IM, SCHMITZER PR. Characterization of plant β -ureidopropionase and functional over expression in *Escherichia coli*. *Plant Physiol* 2001; **125**: 1001–1011.
- [80] WALTHER R, WALD K, GLUND K, TEWES A. Evidence that a single polypeptide catalyzes the two step conversion of orotate to UMP in cells from tomato suspension culture. *J Plant Physiol* 1984; **116**: 301–311.
- [81] WASTERNAK C. Metabolism of pyrimidines and purines. [w] Pirson A, Zimmermann MH [red.] Encyclopedia of Plant Physiology, New Ser, Vol 14B, Springer, Berlin 1982: 263–301.
- [82] WILLIAMSON CL, LAKE MR, SLOCUM RD. A. cDNA encoding carbamoyl phosphate synthetase large subunit (carB) from *Arabidopsis* (Accession No. U40341) (PGR96-055). *Plant Physiol* 1996; **111**: 1354.
- [83] WILLIAMSON CL, SLOCUM RD. Molecular cloning and characterization of the pyrB1 and pyrB2 genes encoding aspartate transcarbamoylase in pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol* 1994; **105**: 377–384.
- [84] YABUKI N, ASHIHARA H. AMP deaminase and the control of adenylate catabolism in suspension-cultured *Catharanthus roseus* cells. *Phytochemistry* 1992; **31**: 5–1909.
- [85] ZHOU L, LACROUTE F, THORNBURG R. Cloning, expression in *Escherichia coli*, and characterization of *Arabidopsis thaliana* UMP/CMP kinase. *Plant Physiol* 1998; **117**: 245–254.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 16.06.2004 r.

Przyjęto: 10.11.2004 r.

Adres autora: ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń.

e-mail: asjawors@biol.uni.torun.pl

NERWIAK ZARODKOWY (NEUROBLASTOMA) – ZNACZENIE WYNIKÓW BADAŃ CYTOGENETYCZNYCH I MOLEKULARNYCH W USTALENIU STRATEGII LECZENIA I ROKOWANIA*

NEUROBLASTOMA – THE SIGNIFICANCE OF CYTOGENETIC
AND MOLECULAR FACTORS IN THE ASSESSMENT
OF THE STRATEGY OF TREATMENT AND PROGNOSIS

Beata Stefania LIPSKA**, Janusz LIMON

Katedra i Zakład Biologii i Genetyki, Akademia Medyczna w Gdańsku

Streszczenie: Praca przedstawia najnowsze poglądy z zakresu biologii nerwiaka zarodkowego (neuroblastoma) szczególną uwagę poświęcając możliwościom wykorzystania czynników molekularnych i cyto-genetycznych w ustalaniu strategii leczenia i rokowania pacjentów chorych na ten nowotwór. Ponadto zaprezentowany został genetyczny model onkogenezy tego nowotworu oraz jego zastosowanie w procesie stratyfikacji pacjentów do grup ryzyka nawrotu choroby.

Słowa kluczowe: nerwiak zarodkowy, czynniki rokownicze, aberracje chromosomowe, amplifikacja *MYCN*, apoptoza, geny oporności wielolekowej, telomeraza, receptory dla neurotrofin, geny supresorowe.

Summary: This review discusses recent advances in the understanding of the biology of neuroblastoma, particular attention is paid to the emerging molecular and cytogenetic factors used to determine the strategy of treatment and prognosis in patients with this tumour. In addition, the genetic model of neuroblastoma development and its application in the process of stratification of patients into risk groups is presented.

Key words: neuroblastoma, prognostic factors, chromosomal aberrations, *MYCN* amplification, apoptosis, multidrug resistance genes, telomerase, neurotrophin receptors, tumour suppressor genes.

*Praca finansowana w ramach projektu KBN nr 6 P05E 09121 oraz częściowo ze środków Fundacji Bankowej im. L. Kronenberga.**Słuchaczka Studium Medycyny Molekularnej przy Akademii Medycznej w Warszawie.

WSTĘP

Nerwiak zarodkowy (neuroblastoma) jest najczęstszym dziecięcym guzem litym zlokalizowanym poza ośrodkowym układem nerwowym, stanowiącym około 50% wszystkich nowotworów rozpoznawanych w wieku niemowlęcym. Nowotwór ten wyróżnia się nadzwyczaj szerokim spektrum przebiegu klinicznego, od samoistnej regresji zmian poprzez spontaniczne lub indukowane dojrzewanie w kierunku zwojakonerwiaka (ganglioneuroma), aż do dramatycznej progresji choroby pomimo zastosowanego agresywnego leczenia. Niemowlęta, nawet w przypadku zaawansowanej choroby, mają bardzo dobre rokowanie, natomiast u dzieci starszych mimo intensywnych i złożonych protokołów leczniczych wciąż z trudnością udaje się zatrzymać progresję choroby [1].

Najnowsze doniesienia z zakresu genetyki i biologii nerwiaka zarodkowego są pomocne w znajdowaniu nowych czynników prognostycznych, które, wprowadzone do codziennej praktyki klinicznej, ułatwiłyby stratyfikację pacjentów na grupy niskiego, średniego lub wysokiego ryzyka oraz zoptymalizowały dobór strategii leczenia. Przy ustalaniu rokowania, oprócz danych klinicznych i histopatologicznych, uwzględnia się obecnie profil genetyczny guza obejmujący stopień ploiddii komórek guza, obecność amplifikacji onkogenu *MYCN* oraz występowanie charakterystycznych aberracji chromosomowych. Wydaje się, że w najbliższej przyszłości do panelu badań prognostycznych zostanie również włączona ocena parametrów molekularnych, np. ocena stopnia ekspresji genów kodujących białka z rodziny receptorów dla neurotrofin, pomiar aktywności telomerazy czy też ekspresji genów oporności wielolekowej *MDR1* i *MRP*.

Do najważniejszych klasycznych czynników rokowniczych zalicza się klasyfikację histologiczną *International Neuroblastoma Pathology Classification* (INPC) z 1999 roku [47]. Klasyfikacja INPC określa budowę histologiczną guza jako korzystną lub niekorzystną w zależności od stopnia zróżnicowania komórek oraz obecności komórek podścieliska zgodnie z historyczną klasyfikacją Shimada (w 1984 Shimada jako pierwszy uznał liczebność komórek podścieliska (komórek Schwanna) za główny parametr odzwierciedlający stopień zróżnicowania guza). Dodatkowo INPC zaleca ocenę stopnia atypii jąder komórkowych (MKI: *mitosis-karyorrhexis index*), indeksu mitotycznego oraz obecności ognisk wapnienia będących histologicznymi czynnikami rokowniczymi. Ważnym uzupełnieniem histopatologicznej oceny agresywności nowotworu są badania określające profil genetyczny guza, a ich wspólna analiza może okazać się nadzwyczaj użytecznym narzędziem przy podejmowaniu decyzji o wyborze leczenia. W niniejszej pracy scharakteryzowane zostaną czynniki genetyczne i markery molekularne wykazujące już udokumentowane, jak i potencjalne znaczenie w ustalaniu rokowania pacjentów z rozpoznaniem nerwiaka zarodkowego. Ponadto przedstawiony zostanie genetyczny model tego nowotworu, który poprzez ukazanie wzajemnych powiązań pomiędzy różnymi elementami profilu genetycznego podejmuje próbę wyjaśnienia procesu onkogenezy tego nowotworu.

W odróżnieniu od nowotworów pochodzenia nabłonkowego, zwłaszcza gruczolakoraków jelita grubego, dla których zaproponowano szczegółowy, wieloetapowy model onkogenezy [11], w przypadku nerwiaka zarodkowego pomimo szczegółowej charakte-

rystyki genetycznej, uwzględnianej w procesie terapeutycznym i rokowniczym, patogeneza procesu nowotworowego pozostaje nadal niejasna. Obserwowane zmiany w profilu genetycznym są różnorodne i do dziś nie udało się wytypować tej jednej, kluczowej dla inicjacji procesu nowotworowego.

Predyspozycja genetyczna

U dzieci chorych na nerwiaka zarodkowego nie stwierdza się charakterystycznych cech dysmorficznych ani częstszego występowania wad wrodzonych [60]. Niewielki odsetek (1–2%) rodzin pacjentów wykazuje autosomalny dominujący charakter predyspozycji genetycznej zachorowania na ten nowotwór o wysokiej penetracji (MIM 256700) [60]. W rodzinach tych średnia wieku w momencie rozpoznania jest znacząco niższa w porównaniu z przypadkami występującymi sporadycznie: 14 miesiąc życia wobec 23 miesięcy. Ponadto pierwotnie wielogniskową lokalizację choroby spotyka się w 25% przypadków dziedzicznego nerwiaka zarodkowego. Pacjentów z rodzinnie występującym nowotworem charakteryzuje ta sama różnorodność przebiegu klinicznego co pacjentów ze sporadycznym guzem: obserwuje się zarówno przypadki spontanicznej regresji, jak i wysokiej agresywności nowotworu w obrębie członków tej samej rodziny [36].

W historycznej pracy z 1972 roku Knudson i Strong oszacowali, iż do 22% przypadków nerwiaka zarodkowego może być wynikiem mutacji generatywnej nieznanego genu supresorowego [30]. Pomimo iż od ogłoszenia wyników analizy statystycznej potwierdzających zgodność mechanizmu onkogenezy nerwiaka zarodkowego z hipotezą dwuuderzeniowej mutacji Knudsona upłynęło już ponad 30 lat, dotychczas nie udało się zidentyfikować żadnego genu supresorowego, którego mutacja odpowiadałaby za inicjację transformacji nowotworowej. Na podstawie analizy sprzężeń w obrębie rodzin z dziedziczną postacią nerwiaka zarodkowego wykluczono lokalizację tego genu w regionie chromosomu 1p36, który ulega częstym rearanżacjom w guzach (35% przypadków sporadycznych) [33]. Najnowsze doniesienia wskazują na region chromosomu 16p12-13 jako potencjalny locus tego genu [36].

CYTOGENETYKA

Znacząca większość przypadków nerwiaka zarodkowego występuje sporadycznie. W ich patogenezie kluczową rolę odgrywają somatyczne zmiany genetyczne na poziomie genów, jak i chromosomów, będąc obszarem zainteresowania zarówno cytogenetyki, jak i biologii molekularnej.

Ploidia DNA

Zawartość DNA w komórkach nowotworowych jest w praktyce klinicznej jednym z najszerszej stosowanych wskaźników cytogenetycznych dla określenia prawdopodobieństwa przeżycia pacjentów z rozpoznaniem nerwiaka zarodkowego. Klasyczna analiza cytogenetyczna aberracji chromosomowych udaje się tylko w 20–30% pierwot-

nych guzów [32], dlatego też do oceny zawartości DNA w komórkach najczęściej wykorzystuje się półautomatyczną metodę cytometrii przepływowej, która jednak nie pozwala ocenić ewentualnych zmian w strukturze chromosomów.

W przypadku niemowląt stwierdzenie triploidalnej ($\sim 3n$) liczby chromosomów oznacza istotnie lepsze rokowanie w porównaniu z pacjentami tej samej grupy wiekowej z diploidalną ($\sim 2n$) lub tetraploidalną ($\sim 4n$) ich liczbą [31]. Niestety, w przypadku starszych dzieci, ploidia DNA traci moc prognostyczną. Prawdopodobnie związane jest to z powstawaniem dodatkowych zmian genetycznych w komórce polegających na występowaniu aberracji strukturalnych, przede wszystkim dotyczących chromosomu 1p oraz obecności często licznych acentrycznych, podwójnych, małych chromosomów – *double minutes (dmin)* [27].

Aberracje chromosomowe

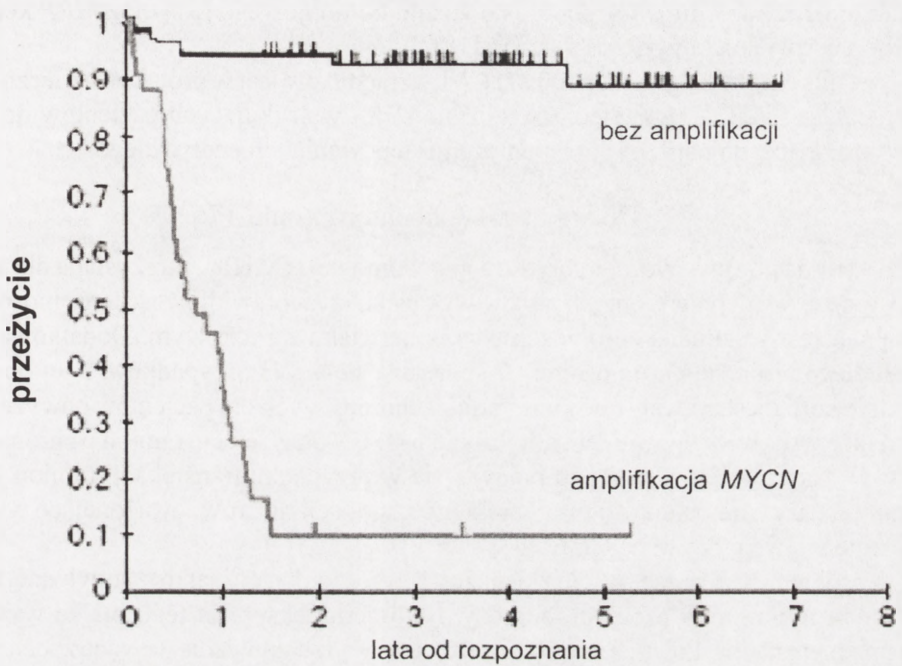
W przeciwieństwie do innych nowotworów wieku dziecięcego, trudno jest wskazać charakterystyczną aberrację chromosomową czy mutację genową, która mogłaby być czynnikiem wywołującym kaskadę zdarzeń na poziomie molekularnym prowadzących do niepohamowanego rozrostu komórek nowotworowych. Poszukiwanie analogii do innych guzów litych, jak np. mięsak Ewinga, gdzie opisywane aberracje strukturalne swoiście dotyczą translokacji chromosomu 11 i chromosomu 22 $t(11;22)(q24;q12)$ formując gen fuzyjny *EWS/FLI*, nie przyniosło konstruktywnych wyników. Najczęściej spotykane w komórkach nerwiaka zarodkowego aberracje chromosomowe to dodatkowa kopia chromosomu 17q [4,5] oraz delecje chromosomów 1p [37] i 11q [17]. Zmiany te pojawiają się na różnych etapach onkogenezy i żadna z nich nie może być uważana za zmianę o charakterze pierwotnym, inicjującym proces nowotworowy.

Amplifikacja onkogenu *MYCN*

Charakterystyka cytogenetyczna niektórych guzów wykazała obecność acentrycznych chromosomów (*dmin*) – które mogą wbudować się do innych chromosomów tworząc regiony o zatartej strukturze prążkowej *HSRs* (*homogeneously staining regions*). *Dmin* i *HSRs* są cytogenetycznymi wykładnikami amplifikacji genu, którego sekwencję zidentyfikowano jako należącą do rodziny onkogenów *MYC* [50].

Prawidłową lokalizacją protoonkogenu *MYCN* jest chromosom 2p24, jednak w przypadku komórek wykazujących jego amplifikację, sekwencje *MYCN* hybrydują również do *dmin* i *HSRs*. W poszczególnych przypadkach procesowi amplifikacji podlega duży fragment krótkiego ramienia chromosomu drugiego, niezmiennie jednak obejmujący locus *MYCN*, a także, w pewnej liczbie przypadków, inne geny, w tym oddalony o 400kb od *MYCN* gen *DEAD box (DDX1)* [45]. Produkt białkowy genu *DDX1*, koamplifikowanego z *MYCN* w 50–70% przypadków, ma wpływ na strukturę drugorzędową RNA warunkując stabilność mRNA, czym uzupełnia i wzmacnia efekt regulacji ekspresji genów przez czynnik transkrypcyjny, jakim jest *MYCN*.

Amplifikacja *MYCN* występuje w $\sim 25\%$ przypadków nerwiaka zarodkowego, a jej obecność silnie koreluje z zaawansowanym stopniem choroby, szybką progresją guza, opornością na chemioterapię oraz złym rokowaniem niezależnie od stopnia zaawan-



RYCINA 1. Czas przeżycia niemowląt < 1 r.ż. z rozsianą postacią nerwiaka zarodkowego na podstawie statusu *MYCN*, za [47]

sowania klinicznego i wieku pacjenta [6]. Wpływ statusu *MYCN* na przeżycie pacjentów najwyraźniej obrazują wyniki uzyskane w grupie dzieci <1 r.ż. z IV stopniem zaawansowania klinicznego choroby (ryc. 1) [48]. Dla niemowląt bez stwierdzonej amplifikacji *MYCN* w guzie 3-letnie przeżycie (*event-free survival*) wynosiło 93% w porównaniu z zaledwie 10% w grupie z amplifikacją tego onkogenu.

Wciąż niewiele wiadomo o mechanizmie, w którym amplifikacja onkogenu *MYCN* prowadzi do powstania agresywnego fenotypu. Istnieje silna korelacja pomiędzy liczbą kopii tego genu w komórce a poziomem ekspresji jego produktu, tj. białka *MYCN*. Otóż w guzach z amplifikacją stwierdza się znacząco większe ilości białka, a pod względem klinicznym guzy te mają bardzo złośliwy przebieg. nierozstrzygnięte pozostaje jednak znaczenie określania poziomu ekspresji białka *MYCN* jako niezależnego czynnika rokowniczego, zwłaszcza w grupie guzów bez amplifikacji, gdyż dotychczas uzyskane wyniki są sprzeczne [6]. Białko *MYCN* jest czynnikiem transkrypcyjnym kontrolującym przejście komórek w fazę G1 cyklu komórkowego. Razem z białkiem *MAX* tworzy heterodimer pełniący funkcję aktywatora transkrypcji. Jeżeli jednak ekspresja białka *MYCN* jest niska, białko *MAX* tworzy homodimer, który pełni rolę antagonistyczną – inhibitora transkrypcji, uniemożliwiając komórkom rozpoczęcie cyklu podziału komórkowego [49]. Dotychczas poznano zaledwie kilka genów regulowanych bezpośrednio przez układ białek *MYCN/MAX*: geny *MCM7* odpowiedzialny za

utrzymanie euploidii DNA podczas podziału komórkowego [51] oraz *MRP* kodujący oporność wielolekową (opis poniżej) [18].

Status amplifikacji onkogenu *MYCN* uwzględniany jest w protokołach leczniczych na całym świecie, będąc jednym z czynników kwalifikujących pacjentów do grupy wymagającej najbardziej agresywnego postępowania terapeutycznego.

Dodatkowa kopia chromosomu 17q

Metoda porównawczej hybrydyzacji genomowej (CGH) wykorzystana dla analizy cytogenetycznej pierwotnych guzów wykazała, iż nieprawidłowości chromosomu 17 są najczęstszą zmianą chromosomową w nerwiaku zarodkowym. Dodatkową kopię długiego ramienia chromosomu 17 stwierdza się w 2/3 przypadków, a jej obecność silnie koreluje z zaawansowanym stadium choroby, wiekiem pacjentów powyżej 1 r.ż., a także współwystępowaniem amplifikacji *MYCN* oraz delecji ramion p chromosomu 1 [5]. Najczęściej zjawisko to pojawia się w przypadku translokacji ramion 17q na ramiona p chromosomu 1 i ma charakter translokacji niezrównoważonej, co wyjaśnia częste ich współwystępowanie [4].

W obrębie chromosomu 17q zlokalizowano gen kodujący białko – surwiwinę, będące silnym inhibitorem procesu apoptozy. Nadmierna ekspresja tego białka wywołana istnieniem nadliczbowych kopii genu prowadzi do zahamowania wewnątrzpochoдного szlaku apoptozy zależnego od kaspazy 9, której swoistym inhibitorem jest właśnie surwiwina [42]. Obserwacja kliniczna przypadków potwierdziła, iż pacjenci, których guzy wykazują wysoką ekspresję tego białka, mają znacznie gorsze rokowanie [26]. Obecność dodatkowej kopii chromosomu 17q w komórce jest silnym niezależnym czynnikiem prognostycznym, jej wykrycie w komórkach guza umożliwia zaszeregowanie pacjentów do grupy o niepomyślnym rokowaniu [5].

Delecja i utrata heterozygotyczności (LOH) chromosomu 1p

W porównaniu z konstytucyjnym genotypem, w tkance guza dość często stwierdza się utratę heterozygotyczności (LOH) niektórych markerów mikrosatelitarnych w obrębie ramion p chromosomu 1 [35]. Występuje ona w ok. 35% przypadków nerwiaka zarodkowego [4, 6] i dotychczas nie udało się wykryć genu w tym rejonie, który mógłby pełnić funkcję genu supresorowego (TSG), a którego utrata prowadziłaby do transformacji nowotworowej. Jak już wspomniano powyżej, w nerwiaku zarodkowym często dochodzi do niezrównoważonej translokacji ramion 17q na ramiona p chromosomu 1 prowadzącej do delecji dystalnego fragmentu tych ramion. Na podstawie analizy porównawczej udało się zawęzić kluczowy region tej delecji do fragmentu 1p35-36, w obrębie którego postuluje się istnienie dwóch niezależnych loci dla genów TSG, w tym jednego podlegającego zjawisku piętna genomowego (*genomic imprinting*) [8].

Istnieje silna korelacja współwystępowania amplifikacji *MYCN* i LOH ramion p chromosomu 1. Grupa pacjentów, u których w guzach stwierdza się równoczesne występowanie obu tych markerów, charakteryzuje się najbardziej złośliwym przebiegiem choroby. Znaczenie LOH 1p jako niezależnego czynnika rokowniczego jest wciąż kontrowersyjne. Jej występowanie pozwala na podział pacjentów pod względem

agresywności przebiegu choroby i ryzyka progresji, nie ma jednak wpływu na ostateczne prawdopodobieństwo przeżycia [35]. Natomiast współwystępowanie z amplifikacją *MYCN* lub dodatkową kopią chromosomu 17q jest silnie związane z niepomyślnym rokowaniem [4].

Analiza pierwotnych guzów przy pomocy porównawczej hybrydyzacji genomowej (CGH) wykazała istnienie w obrębie genomu jeszcze kilku innych miejsc, w których dochodzi do delecji, jednak ich rola w patomechanizmie transformacji nowotworowej nerwiaka zarodkowego ani ewentualne znaczenie prognostyczne nie zostały dotychczas ustalone [4].

MARKERY MOLEKULARNE

W ostatnich latach możliwości analizy profilu genetycznego znacznie wzbogaciły się dzięki zastosowaniu metod opartych o najnowsze osiągnięcia z dziedziny biologii molekularnej. Obecnie, na poziomie molekularnym, diagnostyka nerwiaka zarodkowego obejmuje zarówno analizę materiału genetycznego: poszukiwanie mutacji i polimorfizmów w obrębie genów, ocenę utraty heterozygotyczności (LOH) jak również analizę zjawisk epigenetycznych. Upowszechnienie badań molekularnych znacznie poszerzyło panel informacji o biologii nerwiaka zarodkowego oraz dostarczyło nowych czynników rokowniczych o silnym znaczeniu prognostycznym. Poniżej scharakteryzowane zostaną dotychczas poznane markery molekularne, przedstawione ich mechanizmy działania oraz nakreślone kierunki dalszych badań nad profilem genetycznym tego nowotworu.

LOH chromosomów 11q i 14q

Oprócz przedstawionej powyżej utraty materiału genetycznego z chromosomu 1p LOH zaobserwowano także w innych regionach genomu komórek nerwiaka zarodkowego, w szczególności w chromosomach 11q (43% guzów) [17] i 14q (23%) [56]. Interesujący jest fakt, że w większości wypadków stwierdzenie powyższych anomalii genetycznych wykluczało obecność amplifikacji *MYCN* i LOH chromosomu 1p. Rokowanie pacjentów z LOH chromosomu 11q było niepomyślne, pomimo iż komórki guza miały prawidłową liczbę kopii *MYCN* – jest to bardzo istotne spostrzeżenie, jako że jest to najczęściej spotykane miejsce utraty heterozygotyczności w nerwiaku zarodkowym. Natomiast dla LOH 14q, która najczęściej współwystępuje w guzach z LOH 11q, do tej pory nie wykazano żadnej korelacji z przebiegiem klinicznym i długoletnim przeżyciem.

Geny supresorowe : *TP53*, *TP73*, *NF1*

Geny supresorowe (TSG) poprzez sprawowanie kontroli nad proliferacją komórek zapobiegają procesom nowotworzenia. W trakcie onkogenezy, w większości nowotworów człowieka dochodzi do zaburzeń ich funkcjonowania i w następstwie do utraty kontroli nad cyklem komórkowym. Może się to dokonać w wyniku wielorakich procesów: mutacji somatycznej, utraty heterozygotyczności fragmentu chromosomu, a także

poprzez mechanizmy epigenetyczne, np. metylację regionów promotorowych czy acetylację histonów [10]. W trakcie badań nad profilem genetycznym nerwiaka zarodkowego został przeanalizowany stopień ekspresji większości znanych TSG, jednak dotychczasowe wyniki nie przyniosły jednoznacznych rozstrzygnięć co do roli, jaką odgrywać mogą one w onkogenezie tego nowotworu. Poniżej przedstawione zostaną wyniki badań, które podejmują próbę choć częściowego wyjaśnienia ich udziału w procesie nowotworzenia nerwiaka zarodkowego.

Gen **TP53** kodujący białko p53, który pełni kluczową rolę w procesie stabilizacji materiału genetycznego komórki, jest jednym z genów supresorowych najczęściej podlegających mutacjom w większości nowotworów człowieka. Intrygujące jest więc spostrzeżenie, iż mutacje tego genu są rzadkością w nerwiaku zarodkowym [25, 58]. Wykazano jednak, iż w wypadku guzów o znaczącym stopniu niezróżnicowania dochodzi do zaburzenia prawidłowego funkcjonowania białka p53 poprzez zaburzenie jego transportu do jądra komórkowego [57]. Niewyjaśnione dotychczas mechanizmy epigenetyczne uniemożliwiają transport białka do jądra komórkowego paraliżując pełnienie przez nie funkcji ochronnej genomu. Obserwacja ta wiązana jest z utartą zdolności neuroblastów do różnicowania w kierunku zmian o łagodnym charakterze.

W regionie chromosomu 1p36.33, najczęściej występującej w nerwiaku zarodkowym delecji, znajduje się gen **TP73** wykazujący duże podobieństwo do **TP53** zarówno pod względem organizacji genu, jak i sekwencji [52]. Gen **TP73** nie spełnia jednak klasycznych kryteriów Knudsona dla genu supresorowego [46] – wyjątkowo rzadko dochodzi do mutacji w jego obrębie, ponadto model zwierzęcy nie cechuje się częstym występowaniem nowotworów. U myszy pozbawionej ekspresji białka p73 w trakcie rozwoju embrionalnego dochodzi do różnorodnych zaburzeń ontogenezy, nie wykazuje ona jednak zwiększonej skłonności do chorób nowotworowych [59]. Białko p73 pełni natomiast kluczową rolę w różnicowaniu tkanki nerwowej [38]. W przeciwieństwie do swego homologu **TP53**, gen **TP73** dzięki dwóm alternatywnym promotorom oraz niejednolitemu składaniu potranskrypcyjnego (*differential splicing*) koduje wiele izoform białka p73. Niedawno stwierdzono występowanie w tkance nerwiaka zarodkowego izoform białka p73 pozbawionych fragmentu N-końcowego (**ΔNp73**), wykazujących właściwości proonkogenne. W odróżnieniu od wariantów białka p73 prawidłowej długości, które, tak jak p53, są silnymi induktorami apoptozy, **ΔNp73** silnie hamuje proapoptyczne działanie zarówno p53, jak i p73 [46]. Stwierdzenie ekspresji **ΔNp73** w nerwiaku zarodkowym jest niezależnym negatywnym czynnikiem rokowniczym [9]. Uniemożliwienie przez nie prawidłowego funkcjonowania białka p53 oraz zahamowanie procesu różnicowania neuronalnego poprzez szlak zależny od p73 jest jednym z mechanizmów epigenetycznych odgrywających rolę w onkogenezie nerwiaka zarodkowego.

Jedynym genem supresorowym, w obrębie którego udało się stwierdzić występowanie mutacji w dwóch liniach komórkowych nerwiaka zarodkowego, jest **NF1**. Niestety obserwacje te nie zostały potwierdzone na materiale guzów pierwotnych [55]. Ponadto nie udało się wykazać zwiększonej częstości występowania nerwiaka zarodkowego u pacjentów chorych na nerwiakowłókniakowatość typu 1 (NF-1), u których występuje germinalna mutacja tego genu.

Na koniec należy wspomnieć, iż również żaden ze znanych genów supresorowych z rodziny inhibitorów CDK: *CDKN2A-C* kodujących zależne od cyklin inhibitory kinaz (p16, p21, p18), wyjątkowo często podlegających mutacjom w innych nowotworach, nie odgrywa znaczącej roli w procesie onkogenezy nerwiaka zarodkowego [42], potwierdzając unikatowość tego nowotworu.

Telomeraza

Telomeraza jest białkiem z rodziny odwrotnych transkryptaz odpowiedzialnym za długość telomerów – struktur znajdujących się na końcach chromosomów i zapewniających ich integralność strukturalną. Wzmożona aktywność telomerazy jest cechą wspólną dla wielu nowotworów, będąc *per se* w większości wypadków jedynie niespecyficzną zmianą wtórną ułatwiającą rozrost tkanki nowotworowej niż kluczowym etapem onkogenezy. Tylko skrajne (wysoki lub nieoznaczalny) poziomy ekspresji białka mogą mieć bezpośrednie znaczenie rokownicze, co niestety dotyczy jedynie niewielkiej subpopulacji nerwiaków zarodkowych. Hiyama [22] stwierdził brak aktywności telomerazy oraz równoczesowe skracanie się telomerów w guzach o stopniu zaawansowania 4-S wg INSS (*International Neuroblastoma Staging System*), które uległy spontanicznej regresji. Z drugiej strony, guzy ze stwierdzoną amplifikacją *MYCN* wykazywały nadzwyczaj wysoką ekspresję białka, a ich przebieg kliniczny był niepomyślny. Obserwacje te zostały potwierdzone w kolejnych badaniach [21, 44], co pozwala uznać brak ekspresji telomerazy w tkance guza za wskaźnik dobry prognozytycznie, natomiast wybitnie wysoką aktywność oraz jej współwystępowanie z amplifikacją *MYCN* za bardzo niekorzystny czynnik rokowniczy [23].

Markery procesu apoptozy

Indukcja apoptozy jest podstawowym mechanizmem wykorzystywanym podczas tworzenia się sieci neuronalnej w trakcie embriogenezy. Zaburzenie procesu eliminacji komórek, które nie wykształciły wystarczającej liczby połączeń interneuronalnych, może prowadzić ostatecznie do odwrócenia tego procesu i inicjacji nowotworzenia.

Do aktywacji procesu programowanej śmierci komórki dochodzi pod wpływem różnorodnych bodźców, np. obecności lub braku zewnątrzkomórkowego ligandu dla receptorów z rodziny TNFR (CD95, p75), uszkodzenia DNA lub wzrostu przepuszczalności błon mitochondrialnych – w tym przypadku za przesyłanie sygnału apoptycznego odpowiedzialna jest rodzina mitochondrialnych białek błonowych Bcl. W nerwiaku zarodkowym bardzo często stwierdza się wysoką ekspresję antyapoptycznego białka **Bcl-2**, a jej poziom jest odwrotnie proporcjonalny do procentu komórek podlegających apoptozie oraz do stopnia ich zróżnicowania [15].

Niezależnie od czynnika inicjującego, ostatecznie w komórce ulegają aktywacji białka efektorowe: kaspazy, które uruchamiają sekwencję zdarzeń prowadzących do apoptozy i śmierci komórki [41]. W przypadku nerwiaka zarodkowego stwierdzenie wysokiej ekspresji białek z rodziny kaspaz w tkance guza jest, zgodnie z oczekiwaniem, związane z dobrym rokowaniem. Zjawisko apoptozy jest również kluczowym procesem odpowiedzi tkanki guza na chemioterapię. Cisplatyna, doksorubicyna oraz etopozyd indukują szlak

CD95/CD95L-kaspaza8 [16]. Jednak w grupie guzów z amplifikacją *MYCN* gen kodujący **kaspazę-8** jest hamowany poprzez metylację jego promotora [54], uniemożliwiając ekspresję tego białka, co przejawia się opornością tych guzów na stosowane obecnie leczenie. Natomiast komórki wrażliwe na chemioterapię wykazują wysoką ekspresję białek z rodziny kaspaz [15]. Następuje to poprzez indukcję białka transbłonowego **p75**, będącego receptorem o niskim powinowactwie do NGF (*nerve growth factor*). Ekspresja wspomnianego już antyapoptycznego białka *bcl2* jest natomiast wiązana z procesami nabytej odporności na chemioterapię [12].

