

POSTĘPY BIOCHEMII

PL ISSN
0032-5422

Advances in Biochemistry

TOM 49, NR 3, 2003

MMR.	126
RNAi – sposób na ciszę.	136
Nowotwór bez telomerazy	147
Inhibitor kinaz tyrozynowych STI571	157
Prokoagulant nowotworowy	168
Sekrecja w płytkach krwi	175
Metabolizm fosfolipidów inozytolowych	185
Interleukina-1 w gonadzie męskiej	194
Białka NPP	202

Szanowni Państwo,

w imieniu Komitetu Organizacyjnego Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej

„METABOLIZM LEKÓW I KSENOBIOTYKÓW”

mam zaszczyt i ogromną przyjemność powiadomić Państwa, że w pierwszej dekadzie września 2004 roku pragniemy zorganizować w Ustroniu kolejne nasze spotkanie naukowe.

Aby umożliwić Państwu szybki i bezpośredni kontakt z Komitetem Organizacyjnym uruchamiamy na potrzeby naszej Konferencji stronę internetową, na której będą umieszczane wszystkie ważne i aktualne dane dotyczące Zjazdu:

www.metabolizm.slam.katowice.pl

e-mail: metabolizm@slam.katowice.pl

Tą drogą będziemy chcieli przyjmować od Państwa między innymi dane o rejestracji uczestników, streszczenia referatów i inne informacje.

Strona ta będzie sukcesywnie aktualizowana i uzupełniana i dlatego prosimy o częste jej odwiedzanie.

Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego

dr Andrzej Plewka

WYDAWCA

Editor
POLSKIE TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
Polish Biochemical Society
ul. Pasteura 3,
02-093 Warszawa, Poland
tel/fax 658-20-99
e-mail — ptbioch@nencki.gov.pl
www.ptbioch.edu.pl

REDAKTOR SENIOR

Senior Editor
ZOFIA ZIELIŃSKA
tel. 831-24-03

REDAKTOR NACZELNY

Editor in chief
GRAŻYNA PALAMARCZYK
tel. 658-47-02

REDAKTORZY

Editors
KRYSTYNA GRZELAK
DANUTA HULANICKA
ANDRZEJ JERZMANOWSKI
ANDRZEJ KASPRZAK
LILIANA KONARSKA
ANNA SZAKIEL
ADAM SZEWCZYK

BIURO REDAKCJI

Editorial office
SEKRETARZ
Secretary
HANNA ŁASKOWSKA
poniedziałki, czwartki
monday—thursday
14—16
tel. 659-85-71 w. 441
SKŁAD I ŁAMANIE
Typesetting
MAŁGORZATA BASAJ

RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue
JANUSZ BŁASIAK (Łódź)
ZYGMUNT CIEŚLA (Warszawa)
IWONA FIJAŁKOWSKA (Warszawa)
BOŻENA KAMIŃSKA-
KACZMAREK (Warszawa)
MICHAŁ KOMOSZYŃSKI (Toruń)
RYSZARD OLIŃSKI (Bydgoszcz)
SŁAWOMIR PIKUŁA (Warszawa)
RYSZARD SŁOMSKI (Poznań)
PIOTR WIDŁAK (Gliwice)

ADRES REDAKCJI

Address
REDAKCJA KWARTALNIKA
„POSTĘPY BIOCHEMII”
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa
e-mail: postepy@nencki.gov.pl

SPIS TREŚCI

CONTENTS

Naprawa błędnie sparowanych zasad

Mismatch Repair
TOMASZ POPEŁAWSKI, JANUSZ BŁASIAK 126

RNAi — interferencja RNA — skuteczny sposób na ciszę

RNAi — RNA interference — an efficient way of silence
DANIEL BĄK. 136

Alternatywne wydłużanie telomerów

Alternative lengthening of telomeres
AGNIESZKA DETTLAFF-POKORA, BEATA SCHLICHTHOLTZ 147

Inhibitor kinaz tyrozynowych STI571 - nadzieja na przełom w leczeniu białaczek?

Tyrosine kinases inhibitor STI571 - a breakthrough in leukemias
treatment?
AGNIESZKA CZECHOWSKA, JANUSZ BŁASIAK. 157

Prokoagulant nowotworowy: charakterystyka biochemiczna oraz wpływ na rozwój choroby nowotworowej

Cancer procoagulant: biochemical characteristics and the influ-
ence on the development of neoplastic disease
MAŁGORZATA KAMOCKA, WOJCIECH P. MIELICKI 168

Procesy sekrecji w płytkach krwi

Secretory processes in blood platelets
TOMASZ ZIELIŃSKI, BARBARA WACHOWICZ. 175

Metabolizm fosfolipidów inozytolowych w płytkach krwi

Metabolism of phosphoinositides in blood platelets
BEATA OLAS 185

Układ genów interleukiny-1 w fizjologii gonady męskiej

Interleukin-1 gene system in physiology of human testes
NATALIA ROZWADOWSKA, DOROTA FISZER, MACIEJ KURPISZ 194

Budowa, mechanizm działania i funkcje biologiczne enzy- mów z rodziny pirofosfataz/fosfodiesteraz ektonukleotydów (E-NPP)

Structure, mode of action and biological role of Ectonucleotide
Pyrophosphatase/Phosphodiesterase enzyme family
MARZENA WÓJCIK, BARBARA SZMALENBERG, MARIA
KOZIOŁKIEWICZ 202

Naprawa błędnie sparowanych zasad

Mismatch repair

TOMASZ POPLAWSKI¹, JANUSZ BŁASIAK²

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Naprawa błędnie sparowanych zasad u *E. coli*
- III. Naprawa błędnie sparowanych zasad w komórkach człowieka
- IV. Naprawa błędnie sparowanych zasad w transformacji nowotworowej
- V. Naprawa błędnie sparowanych zasad a oporność na leki
- VI. Naprawa błędnie sparowanych zasad w mitochondrium
- VII. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Mismatch repair in *E. coli*
- III. Mismatch repair in human cells
- IV. Mismatch repair and cancer
- V. Mismatch repair and drug resistance
- VI. Mismatch repair in mitochondrium
- VII. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: 6-TG — 6-tioguanina; 8-oksoG — 7,8-dihydro-8-okso-deoksyguanina; ATP — adenozyntri-fosforan; BER — naprawa DNA przez wycinanie zasad; DHFR — reduktaza dihydrofolianowa; ExoI, hMLH1, hMSH2, hMSH3, hMSH6, hPMST1, hPMST2 — białka naprawy błędnie sparowanych zasad człowieka; ExoI, Exo VII, ExoX — egzonukleazy systemu naprawy błędnie sparowanych zasad *E. coli*; hMMR — naprawa błędnie sparowanych zasad u człowieka; hMutL — heterodimer białek hMLH1 i hPMS2; hMutS α i hMutS β — heterodimery białek hMSH2 i hMSH6 oraz hMSH2 i hMSH3; HNPCC — dziedziczny niepolipowaty rak jelita grubego; miejsce AP — miejsce apurynowe lub apirymidynowe; MED-1 — białko wiążące hMLH1 i DNA; MMR — naprawa błędnie sparowanych zasad; mtDNA — mitochondrialny DNA; mtMYH — mitochondrialny homolog białka MutY *E. coli*; MTX — metotreksat; mutH, mutL, mutS — białka systemu MMR *E. coli*; mutY — glikozyłaza *E. coli* biorąca udział w usuwaniu oksydacyjnych uszkodzeń DNA; NER — naprawa DNA przez wycinanie nukleotydów; PCNA — jądrowy antygen proliferujących komórek; RecJ — egzonukleaza biorąca udział w rekombinacji homologicznej u *E. coli*; SSB — białka stabilizujące jednoniciową strukturę DNA; UvrD — helikaza II, białko systemu naprawy przez wycinanie nukleotydów; VoLo — linia komórkowa ludzkiego raka jelita grubego

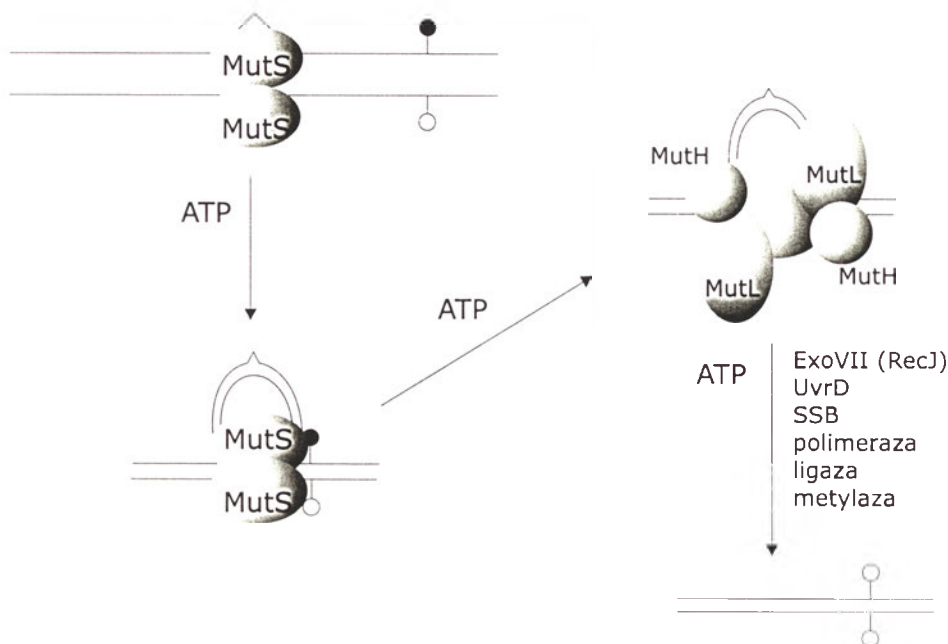
I. Wprowadzenie

Genom człowieka jest narażony na działanie czynników chemicznych i fizycznych, mogących zakłócić jego strukturę i funkcjonowanie, co implikuje utrzymanie integralności genomowego DNA jako warunek konieczny prawidłowego funkcjonowania komórki. Każdego dnia w każdej komórce człowieka ulega uszkodzeniu około 11000 nukleotydów [1]. Zaburzenia struktury genomu mogą przyczyniać się do rozwoju wielu groźnych chorób, w tym nowotworów złośliwych, dlatego też ważne jest poznanie mechanizmów systemów zapewniających utrzymanie i wierność przesyłania informacji genetycznej w komórce, spośród których podstawowe znaczenie mają systemy naprawy uszkodzeń DNA.

Procesy naprawy DNA mogą mieć charakter lokalny i polegać na naprawie uszkodzonego nukleotydu i przywróceniu oryginalnej struktury DNA, tak jak na przykład ma to miejsce w przypadku demetylacji zmetylowanej guaniny przez białko Ada lub działania systemu naprawy przez wycinanie zasad (BER), polegającego na usunięciu uszkodzonej zasady, wycięciu krótkiego fragmentu DNA w pobliżu miejsca pozbawionego zasady (AP) i resyntezie DNA. Obszerniejsze uszkodzenia DNA mogą być usuwane przez system naprawy przez wycinanie nu-

¹Dr, ²prof. dr hab. w Katedrze Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego, ul. Banacha 12/16, 90-237, e-mail janusz@biol.uni.lodz.pl

kleotydów (NER). Zarówno BER jak i NER wymagają nieuszkodzonej drugiej nici DNA, która służy jako matryca dla odtworzenia prawidłowej struktury pierwszorzędowej cząsteczki DNA. W DNA mogą także występować błędnie sparowane lub niesparowane zasady i zarówno jedne jak i drugie, jeśli nie zostaną naprawione, mogą prowadzić do mutacji typu tranzycji/transwersji i przesunięcia ramki odczytu. Błędnie sparowane zasady można podzielić na



Ryc. 1. Naprawa błędnie sparowanych zasad w *E. coli*.

trzy klasy (symbol gwiazdki podkreśla nieprawidłową parę):

- puryna*pirymidyna (G*T, A*C)
- puryna*puryna (G*G, A*A, G*A)
- pirymidyna*pirymidyna (T*T, C*C, T*C)

Błędnie sparowane zasady powstają najczęściej podczas replikacji DNA, rekombinacji homologicznej i w wyniku spontanicznej demetylacji 5'-metylocytozyny. Uszkodzenia te są najczęściej usuwane przez system naprawy błędnie sparowanych zasad (MMR), który tradycyjnie dzieli się na działający w obrębie bardzo krótkich, krótkich i długich odcinków DNA. Najlepiej poznanym i scharakteryzowanym systemem MMR jest poreplikacyjny system naprawy błędnie sparowanych zasad *Escherichia coli* uwarunkowany metylacją adeniny w sekwencji 5'-GATC-3' działający w obrębie długich odcinków DNA.