Na podstawie powyższych obserwacji można uznać iż nerwiak zarodkowy, którego profil genetyczny sugeruje podatność na procesy apoptozy, ze względu na wysoką ekspresję wspomnianych genów, o wiele częściej podlega zjawisku spontanicznej regresji oraz dobrze odpowiada na stosowane leczenie cytotoksyczne. Należy jednak również wspomnieć, iż analiza procesu spontanicznej regresji w przebiegu nerwiaka zarodkowego przyniosła pierwsze dowody potwierdzające przypuszczenia iż, obok apoptozy, istnieją inne procesy zaprogramowanej śmierci komórek, niezależne od kaspaz [29].

Dziś można stwierdzić, iż w patomechanizmie zjawiska spontanicznej regresji w przebiegu nerwiaka zarodkowego odgrywa rolę kilka niezależnych szlaków prowadzących do śmierci komórki. W komórkach guza podlegających regresji tylko w części przypadków stwierdzono obecność wykładników procesu apoptozy [28]. W preparatach nerwiaka zarodkowego analizowanych z wykorzystaniem technik mikroskopii elektronowej nie zawsze stwierdzano występowanie ciał apoptycznych, zamiast których często obserwowano nagromadzenie zmian o charakterze degeneracyjnym, charakterystycznych dla procesu degeneracji autofagalnej [29].

Geny oporności wielolekowej

Pojawienie się oporności na wiele chemioterapeutyków należących do niezależnych grup cytostatyków jest zjawiskiem obserwowanym w przebiegu klinicznym nerwiaka zarodkowego, za które odpowiedzialna jest przede wszystkim nadmierna ekspresja białek z rodziny transporterów kasetowych wiążących ATP (*ATP-binding cassette transporters*). Głównymi przedstawicielami tej rodziny są: **glikoproteina P** – kodowana przez gen *MDR1* (*multi-drug resistance gene 1*) oraz **białko MRP** (*multi-drug resistance-related protein*) kodowane przez gen o tej samej nazwie. Sterowany przez nie proces usuwania cytostatyków z komórki dokonuje się z wykorzystaniem aktywnego, zależnego od ATP, transportu przezbłonowego [20]. Najnowsze doniesienia sugerują, iż onkogen *MYCN* wpływa na stopień odpowiedzi guza na stosowaną chemioterapię poprzez regulację ekspresji genu *MRP* [18] – obserwacja ta stanowi ogniwo łączące fenotyp guza o wysokiej złośliwości z fenotypem lekoopornym. Już wcześniej stwierdzono, iż wysoki stopień ekspresji genu *MRP* w nerwiaku zarodkowym jest niezależnym negatywnym czynnikiem rokowniczym [43]. Również ekspresja genu *MDR1*, który w odróżnieniu od *MRP* nie wykazuje współzależności z występowaniem amplifikacji *MYCN*, w niektórych grupach pacjentów: populacji dzieci starszych (>1 r.ż.) oraz w grupie guzów bez amplifikacji *MYCN* jest markerem złej prognozy [19].

Od ponad dekady znane są substancje farmakologiczne zdolne do odwrócenia efektu lekooporności zależnego od P-glikoproteiny (verapamil, cyklosporyna), jednak ich stosowanie nasila toksyczność winkrystyny i doksorubicyny [20]. Konieczne wydaje się więc poszukiwanie bardziej bezpiecznych leków oraz ich indywidualne stosowanie w przypadkach nerwiaka zarodkowego o stwierdzonej wysokiej ekspresji genów oporności wielolekowej.

Większość badań nad mechanizmem powstawania wielolekooporności i możliwości jej odwrócenia w przebiegu nerwiaka zarodkowego przeprowadzono na liniach komórkowych w warunkach *in vitro*, dlatego też znaczenie kliniczne tych obserwacji pozostaje wciąż do ostatecznego wyjaśnienia.

Rodzina receptorów dla neurotrofin oraz RAS

Kształtowanie się sieci neuronalnej będące wyrazem dojrzewania tkanki nerwowej jest procesem kontrolowanym zarówno czasowo, jak i przestrzennie przez układ neurotrofin i ich receptorów – transbłonowych białek z rodziny Trk wykazujących aktywność kinazy tyrozynowej. Najważniejsi przedstawiciele tej rodziny to: **TrkA** będący selektywnym receptorem dla NGF (*nerve growth factor*) oraz NT-3 (*neurotrophin 3*); **TrkB** wiążący BDNF (*brain derived nerve factor*), jak i NT-4 (*neurotrophin 4*) oraz białko **p75**, które wykazuje niskie powinowactwo do wszystkich neurotrofin. Ekspresja TrkA jest niezależnym, pozytywnym czynnikiem rokowniczym [53]. Przeciwnie, obecność białka TrkB stwierdzana jest w guzach o agresywnym przebiegu klinicznym i często współwystępuje z amplifikacją *MYCN* [40].

Podlegający ścisłej kontroli poziom NGF jest głównym czynnikiem regulującym proces kształtowania się obwodowej sieci neuronalnej układu współczulnego. Pod koniec okresu embrionalnego stwierdza się wysoką ekspresję TrkA i p75 w komórkach dojrzewającego układu sympatycznego. NGF, będący ich swoistym ligandem, promuje proces różnicowania się neuroblastów. W okresie okołoporodowym następuje gwałtowny spadek stężenia NGF, co powoduje masową śmierć komórek, które do tego czasu nie wykształciły wystarczającej liczby połączeń zarówno aksonalnych, jak i dendrytycznych [39]. Zgodnie z teorią tropową zburzenie kruchej równowagi pomiędzy stężeniem neurotrofin a ilością receptorów prezentowanych na błonie komórkowej neuronów prowadzi do niepokohowanego rozrostu komórek będąc zaczątkiem procesu nowotworowego. Jednak dalsze etapy różnicowania się tkanki nerwowej obserwowane w okresie poporodowym mogą prowadzić do przywrócenia równowagi i stanowić podstawę obserwowanej klinicznie spontanicznej regresji zmian.

Przyłączenie się NGF do homodimeru TrkA powoduje autofosforylację receptora oraz aktywację kaskady białek przekazujących sygnał do jądra komórki i regulujących transkrypcję specyficznych genów. Eggert wykazała, iż najważniejszym szlakiem indukowanym przez NGF w komórkach nerwiaka zarodkowego jest układ **Ras/MAPK** [14]. Szlak ten jest odpowiedzialny nie tylko za indukcję procesów różnicowania w kierunku dojrzałych komórek nerwowych, ale również za indukcję wspomnianej powyżej zaprogramowanej śmierci komórki o mechanizmie niezależnym od kaspaz, klinicznie prowadzącej do regresji zmian

[28]. Dlatego też wysoka ekspresja białka Ras jest bardzo dobrym czynnikiem rokowniczym, a zwłaszcza jej współwystępowanie z TrkA [53].

Autokryny układ TrkB/BDNF, którego aktywację obserwuje się w nerwiaku zarodkowym o bardzo agresywnym przebiegu klinicznym, jest czynnikiem odpowiedzialnym za oporność tych guzów na stosowaną chemioterapię [24] oraz odgrywa rolę w promocji angiogenezy [13]. Równocześnie, na zasadzie sprzężenia zwrotnego, jest sam dla siebie czynnikiem wzrostu napędzającym rozrost tkanki guza.

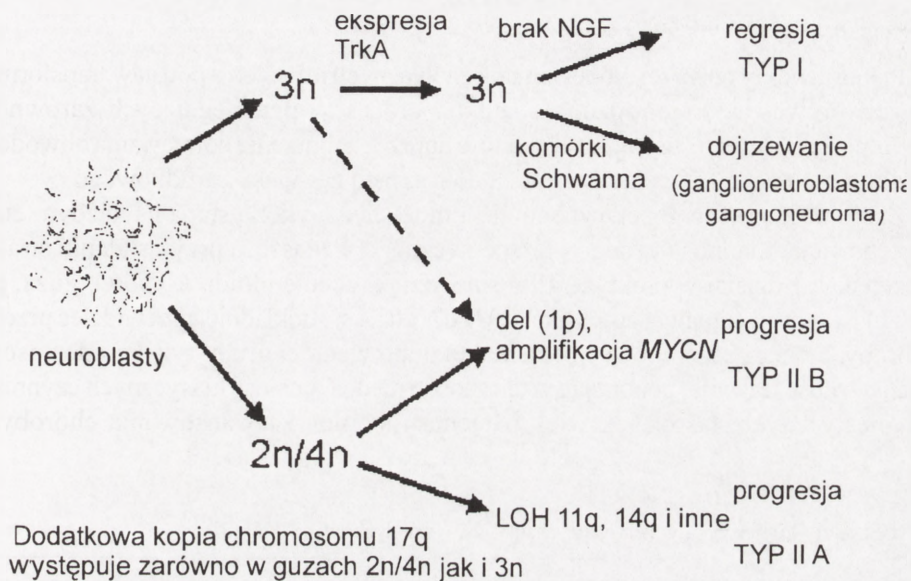
Rodzina receptorów dla neurotrofin sprawuje nadzór nad procesem różnicowania się neuroblastów w kierunku dojrzałych komórek zwojowych oraz decyduje o indukcji zjawiska spontanicznej regresji. W procesach tych kluczową rolę odgrywa stężenie swoistych ligandów, zwłaszcza NGF i BDNF w mikrośrodowisku utkania guza. W Japonii wprowadzono oznaczenie ekspresji białek z rodziny Trk w komórkach nerwiaka zarodkowego do praktyki klinicznej.

GENETYCZNY MODEL ROZWOJU NERWIAKA ZARODKOWEGO

Genetyczna heterogeniczność nerwiaka zarodkowego obserwowana zarówno na poziomie genu, chromosomu, jak i całej komórki świadczy, iż zamiast jednolitej choroby mamy do czynienia ze zbiorem podtypów nowotworu, różniących się przebiegiem klinicznym: agresywnością wzrostu, opornością na stosowane leczenie czy też zdolnością do regresji. Dotychczas nie udało się jednoznacznie ustalić, czy kolejność, w jakiej akumulują się obserwowane nieprawidłowości profilu genetycznego, ma znaczenie rokownicze. Ponadto, jak dotąd nie znaleziono wystarczająco silnych dowodów, które potwierdzałyby zdolność guzów do konwersji w postaci o bardziej agresywnym przebiegu [6,7].

W roku 2000 opublikowano model onkogenezy nerwiaka zarodkowego oparty na analizie profilu genetycznego tkanki guza [7]. Nie wykluczając istnienia potencjalnej jednej wspólnej mutacji, która inicjowałaby proces nowotworzenia i odpowiadała za nieliczne przypadki rodzinie występującego nerwiaka zarodkowego, zaproponowano podział guzów na dwa typy, który dokonywałby się na wczesnym etapie rozwoju nowotworu (ryc. 2).

Typ pierwszy, o łagodnym przebiegu klinicznym, w toku którego często może dochodzić do spontanicznej regresji zmian i/lub dojrzenia, charakteryzuje się zaburzeniem procesu mitozy. Prowadzi to do powstania komórek o kariotypie okołotriploidalnym ($\sim 3n$), przy czym dodatkowe kopie chromosomów mają zachowaną prawidłową strukturę. W tkance guza obserwuje się wysoką ekspresję receptora błonowego TrkA. Brak jego swoistego ligandu NGF prowadzi do uruchomienia mechanizmów odpowiedzialnych za spontaniczną regresję (w tym procesu apoptozy), natomiast obecność komórek Schwanna w podścielisku utkania guza stymuluje proces różnicowania się neuroblastów w kierunku dojrzałego zwojakerwiaka [2]. Klinicznie, typ ten występuje najczęściej u niemowląt do 1 roku życia, w przypadkach o niskim



RYCINA 2. Genetyczny model onkogenezy nerwiaka zarodkowego. Reprodukacja za zgodą autorów [3]: NGF – nerwowy czynnik wzrostu, LOH – utrata heterozygotyczności, $2n, 3n, 4n$ – stopień ploidii, TrkA – receptor dla neurotrofin, ganglioneuroblastoma – nerwiak zwojowokomórkowy zarodkowy, ganglioneuroma – zwojakonerwiak

stopniu zaawansowania (1,2 wg klasyfikacji INSS) oraz w 4-S. Wskaźnik 3-letniej przeżywalności sięga 90%.

W odróżnieniu od niego, **typ drugi** o bardzo agresywnym przebiegu klinicznym charakteryzuje się występowaniem licznych aberracji strukturalnych chromosomów. Kariotyp komórek guza jest okołodiploidalny ($\sim 2n$) lub tetraploidalny ($\sim 4n$). Klinicznie typ ten dotyczy dzieci starszych, powyżej pierwszego roku życia, o znacznie zaawansowanym procesie chorobowym (stopień 3,4 wg INSS). W przebiegu klinicznym nie dochodzi do samoistnej regresji zmian ani do różnicowania się tkanki guza. W tkance guza ekspresja białka TrkA jest śladowa, natomiast stwierdzana jest obecność autokrynego układu TrkB-BDNF stymulującego niepoohamowany rozrost guza. Ponadto w ramach typu drugiego wyróżnia się dwa podtypy. W **podtypie II A**, o mniej agresywnym przebiegu, charakteryzującym się 3-letnim przeżyciem rzędu 30–50%, często stwierdza się utratę heterozygotyczności (LOH) długich ramion chromosomów 11 i 14. Podtyp o najbardziej agresywnym (**II B**) przebiegu często wykazuje natomiast LOH chromosomu 1p oraz amplifikację genu *MYCN* przy wskaźniku 3-letniego przeżycia poniżej 25%.

WNIOSKI KOŃCOWE

Przedstawiony powyżej model zmian genetycznych leżących u podstaw transformacji nowotworowej ilustruje złożony charakter procesów przebiegających zarówno na poziomie genów, jak i chromosomów, które poprzez zaburzenie dojrzewania obwodowej tkanki nerwowej ostatecznie prowadzą do rozrostu nerwiaka zarodkowego.

Znajomość profilu genetycznego guza może być wykorzystana na każdym etapie postępowania diagnostycznego i terapeutycznego, zwłaszcza przy ustalaniu strategii leczenia. Już dzisiaj w praktyce klinicznej dzięki ocenie ploiddii komórek guza, jak i poszukiwaniu ewentualnej amplifikacji *MYCN* udaje się dokładniej przewidzieć przebieg choroby, a więc zaszeregować pacjenta do odpowiedniej grupy ryzyka i dostosować intensywność leczenia, pokonując w ten sposób niedoskonałość klasycznych czynników prognostycznych, takich jak wiek pacjenta i stopień zaawansowania choroby. W

TABELA 1. Grupy ryzyka w nerwiaku zarodkowym, zmodyfikowane wg [42]

Parametry	Ryzyko		
	niskie	pośrednie	wysokie
KLINICZNE			
Wiek	< 1 r.ż	> 1 r.ż	> 1 r.ż
Stopień zaawansowania	1, 2 4S	3, 4	3, 4
5-letnie przeżycie	95%	50%	25%
HISTOPATOLOGICZNE			
Liczebność komórek podścieliska (k. Schwanna)	>50%	<50%	brak lub minimalna
MKI (indeks mitozy / karyorrhesis)	<2%	2–4%	>4%
Indeks mitotyczny	niski		wysoki
Ogniska zwapnień	obecne		brak
CYTOGENETYCZNE			
Ploidia	3n	2n /4n	2n/4n
LOH 1p	rzadko	rzadko	często
LOH 11q, 14q	rzadko	często	rzadko
Dodatkowa kopia chromosomu 17q	rzadko	często	często
Status <i>MYCN</i>	norma	norma	amplifikacja
MOLEKULARNE			
Ekspresja TrkA	wysoka	niska	niska
Ekspresja TrkB	niska	niska	wysoka
Izofорма p73	p73	?	Δ Np73

najbliższej przyszłości do wstępnej oceny powinna zostać włączona również analiza markerów molekularnych, zwłaszcza ocena ekspresji białek z rodziny Trk. Kompleksowa analiza danych klinicznych, histopatologicznych, jak i profilu genetycznego umożliwi stratyfikację pacjentów (tab. 1), tak aby dzieciom z grupy najwyższego ryzyka można było wdrożyć agresywne leczenie, natomiast w grupie o najniższym ryzyku jak najbardziej zminimalizować efekty uboczne terapii. Zrozumienie mechanizmów molekularnych leżących u podstaw transformacji nowotworowej, jak również poznanie mechanizmów spontanicznej regresji to wyzwanie przyszłości badań nad nerwiakiem zarodkowym. Stanowią one drogę dla stworzenia indywidualnych schematów terapii, ukierunkowanej na bezpośrednią ingerencję w procesy transmisji sygnałów wewnątrzkomórkowych tak, aby przywrócić równowagę między zjawiskami apoptozy i proliferacji w tkance dojrzewającego układu nerwowego.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ADAMKIEWICZ-DROŻYŃSKA E. Czynniki prognostyczne i nowe możliwości leczenia neuroblastoma. *Współcz. Onkol.* 2000; **4**: 72–75.
- [2] AMBROS IM, AMBROS PF. The role of Schwann cells in neuroblastoma [w] Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y, Voute PA [red.] Neuroblastoma. Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Tokyo: Elsevier Science B.V 2000: 355–369.
- [3] AMBROS PF, AMBROS IM. Neuroblastom *Med. Genetik* 2002; **2**: 119–124.
- [4] BOWN N. Neuroblastoma tumour genetics: clinical and biological aspects. *J Clin Pathol.* 2001; **54**: 897–910.
- [5] BOWN N, ŁASTOWSKA M, COTTERILL S, O'NEILL S, ELLERSHAW C, ROBERTS P, LEWIS I, PEARSON AD. 17q gain in neuroblastoma predicts adverse clinical outcome. UK Cancer Cytogenetics Group and the UK Children's Cancer Study Group. *Med Pediatr Oncol.* 2001; **36**: 14–19.
- [6] BRODEUR GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nature Rev Cancer* 2003; **3**: 203–216.
- [7] BRODEUR GM, AMBROS PF. Genetic and biological markers of prognosis in neuroblastoma. [w] Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y, Voute PA [red.] Neuroblastoma. Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Tokyo: Elsevier Science B.V 2000: 355–369.
- [8] CARON H, SPIEKER N, GODFRIED M, VEENSTRA M, van SLUIS P, de KRAKER J, VOUTE P, VERSTEEG R. Chromosome bands 1p35-36 contain two distinct neuroblastoma tumor suppressor loci, one of which is imprinted. *Genes Chromosom Cancer* 2001; **31**: 228–239.
- [9] CASCIANO I, MAZZOCCO K, BONI L, PAGAN G, BANELLI B, ALLEMANNI G, PONZONI M, TONINI GP, ROMANI M. Expression of DNp73 is a molecular marker for adverse outcome in neuroblastoma patients. *Cell Death Differ* 2002; **9**: 246–251.
- [10] COTRAN RS, KUMAR V, COLLINS T. Cancer suppressor genes [w] Cotran RS Kumar V Collins T [red.] Robbins pathologic basis of disease. Philadelphia, London, New York, St. Louis, Sydney, Toronto. W.B. Saunders Company 1999. 286–294.
- [11] CHO KR, VOGELSTEIN B. Genetic alternations in the adenoma-carcinoma sequence. *Cancer* 1992; **70**: 1727–1731.
- [12] DOLE M, NUNEZ G, MERCHANT AK, MAYBAUM J, RODECK, BLOCH CA, CASTLE. Bcl-2 inhibits chemotherapy-induced apoptosis in neuroblastoma. *Cancer Res* 1994; **51**: 6529–6538.
- [13] EGGERT A, GROTZER MA, IKEGAKI N, LIU XG, EVANS AE, BRODEUR GM. Expression of neurotrophin receptor TrkA inhibits angiogenesis in human neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 2000; **35**: 569–572
- [14] EGGERT A, IKEGAKI N, LIU XG, CHOU TT, LEE VM, TROJANOWSKI JQ, BRODEUR GM. Molecular dissection of Trk-A signal transduction pathways mediating differentiation in human neuroblastoma. *Oncogene* 2000; **19**: 2043–2051.

- [15] FULDA S, DEBATIN K.M Apoptosis pathways in neuroblastoma therapy. *Cancer Lett* 2003; **197**: 131–135.
- [16] FULDA S, SIEVERTS H, FRIESEN C, HERR I, DEBATIN KM. The CD95 (APO-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Cancer Res* 1997; **57**: 3823–3829.
- [17] GUO C, WHITE PS, WEISS MJ, HOGARTY MD, THOMPSON PM, STRAM DO, GERBING R, MATTHAY KK, SEEGER RC, BRODEUR GM, MARIS JM. Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastoma. *Oncogene* 1999; **18**: 4948–4957.
- [18] HABER M, BORDOW SB, GILBERT J, MADAFIGLIO J, KAVALLARIS M, MARSHALL GM, MECHETNER EB, FRUEHAUF JP, TEE L, COHN SL, SALWEN H, SCHMIDT ML, NORRIS MD. Altered expression of the MYCN oncogene modulates MRP gene expression and response to cytotoxic drugs in neuroblastoma cells. *Oncogene* 1999; **18**: 2777–2782.
- [19] HABER M, BORDOW SB, HABER PS, MARSHALL GM, STEWART BW, NORRIS MD. The prognostic value of MDR1 gene expression in primary untreated neuroblastoma. *Eur J Cancer* 1997; **12**: 2031–2036.
- [20] HABER M, KAVALLARIS M. Multidrug resistance genes in neuroblastoma. [w] Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y, Voute PA [red.] Neuroblastoma. Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Tokyo: Elsevier Science B.V 2000: 207–215.
- [21] HIYAMA E, HIYAMA K, OHTSU K, YAMAOKA H, ICHIKAWA T, SHAY JW, YOKOYAMA T. Telomerase activity in primary neuroblastoma: is it a prognostic indicator of clinical behavior? *Eur J Cancer* 1997; **33**: 1932–1936.
- [22] HIYAMA E, HIYAMA K, YOKOYAMA T, MATASUURA Y, PIATYSZEK MA, SHAY JW. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nat Med* 1995; **1**: 249–255.
- [23] HIYAMA E, REYNOLDS CP. Telomerase as a biological and prognostic marker in neuroblastoma. [w] Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y, Voute PA [red.] Neuroblastoma. Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Tokyo: Elsevier Science B.V 2000: 159–174.
- [24] HO R, EGGERT A, HISHIKI T, MINTURN JE, IKEGAKI N, FOSTER P, CAMORATTO AM, EVANS AE, BRODEUR GM. Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastoma. *Cancer Res* 2002; **62**: 6462–6476.
- [25] HOSOI G, HARA J, OKAMURA T, OSUGI Y, ISHIHARA S, FUKUZAWA M, OKADA A, OKADA S, TAWA A. Low frequency of the p53 gene mutations in neuroblastoma. *Cancer* 1994; **73**: 3087–3093.
- [26] ISLAM A, KAGEYAMA H, TAKADA N, KAWAMOTO T, TAKAYASU H, ISOGAI E, OHIRA M, HASHIZUME K, KOBAYASHI H, KANEKO Y, NAKAGAWARA A. High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene* 2000; **19**: 617–623.
- [27] KANEKO Y, KNUDSON A. Mechanism and relevance of ploidy in neuroblastoma. *Genes Chromosom Cancer* 2000; **29**: 89–95.
- [28] KITANAKA C, KATO K, IJIRI R, SAKURADA K, TOMIYAMA A, NOGUCHI K, NAGASHIMA Y, NAKAGAWARA A, MOMOI T, TOYODA Y, KIGASAWA H, NISHI T, SHIROUZU M, YOKOYAMA S, TANAKA Y, KUCHINO Y. Increased Ras expression and caspase-independent neuroblastoma cell death: possible mechanism of spontaneous neuroblastoma regression. *J Natl Cancer Inst* 2002; **94**: 358–368.
- [29] KITANAKA C, KUCHINIO Y. Caspase independent programmed cell death with necrotic morphology. *Cell Death Differ* 1999; **6**: 508–515.
- [30] KNUDSON A, STRONG L. Mutation and cancer. Neuroblastoma and pheochromocytoma *Am J Hum Genet* 1972; **24**: 514–522.
- [31] LOOK AT, HAYES FA, SHUSTER JJ, DOUGLASS EC, CASTLEBERRY RP, BOWMAN LC, SMITH EI, BRODEUR GM. Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc amplification in childhood neuroblastoma. A Pediatric Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 1991; **9**: 581–591.
- [32] ŁASTOWSKA M. Analiza materiału genetycznego w zwojaku zarodkowym przy pomocy metod cytogenetyki molekularnej – znaczenie kliniczne wykrytych zmian genetycznych. Praca habilitacyjna, AM Poznań 1999.
- [33] MARIS JM, KYEMBA SM, REBBECK TR, WHITE PS, SULMAN EP, JENSEN SJ, ALLEN C, BIEGEL JA, YANOFSKY RA, FELDMAN GL, BRODEUR GM. Familial predisposition to neuroblastoma does not map to chromosome band 1p36 *Cancer Res* 1996; **56**: 3421–3425.
- [34] MARIS JM, TONINI GP. Genetics of familial neuroblastoma [w] Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y, Voute PA [red.] Neuroblastoma. Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Tokyo: Elsevier Science B.V 2000: 125–135.

- [35] MARIS JM, WEISS MJ, GUO C, GERBING RB, STRAM DO, WHITE PS, HOGARTY MD, SULMAN EP, THOMPSON PM, LUKENS JN, MATTHAY KK, SEEGER RC, BRODEUR GM. Loss of heterozygosity at 1p36 independently predicts for disease progression but not decreased overall survival probability in neuroblastoma patients. A Children's Cancer Group study. *J. Clin Oncol* 2000; **18**: 1888–1899
- [36] MARIS JM, WEISS MJ, MOSSE Y, HII G, GUO C, WHITE PS, HOGARTY MD, MIRENSKY T, BRODEUR GM, REBBECK TR, URBANEK M, SHUSTERMAN S. Evidence for a hereditary predisposition locus at chromosome 16p12-13 *Cancer Res* 2002; **62**: 6651–6658.
- [37] MARTINSSON T, SJOBERG RM, HEDBORG F, KOGNER P. Deletion of chromosome 1p loci and microsatellite instability in neuroblastomas analyzed with short-tandem repeat polymorphisms. *Cancer Res* 1995; **55**: 5681–5686.
- [38] MELINO G, DeLAURENZI V, VOUSDEN K. p73: friend or foe in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**: 605–614.
- [39] NAKAGAWARA A. The NGF story and neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 1998; **31**: 113–115.
- [40] NAKAGAWARA A, AZAR CG, SCAVARDA NJ, BRODEUR GM. Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 759–767.
- [41] NALEPA G, ŻUKOWSKA-SZCZECHOWSKA E. Kaspazy i apoptoza: umrzyj i pozwól żyć. *Wiad Lek* 2002; **55**: 100–106.
- [42] Van NOESEL MM, VERSTEEG R. Pediatric neuroblastomas. Genetic and epigenetic 'Danse Macabre' *Gene* 2004; **325**: 1–15.
- [43] NORRIS MD, BORDOW SB, MARSHALL GM, HABER PS, COHN SL, HABER M. Expression of the gene for multidrug-resistance-associated protein and outcome in patients with neuroblastoma. *New Engl J Med* 1996; **334**: 231–238.
- [44] POREMBA C, HERO B, HEINE B, SCHEEL C, SCHAEFER KL, CHRISTIANSEN H, BERTHOLD F, KNEIF S, STEIN H, JUERGENS H, BOECKER W, DOCKHORN-DWORNICZAK B. Telomerase is a strong indicator for assessing the proneness to progression in neuroblastomas *Med Pediatr Oncol*. 2000; **35**: 651–655.
- [45] REITER J, BRODEUR GM. MYCN is the only highly expressed gene from the core amplified domain in human neuroblastomas *Genes Chromosom Cancer* 1998; **23**: 134–140.
- [46] ROMANI M, TONINI GP, BANELLI B, ALLEMANI G, MAZZOCCO K, SCARUFFI P, BONI L, PONZONI M, PAGNAN G, RAFFAGHELLO L, FERRINI S, CROCE M, CASCIANO I. Biological and clinical role of p73 in neuroblastoma. *Cancer Lett* 2003; **197**:111–117.
- [47]. SCHIMADA H, AMBROS IM. DEHNER LP. HATA J. JOSHI V. BROGHILD R. Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors. Recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer* 1999; **86**(2): 349–362.
- [48] SCHMIDT ML, LUKENS JN, SEEGER RC, BRODEUR GM, SHIMADA H, GERBING RB, STRAM DO, PEREZ C, HASSE GM, MATTHAY KK. Biologic factors determine prognosis in infants with stage IV neuroblastoma: a prospective Children's Cancer Group study. *J. Clin. Oncol.* 2000; **18**: 1260–1268.
- [49] SCHWAB M. MYCN amplification in neuroblastoma. [w] Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y, Voute PA [red.] Neuroblastoma. Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Tokyo: Elsevier Science B.V 2000: 75–83.
- [50] SCHWAB M, ALITALO K, KLEMPNAUER KH, VARMUS HE, BISHOP JM, GILBERT F, BRODEUR GM, GOLDSTEIN M, TRENT J. Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature* 1983; **305**: 245–248.
- [51] SHOHET J, HICKS MJ, PLON SE, BURLINGAME SM, STUART S, CHEN SY, BRENNER MK, NUCHTERN JG. Minichromosome maintenance protein MCM7 is a direct target of the MYCN transcription factor in neuroblastoma. *Cancer Res* 2002; **62**: 1123–1128.
- [52] TANAKA T, BERNARD J. Expression of Ha-ras, TP53 and TP73 in neuroblastoma. [w] Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y, Voute PA [red.] Neuroblastoma. Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Tokyo: Elsevier Science B.V 2000: 175–182.
- [53] TANAKA T, SUGIMOTO T, SAWADA T. Prognostic discrimination among neuroblastomas according to Ha-ras/ Trk A gene expression. *Cancer* 1998; **83**: 1626–1633.
- [54] TEITZ T, LAHTI JM, KIDD VJ. Aggressive childhood neuroblastomas do not express caspase-8: an important component of programmed cell death. *J Mol Med* 2001; **79**: 428–436.
- [55] THE I, MURTHY AE, HANNIGAN GE, JACOBY LB, MENON AG, GUSELLA JF, BERNARDS A. Neurofibromatosis type 1 gene mutations in neuroblastoma. *Nature Genet* 1993; **3**: 62–66.

- [56] THOMPSON PM, SEIFRIED BA, KYEMBA SK, JENSEN SJ, GUO C, MARIS JM, BRODEUR GM, STRAM DO, SEEGER RC, GERBING R, MATTHAY KK, MATISE TC, WHITE PS. Loss of heterozygosity for chromosome 14q in neuroblastoma. *Cancer Res* 2001; **61**: 6185–6193
- [57] TWEDDLE DA, PEARSON ADJ, HABER M, NORRIS MD, XUE X, FLEMMING C, LUNEC J. The p53 pathway and its inactivation in neuroblastoma. *Cancer Lett* 2003; **197**: 93–98.
- [58] VOGAN K, BERNSTEIN M, LECLERC JM, BRISSON L, BROSSARD J, BRODEUR GM, PELLETIER J, GROS P. Absence of p53 gene mutations in primary neuroblastomas *Cancer Res* 1993; **53**: 5269–5273.
- [59] YANG A, WALKER N, BRONSON R, KAGHAD M, OOSTERWEGEL M, BONNIN J, VAGNER C, BONNET H, DIKES P, SHARPE A, McKEON F, CAPUT D. p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* 2000; **404**: 99–103.
- [60] Neuroblastoma [w] *Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM*. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: {256700}: {aktualizacja z dnia: 03.06.2004}: World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>

Redaktor prowadzący – Jan Żeromski

Otrzymano: 25.10.2004 r.

Przyjęto: 17.11.2004 r.

ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

e-mail: katgen@amg.gda.pl

LUDZKI WIRUS CYTOMEGALII (HCMV) – LATENCJA I STRATEGIE UCIECZKI SPOD KONTROLI UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO*

HUMAN CYTOMEGALOVIRUS (HCMV) –
LATENCY AND IMMUNE EVASION

Katarzyna BULEK

Pracownia Genetyki Molekularnej i Wirusologii, Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego

Streszczenie: Ludzki wirus cytomegalii (HCMV) ma zdolność do przetrwałego zakażenia poprzez ustalenie stanu latencji w komórkach gospodarza. Wirus może ulegać reaktywacji, w czasie której dodatkowo stosuje różne mechanizmy upośledzające pełną odpowiedź układu odpornościowego. Do tych mechanizmów należą m.in. blokowanie prezentacji antygenów, wpływ na sieć cytokin, hamowanie komórek NK i hamowanie apoptozy.

Słowa kluczowe: HCMV, latencja, reaktywacja, układ odpornościowy.

Summary: Human cytomegalovirus (HCMV) has ability to lifelong maintenance within the host using mechanisms involved in latency. Virus can reactivate and during reactivation HCMV uses different mechanisms (inhibition of antigen presentation, influence on cytokine network, inhibition of NK cells, disturbance of apoptosis) which downregulate effectiveness of immune cells.

Keywords: HCMV, latency, reactivation, immune system.

Wykaz stosowanych skrótów: **ADAM** – rodzina białek dysintegryn i metaloproteinaz; **ADCC** – cytotoxiczność komórkowa zależna od przeciwciał; **APC** – komórka prezentująca antygen; **CD** – kompleks różnicowania; **CIITA** – transaktywator MHC klasy II; **ER** – retikulum endoplazmatyczne; **Fc** – fragment krystalizujący; **GM-CSF** – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów; **gp** – glikoproteina; **HLA** – antygeny ludzkich leukocytów; **IFN** – interferon; **IL** – interleukina; **IRL** – wewnętrzne powtórzenia długie; **ITIM** – motywy immunoreceptorowe hamujące, oparte na tyrozynie; **JAK** – kinaza Janusa; **KIR** – receptory hamujące zabijanie; **LIR** – receptory leukocytów immunoglobulinopodobne; **MAC** – kompleks atakujący błonę; **MCP-1** – monocytarny czynnik chemotaktyczny białkowy 1; **MHC** – główny układ zgodności tkankowej; **MIC** – cząsteczki związane z głównym układem zgodności tkankowej klasy I; **MIP** – białko zapalne makrofagów; **NK** – naturalne komórki cytotoksyczne; **pp** – fosfoproteina; **RANTES** – regulowany przez aktywację: ekspresja i wydzielanie przez

*Praca finansowana z grantów: KBN nr 6P04C02220 i MNiI nr PB0315/P04/2003/25.

prawidłowe limfocyty T; **TAP** – białko transportujące związane z obróbką antygeny; **TNF- α** – czynnik martwicy nowotworów α ; **TGF- β** – transformujący czynnik wzrostu β ; **TRL** – końcowe powtórzenia długie; **UL** – unikalny długi (region); **ULBP** – białko wiążące UL-16; **US** – unikalny krótki (region); **vICA** – wirusowy inhibitor apoptozy indukowanej przez kaspazę; **vMIA** – wirusowy inhibitor apoptozy zlokalizowany w mitochondrium.

1. WSTĘP

Ludzki wirus cytomegalii (HCMV) należy do podrodziny *Betaherpesvirinae* wchodzącej w skład rodziny *Herpesviridae*. Ocenia się, że jest nim zakażone 50–90% dorosłej populacji. Wirus przenosi się na płód przez łożysko, niemowlęta mogą zakażać się pijąc mleko matki, natomiast małe dzieci przez kontakt z moczem lub śliną innych dzieci. Wśród młodzieży i dorosłych zakażenie szerzy się głównie przez pocałunki i stosunki płciowe. Infekcja HCMV jest zwykle wystarczająco kontrolowana przez układ immunologiczny i nie wywołuje poważnej choroby, jednak układ odpornościowy gospodarza nie jest w stanie do końca wyeliminować wirusa. Genom wirusa jest utrzymywany w komórkach gospodarza w formie latentnej prawdopodobnie przez całe życie. Latencja definiowana jest jako obecność genomu wirusowego w komórkach gospodarza bez produkcji zakaźnych cząstek wirusowych. Wirus może ulegać reaktywacji, co skutkuje nawracającymi infekcjami. HCMV jest szczególnie groźny dla osób ze stanami immunosupresji, u których może rozwinąć się wielonarządowa choroba cytomegalioza, będąca najcięższą formą zakażenia [3].

Wirus HCMV stosuje rozmaite mechanizmy dla uniknięcia odpowiedzi ze strony układu odpornościowego:

- ♣ ustala stan latencji, w czasie którego zachodzi ograniczona ekspresja genów wirusa,
- ♣ ulega replikacji w miejscach immunologicznie uprzywilejowanych [23],
- ♣ upośledza mechanizmy obronne gospodarza przez ekspresję różnych czynników wyciszających odpowiedź immunologiczną.

2. MIEJSCE LATENCJI WIRUSA

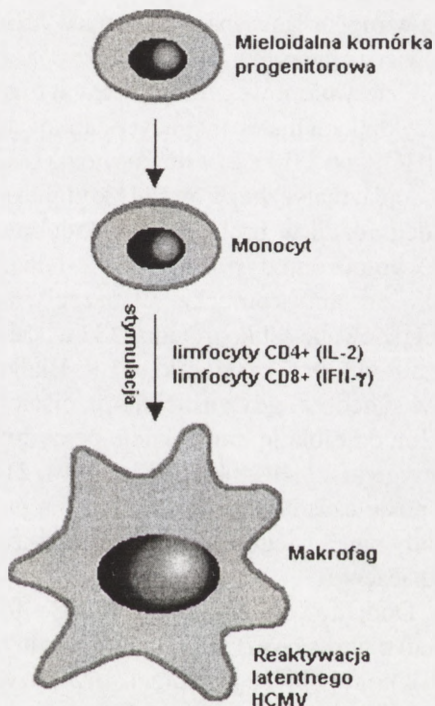
HCMV zakaża różne typy komórek: komórki endotelialne, epitelialne, fibroblasty, neurony, komórki mięśni gładkich, monocyty/makrofagi i granulocyty. Miejscem latencji HCMV są jednojądrzaste komórki krwi obwodowej CD14+ oraz komórki szpiku kostnego CD34+ i CD33+ [24, 26, 28]. Ponadto przypuszcza się, że również komórki endotelialne mogą być miejscem latencji wirusa [9]. HCMV jest utrzymywany w długo żyjącej komórce progenitorowej linii mieloidalnej CD34/CD33 i w czasie jej podziału wirus przekazywany jest do komórek potomnych.

3. MECHANIZMY REAKTYWACJI

Na podstawie badań przeprowadzonych *in vitro* zaproponowano różne modele reaktywacji HCMV [24, 26, 28]. Jeden z nich dotyczy komórki progenitorowej linii mieloidalnej. Na skutek stymulacji tej komórki cytokinami (TNF- α , IFN- γ i GM-CSF) dochodzi do reaktywacji wirusa.

Inny model dotyczy reaktywacji wirusa HCMV w latentnie zainfekowanych monocytach. Różnicowanie tych komórek do ma-kroflagów wywołane cytokinami (IL-2 i IFN- γ) uwalnianymi przez allogeniczne limfocyty CD4+ i CD8+ powoduje reaktywację HCMV. Zastąpienie powyższych cytokin mitogenem nie wywołuje tego efektu. Kluczową rolę w opisanym mechanizmie odgrywa IL-2. Jest ona aktywatorem monocytów: zwiększa ich przeżycie, migrację i wydzielanie innych cytokin. Efekty wywołane przez IL-2 są wzmacniane przez IFN- γ , a blokowane przez TGF- β (obecny w makroflagach stymulowanych mitogenem). Ponadto IL-2 aktywuje limfocyty CD8+, które zwiększają wydzielanie IFN- γ [26] (ryc. 1).

Latentne zakażenie wirusem HCMV jest szczególnie groźne dla osób znajdujących się w stanie immunosupresji (osoby po przeszczepach i osoby zarażone HIV). Wtedy bowiem znacznie zwiększa się ryzyko dodatkowych infekcji i pojawienia się odpowiedzi odpornościowej: pobudzone limfocyty T wytwarzają cytokiny prowadzące pośrednio do reaktywacji wirusa i rozwoju choroby CMV [9].



RYCINA 1. Schemat reaktywacji HCMV w trakcie różnicowania monocytów do makroflagów. Szczególną rolę w tym procesie odgrywają cytokiny uwalniane przez allogeniczne limfocyty T [wg 24, zmienione]

4. STRATEGIE UNIKANIA ODPOWIEDZI UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO

HCMV stosuje różne strategie uniknięcia pełnej odpowiedzi ze strony układu odpornościowego. Do tych mechanizmów zaliczamy m.in. zakłócenia w prezentacji antygenów, oddziaływanie na sieć cytokin, hamowanie komórek NK, hamowanie apoptozy [5, 6, 8, 12, 13, 14, 21].

Antygeny endogenne (np. białka wirusowe) prezentowane są w kontekście MHC klasy I (MHC-I) i rozpoznawane są przez limfocyty T cytotoksyczne. Częsteczki MHC-I, zbudowane z łańcucha ciężkiego (α) i łańcucha lekkiego – β 2 mikroglobuliny, ulegają ekspresji na wszystkich jądrzastych komórkach oraz w małej ilości na erytrocytach. Antygeny cytoplazmatyczne przetwarzane są w proteasomach, a następnie powstałe w nich peptydy transportowane z udziałem białek TAP do siateczki endoplazmatycznej. Tu peptydy wiążą się w rowku łańcucha α częsteczki MHC-I i wraz z nią transportowane są następnie na powierzchnię komórki.

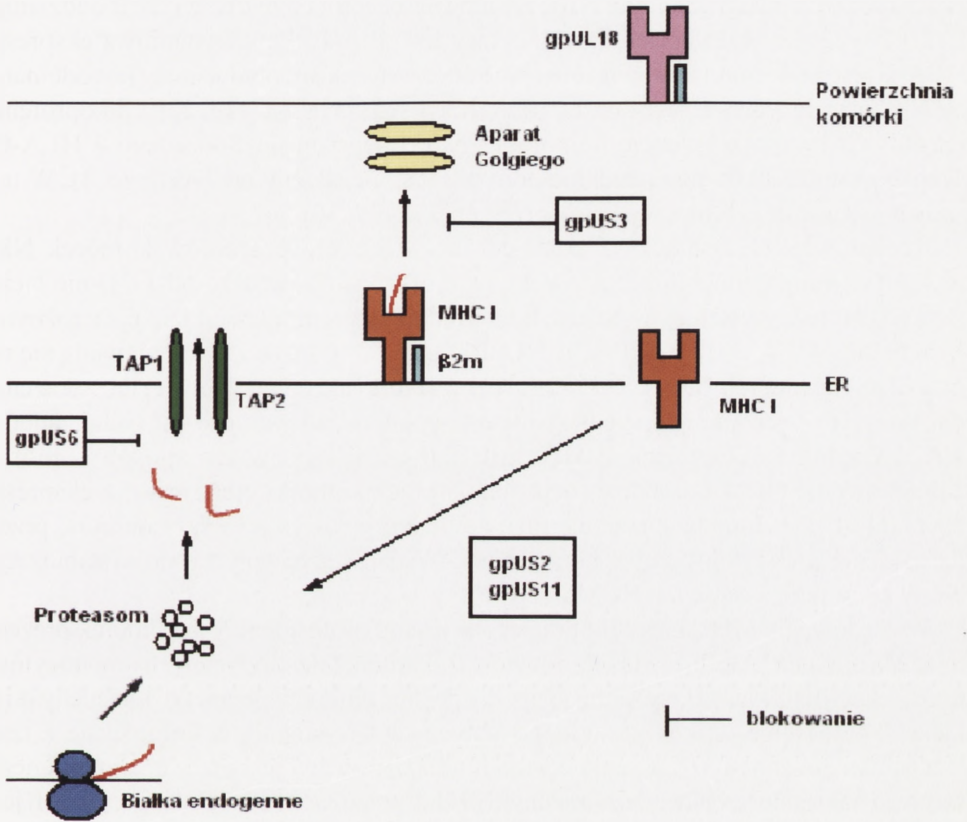
Cztery błonowe glikoproteiny wirusa HCMV (gpUS2, gpUS3, gpUS6, gpUS11) są przykładami białek mogących blokować prezentację antygeny w kontekście częsteczek MHC klasy I (ryc. 2). Glikoproteina US2 wiąże łańcuch ciężki MHC klasy I w siateczce endoplazmatycznej. Powstały kompleks ulega wstęcznemu transportowi do cytoplazmy i degradacji w proteasomie. Podobne działanie ma inne białko wirusa – gpUS11. Wywołuje ono dyslokację MHC-I do cytoplazmy, a przez to spadek liczby MHC-I na powierzchni komórki. W przeciwieństwie do gpUS2, białko gpUS11 nie jest degradowane. Glikoproteina US3 wiąże się z kompleksem: łańcuch α - β 2-mikroglobulina i zatrzymuje te częsteczki w ER. Białko gpUS6 wpływa na łączenie peptydu z MHC-I w siateczce, gdyż asocjuje przejściowo z kompleksem: TAP - łańcuch α MHC-I - β 2m, co blokuje translokację peptydu przez błonę siateczki i zapobiega łączeniu się antygeny z MHC-I [5, 6, 12, 13, 14, 21]. Normalnie białka TAP łączą się przejściowo z pustą częsteczką MHC klasy I, a po dostarczeniu peptydu do siateczki endoplazmatycznej i jego związaniu się w rowku łańcucha α częsteczki MHC-I ulegają odłączeniu.

Dodatkowo produkt genu UL83 – fosfoproteina pp65 chroni bezpośrednio wczesne białko wirusa – czynnik transkrypcyjny IE1 przed prezentacją. Białko pp65 fosforyluje IE1, co zapobiega jego przetworzeniu w proteasomie i w efekcie prezentacji z udziałem częsteczek MHC-I [5, 8, 12].

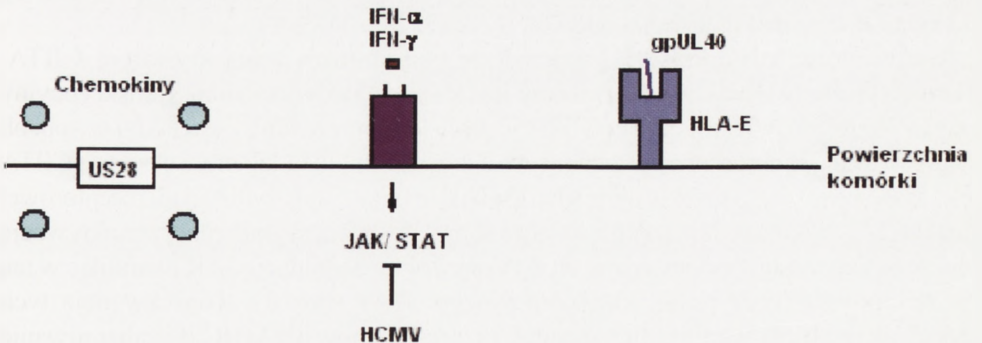
Obniżony poziom częsteczek MHC klasy I bądź ich niepoprawna forma prowadzą do aktywacji komórek NK, które nie otrzymują sygnału hamującego i w konsekwencji wywierają na komórki docelowe efekt cytotoksyczny. W tym przypadku jedną ze stosowanych przez HCMV strategii jest produkcja białka gpUL18 (ryc. 2). Jest ono homologiem MHC klasy I, który wiąże β 2-mikroglobulinę. Kompleks ten ulega ekspresji na powierzchni komórki i hamuje cytotoksyczność komórek NK oddziałując z ich receptorem KIR lub LIR-1 [8].

Komórki NK mają na swej powierzchni receptory dostarczające sygnałów zarówno hamujących, jak i aktywujących [1]. Efektem tych sygnałów jest odpowiednio blokowanie reakcji cytotoksycznej lub uruchomienie mechanizmów prowadzących do lizy. Receptory komórek NK oddziałują z ligandami, którymi mogą być częsteczki MHC klasy I zarówno klasyczne, jak i nieklasyczne. U człowieka wyróżniono dwie grupy receptorów komórek NK. Są to receptory z nadrodziny częsteczek immunoglobulinopodobnych oraz receptory lektynowe z grupy CD94/NKG2.

HCMV hamuje aktywność komórek NK przez receptory dostarczające sygnału hamującego CD94/NKG2A/B. Sama częsteczka CD94 nie jest zdolna do blokowania aktywacji komórek NK, gdyż nie ma ona cytoplazmatycznego motywu hamującego



RYCINA 2. Schemat przedstawiający oddziaływanie wirusa HCMV na prezentację antygenów w kontekście cząsteczek MHC klasy I. Opis w tekście [wg 6, zmienione]



RYCINA 3. Schemat przedstawiający różne strategie oddziaływania wirusa HCMV na układ odpornościowy gospodarza. Opis w tekście [wg 6, zmienione]

ITIM. Może się ona łączyć z innymi cząsteczkami, mającymi powyższy motyw. Są to cząsteczki o charakterze lektyn: NKG2A lub B. Receptor CD94/NKG2A/B oddziałuje z nieklasycznymi cząsteczkami MHC klasy I – HLA-E. Powierzchniowa ekspresja HLA-E jest uzależniona od związania przez tą cząsteczkę peptydu, który jest odcinany od N-końca klasycznych cząsteczek HLA-A, HLA-B i HLA-C [19, 22]. Glikoproteina UL40 HCMV ma sekwencję homologiczną do peptydu pochodzącego z HLA-C. Transport gpUL40 na powierzchnię komórki jest niezależny od TAP (ryc. 3). W ten sposób wirus omija blok wywołany przez gpUS6 [29, 30].

Receptor NKG2D należy z kolei do aktywujących receptorów komórek NK, niektórych subpopulacji limfocytów T i makrofagów. Cząsteczka NKG2D nie łączy się z CD94, lecz występuje w postaci homodimeru. Receptor ten oddziałuje z różnymi ligandami: MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3. Cząsteczki te pojawiają się na powierzchni komórek, które uległy stresowi, transformacji nowotworowej lub zakażeniu wirusem [16]. Okazało się, że białko wirusowe gpUL16 zatrzymuje część tych ligandów w ER i aparacie Golgiego. Białko gpUL16 umożliwia w ten sposób komórce zainfekowanej HCMV uniknąć rozpoznania przez komórki efektorowe z ekspresją NKG2D [4, 11]. Inne badania sugerują, że białko gpUL16 zwiększa ochronę przed działaniem białek cytolitycznych komórek NK. Wydaje się, że wpływa ono na stabilizację błony komórek zakażonych HCMV [18].

Występowanie MHC klasy II ograniczone jest do profesjonalnych komórek prezentujących antygen (APC), a więc limfocytów B, komórek dendrytycznych i monocytów. Cząsteczki MHC klasy II prezentują peptydy pochodzenia egzogenego. Łańcuchy α i β klasy II w obrębie retikulum endoplazmatycznego występują w kompleksie z tzw. łańcuchem zmiennym (Ii). Kompleks $\alpha\beta$ -Ii transportowany jest przez aparat Golgiego do przedziału endosomalnego o obniżonym pH lub przedziału lizosomalnego, gdzie Ii jest uwalniany. Odłączenie łańcucha Ii umożliwia związanie peptydu.

Glikoproteina HCMV – gpUS2 wiąże wolne łańcuchy α , jak również kompleks $\alpha\beta$ z łańcuchem zmiennym Ii. Ponadto wywołuje degradację cząsteczki HLA-DMA. HLA-DMA wraz z HLA-DMB tworzy heterodimer, który stabilizuje cząsteczkę MHC klasy II i katalizuje proces ładowania peptydu [6, 8, 12, 14, 21].

Geny rejonu MHC klasy II znajdują się pod kontrolą transaktywatora CIITA. Transaktywator MHC klasy II uważany jest za podstawowy czynnik transkrypcyjny genów MHC klasy II. Ekspresja CIITA jest ściśle kontrolowana i zachodzi w sposób ciągły jedynie w komórkach prezentujących antygen. Silnym induktorem ekspresji CIITA jest IFN- γ . Cytokina ta przekazuje sygnał z udziałem kinazy tyrozynowej niereceptorowej Janusa (JAK). Kinazy Janusa pośredniczą w przenoszeniu sygnału poprzez aktywację białek z odpowiednimi domenami. HCMV wywołuje degradację JAK I hamując w ten sposób aktywację czynnika transkrypcyjnego STAT (ryc. 3). Konsekwencją tych procesów jest blokowanie CIITA, spadek ekspresji genów dla MHC II i zahamowanie prezentacji antygeny [8, 12, 14].

Ekspresja cząsteczek MHC klasy I wzmagana jest przez wszystkie rodzaje IFN (IFN- α , - β , - γ). HCMV wpływa na różne poziomy przekazu sygnału od IFN- α [15]. Po związaniu IFN- α do receptora dochodzi do aktywacji kinazy tyrozynowej. Ta z kolei fosforyluje inne białka, które tworzą kompleks działający jak czynnik transkryp-

cyjny. Wirus wywołuje spadek ekspresji JAK1 i p48, dwóch ważnych komponentów przekazu sygnału od IFN- α .

Inną strategią wirusa jest blokowanie powstawania metaloproteinaz cysteinowych z rodziny ADAM (CD10 i CD13). HCMV blokuje powstawanie tych proteinaz:

- ◆ CD10 – hamowanie na poziomie RNA,
- ◆ CD13 – hamowanie na poziomie białka; prawdopodobnie wywołuje zatrzymanie w ER.

Metaloproteinazy ADAM to rodzina białek transbłonowych klasy I. Łączą one cechy białek adhezyjnych i proteinaz. Enzymy CD10 i CD13 zaangażowane są w przycinanie peptydu w procesie prezentacji antygeny z udziałem zarówno cząsteczek MHC-I, jak i MHC-II [8].

Wirus HCMV oddziałuje również na sieć cytokin. Chemokiny stanowią grupę cytokin o działaniu chemotaktycznych. Chemokiny przekazują sygnał przez receptory związane z białkami G (R7G). Genom wirusa koduje homologi tych receptorów (geny: UL33, UL78, US27 i US28). Produkty genów US27 i US28 są funkcjonalnymi receptorami chemokin typu CC. Jak wykazano, przekaz sygnału od receptora US28 prowadzi do aktywacji fosfolipazy C, a w efekcie do wpływania na ekspresję różnych genów. Białko US28 może wiązać RANTES, MCP-1, MIP-1 α i -1 β [2, 6, 13, 31]. Związanie chemokin blokuje ich działanie chemotaktyczne (ryc. 3). To z kolei ogranicza napływ efektorowych komórek układu odpornościowego i zmniejsza szanse eliminacji zainfekowanych komórek [6].

Większość znanych chemokin należy do podrodziny α (CXC) lub β (CC). Podział ten oparty jest na obecności aminokwasu pomiędzy cysteinami znajdującymi się blisko N-końca. Ponadto chemokiny α oddziałują głównie na neutrofile, podczas gdy chemokiny β działają na inne komórki: monocyty, eozynofile i bazofile. Geny UL146 i UL147 kodują białka podobne do α chemokin (CXC). Białka te nazwano odpowiednio vCXC-1 i vCXC-2. vCXC-1 naśladuje działanie IL-8 gospodarza i jest chemoatraktantem dla neutrofilii, które grają ważną rolę w rozprzestrzenianiu się wirusa w organizmie. Ponadto vCXC-1 zakłóca normalną migrację poprzez preferencyjne przyciąganie leukocytów, które nie są w stanie całkowicie wyeliminować wirusa [20].

Inne wirusowe białko, produkt genu UL111A, naśladuje działanie IL-10. Ta komórkowa cytokina produkowana jest głównie przez aktywowane pomocnicze limfocyty Th2. Spełnia ona wiele funkcji, a końcowym efektem jej działania jest zahamowanie odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego i odpowiedzi zapalnej. IL-10 hamuje m.in. produkcję innych cytokin i proliferację pobudzonych limfocytów subpopulacji Th1 oraz prowadzi do spadku ekspresji cząsteczek MHC klasy II na monocytach [27]. Białko wirusowe może wiązać się do receptora ludzkiej IL-10 i współzawodniczyć o miejsce wiązania, mimo iż te dwa białka są identyczne tylko w 27% [10].

Do cytokin hamujących należy także TGF- β . Hamuje on proliferację limfocytów B i T, komórek NK oraz zmniejsza wydzielanie innych cytokin. Wirus cytomegalii indukuje syntezę TGF- β , który z jednej strony ogranicza proliferację limfocytów T, a z drugiej stymuluje replikację wirusa [8].

Genom HCMV koduje także białka oddziałujące na proces apoptozy. Apoptoza jest zaprogramowaną śmiercią komórki. Organizm wykorzystuje ten proces do pozbycia się komórek z uszkodzeniami, których nie da się naprawić. Apoptoza może być indukowana ligandami śmierci albo jest wynikiem odpowiedzi mitochondriów na reakcje stresowe. Do głównych receptorów przenoszących sygnał śmierci należą TNF-receptor, CD95/Fas/Apo1R, TRAIL R1, TRAIL R2 i Apo3R [17]. Po związaniu odpowiedniego liganda dochodzi do interakcji receptora z białkami mającymi domeny śmierci, a następnie utworzenia kompleksu inicjującego apoptozę. Kolejny etap to aktywacja kaspazy 8, która aktywuje kaspazy efektorowe. Jedno z białek HCMV, produkt genu UL36 – vICA, hamuje proteolityczną aktywację pro-kaspazy 8 [25].

W przypadku reakcji stresowej dochodzi do zmian w przepuszczalności błon mitochondrialnych. Skutkiem tego jest wyciekanie białek: cytochromu c i Apaf-1. Dochodzi następnie do utworzenia apoptosomu, aktywacji kaspazy 9 i kaspaz efektorowych. Drugi wirusowy produkt – vMIA, kodowany przez gen UL37, działa podobnie jak białka antyapoptotyczne z rodziny Bcl. Białko to jest funkcjonalnym analogiem bcl-2. Blokuję ono powstawanie porów w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, przez co zapobiega wyciekowi białek międzybłonowych [7]. vMIA przeciwdziała apoptozie wywołanej FasL, lekami cytotoksycznymi i infekcjami adenowirusami. W przeciwieństwie do vICA, vMIA jest konieczne do replikacji wirusa.

Inny mechanizm stosowany przez HCMV to indukcja ekspresji receptora dla fragmentu Fc IgG. Receptor ten utworzony jest przez dwie glikoproteiny wirusa: gp68 (UL119-118) i gp34 (TRL11/IRL11). Białka te nie wykazują homologii do klasycznych komórkowych receptorów FcγRI, RII i RIII ani do innych białek. Receptor FcR HCMV wiąże ludzkie izotypy IgG z różnym powinowactwem (IgG1>IgG4>IgG2>IgG3). Okazuje się, że ponad 96% specyficznych przeciwciał IgG przeciw HCMV znajduje się we frakcji IgG1. Związanie tych przeciwciał chroni zainfekowaną komórkę przed cytotoksycznością komórkową zależną od przeciwciał [13]. Ponadto IgG należą do najważniejszych opsonin ułatwiających i biorących udział w fagocytozie. Komórki żerne mają na swej powierzchni receptory dla fragmentu Fc IgG. Połączenie receptora wirusa z fragmentem Fc przeciwciał uniemożliwia zatem efektywną fagocytozę z udziałem IgG.

Wirus zdolny jest także do wpływania na układ dopełniacza. Dopełniacz jest grupą białek surowicy i płynów tkankowych, które w wyniku kaskadowej aktywacji prowadzą do uszkodzenia błony komórkowej różnych patogenów. Składniki dopełniacza służą również jako opsoniny ułatwiające fagocytozę oraz jako chemoatraktanty przyciągające inne komórki układu odpornościowego. Organizm ludzki wytwarza czynniki regulujące, które chronią własne komórki przed działaniem układu dopełniacza. HCMV zwiększa ekspresję białek regulujących: CD55 i CD46. CD55 stanowi ważne zabezpieczenie przyspieszając rozpad konwertaz C3 i C5 drogi klasycznej i alternatywnej. Podobnie białko CD 46 hamuje stabilne tworzenie enzymów konwertazy C3 obu dróg. Zapobiega to aktywacji kolejnych białek i utworzeniu kompleksu atakującego błonę (MAC). Zwiększona ekspresja powyższych białek chroni zainfekowaną komórkę przed lizą. Ponadto białka CD55 i CD59 włączane są w osłonkę wirusa [2]. Częsteczką CD59 wiąże się z białkami C8 i C9. Blokuję ona w ten sposób tworzenie kompleksu atakującego błonę.

Przedstawione w powyższej pracy mechanizmy ukrycia się wirusa HCMV to tylko część ze stosowanych przez niego strategii. Dokładne poznanie tematu w przyszłości umożliwi efektywniejszą walkę z wirusem i jego eliminację.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BIASSONI R, CANTONI C, FALCO M, PENDE D, MILLO R, MORETTA L, BOTTINO C, MORETTA A. Human natural killer cell activating receptors. *Molec Immunol* 2000; **37**: 1015–1024.
- [2] BODAGHI B, JONES TR, ZIPETO D, VITA C, SUN L, LAURENT L, ARENZANA - SIESDESOS F, VIRELIZIER JL, MICHELSON S. Chemokine sequestration by viral chemoreceptors as a novel viral escape strategy: withdrawal of chemokines from the environment of cytomegalovirus-infected cells. *J Exp Med* 1998; **188**: 855–866.
- [3] BOECKH M, NICHOLS WG, PAPANICOLAU G, RUBIN R, WINGARD JR, ZAIA J. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: current status, known challenges and future strategies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003; **9**: 543–558.
- [4] DUNN C, CHALUPNY NJ, SUTHERLAND CL, DOSCH S, SIVAKUMAR PV, JOHNSON DC, COSMAN D. Human cytomegalovirus glycoprotein UL16 causes intracellular sequestration of NKG2D ligands, protecting against natural killer cell cytotoxicity. *J Exp Med* 2003; **197**: 1427–1439.
- [5] FARRELL H, DEGLI-EPOSTI M, DENSLEY E, CRETNEY E, SMYTH M, DAVIS-POYNTER N. Cytomegalovirus MHC class I homologues and natural killer cells: an overview. *Microb Infect* 2000; **2**: 521–532.
- [6] FORTUNATO EA, MCELROY AK, SANCHEZ V, SPECTOR DH. Exploitation of cellular signaling and regulatory pathways by human cytomegalovirus. *Trends Microbiol* 2000; **8**: 111–119.
- [7] GOLDMACHER VS. vMIA, a viral inhibitor of apoptosis targeting mitochondria. *Biochemie* 2002; **84**: 177–185.
- [8] HENGEL H, BRUNE W, KOSZINOWSKI UH. Immune evasion by cytomegalovirus – survival strategies of highly adapted opportunist. *Trends Microbiol* 1998; **6**: 190–197.
- [9] JARVIS MA, NELSON JA. Human cytomegalovirus persistence and latency in endothelial cells and macrophages. *Cur Opin Microbiol* 2002; **5**: 403–407.
- [10] KOTENKO S, SACCANI S, IZOTOVA LS, MIROCHNITCHENKO OV, PESTKA S. Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). *PNAS USA* 2000; **97**: 1695–1700.
- [11] LODOEN M, OGASAWARA K, HAMERMAN JA, ARASE H, HOUCHINS JP, MOCARSKI ES, LANIER LL. NKG2D-mediated natural killer cell protection against cytomegalovirus is impaired by viral gp40 modulation of retinoic acid early inducible 1 gene molecules. *J Exp Med* 2003; **197**: 1245–1253.
- [12] LOENEN WAM, BRUGGEMAN CA, WIERTZ EJHJ. Immune evasion by human cytomegalovirus: lessons in immunology and cell biology. *Immunol* 2001; **13**: 41–49.
- [13] MICHELSON S. Consequences of human cytomegalovirus mimicry. *Human Immunol* 2004; **65**: 465–475.
- [14] MILLER DM, SEDMAK DD. Viral effects on antigen processing. *Cur Opin Immunol* 1999; **11**: 94–99.
- [15] MILLER DM, ZHANG Y, RAHILL BM, WALDMAN WJ, SEDMAK DD. Human cytomegalovirus inhibits IFN- α – stimulated antiviral and immunomodulatory responses by blocking multiple levels of IFN- α signal transduction. *J Immunol* 1999; **162**: 6107–6113.
- [16] MRÓWKA P, GOŁĄB J. Receptor NKG2D i jego ligandy. *Post Biol Kom* 2004; **31**: 73–82.
- [17] MRÓZ P, MŁYNARCZUK I. Mechanizmy indukcji apoptozy i zastosowania TRAIL w terapii nowotworów. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 113–128.
- [18] ODEBERG J, BROWNE H, METKAR S, FROELICH CJ, BRANDEN L, COSMAN D, SÖDERBERG-NAUCLER C. The human cytomegalovirus protein UL16 mediates increased resistance to natural killer cell cytotoxicity through resistance to cytolytic proteins. *J Virol* 2003; **77**: 4539–4545.
- [19] O'CALLAGHAN CA. Natural killer cell surveillance of intracellular antigen processing pathways mediated by recognition of HLA-E and Qa-1b by CD94/NKG2 receptors. *Microb Infect* 2000; **2**: 371–380.
- [20] PENFOLD MET, DAIRAGHI DJ, DUKE GM, SAEDERUP N, MOCARSKI ES, KEMBLE GW, SHALL TJ. Cytomegalovirus encodes a potent α chemokine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 9839–9844.
- [21] PLOEGH HL. Viral strategies of immune evasion. *Science* 1998; **280**: 248–253.