II. Naprawa błędnie sparowanych zasad u *E. coli*

System naprawy błędnie sparowanych zasad *E. coli* może rozpoznawać i naprawiać większość

błędnie sparowanych zasad, przy czym para CC jest naprawiana z efektywnością wyraźnie niższą niż pozostałe niesparowania. Dodatkowo, system ten może rozpoznawać i naprawiać uszkodzenia DNA w postaci krótkich (do 5 nt) jednoniciowych pętli DNA (Ryc. 1). Podstawowymi składnikami tego systemu są białka mutS, mutL i mutH a jego substratem mogą być błędnie sparowane zasady w cząsteczce hemimetylowanego DNA, w którym nić rodzicielska jest

zmetylowana, natomiast nić potomna nie jest [2-12]. Metylacja ma krytyczne znaczenie dla działania systemu MMR u *E. coli* gdyż błędnie sparowane zasady są szczególnym typem uszkodzenia DNA, w którym nie występuje zmiana struktury zasad, ustalenie zatem, która z nich ma być usuwana jest imperatywem. Grupy metylowe są przyłączane do nici potomnej przez metylazę Dam do N⁶ adeniny występującej w sekwencji 5'-GATC-3' po replikacji a nie w jej czasie, co umożliwia systemowi naprawy odróżnienie nici rodzicielskiej od potomnej [8].

Białko MutS jest homodimerem zbudowanym z dwóch monomerów, w którym można wyróżnić domenę wiążącą niesparowane zasady (I), domenę łącznika (II), domenę rdzenia (III), domenę spinającą (IV) i domenę wiążącą ATP (V) [13-15]. W obecności substratu dwie podjednostki MutS formują cząsteczkę w kształcie dysku zawierającym w środku otwór, w którym znajduje się DNA, wiążącym domeny I i IV. Dwie domeny IV obejmują DNA w większym rowku, zaś dwie domeny I oddziałują z mniejszym rowkiem [13-15]. Bezpośredni kontakt z obszarem DNA zawierającym błędne sparowania następuje poprzez fenyloalaninę N-końco-

wego motywu GXFY, występującego w domenie I. Motyw ten charakteryzuje się wysokim stopniem zachowania międzygatunkowego i został odnaleziony w większości homologów białka MutS w komórkach pro- i eukariotycznych [13,15]. W przypadku nieobecności substratu białko MutS formuje cząsteczkę przypominającą kształtem literę U. Prawdopodobnie rozpoznanie fragmentu DNA zawierającego uszkodzenie, błędnie sparowane zasady lub pętle DNA, jest warunkowane zmianami w strukturze DNA spowodowanymi brakiem prawidłowego wiązania wodorowego w miejscu uszkodzenia [15]. W następnym etapie do kompleksu MutS-DNA przyłączany jest ATP, co wywołuje zmiany w konformacji białka MutS, których konsekwencją jest opuszczenie przez homodimer miejsca uszkodzenia i jego przemieszczenie z wytworzeniem pętli, na szczycie której znajduje się fragment DNA zawierający niesparowane zasady [13,14,16,17].

Białko MutH wiąże się z hemizmetylowanym DNA i wykazuje aktywność endonukleolityczną [17]. Przyłączenie cząsteczki ATP do białka MutS powoduje aktywację MutH. Białko MutL, które tworzy kompleks z MutS i DNA, ma podobnie jak MutS domenę wiążącą ATP [18,19]. Hydroliza ATP przez białko MutL wydaje się być niezbędna do aktywacji białka MutH i ma znaczenie dla inicjacji naprawy i formowania kompleksu naprawczego przez białko MutS [20]. Hipotezę tą potwierdza fakt, że białko MutL, a nie MutS, oddziałuje z białkiem MutH [21]. Białko MutL może również oddziaływać z białkiem uvrD (helikaza II), które uczestniczy w naprawie uszkodzeń DNA w szlaku NER [22,23]. Długość fragmentu DNA podlegającego naprawie przez kompleks MutHLS może wynosić do 1 kpz [9,24]. Ponieważ jedna cząsteczka uvrD może rozwinąć nić na długości około 40-50 pz, rola białka MutL może polegać także na zapewnieniu ciągłości procesu przyłączania się helikazy II i tym samym kontynuacji rozwinięcia dupleksu DNA od miejsca nacięcia jednej nici przez MutH, aż do fragmentu zawierającego niesparowane nukleotydy [23]. Rozwinięta nić jest następnie degradowana przez egzonukleazy. Gdy nacięcie nici znajduje się po stronie 5' uszkodzonego fragmentu DNA, niezmetylowana nić jest trawiona przez egzonukleazę ExoVIII lub RecJ, a ich brak powoduje zahamowanie naprawy heterodupleksu DNA, zawierającego niesparowane nukleotydy oraz nacięcie nici od strony 5' miejsca uszkodzenia [25]. W przypadku, gdy nacięcie nici znajduje się od strony 3' degradacja nici jest przeprowadzana przez egzonukleazę ExoI [25]. W procesie tym muszą brać udział również inne enzymy, gdyż brak ExoI nie po-

woduje utraty zdolności naprawy błędnie niesparowanych zasad przez kompleks mutHLS. Wyłączenie genów kodujących białka RecJ, ExoVII oraz ExoI nie powoduje wzrostu poziomu mutacji spontanicznych, co sugeruje, że w szlaku MMR może brać udział więcej białek o właściwościach egzonukleazy [26-28]. Jednym z nich może być ExoX, charakteryzujące się właściwościami egzonukleazy 5' → 3' i 3' → 5' [29]. Nadekspresja ExoX w szczepie pozbawionym aktywności ExoI zmniejsza ilość mutacji powodowanych przez promieniowanie UV, natomiast mutacje w genach kodujących ExoX, RecJ, ExoVII i ExoI powodują wzrost wrażliwości komórki na promieniowanie UV i zwiększenie ogólnej niestabilności genomowej [30].

Jednoniciowy fragment DNA powstały w wyniku działania egzonukleaz systemu MMR jest osłaniany przed degradacją poprzez białka SSB [24]. Końcowym etapem procesu naprawy uszkodzeń DNA przez kompleks MutHLS jest synteza nici przez polimerazę DNA III. Bezpośrednie powiązanie systemu MMR z replikacją DNA u *E. coli* potwierdza oddziaływanie białka MutS z podjednostką β polimerazy DNA III [31].

III. Naprawa błędnie sparowanych zasad w komórkach człowieka

Poznanie sekwencji genów kodujących białka biorące udział w naprawie DNA systemu MMR *E. coli* pozwoliło na poszukiwanie ich homologów w genomach innych organizmów. Do tej pory zidentyfikowano homologi genów *mutL* i *mutS*, natomiast brak jest doniesień wykazujących istnienie genów o wysokim stopniu homologii z genem *mutH* *E. coli*. Analiza filogenetyczna genów należących do rodziny homologów genu *mutS* *E. coli* wskazuje, że wszystkie te geny mogą pochodzić od wspólnego przodka, którego należy szukać u archebakterii [32]. Gen ten mógł trafić do mitochondrium komórki eukariotycznej w wyniku procesu endosymbiozy, skąd następnie został przeniesiony do jądra, gdzie nastąpiło zwiększenie ilości jego kopii. Opisano również przypadek odwrotnego transferu, kiedy gen jądrowy *msh1* *S. cerevisiae* został przeniesiony do genomu mitochondrium [32].

Wyniki badań nad dziedzicznym niepolipowatym rakiem jelita grubego (HNPC) pozwoliły na identyfikację genów oraz kodowanych przez nie białek systemu MMR u człowieka (hMMR). Zidentyfikowano i opisano pięć homologów białka MutS *E. coli* z czego trzy hMSH2, hMSH3 i hMSH6 biorą udział w rozpoznaniu miejsca uszkodzenia DNA powstałego

w wyniku błędnie sparowanych nukleotydów oraz sześć homologów białka MutL (http://www.cgal.ic-net.uk/DNA_Repair_Genes.html#MMR stan na dzień 02-04-2003).

Proces naprawy błędnie sparowanych zasad u człowieka rozpoczyna się od formowania heterodimeru zawierającego białka hMSH2 i hMSH3 lub hMSH6 [33, 34]. Dodanie heterodimeru hMSH2: hMSH6 (hMutS α) do ekstraktu komórkowego uzyskanego z linii komórkowej VoLo nowotworu jelita grubego powoduje naprawę heterodupleksu DNA zawierającego błędnie sparowane zasady [33]. Brak aktywności systemu MMR w komórkach pochodzących z tej linii może być spowodowany mutacją w genie *hmsH2*, powodującą brak ekspresji kodowanego przez nie białka [35]. Białko hMSH2 może również tworzyć kompleks z białkiem hMSH3 (hMutS β) oraz uczestniczyć w szlaku naprawy błędnie sparowanych zasad bez udziału białka hMSH6 [33]. Heterodimery hMutS α i hMutS β przyłączają różne substraty — hMutS α łączy się preferencyjnie z dupleksem DNA zawierającym uszkodzenie w postaci błędnie sparowanej pary zasad lub jednonukleotydowe wypętlenie, natomiast hMutS β wiąże DNA z wypętlaniem dwu- lub więcej nukleotydowym [34, 36]. Heterodimer MutS α może rozpoznawać także wypętlania DNA powstałe w wyniku „poślizgu” polimerazy DNA w replikacji. Zjawisko to zachodzi przede wszystkim przy powielaniu odcinków DNA zawierających sekwencje powtórzone wprost. MutS α z wysoką specyficznością może rozpoznawać pętle powstałe w wyniku „poślizgu” polimerazy DNA na traktach (CA) $_n$ i (G) $_n$ [37]. Brak jest świadectw podobnie wysokiej specyficzności substratowej w odniesieniu do kompleksu MutS β . Specyficzność MutS α w usuwaniu pewnych, ściśle określonych typów uszkodzeń DNA, których źródłem są niesparowane zasady oraz wysoka liczba ich kombinacji pozwalają przypuszczać, że istnieją inne nieopisane do tej pory białka biorące udział w naprawie niesparowanych zasad, działające podobnie jak heterodimery MutS α oraz MutS β .

Kolejnym etapem naprawy jest przyłączanie heterodimeru hMutL α zbudowanego z białek hMLH1 i hPMS2, które są homologami białka MutL *E. coli*, aktywującego endonukleazę MutH [38]. Rola heterodimeru hMutL α może, tak jak w przypadku MutL *E. coli*, polegać na rearanżacji kompleksu hMutS α lub hMutS β z DNA i inicjowaniu procesu przyłączania innych składników hMMR, jednakże wydaje się, że hMutL α nie jest czynnikiem niezbędnym dla funkcjonowania tego systemu [38]. hMMR może działać zarówno w kierunku 5' $\rightarrow$ 3' jak i 3' $\rightarrow$ 5', a

jego główną egzonukleazą jest, podobnie jak u bakterii, ExoI [39-47].

Końcowy etap naprawy MMR u człowieka — re-synteza nici z wyciętym fragmentem zawierającym uszkodzenie — przeprowadzany jest przez polimerazę przy udziale jądrowego antygeny proliferujących komórek, PCNA [48]. PCNA może się wiązać z hMSH2, hMLH1 i hPMS2 i może brać udział w rozpoznawaniu uszkodzenia oraz rozróżnieniu pomiędzy nicią uszkodzoną i nieuszkodzoną [49-51, 31]. Prawdopodobnie mechanizmem leżącym u podstaw rozpoznania nici zawierającej uszkodzenie jest metylacja wysp CpG, co może potwierdzać odkrycie białka MED1, które oddziałuje z białkiem hMLH1 oraz odcinkiem DNA zawierającym zmetylowaną sekwencję CpG [52,53].

IV. Naprawa błędnie sparowanych zasad w transformacji nowotworowej

Zaburzenia funkcjonowania systemów naprawy DNA mogą prowadzić do niestabilności genomowej, sprzyjającej indukcji i rozwojowi transformacji nowotworowej [54-56]. Dziedziczny niepolipowaty rak jelita grubego może być związany z inaktywacją białek systemu MMR spowodowaną mutacjami w kodujących je genach [57-62]. Mutacje te powodują zaburzenia naprawy DNA w obszarach genomu zawierających sekwencje mikrosatelitarne A $_n$, (GGC) $_n$, (CA) $_n$ i są specyficzne dla komórek nowotworowych [63-65]. Niestabilność takich sekwencji mikrosatelitarnych, poza rakiem jelita grubego (częstość występowania 12-28%), stwierdzono także w rakach żołądka (18-39%), jajników (16%), trzustki (67%) oraz płuc (45%) [66].