- [22] ROMAGNANI C, PIETRA G, FALLO M, MAZZARINO P, MORETTA L, MINGARI MC. HLA-E restricted recognition of human cytomegalovirus by a subset of cytolytic T lymphocytes. *Human Immunol* 2004; **65**: 437–445.
- [23] SHOLZ M, DOERR WW, CINATL J. Human cytomegalovirus retinitis: pathogenicity, immune evasion and persistence. *Trends Microbiol* 2003; **11**: 171–178.
- [24] SISSONS JGP, BAIN M, WILLS MR, SINCLAIR JH. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Infect* 2002; **44**: 73–77.
- [25] SKALETSKAYA A, BARTLE LM, CHITTENDEN T, MCCORMICK AL, MOCARSKI ES, GOLDMACHER VS. A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *PNAS USA* 2001; **98**: 7829–7834.
- [26] SÖDERBERG-NAUCLER C, STREBLOW DN, FISH KN, ALLAN-YORKE J, SMITH PP, NELSON JA. Reactivation of latent human cytomegalovirus in CD14+ monocytes is differentiation dependent. *J Virol* 2001; **75**: 7543–7554.
- [27] SPENCER JV, LOCKRIDGE KM, BARRY PA, LIN G, TSANG M, PENFOLD ME, SCHALL TJ. Potent immunosuppressive activities of cytomegalovirus-encoded interleukin-10. *J Virol* 2002; **76**: 1285–1292.
- [28] STREBLOW DN, NELSON JA. Models of HCMV latency and reactivation. *Trends Microbiol* 2003; **11**: 293–295.
- [29] TOMASEC P, BRAUD VM, RICKARDS C, POWELL MB, MCSHARRY BP, GADOLA S, CERUNDOLO V, BORYSIEWICZ LK, MCMICHAEL AJ, WILKINSOS GWG. Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science* 2000; **287**: 1031–1033.
- [30] ULBRECHT M, MARTINOZZI S, GRZESCHIK M, HENGEL H, ELLWART JW, PLA M, WEISS EH. The human cytomegalovirus UL40 gene product contains a ligand for HLA-E and prevent NK cell-mediated lysis. *J Immunol* 2000; **164**: 5019–5022.
- [31] ZIPETO D, BODAGHI B, LAURENT L, VIRELIZIER JL, MICHELSON S. Kinetics of transcription of human cytomegalovirus chemokine receptor US28 in different cell types. *J Gen Virol* 1999; **80**: 543–547.

Redaktor prowadzący – Barbara Płytycz

Otrzymano: 30.10.2004 r.

Przyjęto: 22.11.2004 r.

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

e-mail: kbulek@interia.pl

NEUROPEPTYD B (NPB) I NEUROPEPTYD W (NPW) ORAZ ICH RECEPTORY – WYSTĘPOWANIE I ROLA

NEUROPEPTIDE B (NPB) AND NEUROPEPTIDE W (NPW) AND THEIR RECEPTORS – THEIR DISTRIBUTION AND ROLE

Anna HOCHÓŁ, Marcin RUCIŃSKI

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii,
Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego

Streszczenie: GPR7 i GPR8 (*G-protein-coupled Receptors*) to dwa, ostatnio odkryte i strukturalnie podobne, sieroce receptory związane z białkiem G. Występują one zarówno w centralnym układzie nerwowym, jak i w narządach obwodowych. Ostatnio zidentyfikowano endogenne ligandy tych receptorów. Jeden z nich to polipeptyd o długości 29 aminokwasów. Jest on unikalnie modyfikowany bromem i stąd został nazwany neuropeptydem B (NPB). Drugi – neuropeptyd W (NPW) został zidentyfikowany w dwóch formach molekularnych, odpowiednio 23- i 30-aminokwasowej (NPW23 i NPW30). Sekwencja aminokwasów NPW23 jest identyczna z N-końcowymi 23 resztami aminokwasów NPW30. Rozkład ekspresji genu w mózgu sugeruje, że NPB bierze udział w regulacji odżywiania, w regulacji osi neuroendokrynej, w procesach pamięci i uczenia się. Z kolei NPW wpływa na pobór pożywienia, stymuluje wydzielanie prolaktyny oraz reguluje czynność osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej.

Słowa kluczowe: neuropeptyd B (NPB), neuropeptyd W (NPW), receptory sieroce, rola biologiczna.

Summary: GPR7 and GPR8 (*G-protein-coupled Receptors*) are two recently discovered and structurally related orphan receptors linked to protein G. They are present both in central nervous system and in peripheral organs. Recently, endogenous ligands of these receptors have been identified. One of them is a 29 amino acid residues long, uniquely modified with bromine and, thus, termed the neuropeptide B (NPB). The other, neuropeptide W (NPW), has been identified in two molecular forms of, respectively, 23 and 30 amino acids (NPW23 and NPW30). Amino acid sequence of NPW23 is identical with first 23 N-terminal amino acids of NPW30. Distribution of the gene expression within the brain suggests that NPB plays a role in feeding control, in control of the neuroendocrine axis, as well as in memory and learning processes. NPW, in turn, affects alimentation, stimulates prolactin secretion and regulates function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis.

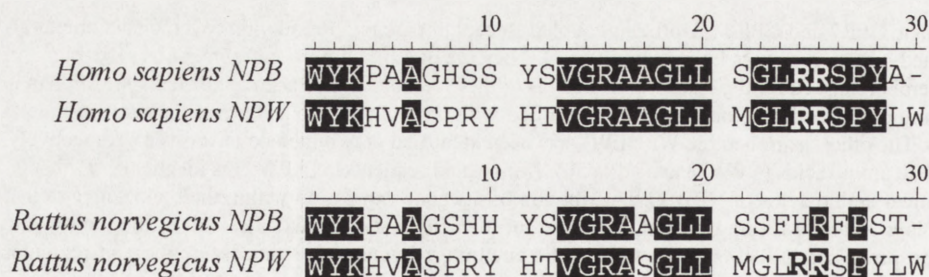
Key words: neuropeptide B (NPB), neuropeptide W (NPW), orphan receptors, biological role.

IDENTYFIKACJA NEUROPEPTYDU B I NEUROPEPTYDU W

Neuropeptyd B (NPB) oraz neuropeptyd W (NPW) są nowo odkrytymi polipeptydami uczestniczącymi w regulacji homeostazy energetycznej organizmu. Należą one do grupy polipeptydów stymulujących pobieranie pokarmu, czyli polipeptydów oreksygennych. Do grupy tej należą również takie polipeptydy, jak oreksyny A i B, ghrelina, neuropeptyd Y, beacon. Okazało się, że NPB i NPW są endogennymi ligandami receptorów z rodziny GPCR (*G-protein-coupled Receptors*), określanych jako GPR7 i GPR8. Sekwencja oraz lokalizacja tych receptorów zostały poznane stosunkowo dawno, jednak przez długi czas nie udało się zidentyfikować endogennych ligandów tych receptorów, stąd przez szereg lat określano je jako receptory sieroce.

W celu wykrycia nowych peptydów oraz późniejszego ich dopasowania do receptorów wykorzystano dwie strategie badawcze. Pierwsza z nich polegała na rozdziale – przy pomocy metody HPLC – ekstraktów tkankowych, co pozwoliło wyodrębnić nowe peptydy mogące być ligandami receptorów sierocych. W drugiej strategii wykorzystano analizy bioinformatyczne genomowej bazy danych. W tych ostatnich badaniach jako argumentu do wyszukiwania użyto sekwencji peptydu sygnałowego. Z uzyskanych wyników odrzucano sekwencje znanych już białek. Użycie pierwszej strategii pozwoliło wyizolować z podwzgórza świni nowy, nieznan wcześniej peptyd, który nazwano neuropeptydem W [9]. Sekwencja aminokwasów wyizolowanego polipeptydu została użyta do przeszukania ludzkiej genomowej bazy danych, co pozwoliło zidentyfikować nowy, homologiczny do NPW, neuropeptyd bromowany na N końcu, nazwany neuropeptydem B [4]. W odkryciu NPB pomógł fakt, iż oba neuropeptydy wykazują znaczną homologię wynoszącą u człowieka 66%. U szczura homologia ta jest nieco niższa i wynosi 45% (ryc. 1).

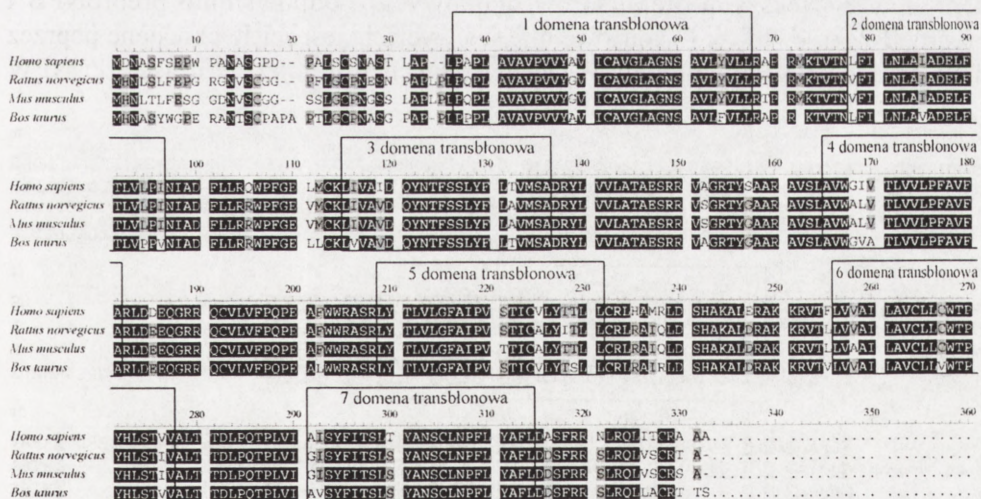
Wysoki stopień homologii GPR7 i GPR8 do receptorów opioidów i somatostatyny sugerował, że ligandy tych receptorów mogą być podobne do opioidów lub somatostatyny. Jednakże okazało się, że ani NPB, ani NPW nie wykazują podobieństwa do wspomnianych neuropeptydów.



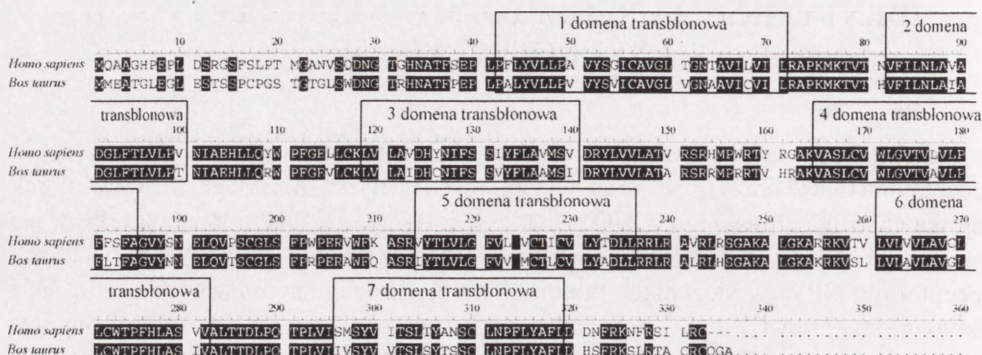
RYCINA 1. Porównanie sekwencji aminokwasów neuropeptydu B oraz neuropeptydu W człowieka oraz szczura. Czarne tło – homologia 100. Dane Genebank, nr dostępu: *Homo sapiens* NPB – BAC07175.1, *Homo sapiens* NPW – BAC07172.1, *Rattus norvegicus* NPB – NP_695205, *Rattus norvegicus* NPW – NP_695206

IDENTYFIKACJA RECEPTORÓW NEUROPEPTYDU B I NEUROPEPTYDU W

Kolejne badania dowiodły, iż NPB i NPW wiążą się swoiście i specyficznie z receptorami GPR7 oraz GPR8. W doświadczeniach tych jako modelu użyto linii komórek jajnika chomika chińskiego (CHO) z nadekspresją genu GPR7 oraz genu GPR8. Na tak zmodyfikowanych komórkach wykazano wiązanie się NPB oraz NPW do badanych receptorów. NPW w stężeniach nanomolarnych do subnanomolarnych wiąże się i aktywuje receptory GPR7 i GPR8, podczas gdy NPB wykazuje aż 1000-krotnie wyższe powinowactwo do GPR7 (w porównaniu z GPR8) [4]. Receptory GPR7 i GPR8 mają 64% identycznych sekwencji aminokwasów i wykazują znaczne podobieństwo do receptorów opioidów i somatostatyny (36–40%) [8]. O ile oba badane receptory obecne są u licznych naczelnych, o tyle u gryzoni wykryto tylko GPR7 [6]. U gryzoni występuje natomiast receptor podobny do GPR8 (*GPR8-like*), o pewnej homologii do GPR8. Zarówno receptor GPR7, jak i GPR8 wykazują bardzo wysoki stopień homologii międzygatunkowej, która wynosi ponad 90% (ryc. 2 i 3). Jak wiadomo, oba receptory, jako receptory sprzężone z białkami G, zawierają 7 domen transbłonowych.



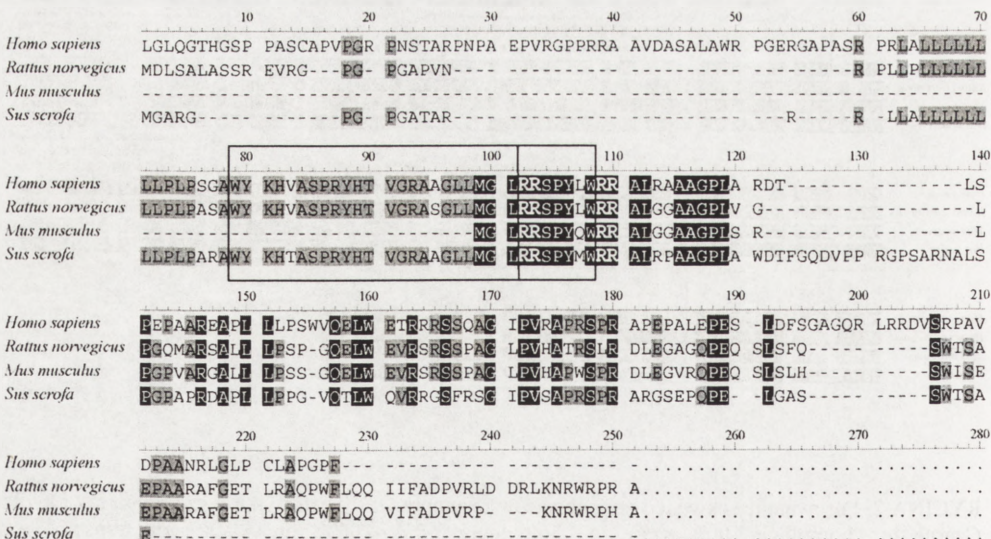
RYCINA 2. Porównanie sekwencji aminokwasów receptora GPR7 człowieka, szczura, myszy i bydła. Czarna tło – homologia 100%, szare tło – homologia >50% <100%, ramka – domeny transbłonowe. Dane Genbank, nr dostępu: *Homo sapiens* – NP_005276, *Rattus norvegicus* – XP_232691, *Mus musculus* – XM_136404, *Bos taurus* – NP_776499



RYCINA 3. Porównanie sekwencji aminokwasów receptora GPR8 człowieka i bydła. Czarne tło – homologia 100%, ramka – domeny transbłonowe. Dane Genebank, nr dostępu: *Homo sapiens* – P48146, *Bos taurus* – NP_776500

BIOSYNTETA NEUROPEPTYDU B I NEUROPEPTYDU W

Zarówno NPB jak i NPW są produktami proteolitycznego wycinania powyższych peptydów z większych prekursorów białkowych – odpowiednio preproNPB i preproNPW (ryc. 4 i 5). C-końcowe miejsce wycięcia jest ściśle określone poprzez dwie zasadowe reszty arginyiny. Wewnątrz sekwencji u dojrzałej cząsteczki NPW



RYCINA 4. Porównanie sekwencji aminokwasów ppNPW człowieka, szczura, myszy i świni. Czarne tło – homologia 100%, szare tło - homologia >50% <100%. Ramką zaznaczono sekwencje NPW 23 oraz NPW 30. RR – dwie reszty arginyiny. Dane Genebank, nr dostępu: *Homo sapiens* – BAC07172.1, *Rattus norvegicus* – NP_695206, *Mus musculus* – XP_354994, *Sus scrofa* – BAC07173

	10	20	30	40	50	60	70
<i>Homo sapiens</i>	WARSATLAA	ALALCLLAP	ELAWYKPA	GHSSYSVGRA	AGLLSGLRRS	FVARRSQPYR	GAEPPEAGA
<i>Rattus norvegicus</i>	MVRCRLVAA	ALAL---LT	ELAWYKPA	GSHHSYVGRA	AGLLSSEHFRF	ESTRRRES--	-PALRVETVP
<i>Mus musculus</i>	MARCRLVAA	ALAL---LP	ELAWYKPA	GPHHSYVGRA	SGLLSSEHFRF	ESTRRRES--	-PALRVETGP
<i>Bos taurus</i>	MAGPAMLVAA	ALALCLLIAS	ELAWYKPA	GGYYSVGRA	AGLLSSEHRS	FVARRSEPRG	GTRSLGIVCT
	80	90	100	110	120	130	140
<i>Homo sapiens</i>	SPEQLHRL	RSLAVCVQDV	APNLQRCERL	PDGRGTIOCK	ANVFLSLRAA	DCLAA.....	
<i>Rattus norvegicus</i>	LRNTEMRESV	RSLALCVKDV	TPNLQSCORQ	LNSRGTIOCK	ADVFLSLHKA	EQCSA.....	
<i>Mus musculus</i>	LRNTEMRESV	RSLALCVKDV	TPNLQSCORQ	LNSRGTIOCK	ADVFLSLHET	DQOST.....	
<i>Bos taurus</i>	FREMR--ENL	RSLAVCVQDV	TPNLQSCPEL	PDGRGTIOCK	ADVFLSLSAS	DGRK-.....	

RYCINA 5. Porównanie sekwencji aminokwasów ppNPB człowieka, szczura, myszy i bydła. Czarne tło – homologia 100%, szare tło – homologia >50% <100%. Ramką zaznaczono sekwencje NPB 29, oraz NPB 23 dla sekwencji ludzkiej. RR – dwie reszty argininy. Dane Genebank, nr dostępu: *Homo sapiens* – BAC07175, *Rattus norvegicus* – NP_695205, *Mus musculus* – NP_695020, *Bos taurus* – NP_776369

występują również dwie reszty argininy, co sugerowało, iż w warunkach naturalnych może powstawać krótsza forma tego peptydu. W istocie zidentyfikowano dwie formy NPW zbudowane odpowiednio z 23 i 30 aminokwasów (NPW23 i NPW30), z których krótsza forma była N-terminalną sekwencją większego peptydu [9]. Jednak nie wykazano różnic w wiązaniu poszczególnych form polipeptydu do receptorów, co może świadczyć że brakujące 7 aminokwasów nie wpływa na proces wiązania się z receptorem. Porównanie sekwencji aminokwasów NPW u różnych organizmów uwidacznia bardzo wysoki stopień homologii tego polipeptydu wynoszący 90%. W określeniu stopnia homologii nie uwzględniono sekwencji NPW myszy, gdyż jest to prawdopodobnie (w chwili obecnej) sekwencja niekompletna.

Dojrzała forma neuropeptydu B obejmuje 29 aminokwasów. Jednak w sekwencji aminokwasów polipeptydu pochodzącego od człowieka występują – analogicznie jak w przypadku NPW – dwie reszty argininy, umożliwiające powstanie krótszej formy tego peptydu, o długości 23 aminokwasów. Jak już wyżej wspomniano, peptyd ten ma bromowaną resztę tryptofanu w pozycji C-6 pierścienia indolowego na końcu N, jest to jedyny znany dotychczas peptyd bromowany [4, 10]. O ile bromowanie nie wpływa ani na wiązanie, ani na skuteczność NPB wobec receptora GPR7 lub GPR8, sugeruje się, że N-terminalny brom może stabilizować NPB *in vivo* [10]. NPB jest endogennym ligandem zasadniczo skierowanym do receptora GPR7 [4]. Porównanie sekwencji aminokwasów pomiędzy gatunkami uwidacznia wysoki stopień homologii między-gatunkowej badanego peptydu, jednakże – w porównaniu z NPW – homologia ta jest niższa i wynosi 62%.

LOKALIZACJA EKSPRESJI GENÓW NEUROPEPTYDU B I NEUROPEPTYDU W

Zmapowano rozkład mRNA NPB i NPW szeregu gatunków, w tym człowieka, szczura i myszy [2, 4, 5, 6, 8, 9, 10]. Okazało się, iż istnieją znaczne różnice gatunkowe w ekspresji tych genów. Ogólnie NPB wykazuje w ośrodkowym układzie nerwowym

TABELA 1. Ekspresja mRNA NPB i NPW oraz mRNA GPR7 i GPR8 w narządach człowieka i szczura, opracowano na podstawie danych Brezillon i wsp. [2] oraz Fujii i wsp. [4], Plusami oznaczono stopień ekspresji, NB – nie badano

	NPB		NPW		GPR7		GPR8	
	człowiek	szczur	człowiek	szczur	człowiek	szczur	człowiek	szczur
Mózg	+++	++	+	NB	++	++	++	brak
Podwzgórze	++	+++	-	NB	-	+++	-	brak
Hipokamp	++	+++	++	NB	+++	+	+++	brak
Wzgórze	+	+	-	NB	+	+	++	brak
Rdzeń przedłużony	NB	++	NB	NB	NB	++	NB	brak
Rdzeń kręgowy	+++	++	-	NB	-	++	-	brak
Przysadka	-	++	-	NB	++	+	++	brak
Tarczycza	-	++	+	NB	-	+	-	brak
Nadnercze	+	+	+	NB	-	+	++	brak
Trzustka	-	++	+	NB	-	NB	-	brak
Śledziona	++	+++	++	NB	-	NB	+	brak
Węzły chłonne	+	+++	+	NB	-	NB	++	brak
Nerka	+	+	+	NB	-	NB	-	brak
Jądro	++	+	++	NB	+	+	+	brak
Macica	+	+	++	NB	-	+++	-	brak
Gruczoł mlekowy	NB	+++	NB	NB	NB	-	NB	brak
Jajnik	++	+	++	NB	-	+	-	brak
Płuca	+	+	-	NB	+	+	+	brak
Tchawica	+	++	+++	NB	+++	+	-	brak
Jelito cienkie	+	+	-	NB	-	NB	-	brak
Jelito grube	-	+	-	NB	+	+	+	brak

szerszą ekspresję niż NPW, podczas gdy na obwodzie jest odwrotnie. U ludzi mRNA NPB najsilniej występuje w obrębie istoty czarnej, hipokampa, podwzgórza, rdzenia kręgowego, a na obwodzie w tchawicy, wątrobie, żołądku, śledzionie, łożysku, macicy, jądrach i jajnikach [2]. Z kolei intensywną ekspresję genu NPW stwierdza się w obrębie istoty czarnej, hipokampa, tchawicy i odbyticy człowieka. U szczura natomiast mRNA NPB występuje w korze czołowej, hipokampie, podwzgórzu; polu zaskrzyżowaniowym, jądrze przykomorowym, nadwzrokowym, jądrze grzbietowo-przyśrodkowym i brzuszno-przyśrodkowym, wzgórz, a na obwodzie w śledzionie, węzłach chłonnych, macicy oraz gruczołach sutkowych [6, 4].

W tabeli 1 przedstawiono występowanie neuropeptydów B i W oraz ich receptorów wykazane przy pomocy metody RT-PCR. Badania immunohistochemiczne potwierdziły obecność immunoreaktywnych komórek i włókien NPW23 w podwzgórzu i przysadce szczura, co przedstawiono w tabeli 2 [3]. Taki schemat rozmieszczenia NPW23-podobnych substancji sugeruje możliwą rolę tego peptydu w uwalnianiu prolaktyny i zachowaniu związanym z odżywianiem.

TABELA 2. Występowanie immunoreaktywnego NPW23 w niektórych częściach podwzgórza i przysadki szczura [3]

	Immunoreaktywne	
	komórki NPW23	włókna NPW23
Jądro przykomorowe (PVN)	+	+
Jądro nadwzrokowe (SON)	+	+
Jądra neurosekrecyjne – dodatkowe	+	-
Jądro łukowate (ARC)	+	-
Jądro okołosklepieniowe	+	-
Pole zaskrzyżowaniowe	-	+
Pole podwzgórzowe grzbietowe i boczne	+	+
Wymiosłość pośrodkowa	-	+
Ciało migdałowe	-	+
Przedni płat przysadki mózgowej	+	-
Tylny płat przysadki mózgowej	+	+

MECHANIZM DZIAŁANIA NPB I NPW

Tylko nieliczne publikacje dotyczą wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałnych modyfikowanych przez NPB i NPW. W komórkach CHO z rekombinowanymi GPR7 i GPR8 wykazano, że NPW23 i NPW30 wywierają podobny efekt hamujący na produkcję cAMP indukowaną forskoliną. Jest to efekt wrażliwy na toksynę krztusca, przy czym nie towarzyszą temu zjawisku zmiany w śródkomórkowym stężeniu jonów Ca^{2+} . Dane te sugerują drogę transdukcji sygnałów indukowanych omawianymi polipeptydami za pośrednictwem białka G [9]. W tychże komórkach NPB efektywniej

hamuje produkcję cAMP działając przez GPR7 niż przez GPR8, natomiast bromowanie NPB nie ma większego wpływu na proces hamowania produkcji cAMP ani na wiązanie się liganda z receptorem [4, 10]. W przeciwieństwie do tych obserwacji, NPB w świeżo izolowanych komórkach strefy pasmowatej/siatkowej kory nadnercza szczura znacząco stymuluje syntezę cAMP, efektu takiego nie wywiera natomiast NPW (obserwacje własne).

ROLA BIOLOGICZNA NPB

Rozkład ekspresji genu NPB w mózgu sugeruje, że polipeptyd ten bierze udział: w regulacji odżywiania, w regulacji osi neuroendokrynej, w procesach pamięci i uczenia się. Z tego zakresu istnieją tylko nieliczne publikacje. Wynika z nich, że podanie dokomorowe NPB myszom indukuje hyperfagię w ciągu pierwszych 2 godz., po czym następuje hypofagia. Takie podawanie polipeptydu powoduje u szczurów również osłabienie reakcji na podskórne iniekcje formaliny, co sugeruje rolę tego neuropeptydu w regulacji nadrdzeniowej związanej z powstawaniem bólu [10].

ROLA NPW W REGULACJI SEKRECJI HORMONÓW

Zespół Shimomury w 2002 roku opisał, iż podanie NPW w dawce 3 nmol do komór bocznych mózgu szczura stymuluje uwalnianie prolaktyny (PRL) przez przedni płat przysadki mózgowej. Maksymalny (2–3-krotny) wzrost wydzielania tego hormonu obserwowano w 20 min. od podania, natomiast powrót do wartości wyjściowej następował w 60 min. W tychże warunkach doświadczalnych nie obserwowano zmian w wydzielaniu FSH, LH, GH, ACTH i TSH. Z powodu braku danych o zależności odpowiedzi na NPW od dawki wprowadzanego polipeptydu, zespół Bakera w 2003 roku powtórzył doświadczenie Shimomury [1]. W ich doświadczeniu podanie 1 nmol NPW do komór bocznych mózgu przytomnych samców szczurów powodowało 2-krotny wzrost poziomu PRL i kortykosteronu w osoczu w stosunku do grupy kontrolnej. Natomiast po dokomorowym wstrzyknięciu 3 nmol NPW obserwowano 5–7-krotny wzrost poziomu PRL i 5-krotny kortykosteronu. W przeciwieństwie do tych wzrostów, poziomy hormonu wzrostu (GH) w osoczu były obniżone zarówno przy dawce 1 nmol jak i 3 nmol NPW.

Badania *in vitro* z zastosowaniem zawiesiny komórek przedniego płata przysadki mózgowej szczura nie wykazały natomiast wpływu NPW na uwalnianie hormonów tego płata przysadki, co sugeruje działanie NPW na poziomie podwzgórza. Ta zdolność egzogenego peptydu do stymulacji zarówno wydzielania prolaktyny, jak i stymulowania osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej sugeruje, że NPW może brać udział

w odpowiedzi podwzgorza na stres [1]. Wstępne wyniki badań własnych wskazują, iż w przypadku pierwotnej hodowli komórek kory nadnercza szczura NPW stymuluje produkcję kortykosteronu oraz proliferację badanych komórek.

ROLA NPW W REGULACJI ŁAKNIENIA

Wykrycie receptora GPR7 w jądrach związanych z regulacją bilansu energetycznego skłoniła zespół Shimomury do przeprowadzenia doświadczeń mających na celu wykazanie wpływu NPW na równowagę energetyczną [9]. Po wstrzyknięciu 10 nmol NPW do komór bocznych mózgu szczura, autorzy ci wykazali, że pobór pokarmu przez szczury otrzymujące NPW w ciągu 2 godzin był trzykrotnie wyższy niż w grupie kontrolnej [9]. Podobne wyniki dotyczące spożywania pokarmu przez szczury stymulowane przez wyższe dawki NPW obserwowali również w swoim doświadczeniu Baker i wsp. [1].

Jednakże powyżej przedstawione dane nie znajdują potwierdzenia w ostatnich doniesieniach. Mianowicie, Mondal i wsp. [7] wykazali, iż pojedyncze dokomorowe podanie NPW hamuje spożywanie pokarmu i wywołuje wzrost wydatku energetycznego, z kolei ciągła infuzja dokomorowa polipeptydu (z zastosowaniem minipompy osmotycznej) hamuje zarówno pobieranie pożywienia, jak i przyrost masy ciała szczurów. Autorzy ci wykazali także, iż podanie anty-NPW IgG stymulowało u tych zwierząt pobieranie pokarmu.

Jak z przedstawionego przeglądu piśmiennictwa wynika, NPB i NPW – z uwagi na ich szerokie występowanie i homologię do innych neuropeptydów – najprawdopodobniej odgrywają rolę w regulacji homeostazy energetycznej organizmu oraz regulacji układu neuroendokrynowego. Jednakże ich dokładna rola w tym zakresie oczekuje na wyjaśnienie.

LITERATURA

- [1] BAKER JR, CARDINAL K, BOBER C, TAYLOR MM, SAMSON WK. Neuropeptide W acts in brain to control prolactin, corticosterone, and growth hormone release. *Endocrinology* 2003; **144**: 2816–2821.
- [2] BREZILLON S, LANNOY V, FRANSSSEN JD, LE POUL E, DUPRIEZ V, LUCCHETTI J, DETHEUX M, PARMENTIER M. Identification of natural ligands for the orphan G protein-coupled receptors GPR7 and GPR8. *J Biol Chem* 2003; **278**: 776–783.
- [3] DUN SL, BRAILOIU GC, YANG J, CHANG JK, DUN NJ. Neuropeptide W-immunoreactivity in the hypothalamus and pituitary of the rat. *Neuroscience Lett* 2003; **349**: 71–74.
- [4] FUJII R, YOSHIDA H, FUKUSUMI S, HABATA Y, HOSOYA M, KAWAMATA Y, YANO T, HINUMA S, KITADA CH, ASAMI T, MORI M, FUJISAWA Y, FUJINO M. Identification of a neuropeptide modified with bromine as an endogenous ligand for GPR7. *J Biol Chem* 2002; **277**: 34010–34016.
- [5] ISHII M, FEI H, FRIEDMAN JM. Targeted disruption of GPR7, the endogenous receptor for neuropeptides B and W, leads to metabolic defects and adult-onset obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 10540–10545.
- [6] LEE DK, NGUYEN T, PORTER CA, CHENG R, GEORGE SR, O'DOWD BF. Two related G protein-coupled receptors: The distribution of GPR7 in rat brain and the absence of GPR8 in rodents. *Molec Brain Res* 1999; **71**: 96–103.

- [7] MONDAL MS, YAMAGUCHI H, DATE Y, SHIMBARA T, TOSHINAI Y, SHIMOMURA Y, MORI M, NAKAZATO M. A role for neuropeptide W in the regulation of feeding behavior. *Endocrinology* 2003; **144**: 4729–4733.
- [8] O'DOWD BF, SCHEIDELER MA, NGUYEN T, CHENG R, RASMUSSEN JS, MARCHESE A, ZASTAWNY R, HENG HH, TSUI LC, SHI X, ASA S, PUY L, GEORGE SR. The cloning and chromosomal mapping of two novel human opioid- somatostatin-like receptor genes, GPR7 and GPR8, expressed in discrete areas of the brain. *Genomics* 1995; **28**: 84–91.
- [9] SHIMOMURA Y, HARADA M, GOTO M, SUGO T, MATSUMOTO Y, ABE M, WATANABE T, ASAMI T, KITADA CH, MORI M, ONDA H, FUJINO M. Identification of neuropeptide W as the endogenous ligand for orphan G-protein-coupled receptors GPR7 and GPR8. *J Biol Chem* 2002; **277**: 35826–35832.
- [10] TANAKA H, YOSHIDA T, MIYAMOTO N, MOTOIKE T, KUROSU H, SHIBATA K, YAMANAKA A, WILLIAMS SC, RICHARDSON JA, TSUJINO N, GARRY MG, LERNER MR, KING DS, O'DOWD BF, SAKURAI T, YANAGISAWA M. Characterization of a family of endogenous neuropeptide ligands for the G protein-coupled receptors GPR7 and GPR8. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 6251–6256.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 15.09.2004 r.

Przyjęto: 02.12.2004 r.

ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań

anhoc@amp.edu.pl

PERSPEKTYWY ZASTOSOWANIA IMMUNOTERAPII W LECZENIU NEUROBLASTOMA*

PERSPECTIVES OF APPLICATION OF IMMUNOTHERAPY IN NEUROBLASTOMA TREATMENT

Irena HORWACIK

Pracownia Genetyki Molekularnej i Wirusologii, Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Streszczenie: Neuroblastoma jest najczęstszym pozaczaszkowym guzem litym u dzieci. Pomimo intensywnego leczenia u większości dzieci z neuroblastoma wysokiego ryzyka dochodzi do wznowy. Konieczne jest opracowanie nowych metod walki z minimalną chorobą resztkową, które polepszyłyby przeżywalność dzieci z neuroblastoma wysokiego ryzyka. Immunoterapia jest jedną z obecnie rozwijanych strategii. W pracy omówiono opublikowane w ostatnich latach dane literaturowe dotyczące immunoterapii neuroblastoma. Przytoczono publikacje, w których badano wzajemne oddziaływanie neuroblastoma i składników układu odpornościowego. Omówiono rozwijane w badaniach klinicznych i przedklinicznych podejścia immunoterapeutyczne do walki z tą chorobą: bierną i czynną terapię, której celem jest antygen neuroblastoma gangliozyd GD2, zastosowanie modyfikowanych komórek neuroblastoma i komórek dendrytycznych jako szczepionek.

Słowa kluczowe: neuroblastoma, immunoterapia nowotworów, przeciwciała monoklonalne, gangliozyd GD2.

Summary: Neuroblastoma is the most common extracranial tumour of childhood. Despite of the application of intensive treatment regiments, the majority of high-risk patients are eventually relapsing. This stresses the need for new therapeutical approaches to eradicate residual tumour cells, which might improve the survival of the high-risk group neuroblastoma patients. Immunotherapy of neuroblastoma is one of the currently developed strategies. In this publication recent data on application of immunotherapy in neuroblastoma treatment have been reviewed. They include the publications investigating neuroblastoma interactions with immune system. Clinically tested and preclinically developed approaches engaging the immune system to fight the tumour have been reviewed. They include data on development of the passive and active therapies targeting a neuroblastoma antigen GD2 ganglioside, as well as application of modified tumour cells and dendritic cells as vaccines.

Key words: neuroblastoma, immunotherapy, monoclonal antibody, GD2 ganglioside.

*Praca finansowana z projektu naukowo badawczego Ministerstwa Nauki i Informatyzacji
3P05A00124

1. WPROWADZENIE

Neuroblastoma (nerwiak zarodkowy współczulny) jest chorobą nowotworową wieku wczesnodziecięcego. Zaliczana jest do grupy guzów „drobno-okrągło-komórkowych”. Jej źródłem są pierwotne komórki nerwowe, wędrujące z cewy nerwowej, aby dać początek strukturom obwodowego układu nerwowego. Jest to najczęstszy pozaczaskowy guz lity [2]. Rocznie, neuroblastoma stanowi w przybliżeniu 10% wszystkich nowotworów diagnozowanych u dzieci i młodzieży (w Polsce około 70 zachorowań).

Guz pierwotny, w największej liczbie przypadków, umiejscowiony jest w okolicy nadnerczy (zwłaszcza u dzieci młodszych), a dalej w śródpiersiu, okolicach szyi i okolicy krzyżowej [25]. Stopień kliniczny neuroblastoma określany np. według międzynarodowego systemu klasyfikacji neuroblastoma (INSS, ang. *International Neuroblastoma Staging System*) i wiek są ważnymi czynnikami prognozującymi przebieg choroby [2]. U dzieci poniżej pierwszego roku życia, ze zlokalizowaną chorobą prognozy są dobre. W tej grupie wiekowej występuje również rozsiały typ choroby, z wtórnymi ogniskami nowotworu głównie w wątrobie i skórze (stopień 4S INSS). Takie dzieci, pomimo obecności wtórnych ognisk nowotworu, mają ogólnie bardzo dobre prognozy, co ma związek z obserwowaną spontaniczną regresją (zanikiem) choroby. Większość przypadków neuroblastoma nie zanika spontanicznie. Neuroblastoma wysokiego ryzyka daje złe prognozy na wyleczenie. Do tej grupy zalicza się głównie dzieci mające powyżej 1 roku życia, u których występuje: zaawansowana neuroblastoma (stopień 4 INSS) z wtórnymi ogniskami nowotworu przede wszystkim w szpiku kostnym, kościach, węzłach chłonnych lub dzieci z chorobą w stopniu 2 i 3 INSS z amplifikacją onkogenu *MYCN* [2,21].

Oprócz stopnia zaawansowania choroby czy wieku pacjenta prognostyczne znaczenie ma również typ histologiczny guza. Neuroblastoma charakteryzuje się heterogennością. Guzy różnią się stopniem zróżnicowania i dojrzewania, stąd podział na neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, ganglioneuroma [25,49]. Dodatkowo, bada się również cechy genetyczne neuroblastoma w kierunku występowania mutacji somatycznych, np. amplifikacji genu *MYCN*, zmian ploidalności, delecji 1p [35]. Amplifikacja onkogenu *MYCN* źle rokuje w przebiegu neuroblastoma [58,65].

Metody leczenia pacjentów z neuroblastoma wysokiego ryzyka obejmują intensywną indukcyjną chemioterapię, zabieg chirurgiczny, mieloablatywną konsolidację z przeszczepem komórek krwiotwórczych, radioterapię. W leczeniu minimalnej choroby resztkowej (MRD, ang. *minimal residual disease*), a więc w niszczeniu tych klonów komórek nowotworowych, które pozostały po chemioterapii i radioterapii próbuje się stosować np. pochodne kwasu retinowego czy immunoterapię [2,62]. Zastosowanie intensywnej terapii u pacjentów wysokiego ryzyka pozwala na wydłużenie czasu, w którym choroba pozostaje w remisji. Niestety, u większości pacjentów z neuroblastoma wysokiego ryzyka dochodzi do wznowy, często w miejsca odległe niż guz pierwotny, zazwyczaj do szpiku kostnego i kości, a komórki za nią odpowiedzialne charakteryzują się m.in. chemioopornością.

Przeżywalność dzieci z neuroblastoma wysokiego ryzyka jest wciąż niezadowalająca, co skłania do opracowania nowych programów leczenia. Jednym z kierunków badań nad metodami walki z MRD jest opracowanie immunoterapii neuroblastoma, u której podstaw leży mobilizacja układu odpornościowego pacjenta do walki z tą chorobą.

2. ODDZIAŁYWANIE NEUROBLASTOMA Z UKŁADEM ODPORNOŚCIOWYM

Opracowanie skutecznej immunoterapii, wymaga poznania związków pomiędzy komórkami transformowanymi a układem odpornościowym. Oddziaływanie to ma charakter złożony. Dla wielu typów nowotworów wykazano zdolność układu odpornościowego do rozpoznania i niszczenia komórek transformowanych. Z drugiej strony poznano także mechanizmy ucieczki komórek rakowych spod kontroli tego układu, czy opisano udział jego składników w patogenezie raka [22,23,28,60].

Szereg prac z ostatnich lat dostarcza informacji o oddziaływaniu neuroblastoma z układem odpornościowym:

- ◆ w 53% z 98 preparatów guza pierwotnego od pacjentów z neuroblastoma w 4 stopniu choroby przed wdrożeniem leczenia wykazano obecność komórek NK T, co związane było z ekspresją chemokiny CCL2 w badanych guzach. Obecność tych komórek silnie korelowała z 5-letnią zdolnością do przeżycia chorych dzieci [34],
- ◆ u niektórych osób zdrowych i pacjentów z neuroblastoma wykazano obecność przeciwciał klasy IgM skierowanych przeciwko neuroblastoma [18],
- ◆ zbadano, że naturalne przeciwciała klasy IgM (od osób zdrowych) hamują *in vivo* wzrost oraz tworzenie wtórnych ognisk u szczurów z ksenoprzeszczepem ludzkiej linii neuroblastoma LAN-1 [17],
- ◆ u 3 z 47 pacjentów z neuroblastoma stwierdzono obecność przeciwciał klasy IgG wiążących antygen NY-ESO-1 obecny na neuroblastoma [48],
- ◆ *in vitro*, w hodowlach limfocytów od niektórych pacjentów z neuroblastoma wykazano, że limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺ po uprzedniej stymulacji swoiście eliminują komórki neuroblastoma wykazujące ekspresję białka NY-ESO-1 [48],
- ◆ świeżo izolowane dziewicze oraz aktywowane przy pomocy interleukiny 2 (IL-2) limfocyty T $\gamma\delta$ od zdrowych dawców zabijają komórki neuroblastoma [54].

Wymienione obserwacje, a także fakt, iż u większości dzieci z neuroblastoma w stopniu 4S obserwuje się spontaniczną regresję choroby, co może mieć związek z zaangażowaniem mechanizmów odpornościowych, stanowią uzasadnienie dla prowadzenia badań na opracowaniem immunoterapeutycznego podejścia do leczenia tego rozrostu.

2.1. Antygenowość i immunogenność neuroblastoma

Na komórkach neuroblastoma wykazano ekspresję szeregu cząsteczek zaliczanych do antygenów związanych z nowotworami, co ma znaczenie dla wzbudzania swoistej komórkowej czy humoralnej odpowiedzi przeciwnowotworowej.

Gangliozyd GD2, glikolipidowy antygen, wykazuje stabilną i dość jednorodną ekspresję na komórkach neuroblastoma [26]. Dla neuroblastoma wykazano nadekspresję MYCN [53], obecność hydroksylazy tyrozyny [20], czy też białek należących do tzw. antygenów wspólnych (jądro/nowotwór), np. NY-ESO-1, MAGE-A1, MAGE-A3/A6 [48,68]. Wöfl i współpracownicy, wykazali ekspresję MAGE-A1, MAGE-A3/A6, NY-ESO-1 u odpowiednio 44, 21 i 28% spośród 19 preparatów guzów barwionych immunohistochemicznie. Otrzymany wzór barwienia świadczył o heterogennej ekspresji tych antygenów związanych z nowotworami. Zjawisko to obserwowane również dla innych typów nowotworów stanowi ograniczenie dla skutecznej eliminacji komórek rakowych z udziałem swoistych mechanizmów, w tym limfocytów T cytotoksycznych (CTL) [68].

Problem podatności neuroblastoma na CTL wciąż nurtuje badaczy. Neuroblastoma jest słabo immunogennym nowotworem, co jest związane m.in. z niskim poziomem lub brakiem cząsteczek MHC [68]. W badaniach, opisano szereg mechanizmów prowadzących do obniżenia lub braku ekspresji cząsteczek MHC I i MHC II w komórkach neuroblastoma, w tym również ekspresji indukowanej przez INF- γ [14,15,71]. Jednak, stosując metody czulsze od technik immunohistochemicznych, Spierings i współpracownicy wykazali, że nawet niski poziom cząsteczek MHC I jest wystarczający dla rozpoznania i lizy komórek neuroblastoma przez swoiste limfocyty T CD8⁺. Pozwala to przypuszczać, że neuroblastoma może być celem dla immunoterapii, jeśli opracowane zostaną metody aktywowania swoistych CTL [61].

Co więcej, na neuroblastoma brak jest wielu cząsteczek kostymulujących. Obecność mRNA dla CD40, CD80, CD86, PD-1L, B7H2, OX40L, 4-1BBL stwierdzono dla szeregu ludzkich linii neuroblastoma oraz w komórkach neuroblastoma od pacjentów. Ekspresję białka OX40L wykazano tylko dla linii GI-CA-N i IMR-32. Co ważne na komórkach neuroblastoma ze szpiku kostnego od pacjentów wykazano ekspresję cząsteczki CD40 (we wszystkich 6 przebadanych próbkach), co otwiera możliwość opracowania terapii z zastosowaniem CD40L. W połowie z tych próbek wykazano obecność cząsteczki CD86 [1].

2.2. Immunosupresja komórek dendrytycznych

Intensywnie badany jest wpływ neuroblastoma na komórki dendrytyczne (DC, ang. *dendritic cell*), co ma związek ze szczególną rolą pełnioną przez te profesjonalne komórki prezentujące antygeny w powstawaniu przeciwnowotworowej odpowiedzi odpornościowej oraz zdolnością do wzbudzania stanu tolerancji przez niedojrzałe DC [29,67].

Badania wykonane na układach modelowych wskazują na immunosupresję DC pod wpływem neuroblastoma. Wykazano, że DC różnicowane *in vitro* z prekursorów szpikowych od myszy z zaawansowaną neuroblastoma były dysfunkcyjne, nawet po transdukcji wektorem adenowirusowym kodującym gen mysiej IL-12. Użycie tych komórek jako szczepionki podawanej do guza u myszy nie prowadziło do jego zaniku, co obserwowano z użyciem DC wyprowadzonych od zwierząt zdrowych [44]. Wykazano również, iż neuroblastoma w bezpośrednim kontakcie hamuje indukowane przez TNF- α dojrzewanie DC, obniżając ich zdolność do stymulacji allogeicznych limfocytów T, a także promuje apoptozę w hodowlach DC [10].

Shurin i współpracownicy zbadali, że komórki mysiej linii neuroblastoma Neuro-2a i ludzkiej linii neuroblastoma SK-N-BE, a także obecne na nich gangliozydy, odpowiednio GM3 i GD2, upośledzają proces różnicowania się DC z komórek wyjściowych (odpowiednio szpikowych progenitorów i komórek prekursorowych CD34⁺ z krwi pępowinowej) [56].

Hamujące działanie gangliozydów na układ odpornościowy zostało szeroko opisane i jest nadal badane. U pacjentów z neuroblastoma gangliozydy, w tym GD2, są obecne we krwi. Wykazano zdolność tych związków do wiązania się do cytokin czy receptorów na komórkach krwi. Pozwala to przypuszczać, iż immunosupresyjny efekt jest wywierany nie tylko w mikrośrodkowisku nowotworu, lecz również ogólnie ustrojowo [6].

2.3. Ucieczka spod kontroli komórek NK i dopełniacza

Niski poziom cząsteczek MHC lub ich brak aktywuje komórki NK, które mają zdolność do efektywnej lizy komórek nowotworowych i wydzielania limfokin [31]. Neuroblastoma jest wrażliwa na efektorowe mechanizmy z udziałem komórek NK. Wykazano skoordynowane współdziałanie obecnych na komórkach NK receptorów naturalnej cytotoksyczności NKp46 (NCR1), NKp44 (NCR2), NKp30 (NCR3) w zabijaniu komórek ludzkich linii neuroblastoma ACN i SK-N-BE [59].

Jednak Castriconi i współpracownicy [8] zaproponowali, że cząsteczka 4Ig-B7-H3 obecna u pacjentów na komórkach neuroblastoma (negatywnych pod względem ekspresji MHC I) hamuje cytotoksyczność komórek NK. Inny mechanizm ucieczki przed aktywnością komórek NK wykazano analizując fenotyp komórek neuroblastoma NXS2 izolowanych z guzów od myszy A/J. Guzy te rozwinęły się u zwierząt po początkowym zaniku, na skutek szczepienia suboptymalną dawką immunocytokiny hu14.18-IL-2 (białko fuzyjne „uczłowieczonego” przeciwciała wiążącego gangliozyd GD2 i IL-2). Terapia ta aktywuje komórki NK. *In vitro*, w tych komórkach neuroblastoma wykazano przejściowy wzrost ekspresji MHC I, ale spadek zawartości gangliozydu GD2. Dodatkowo udało się pokazać, że komórki o takim fenotypie były mniej podatne na bezpośrednią lizę z udziałem komórek NK, jak i na cytotoksyczność komórkową z udziałem przeciwciała hu14.18-IL-2 [36].

Heterogenność jest cechą charakterystyczną guzów typu neuroblastoma. Również w hodowlach *in vitro*, występują różniące się klony komórek: dominujący typ N o fenotypie neuroblastów, typ S odpowiadający komórkom Schwanna, a także typ pośredni [49]. Obserwowana zmienność może mieć znaczenie również dla oddziaływania ze składnikami układu odpornościowego. Neuroblastoma jest wrażliwa na mechanizmy zabijania z udziałem przeciwciał. Jednak, porównując podatność, na cytotoksyczność zależną od dopełniacza (CDC, ang. *complement-dependent cytotoxicity*) odpowiadających sobie klonów typu N i S stwierdzono, że komórki typu S były bardziej odporne na CDC. Korelowało to ze zwiększoną ekspresją związanych z błoną inhibitorów dopełniacza głównie cząsteczki CD59 [9].

3. IMMUNOTERAPIA NEUROBLASTOMA – KIERUNKI PROWADZONYCH BADAŃ

Z powyższych danych wynika, że tolerancja immunologiczna neuroblastoma jest aktywnie ustanawiana i utrzymywana. Lepsze poznanie mechanizmów regulujących to zjawisko daje szansę na opracowanie nowych metod leczenia, w tym szczepionek, zdolnych do przełamania tego stanu i mobilizacji do walki z chorobą mechanizmów obronnych pacjenta.

Ze względu na ograniczoną liczbę dzieci z neuroblastoma, które mogą uczestniczyć w badaniach I fazy klinicznej, podstawowe znaczenie dla rozwoju nowych metod leczenia tej choroby mają modele zwierzęce. Należy do nich model immunokompetentnych myszy A/J, do których transplantuje się komórki syngenicznej linii neuroblastoma C1300, TBJ, Neuro-2a czy NXS2 [4]. Ze względu na niski poziom ekspresji cząsteczek MHC I czy charakter wzbudzonej odpowiedzi przeciwnowotworowej, modele te dobrze oddają stan obserwowany u pacjentów. Komórki NXS2 wykazują heterogenną, ale stabilną ekspresję gangliozydu GD2. Zastosowanie m.in. tej linii, pozwala na modelowanie przerzutów, a zdolność tworzenia przez nią ognisk nowotworu w wątrobie i szpiku kostnym przypomina zaawansowany przebieg choroby u dzieci. Inne stosowane w badaniach modele to np. ksenoprzeszczepy ludzkiej neuroblastoma u gryzoni z niedoborami układu odpornościowego, myszy transgeniczne *MYCN* [4,17,41].

Obecnie rozwijanych jest szereg immunoterapii do walki z neuroblastoma. Poniżej omówiono wybrane prace z ostatnich lat dotyczące tej tematyki.

3.1. Przeciwciała wiążące gangliozyd GD2 w terapii neuroblastoma

Ponieważ gangliozyd GD2 wykazuje wysoką i dość jednorodną ekspresję na komórkach neuroblastoma, a także ograniczone występowanie na komórkach normalnych, przeciwciała swoiście wiążące ten antygen stosowane są dla diagnozowania tej choroby i oceny postępów leczenia [46]. Ten antygen cukrowy związany z nowotworami jest także celem opracowanych immunoterapii. Wykazano, że obecność gangliozydu GD2 w stanie wolnym w surowicy chorych nie jest wystarczająca, aby ingerować z biodystrybucją swoistych przeciwciał. Dodatkowo, wiadomo, że zastosowanie biernej terapii z udziałem przeciwciał wiążących gangliozyd GD2 nie prowadzi do spadku jego ekspresji na komórkach neuroblastoma [26].

Pozyskano szereg przeciwciał monoklonalnych wiążących gangliozyd GD2 [43]. Spośród nich 2 przeciwciała mysie 3F8 (IgG3), 14G.2a (IgG2a) oraz przeciwciało chimeryczne (powstałe z połączenia z regionów zmiennych mysiego przeciwciała i regionów stałych ludzkiej IgG1) ch14.18 są testowane w próbach klinicznych [12]. Dotychczas zgromadzone dane sugerują, że bierna terapia przy pomocy tych przeciwciał może mieć zastosowanie dla leczenia MRD (konsolidacja remisji) u pacjentów z neuroblastoma wysokiego ryzyka. Szereg krajów Unii Europejskiej w tym również ośrodki w Polsce będą uczestniczyć w randomizowanych badaniach III fazy klinicznej nad zastosowaniem przeciwciała ch14.18 w leczeniu MRD u dzieci z neuroblastoma

wysokiego ryzyka (dane z E-SIOP Neuroblastoma Meeting, Kraków, 22–24 października 2004). W doświadczeniach *in vitro*, wykazano, że przeciwciała wiążące gangliozyd GD2 pośredniczą w reakcjach CDC i ADCC (cytotoksyczność zależna od przeciwciał, ang. *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) [9,33,41]. Dodatkowo, wykazano, że efekt leczniczy może być związany z wzbudzeniem sieci przeciwciał idiotypowych. Po 6 i 14 miesiącach od zakończenia terapii, w surowicy pacjentów z neuroblastoma, leczonych przeciwciałem 3F8 wykazano obecność przeciwciał anty-antydotypowych (Ab3 oraz wiążących gangliozyd GD2 Ab3'), co dodatnio korelowało z przeżyciem pacjentów [11]. Prowadzone są badania nad immunomodulacją tej terapii z zasto-sowaniem adjuwantów, np. GM-CSF, β -glukanem [13,39]. W badaniach II fazy klinicznej wykazano odpowiedź u pacjentów z neuroblastoma oporną na leczenie po terapii z udziałem przeciwciała 3F8 i GM-CSF [27].

W hodowlach komórkowych i z zastosowaniem modeli mysiej neuroblastoma bada się szereg pochodnych przeciwciał wiążących gangliozyd GD2, np.

- ◆ **immunocytokiny** np. hu14.18-GM-CSF, ch14.18-IL-2 (białka fuzyjne przeciwciał i cytokin), które w mikrośrodo-wisku guza podnoszą poziom cytokin [30,33],
- ◆ **immunotoksyny** będące białkami fuzyjnymi przeciwciał i modyfikowanych genetycznie toksyn, np. łańcucha A rycyny, egzotoksyny A *Pseudomonas*, domeny katalitycznej dyfterotoksyny, które swoiście wiążą się z komórkami nowotworowymi i wywierają na nie bezpośredni efekt cytotoksyczny [32,63,66],
- ◆ **miniciała** [5],
- ◆ **przeciwciała o podwójnej swoistości**, np. wiążące gangliozyd GD2 i CD3 [32],
- ◆ **immunoliposomy**, w których przyłączone na powierzchni przeciwciała wiążące gangliozyd GD2 umożliwiają selektywne dostarczanie do komórek neuroblastoma np. doksorubicyny, fenretynidu (4-HPR), antysensownych nukleotydów dla onkogenu *c-myb* [7,40,42].
- ◆ **chimeryczne antygenowe receptory** (ang. *chimeric antigen receptor*), które ulegając ekspresji np. na CTL kierowałyby aktywność tych komórek przeciw neuroblastoma. Przykładem jest receptor, który tworzą jednołańcuchowe fragmenty Fv przeciwciała wiążącego GD2 połączone zawiąsem z cytoplazmatyczną domeną sygnałową CD3 ζ [50].

Dla porządku należy dodać, iż efekt terapeutyczny próbuje się uzyskać z zastosowaniem przeciwciał skierowanych także przeciwko białkowym antygenom występującym na komórkach neuroblastoma [16, 37].

3.2. Czynna terapia, której celem jest gangliozyd GD2

Antygeny węglowodanowe związane z nowotworami wykazując największy poziom ekspresji na komórkach rakowych stanowią atrakcyjny cel również dla czynnej terapii. Wiadomo, iż gangliozyd GD2 jest słabo immunogenny u ludzi. Antygeny cukrowe zaliczane są bowiem do grupy antygenów grasiczoniezależnych. Próbuje się przełamać ten stan tolerancji. Przykładem może być zastosowanie do szczepienia zamiast antygenów cukrowych cząsteczek zastępczych, np. przeciwciał antydotypowych czy mimotopów peptydowych.

Badana jest szczepionka DNA kodująca w formie wydzielniczej jednołańcuchowe fragmenty Fv przeciwciała antyidotypowego 1A7 (Ab2 β), które zawierają „wewnętrzny obraz” gangliozydu GD2. Podanie jej domięśniowo myszom wzbudzało odpowiedź humoralną skierowaną przeciwko fragmentom przeciwciała 1A7, a także przeciwko gangliozydowi GD2. Ta szczepionka nie wzbudzała jednak odpowiedzi komórkowej [72].

Kolejnym podejściem jest użycie mimotopów peptydowych wyłowionych z fagowych bibliotek peptydowych, by naśladowały wyjściowy antygen. Trafność takiego podejścia wykazano m.in. dla antygeny cukrowego Lewis Y [24]. Trwają prace nad zastosowaniem mimotopów peptydowych również w przypadku gangliozydu GD2. Przy pomocy przeciwciała 14G2a wyłowiono peptydy ulegające fagowej ekspresji, a wiążące się do tego przeciwciała. Aktualnie, bada się ich antygenowe właściwości i zdolność do wzbudzania swoistej dla gangliozydu GD2 odpowiedzi odpornościowej (informacja własna autora).

3.3. Modyfikowane komórki nowotworowe jako szczepionki

Wykorzystanie do szczepienia komórek rakowych ma już długą tradycję, również w przypadku neuroblastoma. Stosuje się zarówno autologiczne, jak i allogeniczne komórki. Prowadzone są badania nad wzmocnieniem immunogennych właściwości szczepionek opartych na komórkach nowotworowych. Z użyciem wektorów wirusowych i niewirusowych modyfikuje się te komórki w celu uzyskania ekspresji (przejsiowej lub stabilnej) cytokin, chemokin, cząsteczek MHC, czy cząsteczek kostymulujących. W ostatnich latach opublikowano szereg badań z wykorzystaniem szczepionek opartych na modyfikowanych komórkach neuroblastoma.

W badaniach I fazy klinicznej sprawdzano szczepionkę opartą na mieszaninie naświetlonych allogenicznych komórek linii neuroblastoma SJNB-JG-G12 produkujących ludzką IL-2 i limfotaktynę. Była ona dobrze tolerowana w badanych dawkach. Jej zastosowanie wzmagало reaktywność immunologiczną u pacjentów. Obserwowano m.in. naciekanie miejsca iniekcji przez limfocyty T CD4⁺, CD8⁺, komórki Langerhansa CD1a⁺, a u części pacjentów wzrost aktywności cytotoksycznej komórek NK, wzrost IL-5 w osoczu czy wreszcie wzbudzenie przeciwciał klasy IgG wiążących się do komórek użytych do immunizacji [51].

Na modelach zwierzęcych sprawdzane są kolejne szczepionki. Użycie do nastrzykiwania guzów powstałych z niemodyfikowanych komórek Neuro-2a szczepionki z naświetlonych Neuro-2a wykazujących ekspresję ludzkiej IL-2 oraz białka fuzyjnego ludzkiej IL-12 dawało lepszy efekt terapeutyczny, w porównaniu z komórkami modyfikowanymi tylko jedną z tych cytokin. Szczepionka ta aktywowała limfocyty T CD8⁺ i CD4⁺ [57]. Zdolność do hamowania wzrostu ustalonych guzów i wytworzenia przeciwnowotworowej pamięci immunologicznej wykazano dla szczepionki, złożonej z komórek Neuro-2a transdukowanych wektorem retrowirusowym kodującym GM-CSF w połączeniu z oligodeoksynukleotydami zawierającymi niemetylowane sekwencje CpG [52].

Yan i współpracownicy porównali przeciwnowotworowe właściwości szczepionki z agresywnego klonu komórek Neuro-2a, AGN2a, stabilnie transfekowanego cząsteczkami kostymulującymi: 4-1BBL i B7-1, B7-2 i B7-1 oraz tylko B7-1. Najlepszą oporność przed niemodyfikowanym klonem AGN2a uzyskano po podaniu komórek transfekowanych 4-1BBL i B7-1, a najstabszą po podaniu komórek z ekspresją tylko B7-1 [69].

Ciekawym podejściem jest również wykorzystanie onkolitycznego replikującego wirusa opryszczki pospolitej typu-1. Użyto go do transdukcji *in vivo* guzów u myszy konstruktem genowym kodującym rozpuszczalne białko fuzyjne dimeru B7-1 (części zewnątrzkomórkowej) i części Fc przeciwciała IgG1. Białko to uwalniane w środowisku komórek nowotworowych może dostarczać sygnału niezbędnego do aktywacji przeciwnowotworowej odpowiedzi komórkowej. Zastosowanie takiej metody modyfikacji komórek nowotworowych prowadziło do znaczącego ograniczenia wzrostu guza, w czym pośredniczyły limfocyty T CD8⁺ [64].

3.4. Zastosowanie komórek dendrytycznych

Jeszcze innym podejściem są próby użycia DC, choć wymagają one optymalizacji szeregu parametrów, np. stopnia dojrzałości, dawki, drogi i częstości podawania DC, metody dostarczenia antygeny do DC [3]. Na modelu myszy A/J bada się przeciwnowotworową aktywność DC transdukowanych wektorem adenowirusowym kodującym mysią IL-12 [45]. W testach I fazy klinicznej u dzieci z guzami litymi sprawdzono mieszaninę niedojrzałych DC inkubowanych osobno z lizatem autologicznych komórek nowotworowych od pacjentów i KLH. U niektórych pacjentów, w tym jednego z neuroblastoma, po szczepieniu obserwowano wzbudzenie swoistej przeciwnowotworowej odpowiedzi limfocytów T w hodowli świeżo izolowanych niestymulowanych PBMC (jednojądrzastych komórek krwi obwodowej) [19]. Bada się także szczepionki oparte na zfuzjowanych metodą elektroporacji DC i komórki Neuro-2a [38].

4. PODSUMOWANIE

Metody immunoterapeutyczne w leczeniu MRD u dzieci z neuroblastoma wysokiego ryzyka są obecnie sprawdzane w badaniach klinicznych i intensywnie rozwijane w badaniach przedklinicznych. Należy również wspomnieć o innych potencjalnych możliwościach leczenia opartych na biologicznych właściwościach neuroblastoma. Bada się m.in. różnicowanie neuroblastoma z udziałem pochodnych kwasu retinowego, zastosowanie aktywnie pobieranej przez neuroblastoma ¹³¹I-meta-jodobenzylguanidyny, związków hamujących angiogenezę, czy indukujących apoptozę [47,55,70]. W przyszłości po optymalizacji mogą one uzupełnić stosowane już programy leczenia tej choroby. Należy mieć nadzieję, że ich zastosowanie przyczyni się do poprawy przeżywalności dzieci z neuroblastoma wysokiego ryzyka.