Występowanie HNPCC może być związane z mutacjami w genach *hmlh1* i *hmsH2* oraz, w mniejszym stopniu, w genie *hpsm1* [67]. W ekstraktach jądrowych uzyskanych z kilku linii nowotworowych charakteryzujących się niestabilnością sekwencji mikrosatelitarnych stwierdzono brak aktywnego systemu naprawy niesparowanych zasad [33, 68]. Analiza genetyczna tych linii komórkowych pozwoliła na stwierdzenie obecności zmutowanych alleli genów *hmlh1* [69], *hmsH2* [70] i *hpsm2* [71]. Dodanie do ekstraktu jądrowego heterodimerów hMutS α lub hMutL α przywracało zdolność naprawy heterodupleksu zawierającego błędnie sparowane zasady [33, 38].

Proces inaktywacji systemu MMR może być zapoczątkowany mutacją w jednym z jego genów. Większość takich mutacji ma charakter recesywny i dotyczy tylko jednego allelu. Aby doszło do całkowite-

go „wyciszenia” genu potrzebna jest jeszcze mutacja w drugiej jego kopii, co może być następstwem spontanicznej mutacji, utraty heterozygotyczności podczas podziału mitotycznego, konwersji genu lub *crossing-over*. Opisano także przypadki występowania nabytych, dominujących, nieaktywnych alleli ludzkich homologów białek MutS oraz MutL [33, 72-77]. Ze względu na swój globalny zasięg mutacje takie powodują krótki czas przeżycia organizmu od momentu ich ujawnienia. Kolejnym mechanizmem prowadzącym do „wyciszenia” bądź znacznego zmniejszenia aktywności systemu MMR są zaburzenia we wzorze ekspresji genów kodujących poszczególne czynniki tego systemu. Zmiana ekspresji jednego z białek systemu MMR może objawiać się w różny sposób, na przykład naprawiane mogą być tylko uszkodzenia określonego typu lub zaburzeniu może ulec proces rozróżniania nici. Zmiany te są trudne do określenia, gdyż taki system MMR może pozostać aktywny *in vitro*. W komórkach drożdży *S. cerevisiae* transkrypcja genów *msh2*, *msh6* oraz *pms1* jest ściśle powiązana w czasie z procesem replikacji DNA, natomiast poziom ekspresji pozostałych genów MMR jest stały w trakcie całego cyklu komórkowego [78]. Inaktywacja genu kodującego białko PSM1 u drożdży wraz z równoczesną nadekspresją tego genu dostarczonego w wektorze plazmidowym powodowało nabywanie przez komórkę fenotypu mutatorowego [78]. Fakt ten świadczy o niezwyklej precyzji, z jaką komórka reguluje czas oraz poziom ekspresji poszczególnych elementów systemu MMR, a w szczególności PMS1. Podobne zależności zaobserwowano u człowieka [79].

Ekspresja genów kodujących białka systemu MMR może się zmieniać w odpowiedzi na metylację wysp CpG. Niespotykaną wcześniej metylację regionu promotorowego genu *hmlh1* zaobserwowano w nowotworach jelita grubego; metylacja była skorelowana brakiem ekspresji tego genu i nieefektywnym systemem MMR [80].

Nadekspresja białka hMSH3 może hamować aktywność systemu MMR. W wyniku amplifikacji genu *dhfr*, kodującego reduktazę folianową i dzielącego promotor z genem *hms3*, zwiększa się ilość wytwarzanego białka hMSH3, co zmienia stosunek poziomów białek kompleksu MutSα/MutSβ. Zmniejszona ilość heterodimeru MutSα może nie zapewnić efektywnej naprawy wszystkich uszkodzeń DNA, będących wynikiem występowania błędnie sparowanych zasad, podczas gdy uszkodzenia DNA w postaci pętli są naprawiane wydajnie. W efekcie następuje zjawisko znacznego zwiększenia częstotli-

wości występowania mutacji i nabywanie przez komórkę cech nowotworowych [81, 82].

V. Naprawa błędnie sparowanych zasad a oporność na leki

Oporność komórek nowotworowych na leki jest, obok niepożądanych efektów ubocznych, najpoważniejszą przeszkodą terapii przeciwnowotworowej. W szeregu badań stwierdzono korelacje pomiędzy rozwojem oporności i zaburzeniami funkcjonowania systemu MMR [83-91].

Nieefektywność układu MMR może być przyczyną oporności komórek na 6-tioguaninę (6-TG) i czynniki metylujące: *N*-metylo-*N*-nitrozomocznik, temozolomid, dekabazin [92]. Cytotoksyczność 6-TG jest uwarunkowana jej przekształceniem do 6-tioGTP i wprowadzeniem tak zmodyfikowanego nukleotydu do DNA podczas replikacji. Zmodyfikowana zasada ulega metylacji poprzez transfer grupy metylowej z *S*-adenozynometioniny. Produkt tej reakcji może tworzyć pary z tyminą, dając substrat dla systemu MMR [93]. Analogiczny charakter ma mechanizm cytotoksycznego działania wielu innych czynników metylujących DNA, których efektem działania jest obecność w DNA O⁶meG, mogącej tworzyć pary z tyminą lub cytozyną, jednakże para O⁶meG-C nie jest naprawiana przez MMR i może prowadzić do poważnych zaburzeń funkcjonowania komórki.

Oporności na lek przeciwnowotworowy metotreksat (MTX) towarzyszyć może nadekspresja genu *hms3*, który, jak już wspomniano, ma wspólny promotor z genem *dhfr* kodującym reduktazę dihydrofolianową (DHFR), mającą zasadnicze znaczenie dla syntezy zasad azotowych [94]. MTX jest inhibitorem DHFR a oporność komórek na ten lek wiąże się z amplifikacją genu *dhfr* i wzrostem ilości jego produktu [95, 96]. Efektem tego procesu może być zmiana ilości białka hMSH3, które tworzy z hMSH2 kompleks hMutSβ. Ponieważ hMSH2 formuje z hMSH6 heterodimer hMutSα, to zwiększony poziom hMSH3 może prowadzić do zmniejszenia całkowitej ilości heterodimeru hMutSα poprzez zmniejszenie dostępnej puli hMSH2. W komórkach białaczkowych linii HL-60 stosunek hMutSα:hMutSβ wynosił 6:1, podczas gdy w komórkach HL-60R opornych na MTX, był on równy 1:100 [96]. W konsekwencji system MMR nie naprawia uszkodzeń DNA spowodowanych przez błędnie sparowane zasady. Upośledzenie systemu MMR wywołane przez MTX powoduje nabywanie oporności na inne związki stosowane w terapii,

w przypadku jeśli proces ten wiąże się ze zmianą aktywności hMutSα.

Nie zostały jeszcze w pełni wyjaśnione mechanizmy oporności komórek z niesprawnym systemem MMR na powszechnie stosowane w chemioterapii leki cisplatynę (*cis*-diamminodichloroplatinę) i doksyribicynę [92,97-99]. Cisplatyna tworzy preferencyjnie wiązania krzyżowe pomiędzy sąsiednimi lub przedzielonymi jedną zasadą guaninami, zaburzając replikację i transkrypcję komórek nowotworowych. Mechanizm cytostatycznego działania cisplatyny jest więc odmienny od mechanizmu leżącego u podstaw działania związków metylujących, MTX i 6-TG. Niesprawnny system naprawy błędnie sparowanych

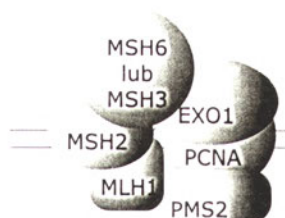
a) Rozpoznanie niesparowanych nukleotydów



b) Formowanie kompleksu naprawczego



c) Wycięcie, resynteza i ligacja



Rys. 2. Naprawa błędnie sparowanych zasad w komórkach człowieka.

nych zasad może powodować wzrost oporności na leki metylujące 20-100 razy, natomiast na cisplatynę — 1,5 do 3 razy [100-102].

Rozważać można co najmniej dwa mechanizmy oporności komórek nowotworowych na cisplatynę. Nieefektywny system MMR powoduje zwiększenie częstotliwości wprowadzanych do genomu mutacji, które zmieniają fenotyp komórki na pozwalający jej na przeżycie w obecności cisplatyny. Precyzyjne określenie charakteru mutacji oraz będących ich konsekwencją zmian fenotypowych, nie zostało dotychczas dokonane. W innym możliwym mechanizmie, oporność komórek nowotworowych na cispla-

tynę jest konsekwencją inaktywacji szlaku zależnego od białka p53 [98]. Wyłączenie tego szlaku często jest powiązane z brakiem naprawy uszkodzeń DNA spowodowanych wystąpieniem błędnie sparowanych nukleotydów. Podobnie jak w przypadku pierwszego mechanizmu, molekularne aspekty tego procesu są złożone i nie do końca poznane [98].

VI. Naprawa błędnie sparowanych zasad w mitochondrium

Mitochondrialny DNA jest bardziej wrażliwy na uszkodzenia niż jego odpowiednik jądrowy ze względu na obecność reaktywnych związków che-

micznych, towarzyszących szlakowi oddechowemu a także brak histonów [103]. W mitochondrium scharakteryzowano szereg białek, które biorą udział w naprawie uszkodzeń DNA przez wycinanie zasad [104,105]. Uszkodzenie zasady może powstawać w wyniku działania reaktywnych form tlenu i mieć charakter mutageny, tak jak na przykład 7,8-dihydro-8-okso-deoksyguanina (8-oksoG), która może prowadzić do transwersji GC → AT [106]. Uszkodzenia takie w mitochondrium człowieka są wydajnie naprawiane przez białko mtMYH, będące homologiem białka MutY *E. coli*. mtMYH może naprawiać błędnie sparowane pary zasad A*8-oksoG [105]. Opisa-

no również inne białka mitochondrialne, które uczestniczą w procesie usuwania uszkodzeń DNA powstałych w wyniku oksydacyjnie zmodyfikowanych zasad purynowych: hOGG1, hMYH1. Białka te są glikozydazami DNA, które wchodzą w skład mito-

naprawy niesparowanych nukleotydów. Analiza z użyciem przeciwciał dla MSH2 nie wykazała obecności białek homologicznych do MSH2 w mitochondriach wątroby szczura [109]. Wynik ten jest w pewnym sensie zaskoczeniem, gdyż

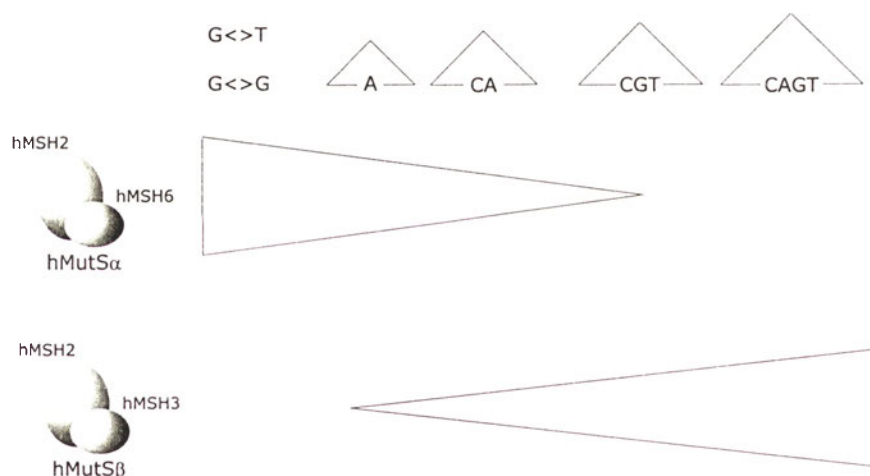
Tabela 1

Składniki systemów naprawy błędnie sparowanych zasad u *E. coli* i ich homologi u niektórych eukariontów

<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	<i>C. elegans</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>H. sapiens</i>
MutS	MSH2	MSH2	MSH2	SPEL1	MSH2	hMSH2
	MSH3	SWI4	—	—	MSH3	hMSH3
	MSH6	MSH6	MSH6	MSH6	MSH6	hMSH6
	—	—	—	—	MSH7	—
MutL	MLH1	MLH1	MLH1	MLH1	MLH1	hMLH1
	PMS1	PMS1	PMS1	PMS2	PMS1	hPMS2
	MLH2	—	—	—	—	—
	MLH3	—	—	—	MLH3	hMLH3
MutH	—	—	—	—	—	—
—	EXO1	EXO1	—	TOSCA	Q9C7NS	EXO1

chondrialnego systemu BER [107]. Białka BER mogą naprawiać błędnie sparowane nukleotydy G*T, podczas gdy uszkodzenia DNA powstałe w wyniku błędnie sparowanych zasad innego typu, w tym G*G nie są przez ten system usuwane [106,108].

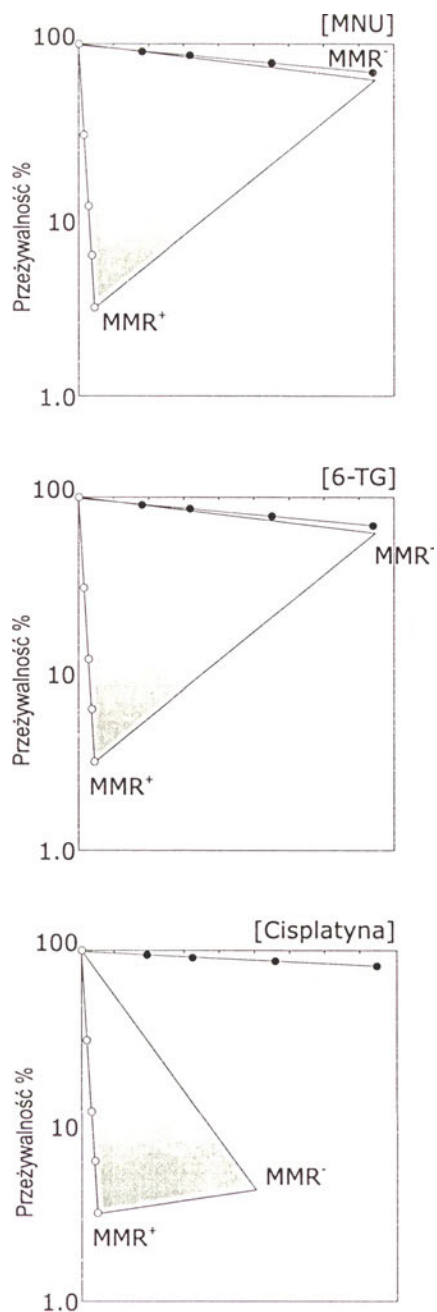
wcześniej Chen i wsp. wykazali obecność białka MSH2 w takich mitochondriach [110]. Brak homologu białka MSH2 sugeruje, że mitochondrialny system MMR może działać niezależnie od białka MSH2. Zaskakującym jest również



Rys. 3. Preferencja substratowa heterodimerów biorących udział w naprawie uszkodzeń DNA wywołanych przez błędnie sparowane zasady i wy-pętlenia DNA zbudowane z jednego, dwóch, trzech i czterech nukleotydów.

Błędnie sparowane nukleotydy G*T oraz G*G mogą być usuwane z DNA przez ekstrakty komórkowe wątroby szczura, a wydajność tego procesu zależy od stężenia ATP i jonów dwuwartościowych, analogicznie jak w naprawie uszkodzeń DNA przez jądrowy system MMR [109]. Zatem w mitochondriach komórek wątroby szczura istnieje system naprawy błędnie sparowanych zasad homologiczny do jądrowego systemu MMR. Jak dotychczas brak jest danych, które pozwoliłyby na identyfikację białek wchodzących w skład mitochondrialnego systemu

fakt braku preferencji przy wyborze odpowiedniej nici w procesie naprawy błędnie sparowanych nukleotydów [109]. Brak dyskryminacji jednej nici podczas procesu naprawy błędnie sparowanych zasad może doprowadzić, w przypadku wyboru nici zawierającej nieprawidłowy nukleotyd jako matrycy w procesie naprawy, do powstania mutacji. Fakt ten tłumaczy wysoki stopień zmienności mtDNA w porównaniu do jądrowego DNA [111, 112]. Jednakże uszkodzenia DNA powstałe w wyniku błędnie sparowanych zasad zostałyby napra-



Rys. 4. Znaczenie zaburzeń funkcjonowania systemu MMR w oporności na leki przeciwnowotworowe: *N*-metylo-*N*-nitrozomocznik (MNU), 6 tioguaninę (6-TG) i *cis*-diamminodichloroplatinę (cisplatynę).

wione podczas następnej replikacji mtDNA i w takim przypadku wcześniejsza interwencja systemów naprawczych jest niekorzystna dla bilansu energetycznego komórki. W świetle uzyskanych do tej pory danych można przyjąć, że system MMR w mitochondrium służy przede wszystkim do naprawy uszkodzeń DNA występujących w postaci krótkich wypełnień nici DNA [109]. Hipotezę tą mogą potwierdzać wyniki badań aktywności jądrowego systemu MMR w komórkach z nieaktywnym genem kodującym białko hMSH2. Ekstrakty uzyskane z tych komórek są zdolne do naprawy uszkodzeń DNA obecnych w postaci krótkich wypełnień, oraz w niewielkim stopniu naprawiają błędnie sparowane zasady [113]. Nie

można zatem wykluczyć, że naprawa niesparowanych nukleotydów w mitochondrium jest przeprowadzana przez mitochondrialny homolog białka, które jest odpowiedzialne za naprawę poreplikacyjnych uszkodzeń DNA w komórkach nieaktywnym białkiem hMSH2.

VII. Uwagi końcowe

Błędnie sparowane zasady powstają w DNA każdego organizmu przede wszystkim jako konsekwencja błędów w syntezie replikacyjnej i naprawczej, chemicznej modyfikacji zasad oraz rekombinacji pomiędzy nieidentycznymi sekwencjami DNA. Naprawa błędnie sparowanych zasad odgrywa zasadniczą rolę w utrzymaniu stabilności genomowej, a utrata zdolności MMR może być podstawą genetycznego uwarunkowania poważnych chorób, w tym nowotworów złośliwych. Brak prawidłowego funkcjonowania systemu MMR obserwowany jest też w wielu rakach sporadycznych. Wyniki badań przeprowadzonych w ostatnich latach wskazują także, że zaburzone działanie MMR może stanowić podstawę rozwoju oporności komórek rakowych na niektóre leki przeciwnowotworowe, w tym cisplatynę i antybiotyki antracyklinowe. Może to być konsekwencją niestabilności genomowej wywołanej utratą MMR i zwiększonym tempem mutacji w kodujących i regulatorowych obszarach genów, których produkty mogą określać reakcję komórek nowotworowych na lek. Utrata MMR może być również związana z opornością na promieniowanie jonizujące.

Nadzieję na postęp w dalszym poznaniu mechanizmów i znaczenia MMR stwarza dostępność myszy z mutacjami typu utraty funkcji w genach *mutS* i *mutL*. Badania z użyciem takich myszy pozwoliły na szczegółową analizę konsekwencji inaktywacji MMR poprzez wyłączenie tych genów oraz na dokładne określenie ich znaczenia biologicznego, w szczególności ich indywidualnej roli w supresji transformacji nowotworowej. Pomimo, że fenotyp nowotworowy może zależeć od gatunku, funkcje MMR są stosunkowo dobrze zachowane pomiędzy gatunkami. Ponieważ obszary kodujące genów MMR u człowieka i myszy są w wysokim stopniu zachowane, to wydaje się możliwe stworzenie linii komórkowych wywodzących się z myszy charakteryzujących się zmianami genetycznymi charakterystycznymi dla chorób człowieka związanych z zaburzeniami MMR, w tym dla dziedzicznego niepolipowatego raka jelita grubego. Wydaje się prawdopodobne, że badania takie będzie można rozwinąć w kierunku poszukiwań bardziej ogólnego znaczenia konsekwencji fenotypo-

wych zmian w sekwencji genów kodujących białka naprawy DNA.

Artykuł otrzymano 10 kwietnia 2003

Zaakceptowano do druku 3 lipca 2003

Piśmiennictwo

1. Friedberg EC, Walker G C, Siede W (1995) W: Friedberg E C, Walker G C, Siede W. *DNA Repair And Mutagenesis*. ASM Press, Washington str. 2-47
2. Au KG, Welsh K, Modrich P (1992) *J Biol Chem* **267**:12142-12148
3. Fang WH, Modrich P (1993) *J Biol Chem* **268**:11838-11844
4. Fang WH, Li GM, Longley M, Holmes J, Thilly W, Modrich P (1993) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **58**:597-603:597-603
5. Lahue RS, Modrich P (1988) *Mutat Res* **198**:37-43
6. Lahue RS, Au KG, Modrich P (1989) *Science* **245**:160-164
7. Marx J (1994) *Science* **266**:728-730
8. Modrich P (1989) *J Biol Chem* **264**:6597-6600
9. Modrich P (1991) *Annu Rev Genet* **25**:229-53:229-253
10. Modrich P (1994) *Science* **266**:1959-1960
11. Polaczek P (1999) *Kosmos* **48**:353-358
12. Worth L, Jr., Clark S, Radman M, Modrich P (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:3238-3241
13. Lamers MH, Perrakis A, Enzlin JH, Winterwerp HH, de Wind N, Sixma TK (2000) *Nature* **407**:711-717
14. Lamers MH, Winterwerp HH, Sixma TK (2003) *EMBO J* **22**:746-756
15. Obmolova G, Ban C, Hsieh P, Yang W (2000) *Nature* **407**:703-710
16. Allen DJ, Makhov A, Grilley M, Taylor J, Thresher R, Modrich P, Griffith JD (1997) *EMBO J* **16**:4467-4476
17. Junop MS, Obmolova G, Rausch K, Hsieh P, Yang W (2001) *Mol Cell* **7**:1-12
18. Ban C, Yang W (1998) *Cell* **95**:541-552
19. Ban C, Junop M, Yang W (1999) *Cell* **97**:85-97
20. Marti TM, Kunz C, Fleck O (2002) *J Cell Physiol* **191**:28-41
21. Hall MC, Matson SW (1999) *J Biol Chem* **274**:1306-1312
22. Dao V, Modrich P (1998) *J Biol Chem* **273**:9202-9207
23. Mechanic LE, Frankel BA, Matson SW (2000) *J Biol Chem* **275**:38337-38346
24. Modrich P, Lahue R (1996) *Annu Rev Biochem* **65**:101-33:101-133
25. Cooper DL, Lahue RS, Modrich P (1993) *J Biol Chem* **268**:11823-11829
26. Harris RS, Ross KJ, Lombardo MJ, Rosenberg SM (1998) *J Bacteriol* **180**:989-993
27. Viswanathan M, Lovett ST (1998) *Genetics* **149**:7-16
28. Viswanathan M, Burdett V, Baitinger C, Modrich P, Lovett ST (2001) *J Biol Chem* **276**:31053-31058
29. Viswanathan M, Lovett ST (1999) *J Biol Chem* **274**:30094-30100
30. Burdett V, Baitinger C, Viswanathan M, Lovett ST, Modrich P (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:6765-6770
31. Lopez de Saro FJ, O'Donnell M (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:8376-8380
32. Culligan KM, Meyer-Gauen G, Lyons-Weiler J, Hays JB (2000) *Nucleic Acids Res* **28**:463-471
33. Drummond JT, Li GM, Longley MJ, Modrich P (1995) *Science* **268**:1909-1912
34. Palombo F, Iaccarino I, Nakajima E, Ikejima M, Shimada T, Jiricny J (1996) *Curr Biol* **6**:1181-1184
35. Umar A, Boyer JC, Thomas DC, Nguyen DC, Rissinger JJ, Boyd J, Ionov Y, Perucho M, Kunkel TA (1994) *J Biol Chem* **269**:14367-14370
36. Parker BO, Marinus MG (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:1730-1734
37. Aquilina G, Hess P, Branch P, MacGeoch C, Casciano I, Karran P, Bignami M (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:8905-8909
38. Li GM, Modrich P (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:1950-1954
39. Amin NS, Nguyen MN, Oh S, Kolodner RD (2001) *Mol Cell Biol* **21**:5142-5155
40. Argueso JL, Smith D, Yi J, Waase M, Sarin S, Alani E (2002) *Genetics* **160**:909-921
41. Fiorentini P, Huang KN, Tishkoff DX, Kolodner RD, Symington LS (1997) *Mol Cell Biol* **17**:2764-2773
42. Jager AC, Rasmussen M, Bisgaard HC, Singh KK, Nielsen FC, Rasmussen LJ (2001) *Oncogene* **20**:3590-3595
43. Jagmohan-Changur S, Poikonen T, Vilkkki S, Launonen V, Wikman F, Orntoft TF, Moller P, Vasen H, Tops C, Kolodner RD, Mecklin JP, Jarvinen H, Bevan S, Houlston RS, Aaltonen LA, Fodde R, Wijnen J, Karhu A (2003) *Cancer Res* **63**:154-158
44. Sokolsky T, Alani E (2000) *Genetics* **155**:589-599
45. Tishkoff DX, Boerger AL, Bertrand P, Filosi N, Gaida GM, Kane MF, Kolodner RD (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:7487-7492
46. Tishkoff DX, Amin NS, Viars CS, Arden KC, Kolodner RD (1998) *Cancer Res* **58**:5027-5031
47. Tran HT, Gordenin DA, Resnick MA (1999) *Mol Cell Biol* **19**:2000-2007
48. Longley MJ, Pierce AJ, Modrich P (1997) *J Biol Chem* **272**:10917-10921
49. Bowers J, Tran PT, Joshi A, Liskay RM, Alani E (2001) *J Mol Biol* **306**:957-968
50. Flores-Rozas H, Clark D, Kolodner RD (2000) *Nat Genet* **26**:375-378
51. Kleczkowska HE, Marra G, Lettieri T, Jiricny J (2001) *Genes Dev* **15**:724-736
52. Bellacosa A, Cicchillitti L, Schepis F, Riccio A, Yeung AT, Matsumoto Y, Golemis EA, Genuardi M, Neri G (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:3969-3974
53. Bellacosa A (2001) *J Cell Physiol* **187**:137-144
54. Fearon ER (1995) *Ann N Y Acad Sci* **768**:101-10:101-110
55. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL (1988) *N Engl J Med* **319**:525-532
56. Vogelstein B, Kinzler KW (1994) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **59**:517-21:517-521
57. Aaltonen LA, Peltomaki P (1994) *Anticancer Res* **14**:1657-1660
58. Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, Salovaara R, Aaltonen LA, De La CA, Peltomaki P, Mecklin JP, Jarvinen HJ (1999) *Int J Cancer* **81**:214-218
59. Akiyama Y, Nagasaki H, Nakajima T, Sakai H, Nomizu T, Yuasa Y (2001) *Jpn J Clin Oncol* **31**:61-64
60. al Taie O, Mork H, Seufert J, Treis H, Jakob F, Scheurlen M (2001) *Med Klin* **96**:529-538
61. Aquilina G, Bignami M (2001) *J Cell Physiol* **187**:145-154
62. Bai YQ, Akiyama Y, Nagasaki H, Lu SL, Arai T, Morisaki T, Kitamura M, Muto A, Nagashima M, Nomizu T, Iwama T, Itoh H, Baba S, Iwai T, Yuasa Y (1999) *Int J Cancer* **82**:512-515
63. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M (1993) *Nature* **363**:558-561
64. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D (1993) *Science* **260**:816-819
65. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pykkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR (1993) *Science* **260**:812-816
66. Eshleman JR, Markowitz SD (1995) *Curr Opin Oncol* **7**:83-89