LITERATURA

- [1] AIROLDI I, LUALDI S, BRUNO S, RAFFAGHELLO L, OCCHINO M, GAMBINI C, PISTOIA V, CORRIAS MV. Expression of costimulatory molecules in human neuroblastoma. Evidence that CD40+ neuroblastoma cells undergo apoptosis following interaction with CD40L. *Br J Cancer* 2003; **88**: 1527–1536.
- [2] BALWIERZ W. Strategia postępowania w nerwiaku zarodkowym współczulnym. *Przegl Lek* 2004; **61**; supl. 2: 3–8.

- [3] BANCHEREAU J, SCHULER-THURNER B, PALUCKA AK, SCHULER G. Dendritic cells as vectors for therapy. *Cell* 2001; **106**: 271–274.
- [4] BELTINGER C, DEBATIN KM. Murine models for experimental therapy of pediatric solid tumors with poor prognosis. *Int J Cancer* 2001; **92**: 313–318.
- [5] BESTAGNO M, OCCHINO M, CORRIAS MV, BURRONE O, PISTOIA V. Recombinant antibodies in the immunotherapy of neuroblastoma: perspectives of new developments. *Cancer Lett* 2003; **197**: 193–198.
- [6] BIRKLE S, ZENG G, GAO L, YU RK, AUBRY J. Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression. *Biochemie* 2003; **85**: 455–463. *Br J Cancer* 2004; **90**: 2210–2218.
- [7] BRIGNOLE C, PAGNAN G, MARIMPIETRI D, COSIMO E, ALLEN TM, PONZONI M, PASTORINO F. Targeted delivery system for antisense oligonucleotides: a novel experimental strategy for neuroblastoma treatment. *Cancer Lett* 2003; **197**: 231–235.
- [8] CASTRICONI R, DONDERO A, AUGUGLIARO R, CANTONI C, CARNEMOLLA B, SEMENTA AR, NEGRI F, CONTE R, CORRIAS MV, MORETTA L, MORETTA A, BOTTINO C. Identification of 4Ig-B7-H3 as a neuroblastoma-associated molecule that exerts a protective role from an NK cell-mediated lysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 12640–12645.
- [9] CHEN S, CARAGINE T, CHEUNG NK, TOMLINSON S. Surface antigen expression and complement susceptibility of differentiated neuroblastoma clones. *Am J Pathol* 2000; **156**: 1085–1891.
- [10] CHEN X, DOFFEK K, SUGG SL, SHILYANSKY J. Neuroblastoma cells inhibit the immunostimulatory function of dendritic cells. *J Pediatr Surg* 2003; **38**: 901–905.
- [11] CHEUNG NK, GUO HF, HELLER G, CHEUNG IY. Induction of Ab3 and Ab3' antibody was associated with long-term survival after anti-G(D2) antibody therapy of stage 4 neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2000; **6**: 2653–2660.
- [12] CHEUNG NK, KUSHNER BH, KRAMER K. Monoclonal antibody-based therapy of neuroblastoma. *Hematol Clin North Am* 2001; **15**: 853–866.
- [13] CHEUNG NK, MODAK S. Oral (1→3), (1→4)-β-D-glucan synergizes with antiganglioside GD2 monoclonal antibody 3F8 in the therapy of neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2002; **8**: 1217–1223.
- [14] CORRIAS MV, OCCHINO M, CROCE M, DE AMBROSIS A, PISTILLO MP, BOCCA P, PISTOIA V, FERRINI S. Lack of HLA-class I antigens in human neuroblastoma cells: analysis of its relationship to TAP and tapasin expression. *Tissue Antigens* 2001; **57**: 110–117.
- [15] CROCE M, DE AMBROSIS A, CORRIAS MV, PISTOIA V, OCCHINO M, MEAZZA R, GIRON-MICHEL J, AZZARONE B, ACCOLLA RS, FERRINI S. Different levels of control prevent interferon-γ-inducible HLA-class II expression in human neuroblastoma cells. *Oncogene* 2003; **22**: 7848–7857.
- [16] DEHAL PK, EMBLETON MJ, KEMSHEAD JT, HAWKINS RE. Targeted cytokine delivery to neuroblastoma. *Biochem Soc Trans* 2002; **30**: 518–520.
- [17] ENGLER S, THIEL C, FORSTER K, DAVID K, BREDEHORST R, JUHL H. A novel metastatic animal model reflecting the clinical appearance of human neuroblastoma: growth arrest of orthotopic tumors by natural, cytotoxic human immunoglobulin M antibodies. *Cancer Res* 2001; **61**: 2968–2973.
- [18] FUKUDA M, NOZAKI C, ISHIGURO Y, HORIBE K. Distribution of natural antibody against human neuroblastoma among children with or without neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 2001; **36**: 147–148.
- [19] GEIGER JD, HUTCHINSON RJ, HOHENKIRK LF, MCKENNA EA, YANIK GA, LEVINE JE, CHANG AE, BRAUN TM, MULE JJ. Vaccination of pediatric solid tumor patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells can expand specific T cells and mediate tumor regression. *Cancer Res* 2001; **61**: 8513–8519.
- [20] HUEBENER N, LANGE B, LEMMEL C, RAMMENSEE HG, STRANDBY A, WENKEL J, JIKAI J, ZENG Y, GAEDICKE G, LODE HN. Vaccination with minigenes encoding for novel «self» antigens are effective in DNA-vaccination against neuroblastoma. *Cancer Lett* 2003; **197**: 211–217.
- [21] IKEDA H, IEHARA T, TSUCHIDA Y, KANEKO M, HATA J, NAITO H, IWAFUCHI M, OHNUMA N, MUGISHIMA H, TOYODA Y, HAMAZAKI M, MIMAYA J, KONDO S, KAWA K, OKADA A, HIYAMA E, SUIA S, TAKAMATSU H. Experience with International Neuroblastoma Staging System and Pathology Classification. *Br J Cancer* 2002 **86**: 1110–1116.
- [22] KAWIAK J, HUS I, ROLIŃSKI J, HOSER G, DMOSZYŃSKA A. Mechanizmy immunologiczne w nowotworach i próby wykorzystania ich w immunoterapii. *Post Biol Kom* 2004; **31**; supl. 22: 67–77.
- [23] KHONG HT, RESTIFO NP. Natural selection of tumor variants in the generation of „tumor escape” phenotypes. *Nat Immunol* 2002; **3**: 999–1005.
- [24] KIEBER-EMMONS T, MONZAVI-KARBASSI B, WANG B, LUO P, WEINER DB. Cutting edge: DNA immunization with minigenes of carbohydrate mimotopes induce functional anti-carbohydrate antibody response. *J Immunol* 2000; **165**: 623–627.

- [25] KLEPACKA T, MICHALAK E, PTASZYNSKI K, SZELIGA M, LIEBHART M. Neuroblastoma – epidemiologia, diagnostyka patomorfologiczna i molekularna, prognoza. *Przegl Lek* 2003; **60**; supl. 5: 22–26.
- [26] KRAMER K, GERALD WL, KUSHNER BH, LARSON SM, HAMEED M, CHEUNG NK. Disialoganglioside GD2 loss following monoclonal antibody therapy is rare in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 2001; **36**: 194–196.
- [27] KUSHNER BH, KRAMER K, CHEUNG NK. Phase II trial of the anti-G(D2) monoclonal antibody 3F8 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2001; **19**: 4189–4194.
- [28] LIN EY, POLLARD JW. Role of infiltrated leucocytes in tumour growth and spread. *Br J Cancer* 2004; **90**: 2053–2058.
- [29] LIU YJ. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adoptive immunity. *Cell* 2001; **106**: 259–262.
- [30] LODE HN, REISFELD RA. Targeted cytokines for cancer immunotherapy. *Immunol Res* 2000; **21**: 279–288.
- [31] LONG EO. Tumor cell recognition by natural killer cells. *Semin Cancer Biol* 2002; **12**: 57–61.
- [32] MANZKE O, RUSSELLO O, LEENEN C, DIEHL V, BOHLEN H, BERTHOLD F. Immunotherapeutic strategies in neuroblastoma: antitumoral activity of deglycosylated Ricin A conjugated anti-GD2 antibodies and anti-CD3xanti-GD2 bispecific antibodies. *Med Pediatr Oncol* 2001; **36**: 185–189.
- [33] METELITSA LS, GILLIES SD, SUPER M, SHIMADA H, REYNOLDS CP, SEEGER RC. Antidisialoganglioside/granulocyte macrophage-colony-stimulating factor fusion protein facilitates neutrophil antibody-dependent cellular cytotoxicity and depends on FcγRII (CD32) and Mac-1 (CD11b/CD18) for enhanced effector cell adhesion and azurophil granule exocytosis. *Blood* 2002; **99**: 4166–4173.
- [34] METELITSA LS, WU HW, WANG H, YANG Y, WARSIZ, ASGHARZADEH S, GROSHEN S, WILSON SB, SEEGER RC. Natural killer T cells infiltrate neuroblastomas expressing the chemokine CCL2. *J Exp Med* 2004; **199**: 1213–1221.
- [35] MORA J, GERALD WL, QIN J, CHEUNG NK. Molecular genetics of neuroblastoma and the implications for clinical management: a review of the MSKCC experience. *Oncologist* 2001; **6**: 263–268.
- [36] NEAL ZC, IMBODEN M, RAKHMILEVICH AL, KIM KM, HANK JA, SURFUS J, DIXON JR, LODE HN, REISFELD RA, GILLIES SD, SONDEL PM. NXS2 murine neuroblastomas express increased levels of MHC class I antigens upon recurrence following NK-dependent immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2004; **53**: 41–52.
- [37] ONDA M, WANG QC, GUO HF, CHEUNG NK, PASTAN I. *In vitro* and *in vivo* cytotoxic activities of recombinant immunotoxin 8H9(Fv)-PE38 against breast cancer, osteosarcoma, and neuroblastoma. *Cancer Res* 2004; **64**: 1419–1424.
- [38] ORENTAS RJ, SCHAUER D, BIN Q, JOHNSON BD. Electrofusion of a weakly immunogenic neuroblastoma with dendritic cells produces a tumor vaccine. *Cell Immunol* 2001; **213**: 4–13.
- [39] OZKAYNAK MF, SONDEL PM, KRAILO MD, GAN J, JAVORSKY B, REISFELD RA, MATTHAY KK, REAMAN GH, SEEGER RC. Phase I study of chimeric human/murine anti-ganglioside G(D2) monoclonal antibody (ch14.18) with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in children with neuroblastoma immediately after hematopoietic stem-cell transplantation: a Children's Cancer Group Study. *J Clin Oncol* 2000; **18**: 4077–4085.
- [40] PASTORINO F, BRIGNOLE C, MARIMPIETRI D, SAPRA P, MOASE EH, ALLEN TM, PONZONI M. Doxorubicin-loaded Fab' fragments of anti-disialoganglioside immunoliposomes selectively inhibit the growth and dissemination of human neuroblastoma in nude mice. *Cancer Res* 2003; **63**: 86–92.
- [41] RAFFAGHELLO L, MARIMPIETRI D, PAGNAN G, PASTORINO F, COSIMO E, BRIGNOLE C, PONZONI M, MONTALDO PG. Anti-GD2 monoclonal antibody immunotherapy: a promising strategy in the prevention of neuroblastoma relapse. *Cancer Lett* 2003; **197**: 205–209.
- [42] RAFFAGHELLO L, PAGNAN G, PASTORINO F, COSIMO E, BRIGNOLE C, MARIMPIETRI D, BOGENMANN E, PONZONI M, MONTALDO PG. Immunoliposomal fenretinide: a novel antitumoral drug for human neuroblastoma. *Cancer Lett* 2003; **197**: 151–155.
- [43] RAVINDRANATH MH, MORTON DL. Antigens: carbohydrates. [w] Encyclopedia of Life Sciences, London: Nature Publishing Group 2001, <http://www.els.net>.
- [44] REDLINGER RE JR, MAILLIARD RB, BARKSDALE EM JR. Advanced neuroblastoma impairs dendritic cell function in adoptive immunotherapy. *J Pediatr Surg* 2003; **38**: 857–862.

- [45] REDLINGER RE JR, MAILLIARD RB, BARKSDALE EM JR. Neuroblastoma and dendritic cell function. *Semin Pediatr Surg* 2004; **13**: 61–71.
- [46] REULAND P, GEIGER L, THELEN MH, HANDGRETINGER R, HAASE B, MULLER-SCHAUBENBURG W, NIETHAMMER D, BARES R. Follow-up in neuroblastoma: comparison of metaiodobenzylguanidine and a chimeric anti-GD2 antibody for detection of tumor relapse and therapy response. *J Pediatr Hematol Oncol* 2001; **23**: 437–442.
- [47] REYNOLDS CP, MATTHAY KK, VILLIBLANCA J, MAURER BJ. Retinoid therapy of high risk neuroblastoma. *Cancer Lett* 2003; **197**: 185–192.
- [48] RODOLFO M, LUKSCH R, STOCKERT E, CHEN YT, COLLINI P, RANZANI T, LOMBARDO C, DALERBA P, RIVOLTINI L, ARIENTI F, FOSSATI-BELLANI F, OLD LJ, PARMIANI G, CASTELLI C. Antigen-specific immunity in neuroblastoma patients: antibody and T-cell recognition of NY-ESO-1 tumor antigen. *Cancer Res* 2003; **63**: 6948–6955.
- [49] ROSS RA, BIEDLER JL, SPENGLER BA. A role for distinct cell types in determining malignancy in human neuroblastoma cell lines and tumors. *Cancer Lett* 2003; **197**: 35–39.
- [50] ROSSIG C, BOLLARD CM, NUCHTERN JG, MERCHANT DA, BRENNER MK. Targeting of G(D2)-positive tumor cells by human T lymphocytes engineered to express chimeric T-cell receptor genes. *Int J Cancer* 2001; **94**: 228–236.
- [51] ROUSSEAU RF, HAIGHT AE, HIRSCHMANN-JAX C, YVON ES, RILL DR, MEI Z, SMITH SC, INMAN S, COOPER K, ALCOSER P, GRILLEY B, GEE A, POPEK E, DAVIDOFF A, BOWMAN LC, BRENNER MK, STROTHER D. Local and systemic effects of an allogeneic tumor cell vaccine combining transgenic human lymphotactin with interleukin-2 in patients with advanced or refractory neuroblastoma. *Blood* 2003; **101**: 1718–1726.
- [52] SANDLER AD, CHIHARA H, KOBAYASHI G, ZHU X, MILLER MA, SCOTT DL, KRIEG AM. CpG oligonucleotides enhance the tumor antigen-specific immune response of a granulocyte macrophage colony-stimulating factor-based vaccine strategy in neuroblastoma. *Cancer Res* 2003; **63**: 394–399.
- [53] SARKAR AK, BURLINGAME SM, ZANG YQ, DULAI V, HICKS MJ, STROTHER DR, NUCHTERN JG. Lysis of MYCN-amplified neuroblastoma cells by MYCN peptide-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res* 2000; **60**: 1908–1913.
- [54] SCHILBACH KE, GEISELHART A, WESSELS JT, NIETHAMMER D, HANDGRETINGER R. Human $\gamma\delta$ T lymphocytes exert natural and IL-2-induced cytotoxicity to neuroblastoma cells. *J Immunother* 2000; **23**: 536–548.
- [55] SCHOR NF. Neuroblastoma as a neurobiological disease. *J Neurooncol* 1999; **41**: 159–166.
- [56] SHURIN GV, SHURIN MR, BYKOVSKAIA S, SHOGAN J, LOTZE MT, BARKSDALE EM JR. Neuroblastoma-derived gangliosides inhibit dendritic cell generation and function. *Cancer Res* 2001; **61**: 363–369.
- [57] SIAPATI KE, BARKER S, KINNON C, MICHALSKI A, ANDERSON R, BRICKELL P, THRASHER AJ, HART SL. Improved antitumor immunity in murine neuroblastoma using a combination of IL-2 and IL-12. *Br J Cancer* 2003; **88**: 1641–1648.
- [58] SIEDLECKI JA. Zastosowanie diagnostyki genetycznej w chorobach nowotworowych. *Post Biol Kom* 2000; **27**; supl. 15: 79–89.
- [59] SIVORI S, PAROLINI S, MARCENARO E, CASTRICONI R, PENDE D, MILLO R, MORETTA A. Involvement of natural cytotoxicity receptors in human natural killer cell-mediated lysis of neuroblastoma and glioblastoma cell lines. *J Neuroimmunol* 2000; **107**: 220–225.
- [60] SMYTH MJ, GODFREY DI, TRAPANI JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2001; **2**: 293–299.
- [61] SPIERINGS DC, AGSTERIBBE E, WILSCHUT J, HUCKRIEDE A. Characterization of antigen-presenting properties of tumour cells using virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Br J Cancer* 2000; **82**: 1474–1479.
- [62] STERBA J. Contemporary therapeutic options for children with high risk neuroblastoma. *Neoplasma* 2002; **49**: 133–140.
- [63] THOMAS PB, DELATTE SJ, SUTPHIN A, FRANKEL AE, TAGGE EP. Effective targeted cytotoxicity of neuroblastoma cells. *J Pediatr Surg* 2002; **37**: 539–544.
- [64] TODO T, MARTUZA RL, RABKIN SD, JOHNSON PA. Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I presentation and tumor cell killing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 6396–6401.
- [65] TONINI GP, ROMANI M. Genetic and epigenetic alterations in neuroblastoma. *Cancer Lett* 2003; **197**: 69–73.
- [66] TUR MK, SASSE S, STOCKER M, DJABELKHIR K, HUHNS M, MATTHEY B, GOTTSTEIN C, PFITZNER T, ENGERT A, BARTH S. An anti-GD2 single chain Fv selected by phage display and fused to *Pseudomonas* exotoxin A develops specific cytotoxic activity against neuroblastoma derived cell lines. *Int J Mol Med* 2001; **8**: 579–584.

- [67] VALTEAU-COUANET D, LÉBOULAIRE C, MAINCENT K, TOURNIER M, HARTMANN O, BERNARD J, BEAUJEAN F, BOCCACCIO C, ZITVOGEL L, ANGEVIN E. Dendritic cells for NK/LAK activation: rationale for multicellular immunotherapy in neuroblastoma patients. *Blood* 2002; **100**: 2554–2561.
- [68] WÖLFL M, JUNGBLUTH AA, GARRIDO F, CABRERA T, MEYEN-SOUTHARD S, SPITZ R, ERNESTUS K, BERTHOLD F. Expression of MHC class I, MHC class II, and cancer germline antigens in neuroblastoma. *Cancer Immunol Immunother* 2004 (praca w druku).
- [69] YAN X, JOHNSON BD, ORENTAS RJ. Murine CD8 lymphocyte expansion *in vitro* by artificial antigen-presenting cells expressing CD137L (4-1BBL) is superior to CD28, and CD137L expressed on neuroblastoma expands CD8 tumour-reactive effector cells *in vivo*. *Immunology* 2004; **112**: 105–116.
- [70] YANIK GA, LEVINE JE, MATTHAY KK, SISSON JC, SHULKIN BL, SHAPIRO B, HUBERS D, SPALDING S, BRAUN T, FERRARA JL, HUTCHINSON RJ. Pilot study of iodine-131-metaiodobenzylguanidine in combination with myeloablative chemotherapy and autologous stem-cell support for the treatment of neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2002; **20**: 2142–2149.
- [71] YAZAWA T, ITO T, KAMMA H, SUZUKI T, OKUDELA K, HAYASHI H, HORIGUCHI H, OGATA T, MITSUI H, IKEDA M, KITAMURA H. Complicated mechanisms of class II transactivator transcription deficiency in small cell lung cancer and neuroblastoma. *Am J Pathol* 2002; **161**: 291–300.
- [72] ZEYTIM HE, TRIPATHI PK, BHATTACHARYA-CHATTERJEE M, FOON KA, CHATTERJEE SK. Construction and characterization of DNA vaccines encoding the single-chain variable fragment of the anti-idiotypic antibody 1A7 mimicking the tumor-associated antigen disialoganglioside GD2. *Cancer Gene Ther* 2000; **7**: 1426–1436.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 02.10.2004 r.

Przyjęto: 10.12.2004 r.

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

**ZABURZENIA HEMATOLOGICZNE
WIEKU PODESZŁEGO**

32 KONFERENCJA BIOLOGII KOMÓRKI
Warszawa 27 listopada 2004 roku

Redaktor
Andrzej Myśliwski

Organizatorzy
A. Myśliwski, J. Moraczewski, P. Sysa

PROGRAM

Konferencji nt. *Zaburzenia hematologiczne wieku podeszłego*
organizowanej przez *Komisję Biologii Starzenia PAN* oraz *Polskie Towarzystwo
Biologii Komórki, Polskie Towarzystwo Anatomiczne i Polskie Towarzystwo
Histochemików i Cytochemików*

- Prof. dr hab. **Anna Dmoszyńska** (Lublin) – Nowotwory układu krwiotwórczego występujące u osób starszych
- Dr med. **Jolanta Wieczorek**, prof. dr hab. **W. W. Jędrzejczak** (Warszawa) – Zależność tolerancji leczenia onkohematologicznego od wieku
- Dr hab. **Kornelia Kędziora-Kornatowska** (Bydgoszcz) – Starzenie się układu czerwonokrwinkowego a anemia w wieku podeszłym
- Mgr anal. med. **R. Podkówka** (Poznań) – Ocena morfologii leukocytów krwi obwodowej sztalatków
- Prof. dr hab. **Andrzej Myśliwski** (Gdańsk) – Czy krwiotwórcze komórki macierzyste starzeją się?

WSTĘP – INTRODUCTION

Proces starzenia się człowieka obejmujący cały organizm, przebiega w różnym tempie w tworzących go narządach i układach. Jednak zmiany związane z wiekiem zawsze prowadzą do upośledzenia funkcji tych narządów i układów. Prowadzi to do zwiększającego się zagrożenia wystąpieniem procesów chorobowych. Poznawanie relacji pomiędzy zmianami wynikającymi z procesu starzenia a rozwojem procesów patologicznych jest jednym z głównych problemów, jakimi zajmuje się współczesna gerontologia i geriatria. Dlatego też Komisja Biologii Starzenia PAN przyjęła jako temat kolejnego posiedzenia „*Zaburzenia hematologiczne wieku podeszłego*”. Posiedzenie to miało charakter konferencji współorganizowanej przez Polskie Towarzystwo Anatomiczne, Polskie Towarzystwo Histochemików i Cytochemików oraz Oddział Warszawski Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki. Konferencja była kontynuacją cyklu posiedzeń naukowo-szkoleniowych poświęconych biologii komórki a organizowanych od wielu lat przez Panią Profesor Zofię Osuchowską oraz Profesora Jerzego Kawiaka. Miejscem konferencji, która odbyła się 27 listopada 2004 roku, była sala wykładowa w gmachu Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego i za jej udostępnienie serdecznie dziękujemy. Problemem, który dominował wśród prezentowanych na konferencji prac były nowotwory układu krwiotwórczego u ludzi starszych, częstość ich występowania oraz efekty leczenia. Z przedstawionych referatów wynikało, że ludzie starsi gorzej niż młodzi znoszą chemioterapię, ale odnowa układu krwiotwórczego po przeszczepie szpiku kostnego przebiega podobnie jak u ludzi młodych. Takie obserwacje spowodowały, że wiek podeszły nie stanowi przeciwwskazania do wykonania tego zabiegu, który daje szansę całkowitego wyleczenia.

*Prof. Andrzej Myśliwski
Zakład Histologii i Immunologii
Akademii Medycznej w Gdańsku*

WITAJCIE W KRAJU

Witajcie w naszym kraju, gdzie przyroda jest tak piękna i różnorodna. Nasze tereny są pełne uroku i spokoju, idealnym miejscem na wypoczynek i relaks. Zapraszamy do zwiedzania i odkrywania piękna naszego regionu. Nasze krajoznawstwo oferuje wiele ciekawych atrakcji i miejsc do odwiedzenia. Zapraszamy do zwiedzania i odkrywania piękna naszego regionu. Nasze krajoznawstwo oferuje wiele ciekawych atrakcji i miejsc do odwiedzenia. Zapraszamy do zwiedzania i odkrywania piękna naszego regionu. Nasze krajoznawstwo oferuje wiele ciekawych atrakcji i miejsc do odwiedzenia.

NOWOTWORY HEMATOLOGICZNE WIEKU STARSZEGO

HAEMATOLOGICAL MALIGNANCIES IN OLDER PATIENTS

A. DMOSZYŃSKA¹, K. GIANNOPOULOS²

¹Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku oraz

²Zakład Immunologii Klinicznej AM w Lublinie

Streszczenie: Obserwuje się wzrastającą liczbę chorych z nowotworami hematologicznymi w wieku powyżej 60 lat. Chorzy ci wymagają chemioterapii i/lub radioterapii, ale w porównaniu osobami młodszymi źle tolerują takie leczenie i notuje się także zwiększony odsetek śmierci związany z taką terapią. Zjawisko to nie jest w pełni zrozumiałe, gdyż zmiany w układzie komórek macierzystych nie są duże w porównaniu z osobami młodszymi i co ciekawsze funkcja komórek dendrytycznych jest prawidłowa. Dla tych chorych obiecującą opcją leczniczą wydaje się immunoterapia. W artykule tym dokonano także przeglądu nowotworów hematologicznych charakterystycznych dla wieku starszego.

Słowa kluczowe: nowotwory hematologiczne, starsi chorzy, opcje terapeutyczne.

Summary: In the near future increasing number of elderly patients with haematological malignancies will require chemotherapy and/or radiotherapy. The high dose or even standard chemotherapy usually results in higher, than in younger patients, percentage of life-threatening myelosuppression and deaths. This phenomenon in elderly patients is not clear. There are reports suggesting that in elderly patients age-related changes are not so different comparing to younger subjects. In elderly patients anti-tumour response is reduced but function of dendritic cells in these patients is preserved. It seems that cell-based immunotherapy might be a promising therapeutic option for age-advanced cancer patients. In this paper we shortly reviewed some age-specific haematological malignancies.

Key words: haematological malignancies, elderly patients, therapeutic options.

Okolo 55–60% chorych na nowotwory jest w wieku powyżej 60 roku życia i ten odsetek systematycznie zwiększa się. Wiadomo na przykład, że średni wiek chorych na chłoniaki nieziarnicze waha się między 60–65 rokiem życia, a 30–35% diagnozowanych chłoniaków występuje u ludzi powyżej 70 roku życia. Zachorowalność na chłoniaki ludzi do 45 roku życia utrzymuje się na zbliżonym poziomie w ciągu ostatniego 10-lecia, ale w grupie 45–75 lat w tym samym czasie liczba zachorowań zwiększyła się o 100%, a w grupie powyżej 75 roku życia jeszcze więcej [16]. Przyjmuje się, że w tej grupie chorych co każde 10 lat następuje wzrost zachorowań o prawie 100%.

Podobne dane publikowane są odnośnie ostrej białaczki szpikowej i szpiczaka plazmocytoowego. Wzrasta więc grupa chorych w starszym wieku wymagających chemioterapii i/lub radioterapii. Przewiduje się, że liczba ta będzie rosła w najbliższej przyszłości. W grupie osób starszych zastosowanie standardowej chemioterapii połączone jest za-zwyczaj ze znacznie nasiloną mielosupresją i co jest z tym związane ze zwiększonym odsetkiem

śmierci w czasie tej terapii w porównaniu z grupą osób młodszych [1, 2, 24, 30].

TABELA 1. Wyniki leczenia ostrej białaczki szpikowej w zależności od wieku na podstawie analizy 1400 chorych przedstawionej przez grupę amerykańską ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*)

Wiek [lata]	Odsetek remisji całkowitych (CR)	Śmierć w okresie indukcji [%]	Oporność na leczenie [%]
< 60	70	10	20
60–70	55	20	25
> 70	35	39	30

Biologiczne mechanizmy odpowiedzialne za gorszą tolerancję chemio- i radioterapii przez osoby starsze nie są dostatecznie zrozumiałe. Nie są także jasno zdefiniowane zmiany, jakie zachodzą w naturalnym przeciwnowotworowym mechanizmie obronnym osób starszych [27, 28].

Choroby nowotworowe układu krwiotwórczego u osób powyżej 60 roku życia charakteryzują się odmienną

biologią. Obserwuje się też wybiórcze występowanie u osób starszych pewnych chorób hematologicznych. Do chorób, których predyspozycja związana jest z wiekiem, zalicza się przewlekłą białaczkę limfocytową B komórkową, szpiczaka plazmocytoowego i różne typy zespołów mielodysplastycznych.

Co ciekawe komórki dendrytyczne generowane od osób starszych wydają się być w pełni czynnościowo sprawne, a zatem być może należałoby w przyszłości wykorzystać te komórki do immunoterapii resztkowej choroby nowotworowej [26].

Jest ciągle przedmiotem kontrowersji, jakim zmianom podlegają krwiotwórcze komórki macierzyste w ciągu starzenia organizmu [19, 21]. Najczęściej opisywane u ludzi starszych defekty krwiotwórczych komórek macierzystych zestawiono w tabeli 2.

TABELA 2. Zmiany hematologiczne u osób zdrowych w wieku powyżej 60 lat

Komórkowość szpiku	obniżona
Komórki progenitorowe	prawidłowa zawartość
Chromosomy	aneuploidia, utrata Y
Poziom hemoglobiny	nieznacznie obniżony
Liczba czerwonych krwinek	nieznacznie obniżona
Średnia objętość krwinki czerwonej (MCV)	zwiększona
Krwinki białe	obniżona liczba, zaburzona funkcja, dyskretne przesunięcie w prawo w rozmazie krwi obwodowej
Limfocyty CD8 + OB.	obniżona liczba, zaburzona funkcja
Poziom ferrytyny	dyskretny wzrost
	podwyższony u kobiet, obniżony u mężczyzn
Poziom witaminy B12	obniżony

Badania na zwierzętach wykazały, że wraz z wiekiem zmniejszają się zdolności replikacyjne krwiotwórczych komórek macierzystych [19]. Stwierdzono zależność między ekspresją antygenu CD 28 a długością telomerów. Molekuła CD 28 jest cząsteczką sygnalizacyjną zaangażowaną w aktywację telomerazy i skracanie telomerów. Z wiekiem aktywność komórek z ekspresją CD 28⁺ zwiększa się. Może to wskazywać, że komórki macierzyste podlegają procesom starzenia i ten stan może odpowiadać za gorsze tolerowanie chemioterapii i radioterapii przez osoby starsze, ale są badania wykazujące, że mimo różnicy w długości telomerów zdolności replikacyjne komórek macierzystych są zachowane [23]. Na ekspresję CD 28 na limfocytach mogą też wpływać komórki nowotworowe powodując zastąpienie CD 28 cząsteczkami CTLA 4 (*Cytotoxic T Lymphocyte Antigen*), co prowadzi do anergii klonów limfocytów T swoistych skierowanych przeciwko komórkom nowotworowym. Cząsteczki CTLA 4 mają podobną budowę do CD 28, ale ich oddziaływanie z antygenem B 7 nie prowadzi do przekazania sygnału limfocytowi T w celu zniszczenia komórki nowotworowej i w konsekwencji osłabienia naturalnej obrony przeciwnowotworowej.

PARAMETRY KRWI OBWODOWEJ

Stężenie hemoglobiny obniża się po 60 roku życia i ten trend wyraźnie nasila się po 70 roku życia. U 10–20% starszych chorych rozwija się niedokrwistość z niedoboru żelaza. Powodów niedoboru żelaza jest dużo m.in. sposób odżywiania, mikrokrwawienia z przewodu pokarmowego, np. w następstwie szerokiego przyjmowania niesterydowych leków przeciwzapalnych przyjmowanych z powodu nasilających się z wiekiem dolegliwości bólowych narządu ruchu. Rolę odgrywa też występujący w starszym wieku zanik błony śluzowej żołądka. Na drugim miejscu pod względem częstości występowania jest niedokrwistość towarzysząca przewlekłym chorobom zapalnym, a następnie niedokrwistość megaloblastyczna [3, 4]. W tabeli 3 zestawiono najczęściej obserwowane zmiany w parametrach hematologicznych u osób starszych.