67. Liu B, Parsons RE, Hamilton SR, Petersen GM, Lynch HT, Watson P, Markowitz S, Willson JK, Green J, De La CA (1994) *Cancer Res* **54**:4590-4594
68. Parsons R, Li GM, Longley MJ, Fang WH, Papadopoulos N, Jen J, De La CA, Kinzler KW, Vogelstein B, Modrich P (1993) *Cell* **75**:1227-1236
69. Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD (1994) *Science* **263**:1625-1629
70. Liu B, Nicolaides NC, Markowitz S, Willson JK, Parsons RE, Jen J, Papadopoulos N, Peltonmaki P, De La CA, Hamilton SR (1995) *Nat Genet* **9**:48-55
71. Risinger JL, Umar A, Barrett JC, Kunkel TA (1995) *J Biol Chem* **270**:18183-18186
72. Alani E, Sokolsky T, Studamire B, Miret JJ, Lahue RS (1997) *Mol Cell Biol* **17**:2436-2447
73. Aronshtam A, Marinus MG (1996) *Nucleic Acids Res* **24**:2498-2504
74. Pang Q, Prolla TA, Liskay RM (1997) *Mol Cell Biol* **17**:4465-4473
75. Parsons R, Myeroff LL, Liu B, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B (1995) *Cancer Res* **55**:5548-5550
76. Parsons R, Li GM, Longley M, Modrich P, Liu B, Berk T, Hamilton SR, Kinzler KW, Vogelstein B (1995) *Science* **268**:738-740
77. Wu TH, Marinus MG (1994) *J Bacteriol* **176**:5393-5400
78. Kramer W, Fartmann B, Ringbeck EC (1996) *Mol Gen Genet* **252**:275-283
79. Marra G, Chang CL, Laghi LA, Chauhan DP, Young D, Boland CR (1996) *Oncogene* **13**:2189-2196
80. Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, Jessup JM, Kolodner R (1997) *Cancer Res* **57**:808-811
81. Drummond JT, Genschel J, Wolf E, Modrich P (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:10144-10149
82. Marra G, Iaccarino I, Lettieri T, Roscilli G, Delmastro P, Jiricny J (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:8568-8573
83. Aquilina G, Ceccotti S, Martinelli S, Soddu S, Crescenzi M, Branch P, Karran P, Bignami M (2000) *Clin Cancer Res* **6**:671-680
84. Aquilina G, Ceccotti S, Martinelli S, Hampson R, Bignami M (1998) *Cancer Res* **58**:135-141
85. Cenni B, Kim HK, Bubley GJ, Aebi S, Fink D, Teicher BA, Howell SB, Christen RD (1999) *Br J Cancer* **80**:699-704
86. Durant ST, Morris MM, Illand M, McKay HJ, McCormick C, Hirst GL, Borts RH, Brown R (1999) *Curr Biol* **9**:51-54
87. Fink D, Aebi S, Howell SB (1998) *Clin Cancer Res* **4**:1-6
88. Glaab WE, Risinger JL, Umar A, Barrett JC, Kunkel TA, Tindall KR (1998) *Carcinogenesis* **19**:1931-1937
89. Kaina B, Christmann M (2002) *Int J Clin Pharmacol Ther* **40**:354-367
90. Lage H, Dietel M (1999) *J Cancer Res Clin Oncol* **125**:156-165
91. las Alas MM, Aebi S, Fink D, Howell SB, Los G (1997) *J Natl Cancer Inst* **89**:1537-1541
92. Aebi S, Fink D, Gordon R, Kim HK, Zheng H, Fink JL, Howell SB (1997) *Clin Cancer Res* **3**:1763-1767
93. Swann PF, Waters TR, Moulton DC, Xu YZ, Zheng Q, Edwards M, Mace R (1996) *Science* **273**:1109-1111
94. Watanabe A, Ikejima M, Suzuki N, Shimada T (1996) *Genomics* **31**:311-318
95. Carman MD, Schornagel JH, Rivest RS, Srimat-kandada S, Portlock CS, Duffy T, Bertino JR (1984) *J Clin Oncol* **2**:16-20
96. Trent JM, Buick RN, Olson S, Horns RC, Jr., Schimke RT (1984) *J Clin Oncol* **2**:8-15
97. Aebi S, Kurdi-Haidar B, Gordon R, Cenni B, Zheng H, Fink D, Christen RD, Boland CR, Koi M, Fishel R, Howell SB (1996) *Cancer Res* **56**:3087-3090
98. Anthoney DA, McIlwraith AJ, Gallagher WM, Edlin AR, Brown R (1996) *Cancer Res* **56**:1374-1381
99. Fedier A, Schwarz VA, Walt H, Carpin RD, Halter U, Fink D (2001) *Int J Cancer* **93**:571-576
100. Fink D, Nebel S, Aebi S, Zheng H, Kim HK, Christen RD, Howell SB (1997) *Br J Cancer* **76**:890-893
101. Fink D, Zheng H, Nebel S, Norris PS, Aebi S, Lin TP, Nehme A, Christen RD, Haas M, MacLeod CL, Howell SB (1997) *Cancer Res* **57**:1841-1845
102. Fink D, Nebel S, Aebi S, Zheng H, Cenni B, Nehme A, Christen RD, Howell SB (1996) *Cancer Res* **56**:4881-4886
103. Richter C, Park JW, Ames BN (1988) *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:6465-6467
104. Croteau DL, Bohr VA (1997) *J Biol Chem* **272**:25409-25412
105. Parker A, Gu Y, Lu AL (2000) *Nucleic Acids Res* **28**:3206-3215
106. Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:10771-10778
107. Nakabeppu Y (2001) *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **68**:75-94
108. Tomilin NV, Aprelikova ON (1989) *Int Rev Cytol* **114**:125-179
109. Mason PA, Matheson EC, Hall AG, Lightowers RN (2003) *Nucleic Acids Res* **31**:1052-1058
110. Chen Z, Felsheim R, Wong P, Augustin LB, Metz R, Kren BT, Steer CJ (2001) *Biochem Biophys Res Commun* **285**:188-194
111. Herrnstadt C, Elson JL, Fahy E, Preston G, Turnbull DM, Anderson C, Ghosh SS, Olefsky JM, Beal MF, Davis RE, Howell N (2002) *Am J Hum Genet* **70**:1152-1171
112. Herrnstadt C, Preston G, Andrews R, Chinnery P, Lightowers RN, Turnbull DM, Kubacka I, Howell N (2002) *Mutat Res* **501**:19-28
113. Taghian DG, Hough H, Nickoloff JA (1998) *Genetics* **148**:1257-1268

RNAi — interferencja RNA — skuteczny sposób na ciszę*

RNAi — RNA interference — an efficient way for silence

DANIEL BĄK

Spis treści:

- I. Czym jest interferencja RNA (ang. *RNAi*)?
- II. Mechanizm RNAi
 - II-1. Etap inicjacyjny
 - II-2. Etap efektorowy
- III. Cechy cząsteczek RNA indukujących RNAi
- IV. Lokalizacja komórkowa RNAi
- V. Pokoleniowe przekazywanie i rozpowszechnianie RNAi w organizmie
- VI. Mikro RNA (ang. *miRNA*)
- VII. Próby terapeutycznego wykorzystania RNAi
 - VII-1. Strategie dostarczania terapeutycznego RNA do komórek
- VIII. Znaczenie biologiczne posttranskrypcyjnego wyciszania genów (ang. *PTGS*)
- IX. Uwagi końcowe

Wykaz stosowanych skrótów: dsRNA — dwuniciowe RNA (ang. *double-stranded RNA*); LPS — lipopolisacharyd otoczek bakteryjnych (ang. *Lipopolysaccharide*); miRNA — mikroRNA (ang. *microRNA*); NMD — degradacja cząsteczek mRNA zawierających przedwczesny kodon terminacji translacji (ang. *Nonsense-Mediated Decay*); PKR — kinaza białkowa zależna od dsRNA (ang. *Protein Kinase RNA-dependent*); pre-mRNA — prekursorowy mRNA; PTGS — posttranskrypcyjne wyciszanie genu (ang. *Post-transcriptional Gene Silencing*); RNAi — interferencja RNA (ang. *RNA interference*); RdRP — polimeraza RNA zależna od RNA (ang. *RNA-dependent RNA Polymerase*); RISC — kompleks wyciszający indukowany przez RNA (ang. *RNA-induced Silencing Complex*); rRNA — rybosomalny RNA (ang. *ribosomal RNA*); siRNA — małe interferencyjne RNA (ang. *small interfering RNA*); 3'UTR — 3'-końcowy region transkryptu nie ulegający translacji (ang. *3' Untranslated Region*); VIGS — wyciszanie ekspresji genu indukowane obecnością w komórce wirusowego dsRNA (ang. *Virus-induced Gene Silencing*)

W jednym z ostatnich numerów Postępów Biochemii ukazał się artykuł na temat interferencyjnego RNA [1]. W publikacji znajduje się omówienie pod-

Contents:

- I. What is RNA interference (RNAi)?
- II. Mechanism of RNAi
 - II-1. Initiation step
 - II-2. Effector step
- III. Characteristic of RNAs which induce RNAi
- IV. Cellular location of RNAi pathway
- V. Inheritance of RNAi and its spreading in the organism
- VI. MicroRNA (miRNA)
- VII. Therapeutic testing of RNAi
 - VII-1. A strategy for delivery of therapeutic RNAs to cells
- VIII. Biological significance of posttranscriptional gene silencing (PTGS)
- IX. Concluding remarks

stawowego mechanizmu interferencji RNA (RNAi, ang. *RNA interference*) oraz szereg informacji pozwalających na zrozumienie biologicznego sensu istnienia opisanych mechanizmów. Ponadto Czytelnik odnajdzie tam opracowanie metod stosowanych w badaniach nad RNAi.

Wszystkie powyższe zagadnienia zostaną tutaj w dużej mierze pominięte — jednak w taki sposób, aby nie zaburzyć odbioru artykułu, jako spójnej całości. Wiele wątków z pracy Wy s z k o i wsp. [1] jest kontynuowanych — zostały one rozbudowane.