TABELA 3. Defekty krwiotwórczych komórek macierzystych w wieku starszym

Defekt zasiedlenia (<i>homing</i>)		
Wielopotencjalne komórki macierzyste	Ukierunkowane komórki macierzyste	Komórki podścieliska i komórki wspomagające
Defekty wewnątrzkomórkowe	defekty uwalniania cytokin	zmiany w miejscowej syntezie cytokin
Defekt kontaktu z podścieliskiem	defekt interakcji z komórkami wielopotencjalnymi	
Defekty uwalniania cytokin		

PRZEWLEKŁA BIAŁACZKA LIMFOCYTOWA B KOMÓRKOWA (PBL-B)

Przewlekła białaczka limfocytowa jest najczęstszym typem białaczki w Europie Zachodniej i Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej. Aż 40% zachorowań stanowią chorzy powyżej 65 roku życia. Średni wiek ujawnienia choroby waha się między 65–70 rokiem życia. 20–30% chorych ma mniej niż 55 lat. Częstość zachorowania w skali roku wynosi 3/100 000 mieszkańców. Ta postać białaczki jest 20–30 razy częstsza w Europie niż w Indiach, Chinach i Japonii. 5–7% chorych wykazuje też pewną predyspozycję rodzinną. 70–87% diagnozowanych obecnie chorych nie ma żadnych objawów i rozpoznanie stawia się przypadkowo w czasie kontrolnej morfologii krwi.

W prawidłowym rozwoju komórek B wyróżniamy dwa etapy: niezależny i zależny od kontaktu z antygenem. Pierwszy ma miejsce w szpiku i w tym okresie dochodzi do rearanzacji genów V, D i J kodujących immunoglobuliny i tworzenia pierwszych przeciwciał. Drugi etap zachodzi w centrach rozrodczych obwodowych narządów limfoidalnych, gdzie aktywowany dziewiczy limfocyt B ulega proliferacji i różnicowaniu w komórkę pamięci [10].

Dojrzałość komórek B odzwierciedla m.in. obecność somatycznych mutacji genów kodujących części zmienne łańcuchów ciężkich i lekkich immunoglobulin. Do mutacji somatycznych obejmujących głównie regiony zmienne immunoglobulinowych genów dochodzi w centrach rozrodczych grudek chłonnych w obecności antygeny prezentowanego przez folikularne komórki dendrytyczne oraz limfocyty T [10].

Dziewicze limfocyty B cechuje brak mutacji genów kodujących części zmienne łańcuchów immunoglobuliny, obecność na powierzchni komórek IgM i IgD oraz braku antygeny CD 27. We krwi obwodowej 15–30% tych komórek ma na swej powierzchni antygen CD 5. We krwi obwodowej ludzi zdrowych dominują limfocyty B dziewicze, które nie weszły jeszcze do centrów rozrodczych, pozostałe to te, które opuściły centra rozrodcze i mają mutacje genów IgV i obecność antygeny CD 27, należącego do rodziny receptorów czynnika martwicy nowotworu. Uważa się, że komórki z ekspresją tego antygeny to komórki pamięci. Odsetek tych komórek wzrasta wraz z wiekiem [5].

W większości przypadków komórka prekursorowa, z której wywodzi się przewlekła białaczka limfocytowa, determinuje przebieg kliniczny i rokowanie w tej chorobie. Jeszcze do niedawna uważano, że komórki te tworzą jednorodną populację komórek spoczynkowych w fazie Go, które nie miały kontaktu z antygenem i uważano, że PBL-B jest raczej chorobą z akumulacji niż aktywnej proliferacji [17]. Prace ostatniego 10-lecia dowodzą, że PBL-B wywodzi się z limfocytów na różnych poziomach dojrzenia:

- 1) komórek dziewiczych
- 2) komórek pamięci immunologicznej [6].

Są autorzy, którzy sądzą, że są to dwie różne populacje [5]. Ale są również doniesienia wskazujące, że wszystkie komórki PBL-B miały kontakt z antygenem [10]. Nasuwa się tylko pytanie, czy komórki z niezmutowanym genem IgV są dziewiczymi limfocytami B czy może odpowiadają komórkom, które miały kontakt z antygenem, ale nie doszło u

nich do mutacji i stały się anergiczne. Istnieje możliwość, że ten nieokreślony antygen ma charakter T niezależny lub ma cechy superantygeny, a jak wiadomo, cząstki te nie doprowadzają do mutacji genów IgV. W przypadku limfocytów T superantygen jest zdolny do pobudzania określonej liczby klonów limfocytów i będzie aktywował wszystkie limfocyty T z receptorem TCR i łańcuchem β . W przypadku limfocytów B superantygeny wiążą się z receptorami immunoglobulinowymi poza klasycznym miejscem wiązania antygeny (np. gronkowcowe białko A). Niejednoznaczna jest też równoczesna obecność na powierzchni białaczkowych limfocytów zarówno markerów dziewiczych, np. IgM i IgD, jak i receptorów będących wyznacznikami kontaktu z antygenem CD 27 i CD 23. Występowanie antygeny CD 23 odróżnia tę postać białaczki od chłoniaka z komórek płaszczka. Heterogenność przebiegu klinicznego wynika z mechanizmów biologicznych leżących u podstaw tej choroby [6].

SZPICZAK PLAZMOCYTOWY

Szpiczak plazmocytowy jest chorobą występującą najczęściej w wieku powyżej 60 roku życia. Według danych opublikowanych przez amerykańską grupę ECOG zachorowalność na tę chorobę wzrasta z wiekiem. (tab. 4).

TABELA 4. Zachorowalność na szpiczaka w zależności od wieku (na 100 000 mieszkańców USA)

Płeć	Wiek [lata]				
	<35	35–39	40–60	60–80	>80
M	0	0,4	2,7	21	39
K	0	0	0,4	14	30,9

Szpiczak plazmocytowy należy do nowotworów, w których obserwuje się znaczne unaczynienie (*vascularization*) i nasiloną angiogenezę. Dmoszyńska i wsp. [8] wykazali, że osoczowe stężenie cytokin stymulujących angiogenezę, takich jak: VEGF i bFGF, jest znacznie podwyższone u chorych na szpiczaka. Te i inne obserwacje skierowały uwagę na talidomid, którego antyangiogenne właściwości znane były od dość dawna [20, 25].

W tabeli 5 zestawiono dotychczas opisane mechanizmy działania talidomidu w szpiczaku plazmocytowym.

Nową grupą leków, która może mieć potencjalne zastosowanie w terapii szpiczaka plazmocytoowego, są inhibitory proteasomu. Proteasom jest wielobiałkowym kompleksem, którego zadaniem jest trawienie białek przeznaczonych do degradacji. Proteasom jest niezbędny dla biologii wielu komórek eliminując białka przeznaczone do destrukcji w miejscu ich ubikwitylizacji. Eliminuje on np. receptory czynników wzrostowych po ich internalizacji [7].

TABELA 5. Mechanizm działania talidomidu

Zwiększenie ekspresji cząsteczek adhezyjnych na komórkach szpiczakowych i komórkach podścieliska szpiku (CD 11a, CD 11b, CD 11c, CD 18)
 Immunomodulacyjny wpływ na sekrecję cytokin wydzielanych przez limfocyty T (IL-1 β , IL-6, IL-2, IFN γ)
 Zwiększenie wytwarzania IL-4, IL-5, IL-8
 Hamowanie wytwarzania IL-2 i TNF
 Synergistyczne działania z cząsteczką CD 28 w przewodzeniu sygnałów komórkowych
 Hamowanie angiogenezy (obniża VEGF, bFGF) -
 Zwiększenie liczby limfocytów T CD 8+
 Zwiększenie ekspresji markerów aktywacji limfocytów T

Inhibitory proteasomu hamują degradację ubikwitynowanych białek, takich jak: cykliny czy cyklino-zależne inhibitory kinaz, regulując w ten sposób cykl komórkowy. Kilka

TABELA 6. Mechanizm działania inhibitora proteasomu PS 341 (Velcade)

Zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M
 Blokowanie aktywności NF κ B
 Zmniejszenie wytwarzania TNF
 Zwiększenie aktywności JNK
 Zwiększenie ekspresji MDM2
 Zwiększenie ekspresji TP 53
 Zmniejszenie antyapoptycznego działania IL-6

inhibitorów proteasomu sygnowanych skrótami PS341, PS1 i MG132 poddanych jest badaniom klinicznym I i II fazy. Leki tej grupy w sposób pośredni i bezpośredni hamują kluczowy czynnik transkrypcyjny NF- κ B, którego aktywacja jest konieczna dla wydłużenia czasu przeżycia komórek szpiczakowych. Inhibitory proteasomu hamują zarówno proliferację, jak i wzmagają apoptozę komórek szpiczakowych (tab. 6).

Kolejny lek z grupy immunomodulatorów biologicznych to trójtlenek arsenu. Trójtlenek arsenu od wieków znany jako trucizna był stosowany w tradycyjnej medycynie chińskiej jako skuteczny lek w bardzo wielu chorobach m.in. w łuszczycy, kile, reumatoidalnym zapaleniu stawów. W Europie stosowano go w postaci roztworu Fowlera także w leczeniu kiły i tryposomiazы. W latach siedemdziesiątych XX wieku w Chinach lek zastosowano w leczeniu ostrej białaczki promielocytowej z bardzo dobrym efektem, jednak z uwagi na jego kokarcynogenne właściwości przyglądano się tej terapii z dużą rezerwą.

TABELA 7. Mechanizm działania trójtlenku arsenu (ATO, Trisenox)

Hamowanie angiogenezy
 Indukcja apoptozy
 Zahamowanie aktywacji N κ B
 Zahamowanie przewodzenia sygnałów przez szlak JAK-STAT
 Zaburzenia czynności ICAM i VCAM 1

Dalsze obserwacje potwierdziły skuteczność As₂O₃ w leczeniu ostrej białaczki promielocytowej. Aktywność As₂O₃ wykazano zarówno w

liniach komórkowych szpiczaka, jak i u chorych z oporną postacią szpiczaka plazmocytoowego. Mechanizm jego działania, podobnie jak innych leków immunomodulacyjnych, jest

wielokierunkowy. Lek ten zarówno hamuje angiogenezę, jak również indukuje apoptozę w komórkach szpiczakowych. Wykazano także, że dodatek kwasu askorbinowego wzmacnia efektywność As_2O_3 [9]. W tabeli 7 zestawiono opisane dotychczas mechanizmy działania trójtlenku arsenu.

ZESPOŁY MIELODYSPLASTYCZNE – MDS

Etiologia zespołów MDS (*myelodysplastic syndromes*) jest nieznaną, ale czynniki, które uszkadzają kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA), takie jak: leki cytostatyczne, napromienianie radiologiczne, kontakt z benzenem i wiele innych, stanowią czynniki ryzyka rozwoju MDS. Dane statystyczne potwierdzają korelację między wiekiem pacjentów a występowaniem MDS. Częstość zachorowania ludzi po 70 roku życia wynosi 20 na 100 tysięcy osób [27]. Uważa się, że w wieku starszym mechanizmy naprawcze DNA są osłabione i to sprzyja występowaniu MDS.

MDS stanowią heterogenną grupę klonalnych chorób komórki macierzystej o różnym rokowaniu, charakteryzujących się dyshematopoezą oraz jedno-, dwu- lub trójukładową cytopenią. Najczęstsze objawy kliniczne MDS przedstawiono w tabeli 8.

Zaburzenia mielodysplastyczne są rzadkie przed 50 rokiem życia. W starszym wieku zmniejsza się komórkowość szpiku ze 100 prawie do 50% w czasie pierwszych 30 latach życia z utrzymującym się *plateau* do mniej więcej 65 roku życia, od którego to roku komórkowość obniża się sukcesywnie do około 30%. Miejsce czynnej tkanki hematopoetycznej zajmuje tkanka tłuszczowa. Jeśli chodzi o zaburzenia chromosomowe, to 12–35% mężczyzn po 60 roku życia wykazuje utratę chromosomu Y. 75% mężczyzn po 80 roku życia wykazuje kariotyp 45 X. Średnie stężenie Hg u tych osób również obniża się ze średniej w młodym wieku równej 13,8 do 11, 7 g/dl [3]. Zmiany cytogenetyczne w MDS mają znaczenie rokownicze (tab. 9).

TABELA 8. Objawy kliniczne najczęściej występujące u chorych na MDS

Krew	niedokrwistość neutropenia małopłytkowość pancytopenia
Szpiik	zwiększona komórkowość nieprawidłowości morfologiczne obrączkowe sideroblasty zwiększony odsetek blastów
Zmiany kariotypu	del 11 q del 5q monosomia 5 i 7 trisomia 8

TABELA 9. Znaczenie rokownicze zmian cytogenetycznych w MDS

1. Rokowanie korzystne	kariotyp prawidłowy, 5q-, 20q-, -Y
2. Rokowanie pośrednie	trisomia 8, pojedyncze aberracje inne niż w pkt. 1 i 3, dwie aberracje
3. Rokowanie niekorzystne	złożone aberracje (>3), aberracje chromosomu 7

OSTRE BIAŁACZKI

W przypadku ostrych białaczek wyniki leczenia osób starszych są gorsze niż ludzi młodych [22, 29]. Zaobserwowano także, że ostre białaczki limfoblastyczne osób starszych rokują gorzej niż ostre białaczki mieloblastyczne [18]. Aż 90% chorych umiera w ciągu 2 lat od rozpoznania, a remisja po leczeniu indukcyjnym wywołującym remisję jest mniejsza niż 70% ze średnią przeżycia 7 miesięcy [24]. Ciekawe są badania psychologiczne. Aż 50% starszych chorych na białaczkę wierzy w wyleczenie, podczas gdy lekarze oceniają tę szansę zaledwie na 10% [18].

Ferrara i wsp. [11] poddali ocenie grupę 70 chorych w wieku powyżej 75 roku życia, u których rozpoznano ostrą białaczkę szpikową. Remisję hematologiczną uzyskano u 32% chorych. Autorzy konkludują, że wysokodawkowa chemioterapia nie jest zalecana w tej grupie chorych, ale nieliczni chorzy odnoszą korzyść z tego postępowania. Powstaje pytanie, jak określić grupę chorych w starszym wieku, która odniesie korzyść z intensywnej chemioterapii?

Dla tych chorych wydają się być obiecujące takie opcje leczenia, jak: przeciwciała monoklonalne, inhibitory angiogenezy, niemieloablacyjne transplantacje krwiotwórczych komórek macierzystych i immunoterapia z użyciem komórek dendrytycznych [13, 14].

Można spodziewać się, że w przyszłości leczenie chorób nowotworowych układu krwiotwórczego ludzi starszych będzie w dużej mierze opierać się na immunoterapii. Ale ta terapia może być skuteczna tylko w przypadku małej masy nowotworu i stąd nadzieje, które początkowo wiązano z tą terapią nie spełniły się. Wstępnym okresem poprzedzającym immunoterapię powinno być zmniejszenie masy nowotworu np. chirurgicznie lub w wyniku chemioterapii lub też terapii przeciwciałami monoklonalnymi. Przeciwciała takie wykorzystywane klinicznie są zwykle cząsteczkami hybrydowymi, gdzie część wiążąca antygen pochodzi z mysich immunoglobulin, a część stała jest ludzką immunoglobuliną. Immunoterapia ma na celu zwiększenie klonów limfocytów T cytotoksycznych skierowanych przeciw komórkom nowotworowym. Najprostszym sposobem jest szczepienie chorego jego własnymi komórkami nowotworowymi po indukcji w tych komórkach apoptozy i/lub nekrozy [15].

W pilotowych badaniach przeprowadzonych w naszej Klinice zastosowaliśmy szczepionkę przeciwbiałaczkową u 11 chorych we wczesnej fazie przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej.

Szczepionka została przygotowana z komórek dendrytycznych stymulowanych lizatami komórek białaczkowych i podawano ją śródskórnym w odstępach 3-tygodniowych. Tolerancja leczenia była dobra i poza miejscowym zaczerwienieniem skóry nie wystąpiły inne objawy niepożądane. W trakcie leczenia obserwowano obniżenie odsetka komórek białaczkowych o fenotypie CD 19⁺/CD 5⁺ oraz zwiększenie odsetka komórek CD 8⁺ i NK. Wyniki te zachęcają do dalszych badań w tym kierunku. Można mieć nadzieję, że te i inne próby podejmowane w celu poprawienia wyników leczenia pacjentów na nowotwory hematologiczne w starszym wieku przyczynią się do przedłużenia czasu przeżycia i poprawy jakości życia tej grupy chorych.

LITERATURA

- [1] BALDUCCI L, HARDY CL, LYMAN GH. Hematopoietic growth factors in the older cancer patient. *Curr Opin Hematol* 2001; **8**: 170–187.
- [2] BALDUCCI L, LYMAN GH. Patients aged > 70 are at high risk for neutropenic infection and should receive hemopoietic growth factors when treated with moderately toxic chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000; **18**: 3558–3585.
- [3] BAVALDI-JUNKINS CA, BECK AC, ROTHSTEIN G. Hematopoiesis and cytokines. Relevance to cancer and aging. *Hematol Oncol Clin North Am* 2000; **14**: 45–61.
- [4] BEGHÉ C, WILSON A, ERSHLER WB. Prevalence and outcomes of anemia in geriatrics: a systemic review of literature. *Amer J Med* 2004; **116**: 35–105.
- [5] CALIGARIS-CAPPIO F, HAMBLIN TJ. B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *J Clin Oncol* 1999; **17**: 399–408.
- [6] DIGHIERO G. Unsolved issues CLL biology and management. *Leukemia* 2003; **17**: 2385–2391.
- [7] DMOSZYŃSKA A. Immunomodulatory biologiczne w leczeniu szpiczaka plazmocytoowego. *Pol. Arch. Med. Wewn* 2002; **108**: 1091–1096.
- [8] DMOSZYŃSKA A, BOJARSKA-JUNAK A, DOMAŃSKI D, ROLIŃSKI J, HUS M, SOROKA-WOJTASZKO M. Production of Proangiogenic cytokines During Thalidomide Treatment of Multiple Myeloma. *Leukemia and Lymphoma* 2002; **43**,2: 401–406.
- [9] DMOSZYŃSKA A, GÓRSKA M. Trójtlenek arsenu, stary lek, nowe oblicze. *Acta Haemat Pol* 2004; **35**, 1: 5–14.
- [10] HAMBLIN TJ, OSCIER DG. Chronic lymphocytic leukemia: the nature of the leukemic Wells. *Blood Rev* 1997; **11**: 119–128.
- [11] FERRARA F, ANNUNZIATA M, COPIA C, MARGIN S, MELE G, MIRTO S. Therapeutic options and treatment results for patients over 75 years of age with acute myeloid leukemia. *Haematologica* 1998; **83**:126–131.
- [12] HOOD LE. Chemotherapy in the elderly: supportive measures for chemotherapy – induced myelotoxicity. *Clin J Oncol Nursing* 2003; **7**: 185–190.
- [13] HUS I, ROLIŃSKI J, TABARKIEWICZ J, WOJAS K, DMOSZYŃSKA A, WAŚIK-SZCZEPANEK E. Immunotherapy of patients with B-CLL in early stage with allogeneic dendritic cells pulsed with tumor lysates – preliminary report. *Leuk Lymph* 2003; suppl. 2, 44, 63. X International Workshop on CLL.
- [14] KAMINSKI ER, GODDARD RU, PRENTICE AG. Dendritic cells and their potential therapeutic role in haematological malignancy. *Leuk Lymph* 2003; **44**:1657–1666.
- [15] KAWIAK J, HUS I, ROLIŃSKI J, HOSER G, DMOSZYŃSKA A. Mechanizmy immunologiczne w nowotworach i próby wykorzystania ich w immunoterapii. *Post Biol Kom* 2004; **31**, 22: 67–77.
- [16] KOUROUKIS CT, BROWMAN GP, ESMAIL R, MEYER RM. Chemotherapy for older patients with newly diagnosed, advanced stage, aggressive histology non-Hodgkin lymphoma: a systematic review. *Ann Intern Med* 2002; **136**: 144–152.
- [17] LAGNEAUX L, DELFORGE A, BRON D, DE BRUYN C, STRYCKMANS P. Chronic lymphocytic leukemia B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact not normal bone marrow stromal cells. *Blood* 1998; **91**: 2387–2396.
- [18] LANCET JE, WILLMAN CL, BENNETT JM. Acute leukemia and aging. Clinical interactions. *Hematol Oncol Clinics of North America* 2000; **14**: 251–267.
- [19] LIPSCHITZ CA, UDUPA KB, MILTON KY. Effect of age on hematopoiesis in man. *Blood* 1984; **63**: 502–509.
- [20] MARRIOTT JB, MULLER D, DALGLEISH AG. Thalidomide as an emerging immunotherapeutic agent. *Immunology Today* 1999; **20**: 53–55.
- [21] NEWLAND AC, EVANS TGJR. ABC of clinical haematology – haematological disorders at the extremes of life. *Br Med J* 1997; **314**: 1262–1273.
- [22] OZER H. Patients aged > 70 are high risk for neutropenic infection and should receive hemopoietic growth factors when treated with moderately toxic chemotherapy. *J Clin Oncol* 2001; **19**: 1584–1585.
- [23] PINTO A, DE FILIPPI R, FRIGERI F, CORAZZELLI G, NORMANO N. Aging and the hemopoietic system. *Oncol Hemat* 2003; **48**: 53–512.
- [24] PINTO A, ZAGONEL V, FERRARA F. Acute myeloid leukemia in the elderly: biology and therapeutic strategies. *Crit Rev Oncol Hematol* 2001; **39**: 275–287.

STARZENIE SIĘ UKŁADU CZERWONOKRWINKOWEGO A ANEMIA W WIEKU PODESZŁYM

AGING OF ERYTHROCYTE SYSTEM AND ANEMIA IN THE ELDERLY

Kornelia Kędziora-Kornatowska

Katedra i Klinika Geriatrii Akademii Medycznej w Bydgoszczy

Streszczenie: Zwiększenie odsetka osób w wieku podeszłym w społeczeństwach krajów rozwiniętych wiąże się z występowaniem wielu złożonych problemów zdrowotnych. Starzenie się i sama starość jako etap życia kojarzy się z współwystępowaniem zmian inwolucyjnych w wielu narządach i układach oraz chorób, które towarzyszą temu okresowi życia. W procesie fizjologicznego starzenia dochodzi do zaburzeń w zakresie hematopoezy zwłaszcza w warunkach tzw. stresu hematologicznego, co wpływa na ograniczenie zdolności kompensacyjnych szpiku kostnego w zakresie szybkiego wyrównywania niedoborów krwi obwodowej w przypadku zwiększonego zapotrzebowania. Może mieć to związek z telomerową hipotezą starzenia się. Ponadto na zmiany ilościowe oraz jakościowe w populacji komórek macierzystych szpiku wpływają wzajemnie powiązane ze sobą czynniki, takie jak: mutacje genowe, stres oksydacyjny, niekontrolowana apoptoza, zaburzenia regulacji produkcji cytokin. Proces starzenia się może wpływać na zmiany strukturalne błon erytrocytarnych, nasilenie procesów katabolicznych, zmniejszone wytwarzanie erytropoetyny w nerkach. Wymienione czynniki sprzyjają powstawaniu u osób starszych niedokrwistości o różnej etiologii. Jest to częsta choroba układu krwiotwórczego istotnie zwiększająca chorobowość i śmiertelność w tej grupie wiekowej, prowadzi często do chorób układu sercowo-naczyniowego, zaburzeń funkcji poznawczych, zaburzeń funkcjonalnych i upadków. Negatywnie wpływa na jakość życia. Rozpoznanie i leczenie niedokrwistości w wieku podeszłym jest złożonym i trudnym problemem geriatrycznym.

Słowa kluczowe: starzenie się, hematopoeza, erytrocyt, cytokiny, stres oksydacyjny, anemia.

Summary: Increasing rate of aged people in societies of developed countries is inevitably connected with occurrence of health problems closely related to this period of life. Ageing as well as old age itself, being a stage of life, are associated with coexisting involucional changes in organs, systems of organs, and old age diseases, accompanying this period of life. In physiological ageing process the disorders mainly concern haematopoesis, especially in conditions of so called hematological stress. It influences the limitations in bone marrow compensation abilities concerning quick leveling of peripheral blood deficits in case of increased demand. It can be connected with telomer hypothesis of ageing. Moreover, the quantitative and qualitative changes in stem cell population are influenced by mutually related factors such as: gene mutations, oxidative stress, uncontrollable apoptosis, regulative disorders of cytokine production. Ageing may also influence the structural changes of erythrocytary membranes, intensification of catabolic processes, and decreased erythropoietin production in kidneys. In aged people, the listed factors are conducive to develop anemias of various etiology. These frequent haematopoietic

system diseases, significantly increasing morbidity and mortality in this age group, often result in cardiovascular system diseases, cognitive functions disorders, functional disorders, and fall-downs. They negatively influence the quality of life, however the diagnosis and therapy of old age anemia is a complex geriatric problem.

Key words: ageing, haematopoiesis, erythrocyte, cytokines, oxidative stress, anemia.

WSTĘP

Starzenie się populacji światowej to istotny problem zdrowia publicznego. Obserwuje się stopniowe wydłużanie przeciętnego trwania życia. Według prognoz demograficznych w połowie XXI wieku liczba osób powyżej 60 roku życia stanowić będzie około 20% populacji, a w niektórych krajach odsetek ten osiągnie nawet 30%. Charakterystycznym zjawiskiem jest zwiększenie się liczebności starszej populacji osób w tzw. późnej starości tzn. powyżej 75 roku życia [30]. Starzenie się człowieka jest procesem złożonym, wieloczynnikowym i nie do końca poznany. Jest to integralna składowa genetycznie zaprogramowanej ontogenezy. Postęp, jaki dokonał się w zakresie badań nad etiologią tego procesu, umożliwił poznanie szeregu mechanizmów związanych ze starzeniem się na poziomie narządowym, komórkowym i molekularnym. W wyniku fizjologicznego starzenia powstaje szereg zmian inwolucyjnych, które należy odróżnić od tych, które są wynikiem procesu patologicznego. Wąskie granice homeostazy ustrojowej oraz ograniczone możliwości adaptacyjne organizmu są przyczyną występowania u osób starszych wielu chorób, które nakładają się na procesy inwolucyjne. Jednym z układów, w którym wraz z wiekiem powstaje szereg zmian, jest układ krwiotwórczy.

STARZENIE SIĘ A HEMATOPOEZA

Starzenie się to proces złożony, wieloczynnikowy i nie do końca poznany. Dlatego też jest to w dalszym ciągu przedmiot wielu niejednokrotnie kontrowersyjnych badań naukowych. Powstały liczne teorie starzenia się, ale żadna z tych hipotez nie jest w stanie samodzielnie wytłumaczyć etiologii tego procesu. Spośród wielu teorii bardzo istotną rolę odegrały badania L. Hyflicka, który wykazał, że maksymalna możliwość trwania życia (MSL – *maximum life span*) wiąże się z istnieniem gatunkowo swoistej ograniczonej liczby podziałów komórkowych [16]. Sformułowana w ostatnich latach telomerowa teoria starzenia się [17] koresponduje z teorią Hyflicka i wskazuje, że wraz z wiekiem dochodzi do wyczerpywania się potencjału mitotycznego komórek. Telomery będące końcowymi odcinkami chromosomów są zbudowane z powtarzających się wiele tysięcy razy nukleotydów (TTA GGG)_n. Są one konieczne do podziałów komórek, nie ulegają pełnemu przepisaniu podczas transkrypcji i przy każdym podziale jądra następuje stopniowe ich skracanie. Po kilkudziesięciu podziałach telomery zanikają, a komórka ginie. Biorąc pod uwagę przytoczone dane bardzo możliwe, że średnia długość

życia organizmu jest uwarunkowana limitem podziałów komórek. Jednocześnie komórki budujące organizm istotnie różnią się potencjałem proliferacyjnym. Biorąc pod uwagę okres replikacji i terminalnego zróżnicowania, komórki macierzyste krwiotworzenia stanowią szczególny rodzaj komórek, które są zdolne do podziałów i różnicowania przez całe życie w warunkach ciągłego zużywania komórek końcowych. Jednakże w trakcie kolejnych podziałów długość telomerów tych komórek, podobnie jak innych komórek somatycznych ulega skróceniu, co warunkuje ich potencjał proliferacyjny. Wykazano, że podstawowy potencjał hematopoetyczny osób w wieku podeszłym jest zachowany, a układ krwiotworzenia nie różni się istotnie od tego układu osób młodszych [5]. Potwierdza to pogląd, że w warunkach fizjologicznych wartości takich parametrów, jak: hematokryt, hemoglobina, liczba krwinek białych i krwinek płytkowych osób w wieku podeszłym nie wykazują istotnych różnic w porównaniu z osobami dorosłymi, ale młodszymi [7]. Jednakże stwierdzono, że w procesie starzenia się dochodzi do pewnych ilościowych, jak i jakościowych zmian w zakresie komórek macierzystych krwiotworzenia. Spośród nich szczególnie istotne są zmiany jakościowe ze względu na ich wpływ na takie procesy, jak: zdolność do samoodnawiania, różnicowania, plastyczność, a także zdolność do reagowania na sygnały z zewnątrz, w tym z mikrośrodowiska hematopoetycznego utworzonego z komórek podścieliska krwiotwórczego i drobnych naczyń. Komórki podścieliska krwiotwórczego są zasadniczym źródłem informacji dla komórek krwiotwórczych przekazywanej w sposób parakryny, jukstakryny lub endokryny. Mikrośrodowisko hematopoetyczne zapewnia właściwy przebieg krwiotworzenia poprzez dostarczanie czynników odżywczych oraz cytokin regulujących hematopoezę. Uszkodzenie tego mikrośrodowiska zaburza lub uniemożliwia hematopoezę [21]. Mimo że u osób w wieku podeszłym zachowana jest podstawowa funkcja układu krwiotwórczego, to bardzo istotny jest fakt, że układ ten podlega fizjologicznym zmianom inwolucyjnym. Proces ten, który zaczyna się już po 30 roku życia, nabiera szczególnego znaczenia po 60 roku życia, kiedy całkowita liczba komórek czynnego szpiku zmniejsza się o około 50%, a w okresie późnej starości nawet do około 30% liczby komórek obserwowanej w 20 roku życia. W wieku podeszłym dochodzi do zastępowania komórek wszystkich układów hemopoezy przez tkankę łączną i tłuszczową, przy czym najbardziej uszkodzona jest erytropoeza (zmniejszenie liczby erytroblastów na korzyść prekursorów granulocytarnych) [24]. Dlatego też w warunkach tzw. stresu hematologicznego ujawnia się związany z wiekiem utajony defekt hematopoezy [7, 25]. Zaburzenia krwiotworzenia w wieku podeszłym ściśle wiążą się ze zwiększonym występowaniem niedokrwistości w tej grupie wiekowej. Zjawisko obniżonej zdolności regeneracyjnej w zakresie erytropoezy obserwowane zarówno w badaniach na zwierzętach z wywołaną czynnikiem infekcyjnym eksperymentalną niedokrwistością, a także u starszych pacjentów z niedokrwistością nie jest w pełni wyjaśnione [24]. W badaniach tych zaobserwowano paradoksalną redukcję komórek progenitorowych, a nie spodziewane zwiększenie liczby tych komórek jak w przypadku osób młodych. U starszych pacjentów z niedokrwistością obserwuje się brak adekwatnej reakcji ze strony retikulocytów po krwotoku, co potwierdza ograniczenie rezerwy szpikowej i brak zdolności mobilizacyjnej [7,25]. Chociaż na obecnym etapie wiedzy trudno jednoznacznie wytłumaczyć, dlaczego u osób w wieku podeszłym dochodzi do

„utajonego defektu hematopoezy”, jednakże wiadomo, że może mieć to związek z zaburzeniami w zakresie produkcji cytokin krwiotwórczych, czyli tzw. hematopoetyn [2]. W badaniach metodą *in vitro* w hodowli komórek śledziony pochodzących od starych myszy (u myszy także śledziona jest prawidłowym narządem krwiotwórczym) stwierdzono obniżoną aktywność kolonii śledzionowych w porównaniu z tą aktywnością u młodych dorosłych mysz. Potwierdzają to eksperymenty na komórkach krwi pochodzących od osób zdrowych w wieku podeszłym. U osób starszych stwierdzono także zaburzoną produkcję czynnika pobudzającego kolonie granulocytów i makrofagów (GM-CSF). Ponadto niezależnie od zaburzonej produkcji cytokin obserwuje się zaburzenia w zakresie ich ekspresji, zwiększa się stężenie niektórych cytokin, np. interleukiny-6 [8].