I. Czym jest interferencja RNA ?

Interferencja RNA jest jednym z epigenetycznych mechanizmów regulacji ekspresji genów [1, 2]. Kluczowym składnikiem tego układu regulacyjnego jest dwuniciowy RNA — dsRNA (ang. *double-stranded RNA*), powodujący degradację homologicznych

Licencjat, Pracownia Genetyki Molekularnej, Zakład Genetyki Medycznej, Instytut Matki i Dziecka w Warszawie, ul. Kasprzaka 7A, 01-211 Warszawa; biolog2@poczta.wp.pl

*Patrz: „Postępy Biochemii” 2003, 49: 2-8, Eliza Wyszko, Witold Szaflarski, Jan Barciszewski — „Interferencyjny RNA — molekularny regulator ekspresji genu”.

cząstek RNA. Ogół procesów komórkowych, prowadzących ostatecznie do wspomnianej degradacji RNA, określa się właśnie jako interferencję RNA [2]. Skrót „RNAi” wydaje się być zarezerwowany dla procesów zachodzących w komórkach zwierzęcych. RNAi jest jednak tylko składową ogółu procesów posttranskrypcyjnego wyciszania ekspresji genów (ang. PTGS, *Post-transcriptional Gene Silencing*), które pierwotnie odkryto u roślin [3-5].

II. Mechanizm działania RNAi

Wydaje się, że podstawowy mechanizm działania RNAi jest silnie konserwowany ewolucyjnie i występuje prawdopodobnie u większości, jeśli nie u wszystkich organizmów eukariotycznych [2, 6]. Procesy składające się na mechanizm RNAi (Ryc. 1) podzielono na dwa etapy: etap inicjacyjny oraz etap efektorowy.

II-1. Etap inicjacyjny

Na etapie inicjacji cząsteczka dsRNA jest cięta na fragmenty o długości 21-23 nukleotydów, zwane małymi interferującymi RNA, czyli siRNA (ang. *small interfering RNA*) [7]. Proces fragmentowania jest przeprowadzany przez enzym typu RNazy III (ang. *RNase III-like*). Enzym ten, u *D. melanogaster* zwany Dicer, jest rybonukleazą specyficzną względem dsRNA [1, 8].

Rybonukleazy o charakterze RNazy III, dla których sugeruje się udział w procesach inicjujących RNAi, można podzielić na trzy grupy. Bakteryjna RNaza III zawiera pojedynczą domenę katalityczną oraz domenę wiążącą dsRNA. Pełni ona funkcje m.in. w procesach enzymatycznej przebudowy rRNA (ang. *rRNA processing*) [9]. Homologi RNazy III charakterystyczne dla roślin i zwierząt podzielić można na dwie rodziny. Pierwsza z nich — nukleazy Drosha, obejmuje enzymy zawierające dwie domeny katalityczne oraz domenę wiążącą dsRNA [10]. Druga rodzina — nukleazy Dicer, różni się od nukleaz typu Drosha występowaniem N-końcowej domeny helikazowej, zależnej od ATP [8]. Udział właśnie tego typu RNaz zasugerowano w mechanizmach opisujących RNAi [8]. Białka należące do rodziny RNaz typu Dicer, zidentyfikowane m.in. u *D. melanogaster*, *A. thaliana*, *C. elegans*, *N. crassa* i ssaków, są silnie konserwowane ewolucyjnie. W każdym przypadku wykazano, że RNaza specyficzna dla danego gatunku rozpoznawała i hydrolizowała dsRNA, zaś produktem reakcji były siRNA o typowej charakterystyce [8, 11, 12].

II-2. Etap efektorowy

W etapie efektorowym siRNA staje się częścią wielobiałkowego kompleksu zwanego RISC (ang. *RNA-induced Silencing Complex*) [13]. W procesie zależnym od ATP siRNA, będący już częścią RISC, ulega rozpleceniu do postaci jednoniciowego kwasu rybonukleinowego [14]. Obecność tych krótkich, jednoniciowych fragmentów RNA aktywuje kompleks RISC. Jednoniciowy RNA tworzy pary typu Watsona-Cricka z komórkowymi transkryptami, które zawierają regiony komplementarne do siRNA [14, 15]. Następnym krokiem jest degradacja komplementarnego transkryptu przez nie zidentyfikowaną do tej pory endorybonukleazę. Endonukleolityczne cięcie odbywa się w regionie transkryptu komplementarnym do siRNA, w odległości ok. 10-12 nukleotydów od końca 3' siRNA [16, 17]. Całkowita hydroliza transkryptu wymaga aktywności egzonukleaz [13]. Sugeruje się, że przynajmniej u *Drosophila*, egzonukleaza jest częścią RISC [12].

Zidentyfikowano jedynie część białek wchodzących w skład kompleksu RISC. Wśród nich znalazły się białka należące do rodziny *Argonaute* [1, 18]. Biorą one m. in. udział w mechanizmach typu RNAi oraz w procesach regulacji rozwoju organizmów. Prawdopodobnie w wielu przypadkach te funkcje się nie wykluczają. Przeciwnie, coraz częściej sugeruje się udział mechanizmów wyciszania ekspresji genów w regulacji rozwoju organizmów roślinnych i zwierzęcych [18].

Białka *Argonaute* mają silnie zasadowy charakter, który mógłby sprzyjać wiązaniu przez nie cząstek RNA. Istotnie, stwierdzono, że przynajmniej niektóre z tych białek wykazują tę zdolność [19, 20].

III. Cechy cząstek RNA indukujących RNAi

Cząsteczki RNA indukujące mechanizmy RNAi charakteryzują się specyficzną strukturą oraz specyficznymi właściwościami chemicznymi. Parrish i wsp. [21] podjęli próbę określenia wspomnianych cech, wykorzystując najlepiej poznany pod względem RNAi organizm modelowy — *C. elegans*. W pierwszej serii doświadczeń wykorzystano dsRNA o różnej długości (62-242 pz) i nie zachodzących na siebie wzajemnie sekwencjach. Sekwencja nukleotydowa segmentów pokrywała 717-nukleotydowy fragment sekwencji kodującej docelowego genu (ang. *targeted gene*). Każdy dsRNA indukował RNAi, choć z różną efektywnością. Nieważne było,

któremu fragmentowi sekwencji docelowego genu odpowiadał segment dsRNA.

W kolejnej serii eksperymentów stosowano dsRNA, których sekwencja odpowiadała, nie zachodzącym na siebie, fragmentom docelowego genu. W sekwencjach tych nie występowały odpowiednio: A, G, U lub C. Tylko w jednym z przypadków (brak G) nie udało się wywołać RNAi. Także w tym eksperymencie wykazano, że skład nukleotydów w sekwencji dsRNA wydaje się nie odgrywać zasadniczej roli.

W badaniach tych potwierdzono również, że tylko dsRNA jest w stanie indukować RNAi. Wykorzystano do tego RNA, którego sekwencja odpowiadała dwóm różnym genom docelowym w układzie *cis*. RNA przygotowywano w ten sposób, że jedynie część segmentu miała charakter dwuniciowy. Po wstrzyknięciu RNA do nicienia stwierdzono RNAi skierowane tylko „przeciwko” genowi, którego sekwencję reprezentowały w RNA dwie nici: sensowna i antysensowna.

Modyfikacje szkieletu fosforanowo-cukrowego oraz zasad azotowych dostarczyły jednak dowodów na nierównocенność nici: sensownej i antysensownej w mechanizmach RNAi. Stwierdzono ponadto, że to prawdopodobnie nie antysensowna oddziałuje bezpośrednio z transkryptem docelowego genu, co „skazywałoby” transkrypt na degradację.

Okazało się ponadto, że zdolność do indukowania RNAi wymaga występowania dsRNA w formie helikalnej. Manipulacje topologiczne (modyfikacje chemiczne zasad azotowych), zaburzające strukturę helisy typu A, redukowały indukujące właściwości dsRNA.

Wydaje się, że powstawanie cząsteczek siRNA o stałej długości 21-23 nukleotydów zapewnia wysoką specyficzność mechanizmów RNAi. W rozważaniach pomija się jednak fakt istnienia rodzin wielogenowych — zespołów genów o wysokim stopniu wzajemnej homologii [22]. Tymczasem postuluje się, że dsRNA reprezentujący sekwencje homologiczne, choć nieidentyczne z docelowym genem, mogłyby być wykorzystane do indukcji mechanizmów RNAi, wyciszających ekspresję tego genu. Warunkiem, jaki musiałby spełniać gen miałaby być obecność segmentów ciągłej sekwencji, prawdopodobnie o długości >30-35 nukleotydów, identycznej z sekwencją dsRNA. Sugeruje to dolną granicę homologii między sekwencjami — ok. 90% [21, 23].

IV. Lokalizacja komórkowa RNAi

Kwestia przedziału komórkowego, w którym miałyby przebiegać RNAi pozostaje nie rozstrzy-

gnięta. Większość dowodów wskazuje, że RNAi jest procesem cytoplazmatycznym. Wykazano m.in. wyciszenie ekspresji genów, których transkrypty akumulują się w oocytach myszy w trakcie oogenezy [24]. Podobnie replikacja wirusów RNA, przebiegająca w cytoplazmie, jest wstrzymywana na drodze zależnej od RNA tak w roślinach, jak i u ssaków [25, 26]. W komórkach człowieka transkrypty obecne na obszarze nukleoplazmy są odporne na proces degradacji indukowany przez siRNA [27]. Ponadto, jedyny znany ludzki homolog Dicer zidentyfikowano na terenie cytoplazmy komórek HeLa [28]. Zarówno u roślin [29], jak i u *D. melanogaster* [30] można wywołać RNAi stosując transgeny zawierające odwrócone sekwencje powtórzone — ich transkrypty tworzą dsRNA w postaci „spinki do włosów” (ang. *hairpin dsRNA*), które po transporcie do cytoplazmy mogłyby być cięte do postaci siRNA. Wykazano, że transgeny tego typu indukują RNAi bardziej efektywnie, jeśli dsRNA zawiera intron oraz sygnały poliadenylacji. Takie dsRNA miałyby łatwiej ulegać eksportowi do cytoplazmy [31].

Okazało się także, że RNAi można wywołać stosując siRNA homologiczne jedynie do intronów [32]. Sugerowałoby to, że pre-mRNA obecne w jądrze komórkowym również mogłyby podlegać mechanizmom RNAi. Dodatkowe wątpliwości wnosi analiza RNAi u *Chlamydomonas reinhardtii*. Występujące u tej zielenicy białko MUT-6 jest helikazą RNA obecną w jądrze komórkowym, wymaganą w mechanizmie PTGS [2, 33]. Wykazano ponadto, że helikaza MUT-6 jest konieczna w procesie degradacji transkryptów transpozonowych nie ulegających poliadenylacji [33]. Przyjmuje się, że brak poliadenylacji powoduje retencję tych transkryptów w jądrze komórkowym [2]. W świetle opisanych faktów pytanie o istnienie jądrowego kompleksu typu RISC, a więc i jądrowych mechanizmów RNAi, pozostaje otwarte.

V. Pokoleniowe przekazywanie i rozprzestrzenianie RNAi w organizmie

Poprzez wprowadzenie dsRNA wykazano, że cecha wyciszenia ekspresji przynajmniej kilku genów może być u *C. elegans* przekazywana potomstwu [34-36]. Zjawisko takie opisano także w rodzaju *Triebolium* (Coleoptera) [37].

U nicienia *C. elegans* zaobserwowano wyciszenie konkretnych genów w przypadku osobników pokolenia F₁, będących potomstwem hermafrodytycznego osobnika rodzicielskiego, któremu wcześniej wstrzyknięto odpowiedni dsRNA [34-36]. W więk-

szości przypadków przywrócenie ekspresji docelowego genu obserwowano już w pokoleniu F₂ [34, 36]. Jedynie w eksperymentach, w których RNAi dotyczyło genów ulegających ekspresji w linii żeńskich komórek płciowych, RNAi obserwowano w pokoleniu F₂, a w mniejszym stopniu również u osobników w kolejnych pokoleniach [38]. Wykonanie krzyżówek genetycznych pozwoliło stwierdzić, że przekazanie opisywanej cechy potomstwu wiąże się z obecnością w oocytach, bądź plemnikach czynnika o dominującym charakterze [38].

Wiadomo, że dziedziczenie niektórych efektów epigenetycznych wiąże się z odwracalnymi zmianami w obrębie danego genu, lub struktury chromatyny w regionie sekwencji tego genu. Hipotezę tę sprawdzono u *C. elegans*. Wyhodowano szczep nicienia, którego samce, należące do pokolenia F₁, miały delecję jednego z dwóch alleli genu, względem którego można było u nich indukować RNAi. Plemniki samców, nie zawierające dzikiego allela docelowego genu, były zdolne do przekazania pokoleniu F₂ cechy wyciszenia ekspresji danego genu przez odpowiednie dsRNA. Tak więc przekazanie tej cechy pokoleniu F₂ okazało się nie być związane z docelowym *locus* [38].

U *C. elegans* zidentyfikowano dwie grupy genów koniecznych dla zaistnienia RNAi [35]. Mutanty w genach należących do pierwszej grupy: *rde-1* i *rde-4* (*rde*, ang. *RNAi-deficient*), wykazują defekt mechanizmów RNAi. Poza tym ich fenotyp wydaje się nie zmieniony. Mutanty w genach drugiej grupy: *rde-2*, *rde-3*, *mut-2*, *mut-7* (*mut*, ang. *mutator*), wykazują defekt mechanizmów RNAi, a ponadto charakteryzują się aktywacją transpozonów na zwiększonym poziomie, obniżoną płodnością oraz wysoką częstością utraty chromosomu X w czasie mejozy, skutkującą zwiększonym odsetkiem samców. W badaniach nad genetycznymi uwarunkowaniami procesu przekazywania efektu wyciszenia docelowych genów G r i s h o k i wsp. [38] analizowali funkcję czterech ze wspomnianych wcześniej genów: *rde-1*, *rde-4*, *rde-2* i *mut-7*. Wykazano, że przekazanie osobnikom pokolenia F₁ i F₂ cechy wyciszenia ekspresji docelowego genu wymaga ekspresji genu *rde-1*, ale tylko u osobników rodzicielskich. Ekspresja genów *rde-2* i *mut-7* była natomiast konieczna tak w organizmach rodzicielskich, jak i u osobników w pokoleniach F₁ i F₂. Wykazano ponadto, że efekty zależne od ekspresji genu *rde-1*, bezwzględnie wymagają ekspresji genu *rde-4*. Przypuszcza się, że produkty genów *rde-1* i *rde-4* biorą udział w tworzeniu pozagenowego czynnika, który warunkowałby przekazywanie „cechy RNAi” z pokolenia na pokolenie.

Proponowane rozwiązanie zakłada funkcje efektorowe dla produktów genów *rde-2* i *mut-7*.

Dziedziczenie efektu wyciszenia ekspresji konkretnych genów oraz uogólniony charakter tego wyciszenia w całym ciele *C. elegans*, wskazuje na konieczność istnienia mechanizmów powielania i rozprzestrzeniania „sygnału” wyciszającego ekspresję. Mechanizmy posttranskrypcyjnego wyciszania genów zależne od dsRNA, obserwowane u roślin oraz u *C. elegans*, wymagają obecności białka o charakterze polimerazy RNA zależnej od RNA-RdRP (ang. *RNA-directed RNA polymerase*). Proponowany model rozprzestrzeniania RNAi zakłada, że siRNA miałyby służyć jako starter syntezy wtórnych cząsteczek dsRNA na matrycy transkryptów docelowego genu [39, 40]. Powstające cząsteczki dsRNA miałyby być cięte przez nukleazę Dicer, a produktem hydrolizy byłyby nowe cząsteczki siRNA, aktywujące kompleks RISC [39, 40]. Zgodnie z powyższymi założeniami udało się uzyskać wyciszenie konkretnych genów, wstrzykując *C. elegans* krótkie antysensowne oligomery RNA [41]. Ponieważ białka RDE-1 i RDE-4 wymagane są jedynie w procesie inicjacji RNAi i tylko u nicieni pokolenia rodzicielskiego, to wyjaśnienia wymaga kwestia dostarczania wtórnych cząsteczek dsRNA do nukleazy Dicer. Możliwe jest, że RdRP tworzy kompleks z Dicer. W ten sposób nowo powstające dsRNA byłyby od razu dostępne dla Dicer, bez konieczności angażowania białek RDE-1 i RDE-4 [2].

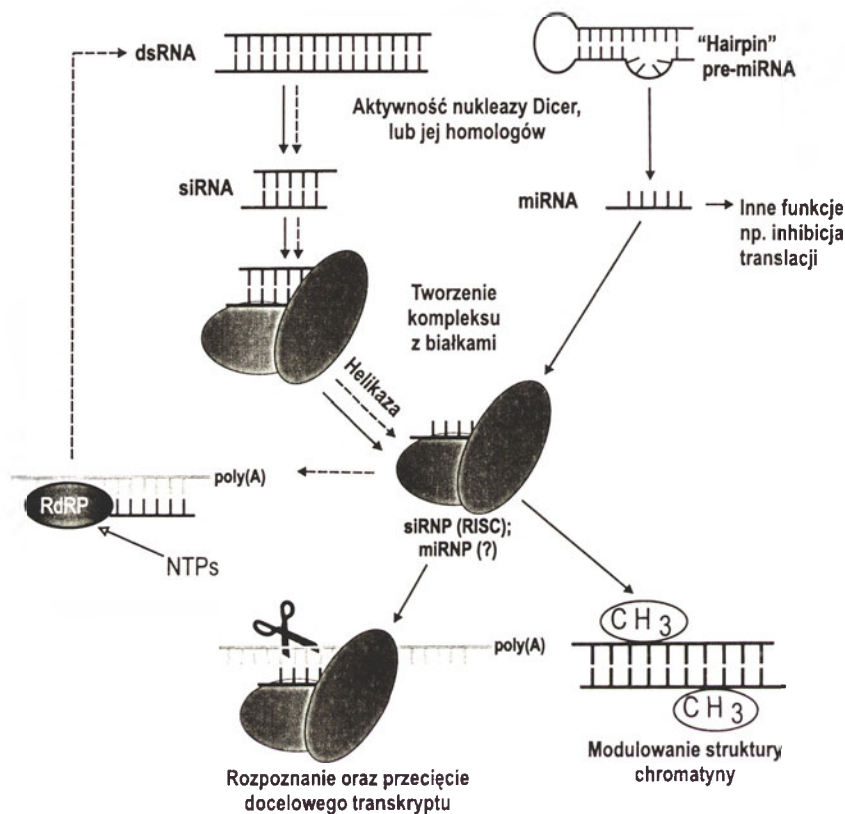
RNAi u *C. elegans* cechuje systemowy, uogólniony — w kontekście całego organizmu — charakter tego zjawiska. Wstrzyknięcie dsRNA do danej tkanki nicienia skutkuje wyciszeniem ekspresji konkretnego genu także w innych tkankach [34]. Systemowy charakter RNAi z pewnością wymaga powielania bliżej nie sprecyzowanego sygnału, wywołującego ogólnoustrojowy efekt RNAi (jedynie komórki nerwowe nie wykazują, lub wykazują na obniżonym poziomie, zjawiska RNAi [42]*. Poszukiwano więc *loci*, odpowiedzialnych za defekt systemowego RNAi, ale bez wpływu na inicjację i utrzymywanie typowego, ograniczonego do konkretnej tkanki, RNAi. W i n s t o n i wsp. [45] zidentyfikowali *loci sid* (ang. *systemic RNA interference-deficient*). Użyte mutanty podzielono na 3 grupy komplementacyjne — *sid-1*, *-2*, *-3*. Znana jest w tej chwili wstępna charakterystyka *locus sid-1*. Produktem genu *sid-1*

*Istnieją jednak doniesienia o efektywnym uzyskiwaniu RNAi w komórkach układu nerwowego *C. elegans*: [43, 44]

jest białko SID-1 zawierające prawdopodobnie 11 domen transbłonowych i lokalizowane w peryferycznych obszarach komórki. Jego funkcja pozostaje nieznana. Możliwe, że stanowi ono kanał błonowy dla dsRNA, siRNA, lub innej, nie zidentyfikowanej cząsteczki sygnałowej [45]. Nie wykluczone, że białko to jest receptorem błonowym dla nie poznanego jeszcze czynnika sygnałowego, decydującego o rozprzestrzenieniu się RNAi w organizmie *C. elegans* [45].

VI. MikroRNA

Wspominana wcześniej nukleaza Dicer jest w stanie wytwarzać, różną od siRNA, klasę cząsteczek RNA. Są to miRNA (ang. *microRNA*) — krótkie cząsteczki RNA o długości 21-23 nukleotydów [48, 49]. W odróżnieniu jednak od siRNA są to cząsteczki jednoniciowe [50]. miRNA występują powszechnie u roślin, bezkręgowców i kręgowców. Jednymi z odkrytych jako pierwsze były *lin-4* i *let-7*, określone



Ryc. 1. Wynikiem aktywności nukleazy Dicer są siRNA i miRNA. Aby pełnić swe funkcje siRNA musi utworzyć kompleks z białkami (siRNP); miRNA może natomiast wpływać na ekspresję genów bezpośrednio, lub prawdopodobnie tak jak siRNA — także po utworzeniu kompleksu z białkami (miRNP). Linia przerywaną (---) zaznaczono, mogący dodatkowo istnieć w komórce, szlak amplifikacji cząsteczek dsRNA, będących substratem nukleazy Dicer — na matrycy komórkowych docelowych transkryptów polimeraza RNA zależna od RNA syntetyzuje nowe cząsteczki dsRNA (polimeraza ta występuje u *A. thaliana* oraz *C. elegans*, ale nie *D. melanogaster* i człowieka). Dicer — nukleaza wytwarzająca siRNA z dłuższych cząsteczek dsRNA oraz miRNA z prekursorowych pre-miRNA; dsRNA — dwuniciowe RNA, miRNA — mikroRNA; RdRP — polimeraza RNA zależna od RNA; RISC — kompleks wyciszający indukowany przez RNA — jest prawdopodobne, że w jego skład może wchodzić nie tylko siRNA, ale także miRNA; siRNP/miRNP to kompleksy rybonukleoproteinowe, których komponent rybonukleinowy stanowią odpowiednio: siRNA (właśnie ten kompleks określono pierwotnie jako RISC) lub miRNA; oznaczenie CH₃ symbolizuje metylację — jedną z modyfikacji DNA, wpływającą na aktywność transkrypcyjną chromatyny; zacięnięte elipsy symbolizują białkowy komponent kompleksów RNP.

Proteomy — mysz i ludzki, zawierają białka bardzo podobne w sekwencji aminokwasowej do SID-1, co mogłoby sugerować, że RNAi u tych ssaków ma również systemowy charakter [45].

Także procesy posttranskrypcyjnego wyciszania ekspresji genów opisane u roślin, mogą rozprzestrzeniać się w obrębie organizmu. Również w tym przypadku zaobserwowano przekazywanie wspomnianej cechy potomstwu [46, 47].

wtedy jako stRNA (ang. *small temporal RNA*) [51, 52]. Są to RNA stwierdzone u *C. elegans*, biorące udział w regulacji mechanizmów rozwoju nicienia. Cząsteczki te wiążą się w obrębie regionów 3'UTR docelowych transkryptów, przy czym wiązana sekwencja nie jest w pełni komplementarna do sekwencji miRNA. Skutkiem opisanego oddziaływania jest zablokowanie translacji docelowych transkryptów. Funkcja innych znanych miRNA pozostaje nie wyja-

śniona. Coraz więcej wskazuje jednak na wzajemną zależność pomiędzy miRNA, a mechanizmami RNAi [53-55].

Wciąż niewiele wiadomo na temat biogenezy miRNA. W komórkach ssaków dojrzewanie miRNA przebiega w co najmniej dwóch etapach. Początkowo powstają długie transkrypty (pri-miRNA), których cięcie prowadzi do prekursorów o długości ok. 70 nukleotydów (pre-miRNA). Do tego momentu RNA pozostaje na terenie nukleoplazmy. Prekursory są następnie eksportowane do cytoplazmy, gdzie nukleaza Dicer przecina je, produkując cząsteczki długości 21-23 nukleotydów. Wspólną cechą miRNA jest to, że analiza struktury drugorzędowej pre-miRNA *in silico*, pozwala zazwyczaj przewidywać formy przestrzenne typu „trzonka z główką” (ang. *stem-loop*). Komplementarność zasad azotowych w ich obrębie jest często zaburzona. Wydaje się, że większość pre-miRNA jest kodowanych w regionach międzygenowych genomu, wykorzystując do swej ekspresji autonomiczne promotory. Znaną są jednak policistronowe transkrypty, stanowiące prekursory dla pre-miRNA [50].