NIEDOKRWISTOŚĆ W WIEKU PODESZŁYM

Niedokrwistość to jedna z najczęstszych chorób układu krwiotwórczego w wieku podeszłym. Etiologia niedokrwistości może być bardzo różna począwszy od niedoboru żelaza i utraty krwi, niedoboru witaminy B₁₂ i/lub kwasu foliowego, złożonych niedoborów pokarmowych, hipoplazji układu krwiotwórczego, a skończywszy na niedokrwistości chorób przewlekłych (ACD). Związane z wiekiem fizjologiczne zmiany involucyjne stanowią istotne czynniki sprzyjające powstawaniu niedokrwistości u starszych pacjentów. Poza omówionymi wcześniej defektami w zakresie hematopoezy istotne znaczenie mogą mieć także takie czynniki związane z wiekiem, jak zwiększona aktywność procesów katabolicznych, zmiany strukturalne i czynnościowe błon erytrocytarnych, zmiany w nerkach czy też zaburzenia wchłaniania w przewodzie pokarmowym. Nie bez znaczenia jest obserwowana u osób starszych wielochorobowość i związana z tym polipragmatyzacja [1]. Wykazano, że częstość występowania niedokrwistości istotnie wzrasta wraz z wiekiem. Występuje ona u około 12% osób powyżej 60 roku życia, a u osób powyżej 85 roku życia odsetek ten ulega podwojeniu [26]. Dlatego też biorąc pod uwagę starzenie się społeczeństwa niedokrwistość w wieku podeszłym staje się istotnym i złożonym problemem zdrowia publicznego. Z niedokrwistością wiąże się współwystępowanie chorób układu sercowo-naczyniowego, zaburzeń funkcji poznawczych, depresja, upośledzenie funkcjonalne, deficyt w zakresie samoopieki. Niedokrwistość w wieku podeszłym jest najczęściej objawem wtórnym takich chorób, jak: choroby nowotworowe, przewlekłe choroby nerek, reumatoidalne zapalenie stawów czy też choroby zapalne jelit. Niezależnie od przyczyny niedokrwistości stwierdzono, że jest to istotny czynnik ryzyka zwiększonej śmiertelności osób starszych [13]. Przyjmuje się, że kryteria rozpoznawania niedokrwistości w wieku podeszłym są takie same jak w przypadku młodszych osób dorosłych (obniżenie stężenia hemoglobiny – u kobiet poniżej 12g%, a u mężczyzn poniżej 13g%, chociaż w literaturze coraz częściej pojawiają się opinie, że należy zrewidować ten pogląd). Biorąc pod uwagę te wartości objaw ten rozpoznano u około 50% starszych pacjentów zakładu opieki

długoterminowej [6]. Mimo złożonych przyczyn występowania niedokrwistości w wieku podeszłym, w niektórych przypadkach etiologia pozostaje nieznana. Potwierdzają to badania przeprowadzone w jednej z Klinik Geriatrii w Belgii, gdzie aż u 17% pacjentów nie udało się ustalić przyczyny niedokrwistości [18]. Dlatego też należy sobie zadać pytanie, czy niedokrwistość w tej grupie wiekowej nie jest jednym z wielu znamion fizjologicznego starzenia się?. Pytanie w kontekście aktualnej wiedzy pozostaje bez odpowiedzi, niemniej jednak głębsza analiza molekularnych mechanizmów starzenia się może stanowić pewne rozwiązanie tego zagadnienia. Głównym czynnikiem pobudzającym proliferację i różnicowanie prekursorów erytrocytów (głównie na komórki ukierunkowane i prekursorowe erytropoezy) niezależnie od wieku jest cytokina – erytropoetyna (EPO). Ponieważ u osób dorosłych zasadniczym miejscem wytwarzania EPO są nerki, na proces ten u osób starszych będą wpływały zmiany inwolucyjne w obrębie tego narządu w procesie fizjologicznego starzenia. U osób w wieku podeszłym obniża się masa nerek (o około 30% w 80 roku życia), liczba czynnych kłębuszków nerkowych, które ulegają szkliwieniu, przybywa komórek mezangium, zmniejsza się liczba komórek nabłonkowych, a tym samym obniża się powierzchnia filtracji. Zmniejsza się przepływ krwi przez warstwę korową nerek. Biorąc pod uwagę zmiany strukturalne i czynnościowe w nerkach możemy użyć określenia, że nerki w okresie starości znajdują się w stanie utajonej (wyrównanej) przewlekłej niewydolności [18,19]. Wszystko to może mieć istotny wpływ na wytwarzanie EPO w okresie starości. W warunkach fizjologicznych pod wpływem zmniejszonego stężenia tlenu zostaje wydzielana erytropoetyna, która w sposób endokrynnny reguluje linię komórek erytropoetycznych i wpływa na wytwarzanie erytrocytów. U pacjentów z niedokrwistością o nieznaną przyczynę w badaniu szpiku stwierdzono znamienne niższy poziom komórek progenitorowych erytrocytów w porównaniu z osobami młodszymi z tego typu anemią oraz osobami starszymi zdrowymi. Ponadto u chorych tych wykazano mniejszą odpowiedź komórek progenitorowych erytrocytów na endogenną erytropoetynę. Dlatego też zaburzenia w zakresie produkcji EPO związane z wiekiem mogą istotnie wpływać na rozwój niedokrwistości u osób starszych [28]. W procesie erytropoezy niezależnie od wieku istotną rolę odgrywiają cytokiny, przy czym większość z nich jest niezbędna do prawidłowego przebiegu różnych etapów tego procesu. W przypadku erytropoezy najważniejszą cytokiną działającą na komórki ukierunkowane, prekursorowe i dojrzewające jest EPO. Jednakże są także cytokiny, które mają negatywny wpływ na ten proces, a mianowicie cytokiny prozapalne (głównie czynnik martwicy guza – TNF_{α} oraz IL-6). Wraz z wiekiem zwiększa się poziom cytokin prozapalnych. O ile nie budzi zdziwienia zwiększenie stężenia tych cytokin w przypadku takich chorób, jak: cukrzyca, choroby nowotworowe, choroby układu sercowo-naczyniowego, reumatoidalne zapalenie stawów czy też choroby infekcyjne, to niejasny pozostaje wzrost ich stężenia u starszych pacjentów bez stwierdzonych wymienionych procesów chorobowych [13].

Jeżeli chodzi o proces erytropoezy, cytokiny prozapalne hamują syntezę erytropoetyny, dojrzewanie komórek ukierunkowanych (progenitorowych) oraz zaburzają prawidłowy metabolizm żelaza [9]. Być może dlatego u osób w wieku podeszłym obserwuje się między innymi zwolnione wbudowywanie żelaza do erytrocytów. Z dużym prawdopodo-

bieństwem można stwierdzić, że efekty związane z działaniem cytokin prozapalnych mogą stanowić kluczowy czynnik patogenetyczny niedokrwistości o nieznannej etiologii w wieku podeszłym.

INTERLEUKINA-6 A NIEDOKRWISTOŚĆ W WIEKU PODESZŁYM

Interleukina-6 (IL-6) to cytokina prozapalna o działaniu plejotropowym. Zasadniczą jej rolą jest udział w odpowiedzi immunologicznej, w reakcji zapalnej i krwiotworzeniu. Głównymi czynnikami mającymi wpływ na jej wytwarzanie jest interleukina-1 (IL-1) oraz TNF- α . Z kolei IL-6 zwrótnie hamuje ich wydzielanie [29]. W warunkach fizjologicznych u młodych osób dorosłych produkcja IL-6 jest ściśle regulowana, dlatego też obserwuje się bardzo niski, nieoznaczalny poziom tej cytokiny w surowicy. Badania wielu autorów wykazały, że u osób zdrowych wraz z wiekiem stężenie IL-6 w surowicy znamienne wzrasta, zwłaszcza po menopauzie czy andropauzie [12]. Badania w populacji Framingham (*Framingham Heart Study*) wykazały między innymi zwiększoną syntezę IL-6 u osób w wieku podeszłym (średnia wieku 78 lat) w porównaniu z młodszą grupą wiekową (średnia wieku 39,3 lat) nawet przy niskich wartościach CRP. Fakt ten potwierdzają także inne badania [13]. Z kolei przeprowadzone w kilku ośrodkach w Stanach Zjednoczonych badania na dużej populacji osób w wieku podeszłym (*Established Populations for Epidemiologic Studies of the Elderly* – EPESE) nie tylko wskazują na podwyższone stężenie IL-6 w surowicy u osób powyżej 70 roku życia, ale także na istnienie dodatkowej korelacji z zaburzeniami funkcjonalnymi w wieku podeszłym, takimi jak: zmniejszenie mobilności, ograniczenie aktywności dnia codziennego (ADL), czy też występowanie depresji i zwiększona śmiertelność [11,14]. Związek między występowaniem niedokrwistości a podwyższonym stężeniem IL-6 wykazano w badaniach eksperymentalnych na zwierzętach, którym podawano podskórną rekombinowaną ludzką IL-6 [27]. Obniżenie stężenia hemoglobiny wkrótce po rozpoczęciu terapii rekombinowaną IL-6 obserwowano także u pacjentów z chorobą nowotworową. U chorych tych stwierdzono także zwiększenie objętości osocza i obniżenie stężenia żelaza w surowicy. Stężenie hemoglobiny normalizowało się mniej więcej po miesiącu od zaprzestania terapii [23]. Wpływ IL-6 na układ czerwono-krwinkowy potwierdzają także inne badania w populacji geriatrycznej [20]. Reasumując, zaburzenia homeostazy cytokin i wzrost stężenia IL-6 może być kluczowym czynnikiem patogenetycznym niedokrwistości w wieku podeszłym.

STRES OKSYDACYJNY A NIEDOKRWISTOŚĆ W WIEKU PODESZŁYM

Badania wielu autorów potwierdzają nasilenie ogólnoustrojowego stresu oksydacyjnego u osób w wieku podeszłym, chociaż sformułowana po raz pierwszy przez D. Harmana teoria wolnorodnikowa starzenia się budzi aktualnie liczne kontrowersje [15]. W warunkach zwiększonego generowania reaktywnych form tlenu (RFT) w procesie starzenia obserwuje się wiele skutków ich toksycznego działania na komórki, a zwłaszcza erythrocyty ze względu na ich fizjologiczną rolę. Starzejące się krwinki czerwone pochodzące od osób w wieku podeszłym nie tylko wytwarzają więcej RFT, ale mają też ograniczone możliwości obrony przed ich działaniem. U osób starszych stężenie antyoksydantów niskocząsteczkowych jest obniżone (np. witaminy E), a aktywność komórkowych enzymów antyoksydacyjnych (dysmutazy ponadtlenkowej, reduktazy czy peroksydazy glutationowej) jest zmniejszona [10]. Konsekwencją oksydacyjnego uszkodzenia erythrocytów obserwowanego w wieku podeszłym może być szereg zaburzeń patologicznych. Najważniejsze z nich to zmniejszona odkształcalność oraz płynność lipidów błony, inaktywacja enzymów, obniżenie stężenia ATP, upośledzona zdolność transportu tlenu, zaburzenia gospodarki jonowej. Zmiany te powodują wcześniejsze usuwanie krwinek czerwonych z krwioobiegu, czy też skrócenie czasu ich życia, co może prowadzić do niedokrwistości osób starszych [4]. W jaki sposób erythrocyty uszkodzone w wyniku utleniania są rozpoznawane przez makrofagi? Jedną z możliwych koncepcji to istnienie zmiatacza receptorowego, rozpoznającego oksydatywnie zmodyfikowane cząsteczki lipoprotein [3].

UWAGI KOŃCOWE

Chociaż niedokrwistość jest objawem bardzo często występującym w wieku podeszłym, a jej etiologię nie zawsze da się określić, nie możemy jej traktować jako nieuchronną konsekwencję starzenia się. Dla znacznej grupy pacjentów można określić przyczynę niedokrwistości i zastosować odpowiednią terapię.

Wykazano, że leczenie niedokrwistości w wieku podeszłym bez względu na pierwotną przyczynę poprawia wydolność czynnościową, funkcje poznawcze, zmniejsza objawy depresji, zapobiega upadkom, spowalnia progresję wielu chorób, zmniejsza śmiertelność oraz wpływa pozytywnie na jakość życia. Dlatego tak ważne jest rozpoznawanie niedokrwistości u osób starszych, chociaż często objawy z nią związane są mylnie przypisywane osłabieniu, niesprawności i niewydolności związanej z wiekiem.

Ze względu na istotne znaczenie niedoboru erythropoetyny w patogenezie niedokrwistości w wieku podeszłym oraz biorąc pod uwagę różne aspekty zarówno medyczne, jak i ekonomiczne, w terapii anemii w tej grupie wiekowej należy rozważyć korzyści z podawania erythropoetyny. Biorąc pod uwagę niewielką liczbę badań eksperymentalnych,

a także klinicznych dotyczących zaburzeń erytropoezy w populacji geriatrycznej, problem niedokrwistości w tej grupie wiekowej pozostaje ciągle niewyjaśniony i powinien być przedmiotem dalszych badań.

LITERATURA

- [1] ANIA BJ, SUMAN VJ, FAIRBANKS VF. Incidence of anemia in older people: An epidemiology study in a well defined population. *J Am Geriatr Soc* 1997; **45**: 825–831.
- [2] BARALDI-JUNKINS CA, BECK AC, ROTHSTEIN G. Hematopoiesis and cytokines. Relevance to cancer and aging. *Hematol Oncol Clin North Am* 2000; **14**: 45–61.
- [3] BARTOSZ G. Erythrocyty. W: Fizjologia krwi. (red.) Z. Dąbrowski, t. 2. Wydaw. Nauk. PWN, Warszawa 2000: 72–166.
- [4] BARTOSZ G. Druga twarz tlenu. Wydaw. Nauk. PWN, Warszawa 2003: 242–264.
- [5] BERKAHN L, KEATING A. Hematopoiesis in elderly. *Hematology* 2004; **9** (3): 159–163.
- [6] BESA EC. Approach to mild anemia in the elderly. *Clin Geriatr Med* 1998; **4**: 43–55.
- [7] BOGGS DR, PATRENE K. Hematopoiesis and aging. III. Anemia and a blunted erythropoietic response to hemorrhage in aged mice. *Am J Hematol* 1985; **19**: 327–338.
- [8] BUCHANAN JJP, PETERS CA, RASMUSSEN C. Impaired expression of hematopoietic growth factors: A candidate mechanism for the hematopoietic defect of aging. *Exp Gerontol* 1996; **31**: 135–144.
- [9] CARMEL R. Anemia of aging. An overview of clinical, diagnostic and biological issues. *Blood Rev* 2001; **15**: 9–18.
- [10] CUTLER RG. Antioxidants and aging. *A J Clin Nutr* 1991; **53**: 373 S–379 S.
- [11] DENTINO AN, PIEPER CF, RAO MK et al. Association of interleukin-6 and other biologic variables with depression in older people living in the community. *J Am Geriatr Soc* 1999; **47**: 6–11.
- [12] ERSHLER WB, KELLER ET. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. *Annu Rev Med* 2000; **51**: 245–270.
- [13] ERSHLER WB. Biological interactions of aging and anemia: A focus on cytokines. *J Am Geriatr Soc* 2003; **51**: S18–S21.
- [14] FERRUCI L, HARRIS TB, GURALNIK JM et al. Serum IL-6 level and the development of disability in older persons. *J Am Geriatr Soc* 1999; **47**: 639–646.
- [15] HARMAN D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956; **11**: 298–300.
- [16] HAYFLICK L, MOORHEAD PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res* 1961; **25**: 585.
- [17] JOHNSON FB, MARCINIAK RA, GUARENTE L. Telomeres, the nucleus and aging. *Curr Opin Cell Biol* 1998; **10**: 332–338.
- [18] JOOSTEN E, PELEMANS W, HIELE M et al. Prevalence and cause of anaemia in a geriatric hospitalized population. *Gerontology* 1992; **38**: 111–117.
- [19] LAVRIJSEN ATJ, KRUIHOF HC, DELEEUW PW. The aging kidney – a review. *Ger Neph Urol* 1995; **5**: 21–28.
- [20] LENG S, CHAVES P, KOENIG K et al. Serum interleukin-6 and hemoglobin as physiological correlates in the geriatric syndrome of frailty: A pilot study. *J Am Geriatr Soc* 2002; **50**: 1268–1271.
- [21] LIANG Y, van ZANT G. Genetic control of stem-cell properties and stem cells in aging. *Curr Opin Hematol* 2003; **10** (3): 195–202.
- [22] LIPSCHITZ D. Medical and functional consequences of anemia in the elderly. *J Am Geriatr Soc* 2003; **51**: S10–S13.
- [23] NIKEN J, MULDER NH, BUTER J et al. Recombinant human interleukin-6 induces a rapid and reversible anemia in cancer patients. *Blood* 1995; **86**: 900–905.
- [24] ROTHSTEIN G. Disordered hematopoiesis and myelodysplasia in the elderly. *J Am Geriatr Soc* 2003; **51**: S22–S26.
- [25] ROTHSTEIN G, CHRISTENSEN RD, NEILSEN GR. Kinetic evaluation of pool sizes and proliferative response in bacterial challenged aged mice. *Blood* 1987; **70**: 1836–1841.

- [26] SALIVE ME, CORNONI-HUNTLEJ J, GURALNIK JM et al. Anemia and hemoglobin levels in older persons. Relationship with age, gender and health status. *J Am Geriatr Soc* 1992; **40**: 489–496
- [27] SUN WH, BINKLEY N, BIDWELL DW et al. The influence of recombinant human interleukin-6 on blood and immune parameters in middle-aged and old rhesus monkeys. *Lymphokine Cytokine Res* 1993; **12**: 449–455.
- [28] QUAGLINO D, GINALDI L, FURIA N et al. The effect of age on hemopoiesis. *Aging Clin Wxp Res* 1996; **8**: 1–12.
- [29] WILDER RL, MANOLAGAS SC, CHRONSOS GP. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Ann Intern Med* 1998; **128**: 127–137.
- [30] WORLD POPULATION AGING: 1950–2050. United Nations Population Division, New York, United Nations 2001.

Adres autora: ul. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz
e-mail: kasiakor@interia.pl

ZALEŻNOŚĆ TOLERANCJI LECZENIA ONKOHEMATOLOGICZNEGO OD WIEKU

AGE-DEPENDENCY OF THE TOLERANCE OF ONCOHEMATOLOGICAL TREATMENT

Jolanta WIECZOREK, Wiesław Wiktor JĘDRZEJCZAK

Katedra i Klinika Hematologii, Onkologii i chorób Wewnętrznych
Akademii Medycznej w Warszawie

Streszczenie: Tolerancja organizmu na silnie działające leki i sposoby leczenia, (a do takich bez wyjątku należą metody zwalczające nowotwory układu krwiotwórczego) zależy zarówno od wieku, jak i od obecności schorzeń towarzyszących. Z kolei występowanie tych schorzeń zwiększa się z wiekiem, więc są to parametry statystycznie, (choć nie indywidualnie) skorelowane. Drugim zagadnieniem, które trzeba tu brać pod uwagę jest możliwa rozbieżność wieku metrykalnego i wieku biologicznego u poszczególnych chorych. Wreszcie ta tolerancja zależy także od szczególnego rodzaju nowotworu obecnego u danego chorego. W zależności od rodzaju stosowanego leczenia różne są też przyczyny zwiększającej się wraz z wiekiem jego toksyczności. W odniesieniu do chemioterapii jest to zwiększająca się ogólna podatność narządów wewnętrznych na uszkodzenia połączona ze zmniejszoną zdolnością regeneracyjną. W odniesieniu do przeszczepiania allogenicznego szpiku jest to większa skłonność do rozwoju ciężkiej choroby przeszczep przeciw gospodarzowi związana z zanikiem funkcji grasicy i wreszcie w odniesieniu do przeciwciał monoklonalnych i innych leków silnie immunosupresyjnych jest to mniejsza zdolność układu odpornościowego do odnowy skutkująca długotrwałą immunosupresją. Jednakże, poza chorymi, którzy przebyli bardzo wiele kursów chemioterapii nie obserwuje się gorszej odnowy układu krwiotwórczego u osób starszych. Łącznie powoduje to, że nie stosuje się intensywnej chemioterapii u osób starszych niż 70 ± 5 lat, przeszczepienia autologicznego szpiku u osób starszych niż 65 ± 5 lat w szpiczaku i 60 ± 5 lat w ostrych białaczkach. Przeszczepienie szpiku allogenicznego od dawców rodzinnych jest ograniczone wiekiem 55 ± 5 lat, a przeszczepienie allogeniczne od dawcy niespokrewnionego wiekiem 45 ± 5 lat.

Summary: Organism tolerance of very active drugs and aggressive methods of treatment (such as those used in hematology and oncology) is dependent both on age and the possible presence of comorbid disorders. On the other hand, the frequency of these disorders increases with age, so these parameters are statistically (but not always individually) related. Another problem that may influence the analysis is the possible discrepancy between biological and nominal age in particular patients. Furthermore, the tolerance is also dependent on particular tumor present in given patient.

Depending on the type of treatment under consideration different are reasons for toxicity increasing with age. With regard to chemotherapy this is increasing with age general susceptibility of internal organs to injury combined with reduced regeneration potential. With regard to bone marrow transplantation it is increased risk of severe graft versus host disease related to thymic involution and with regard to monoclonal antibodies and other immunosuppressive drugs is lowered capacity of immune system to recovery leading to protracted immunodeficient status. However, except for patients heavily pretreated with chemotherapeutic drugs there is no impaired hematopoietic regeneration in older people.

Final conclusion is, that intensive chemotherapy is contraindicated in people older than 70 ± 5 years (depending on comorbidities), autologous stem cell transplantation is contraindicated in patients older than 65 ± 5 years in myeloma and 60 ± 5 years in acute leukemias. Allogeneic transplantation from HLA-identical family donor has upper age limit 55 ± 5 years while allogeneic transplantation from unrelated donor has upper age limit 45 ± 5 years.

ILOŚCIOWA I JAKOŚCIOWA ANALIZA LEUKOCYTÓW KRWI OBWODOWEJ U OSÓB STULETNIICH W PORÓWNANIU Z MŁODYMI OSOBAMI ZDROWYMI*

THE QUANTITATIVE AND QUALITATIVE ANALYSIS
OF THE PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES IN CENTENARIANS
IN COMPARISON TO THE HEALTHY YOUNGER SUBJECTS

Renata PODKÓWKA¹, Zofia NIEMIR², Małgorzata MOSSAKOWSKA³,
Krzysztof SAWIŃSKI⁴, Katarzyna WIECZOROWSKA-TOBIS¹

¹Pracownia Gerontologii i Geriatrii Katedry i Zakładu Patofizjologii, ²Pracownia Nefrologii Molekularnej Katedry i Kliniki Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych oraz ⁴Katedra i Klinika Hematologii i Chorób Rozrostowych Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, ³Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie

Streszczenie: W niniejszej pracy podjęto próbę scharakteryzowania leukocytów krwi obwodowej (LKO) osób stuletnich. Badaniami objęto 39 stulatków (33 kobiety i 6 mężczyzn) zamieszkujących różne regiony Polski (grupa S) oraz 40 zdrowych osób (35 kobiet i 5 mężczyzn) w wieku 20–30 lat (grupa K), u których przeprowadzono ilościową i jakościową analizę LKO w rozmazach. Dodatkowo, w grupie S oceniono związek wielkości komórek z wybranymi parametrami biochemicznymi surowicy (białko C-reaktywne, witamina B₁₂, kwas foliowy, żelazo pozahemoglobinowe). Średnia liczba WBC w grupie S była niższa niż w grupie K ($p < 0,05$), podobnie jak bezwzględna liczba ($p < 0,05$) granulocytów obojętnochłonnych (GO) i limfocytów (L). Przeciwnie bezwzględna liczba monocytów (M) u stulatków była wyższa ($p < 0,001$). W grupie S średnica wszystkich analizowanych rodzajów LKO (GO, L, M) była większa w porównaniu z grupą K ($p < 0,0001$). Nie obserwowano związku wielkości analizowanych krwinek z żadnym z ocenianych parametrów biochemicznych. Podsumowując, u osób stuletnich obserwuje się zmiany ilościowe i jakościowe LKO. Wyjaśnienie ich przyczyny wymaga dalszych badań.

Słowa kluczowe: stulatkowie, leukocyty, starzenie.

*Praca finansowana przez Komitet Badań Naukowych w ramach projektu PBZ-KBN-022/PO5/1999 „Genetyczne i środowiskowe czynniki długowieczności” koordynowanego przez Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie.

Summary: The aim of the study was to characterize the leukocytes (L) from the peripheral blood of centenarians. The study involved 39 subjects aged 100 years and older (group S – 33 females and 6 males) as well as 40 young healthy individuals aged 20–30 years (group K – 35 females and 5 males). In all of them, the quantitative and qualitative analysis of L from blood smear was performed. Additionally, in centenarians, the relationship between the diameter of L and selected serum parameters was studied (vitamin B₁₂, folic acid, iron, C-reactive protein). The mean WBC count as well as mean neutrophils (N) count and lymphocytes (L) count were lower in group S than in group K ($p < 0.05$). Oppositely, the mean monocytes (M) count was higher in group S ($p < 0.001$). The diameter of all analyzed L (N, L, M) in group S was higher in comparison to group K ($p < 0.0001$). There was no relationship between the diameter of analyzed leukocytes and the levels of studied biochemical serum parameters. In conclusion, in centenarians the quantitative and qualitative alterations in peripheral blood leukocytes were found. Further studies are necessary to explain their pathomechanism.

Key words: centenarians, leukocytes, aging.

KOMUNIKATY

XII ZJAZD POLSKIEGO TOWARZYSTWA IMMUNOLOGII DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ

LUBLIN 19–22 MAJA 2005 R.

Komitet Organizacyjny:

Zakład Immunologii Klinicznej AM im F. Skubiszewskiego w Lublinie

ul. Jaczewskiego 8, 20-950 Lublin

tel. (081) 742 50 26, (081) 742 50 27, fax. (081) 746 70 10

e-mail: ppozarowski@o2.pl

Pragniemy zawiadomić, że **XII Zjazd Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej** odbędzie się w **Lublinie** w dniach **19–22.05.2005**, jak również, że streszczenia zjazdowe będą drukowane w *Central-European Journal of Immunology* oraz o możliwości zamieszczenia pełnych prac w *Polish Journal of Environmental Study* (IF za 2003 wynosi 0.461).

Aby uzyskać bliższe informacje, prosimy o kontakt: www.immuno.prot.pl lub z Piotrem Pożarowskim – sekretarzem Zjazdu pod adresem, jaki podano wyżej.

Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego

XII Zjazdu PTIDiK

prof. dr hab. Jacek Roliński

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, JPG), albo pliki z Corela, wersja 9,0 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. Na zdjęciach konieczne jest umieszczanie podziałki wskazującej powiększenie obiektów, a nie podawanie powiększeń w podpisach, gdyż zdjęcia ulegają zmniejszeniu do formatu B₅.

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

Cennik dla Autorów w 2005 r.

	odbitki prac			barwne ryciny	str. druku (ponad 15)
Liczba odbitek	50	100	200	1 szt.	1 str.
Cena zł	100,00	120,00	150,00	400,00	50,00

Zamówienie na odbitki musi być złożone wraz z przesłaną korektą pracy

Warunki prenumeraty kwartalnika PBK

Prenumerata roczna

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 2005 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 20124010531111000004409533.

Cena prenumeraty rocznika na rok 2005

dla instytucji (bibliotek) wynosi 150 zł

dla odbiorców indywidualnych 50 zł

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 2005

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 20124010531111000004409533.

Price per year 25 dollars USA or 21 euro.

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, niepublikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem biochemicznym, histologicznym, anatomicznym i embriologicznym. Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody redakcji publikowane w innych periodykach. Prosimy Autorów o nadsyłanie prac bezpośrednio do Redaktorów odpowiedniej specjalności (adresy na 2 str. okładki), a do Redakcji w Warszawie tylko te artykuły, które nie odpowiadają żadnej z wymienionych specjalności.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają

1) artykuły przeglądowe nie przekraczające 15 stron druku 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 druku z kilkoma pozycjami bibliograficznymi z ostatniego roku (licząc od daty wysłania do redakcji); 3) listy do redakcji (do 1 strony maszynopisu).

Tekst pracy i załączniki należy przysłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 w układzie normalnym 1800 znaków na stronie z podwójnym odstępem. Ostateczna wersja tekstu i rysunki (wskazówki s.140) 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). Następną stroną powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 1 str.) oraz słowa kluczowe 3 do 10 słów zgodnych z terminami w *Medical Subject Headings (Index Medicus)*, o ile są tam zawarte. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rycin, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, ryc. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane 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. Na zdjęciach prosimy zamieszczać podziałkę, a nie podawać powiększenia w podpisie w związku z potrzebą zmniejszania ilustracji. 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 1. autora i oznaczenie 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. Poprawioną po recenzji wersję pracy należy zwrócić do redakcji koniecznie w ciągu 30 dni. Redakcja zrezygnuje z publikacji maszynopisu, którego autorzy do 30 dni nie odpowiedzą na list redaktora. Od stycznia 2003 r. Redakcja wprowadza odpłatność 300,- zł za artykuł nie przekraczający 15 str. druku.

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

Dołączono 2 kopie maszynopisu, tabel i rycin	Treść pracy nie była uprzednio publikowana,	
	nic została wysłana do innej redakcji	<i>tak nie</i>
Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę	Dołączone kopie pracy wraz z rycinami na dyskietce z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego	<i>tak nie</i>
Jest zgoda osób, których informacje niepublikowane są zamieszczone w tekście	z komputera IBM	<i>tak nie</i>

Opowiadam za całość pracy opisaną w załączonym maszynopisie *tak nie*

Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w „Postęпах” przechodzi na własność Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji. *podpisy wszystkich autorów*

TREŚĆ – CONTENT

W tym Zeszyście	1
WYKAZ RECENZENTÓW z tomu 31, 2004 – Referees of the volume 31, 2004	2
GRZELAKOWSKA-SZTABERT B.: Nagroda Nobla z chemii za 2004 rok – Docenienie kontrolowanej, zależnej od ubikwityny, proteolitycznej degradacji białek Nobel prize in chemistry for 2004 – Appreciation of controlled, ubiquitin-dependent protein degradation	3
LAMPARSKA-PRZYBYSZ M., MOTYL T.: Autofagia – narzędzie przeżycia czy śmierci komórki nowotworowej? – Autophagy – the tool of cancer cell survival or death?	13
WINCEWICZ A, SULKOWSKA M., KODA M., MUSIATOWICZ M., SULKOWSKI S.: Rola białek STAT w chorobach zapalnych i karcynogenezie jelita grubego Role of STAT proteins in inflammatory bowel diseases and colon carcinogenesis	23
SZMIDT-JAWORSKA A., JAWORSKI K., KOPCEWICZ J.: Metabolizm nukleotydów u roślin wyższych – Nucleotide metabolism in higher plants	37
LIPSKA B. S., LIMON J.: Nerwiak zarodkowy (neuroblastoma) – znaczenie wyników badań cytogenetycznych i molekularnych w ustaleniu strategii leczenia i rokowania Neuroblastoma – the significance of cytogenetic and molecular factors in the assessment of the strategy of treatment and prognosis	59
BULEK K.: Ludzki wirus cytomegalii (HCMV) – latencja i strategie ucieczki spod kontroli układu odpornościowego Human cytomegalovirus (HCMV) – latency and immune evasion	77
HOCHÓŁ A., RUCIŃSKI M.: Neuropeptyd B (NPB) i neuropeptyd W (NPW) oraz ich receptory – występowanie i rola Neuropeptide B (NPB) and neuropeptide W (NPW) and their receptors – their distribution and role	87
HORWACIK I.: Perspektywy zastosowania immunoterapii w leczeniu neuroblastoma Perspectives of application of immunotherapy in neuroblastoma treatment	97
32. KONFERENCJA BIOLOGII KOMÓRKI nt. „Zaburzenia hematologiczne wieku podeszłego”	111
MYŚLIWSKI A.: Wstęp – Introduction	113
DMOSZYŃSKA A, GIANNOPOULOS K.: Nowotwory hematologiczne wieku starszego Haematological malignancies in older patients	115
KĘDZIORA-KORNATOWSKA K.: Starzenie się układu czerwonych krwinek a anemia w wieku podeszłym – Aging of erythrocyte system and anemia in the elderly	125
WIECZOREK J., JĘDRZEJCZAK W.W.: Zależność tolerancji leczenia onkohematologicznego od wieku Age-dependency of the tolerance of oncohematological treatment	135
PODKÓWKA R, NIEMIR Z., MOSSAKOWSKA M., SAWIŃSKI K., WIECZOROWSKA-TOBIS K.: Ilościowa i jakościowa analiza leukocytów krwi obwodowej u osób stuletnich w porównaniu z młodymi osobami zdrowymi The quantitative and qualitative analysis of the peripheral blood leukocytes in centenarians in comparison to the healthy younger subjects	137
Komunikat	139
Wskazówki dla autorów i warunki prenumeraty	140