Pierwotnie przyjmowano, że funkcje siRNA i miRNA nie zachodzą na siebie. siRNA przypisano rolę w mechanizmach RNAi — specyficznej degradacji homologicznych transkryptów, zaś miRNA miało hamować translację, nie wpływając jednak na stabilność transkryptów. Niedawne doniesienia ostatecznie burzą tak ścisły rozdział funkcji między te klasy cząsteczek RNA. W ludzkich komórkach HeLa zidentyfikowano nowy kompleks rybonukleoproteinowy — miRNP, w skład którego wchodzi co najmniej 40 różnych miRNA, a ponadto białka: Gemini-3, -4 oraz białko *Argonaute* eIF2C2 [55]. Temu odkryciu towarzyszyło kolejne. Okazało się, że funkcja, jaką spełniać będzie dany miRNA, zależy w dużej mierze od stopnia jego komplementarności z docelowym transkryptem [53]. Na podstawie sekwencji RNA *let-7* przygotowano *let-7*-siRNA. Cząsteczka taka indukowała RNAi w lizatach komórek zarodkowych *Drosophila*. Podobną, specyficzną reakcję wywołało podanie prekursora pre-*let-7* RNA, przekształcanego przez nukleazę Dicer do postaci jednokwasu rybonukleinowego. Tak więc dostępność *in vitro* ściśle komplementarnego substratu umożliwia miRNA udział w mechanizmach RNAi. Stwierdzono ponadto, że dodanie do lizatu komórek HeLa transkryptu zawierającego sekwencje homologiczne z *let-7*, indukowało specyficzną odpowiedź RNAi. Sugerowałoby to istnienie w cytoplazmie komórek HeLa enzymu typu RISC, w skład którego wchodziłby ludzki homolog *let-7*-miRNA. Homolog

taki (miR-98, paralog *let-7*, różniący się od *let-7* w dwóch pozycjach nukleotydowych [55]) stwierdzono w opisywanym wcześniej kompleksie miRNP [55]. Zaangażowanie kompleksu rybonukleoproteinowego w opisywaną degradację transkryptów *let-7* potwierdzono w testach aktywności anty-*let-7* koimmunoprecypitowanych składników białkowych kompleksu. Zaproponowano, że kompleks miRNP mógłby być ludzkim odpowiednikiem RISC. Ze względu na udział w ludzkim RISC składników miRNA (co nie wyklucza obecności siRNA), wyciszanie ekspresji genów mogłoby odbywać się na dwa sposoby. Z jednej strony miRNA mogą zachowywać się jak siRNA — kiedy dostępny jest w pełni komplementarny transkrypt. Z drugiej strony miRNA mogłoby hamować translację, wiążąc docelowe transkrypty w procesie o mniejszych wymaganiach względem komplementarności oddziałujących cząsteczek.

Występowanie miRNA stwierdzono także u roślin. Są to, podobnie jak u zwierząt, cząsteczki o długości ok. 20-24 rybonukleotydów, powstające z prekursorów przyjmujących strukturę *stem-loop*. Sugeruje się jednak, że prekursory roślinnych miRNA, jeśli istnieją, są prawdopodobnie ok. 3 razy dłuższe, niż ich odpowiedniki u zwierząt. Ponadto, utrata aktywności nukleazy Dicer u zwierząt związana jest z akumulacją cząsteczek prekursorowych. Takiej sytuacji nie zaobserwowano w komórkach *Arabidopsis*, pozbawionych funkcji genu *caf* (ang. *carpel factory*), którego produktem jest homolog nukleazy Dicer. Jedynym zidentyfikowanym efektem braku białka CAF był spadek ilości dojrzałych cząsteczek miRNA. Możliwe, że prekursory miRNA u roślin ulegają bardziej gwałtownym przekształceniom posttranskrypcyjnym, niż pre-miRNA u zwierząt. Z drugiej strony nie wyklucza się kotranskrypcyjnego przekształcania prekursorowych transkryptów [56].

Analiza obecności miRNA u *C. elegans*, *D. melanogaster* i *Homo sapiens* pozwoliła zidentyfikować łącznie ponad 135 różnych miRNA. Jednak żadne ze zidentyfikowanych miRNA nie jest w pełni komplementarne z występującymi w tych organizmach cząsteczkami mRNA [53]. Natomiast u *A. thaliana* i ryżu zidentyfikowano miRNA w pełni, lub prawie całkowicie komplementarne do potencjalnych, docelowych mRNA [56]. Przykładem może być miR171 u *A. thaliana*, oddziałujące z transkryptami genów kodujących prawdopodobne czynniki transkrypcyjne należące do rodziny SCL (ang. *Scarecrow-like*) [54]. Takie oddziaływanie skutkuje przecinaniem docelowych transkryptów w obrębie regionu wzajemnej komplementarności cząsteczek. Sugeruje-

wałoby to, że ta klasa miRNA mogłaby funkcjonować jak siRNA u zwierząt i brać udział w mechanizmach PTGS u roślin.

Tak u roślin, jak i zwierząt funkcje zależne od siRNA i miRNA zdają się silnie na siebie zachodzić, bez względu na istniejące różnice w biogenezie obu klas RNA.

VII. Próby terapeutycznego wykorzystanie RNAi

Terapia na poziomie komórki, polegająca na zahamowaniu aktywności biologicznej danej cząsteczki, dotyczyć może etapu transkrypcji docelowego genu, etapu posttranskrypcyjnego lub posttranslacyjnego. Celem tradycyjnej terapii są białka — zwykle enzymy, bądź receptory. Powszechnie stosowane leki to zazwyczaj substancje o małej masie cząsteczkowej. Przełomem stały się próby z wykorzystaniem kwasów nukleinowych — terapia antysensownymi kwasami nukleinowymi [57] oraz technologia tripleksów [58]. Największym ograniczeniem obu metod stał się brak skutecznego sposobu dostarczania terapeutycznych cząsteczek do miejsc ich oddziaływania w organizmie.

Z RNAi wiąże się duże nadzieje, ponieważ terapia oparta na tym zjawisku wykorzystywałaby naturalny proces komórkowy. Wiadomo ponadto, że jest to mechanizm bardzo specyficzny, który u roślin i niektórych zwierząt, może przyjmować systemowy charakter [45, 46]. Taki uogólniony charakter należałoby w tym momencie rozumieć jako przełamanie bariery, której nie pokonały terapie oparte na antysensach i tripleksach. W naturalny sposób rozwiązywałyby się problem dostarczania terapeutycznego kwasu nukleinowego do różnych tkanek organizmu jednocześnie. Należy jednak zauważyć, że istnieje bardzo mało dowodów na uogólniony charakter RNAi u ssaków, a wydaje się, że właśnie od tego, czy RNAi w organizmie człowieka przyjmuje systemowy charakter oraz od trwałości uzyskiwanego efektu, zależeć będzie powodzenie prób terapii chorób człowieka. Ponadto należy zwrócić uwagę, że obecność stosowanego w terapii RNA w wielu tkankach jednocześnie, będąca rezultatem systemowego RNAi, mogłaby prowadzić do wyciszania genu w tkance, gdzie jest to niepożądane. Nie znamy w tej chwili skutecznego rozwiązania tego problemu.

Projektując nowe strategie terapii z wykorzystaniem RNAi należy pamiętać o tym, że ssące komórki nie są obojętne względem procesu wprowadzenia do nich dsRNA. Wykazano, że konsekwencją obecności dsRNA w komórce jest aktywacja kinazy

białkowej zależnej od dsRNA (PKR; ang. *Protein Kinase dsRNA-dependent*). PKR jest kinazą biorącą udział w szlakach transdukcji sygnału, indukowanych nie tylko przez dsRNA, ale także bakteryjny LPS i wiele cytokin. Związanie dsRNA z kinazą PKR aktywuje ją i prowadzi do fosforylacji małej podjednostki eukariotycznego czynnika inicjacji translacji eIF-2 α . Konsekwencją jest zablokowanie translacji. Poza tym PKR kontroluje aktywność takich czynników regulatorowych, jak: NF- κ B, TP53 oraz STAT [59].

Ponadto, obecność dsRNA w komórkach może zdecydować o ich śmierci. PKR pośredniczy bowiem w procesach apoptotycznych. Wśród genów, których ekspresję na zwiększonym poziomie obserwuje się w odpowiedzi na aktywność PKR są m. in. *FAS*, *BAX* i *TP53*. Wykazano, że dsRNA stymuluje także aktywność syntetazy (2'-5') oligo (A) — enzymu produkującego kwas 2'-5' poliadenylowy. Kwas 2'-5' poliadenylowy jest aktywatorem RNazy L. Ta endoribonukleaza bierze prawdopodobnie udział w regulacji metabolizmu mRNA na terenie komórki. Postuluje się jej udział w procesach odpowiedzi na infekcję wirusową, ale także w mechanizmach apoptozy [59, 60].

Nie zawsze więc dostarczanie dsRNA do komórek musiałoby dawać efekt leczniczy. Zauważono jednak, że opisywane ograniczenia dotyczą być może tylko dużych cząsteczek dsRNA [61]. Tak więc terapia mogłaby polegać na stosowaniu dsRNA o odpowiednio mniejszej masie cząsteczkowej, lub specjalnie w tym celu projektowanych wektorów DNA [62].

VII-1. Strategie dostarczania terapeutycznych cząsteczek RNA do komórek

Strategie dostarczania terapeutycznych cząsteczek RNA do komórek można podzielić na dwie grupy. RNA może być dostarczany „z zewnątrz” — zazwyczaj jest wstrzykiwany (pod uwagę bierze się właściwie tylko siRNA). Alternatywną metodą jest wprowadzanie do komórek wektorów plazmidowych, pozwalających na ekspresję terapeutycznych cząsteczek RNA. RNAi indukowane przez egzogeny RNA jest zwykle krótkotrwałe. Względnie trwały efekt uzyskuje się z wykorzystaniem wektorów.

O metodach wykorzystywanych w celu uzyskania wewnątrzkomórkowej ekspresji siRNA pisano już w *Postęпах Biochemii* [1]. Strategie te zaowocowały efektywnym i bardzo specyficznym RNAi w komórkach ssących (siRNA zawierający pojedyncze punktowe mutacje nie wywoływał RNAi) [62]. Odkrycia te stały się powodem dyskusji na temat terapii

genowej z wykorzystaniem RNAi. Można by wyobrazić sobie siRNA skierowane tylko „przeciwko” zmutowanemu allelowi konkretnego genu. Jeśli osobnik byłby heterozygotą względem danego genu, RNAi powodowałoby zachowanie funkcji tylko prawidłowego allele. Jest to wizja terapii chorób dziedziczących się w sposób autosomalny dominujący. Terapia taka pozostaje na razie w sferze teoretycznych rozważań.

Cały czas podejmowane są próby wprowadzania długich cząsteczek dsRNA do komórek ssaczych. Związane jest to z możliwością powstawania wielu różnych siRNA z jednej długiej cząsteczki dsRNA. Nukleaza Dicer wytwarzałaby zestaw siRNA skierowanych „przeciwko” różnym sekwencjom w obrębie tego samego docelowego transkryptu. Można także wyobrazić sobie projektowanie złożonych dsRNA, zawierających segmenty sekwencji komplementarnych do kilku transkryptów. Byłby to sposób na jednoczesne „uderzenie” w więcej, niż jeden gen jednocześnie. Stosowanie dsRNA i powstawanie całego zestawu siRNA mogłoby mieć jeszcze jedną korzyść. Zabezpieczałoby ono przed rozwinięciem się „oporności na terapię RNAi”. Oporność taka mogłaby pojawiać się w wyniku np. mutacji punktowych w docelowym genie, zwłaszcza w obrębie jego sekwencji kodującej. Efekt ochronny wynikałby z faktu wytwarzania przez Dicer wielu różnych siRNA, wśród których znalazłby się prawdopodobnie siRNA komplementarny do sekwencji docelowego transkryptu poza miejscem występowania mutacji [22].

Z punktu widzenia terapii chorób człowieka najistotniejsze wydają się opublikowane w ostatnim czasie prace dotyczące efektów ekspresji ok. 500 nukleotydowych dsRNA w komórkach myszy. W swoich badaniach P a d d i s o n i wsp. [63] wykorzystali różne linie komórkowe: zarodkowe komórki nowotworowe (ang. *embryonic carcinoma cells*), pierwotne komórki zarodkowe oraz mioblasty. W przypadku komórek nowotworowych oraz pierwotnych komórek zarodkowych obecność dsRNA stymulowała specyficzną redukcję ekspresji docelowych genów. Mogłoby to sugerować istnienie mechanizmów RNAi w komórkach pochodzenia zarodkowego u myszy. Byłoby to szczególnie cenne z punktu widzenia zabiegów transgenezy zwierząt. Zyskano by w ten sposób metodę wyciszania konkretnych genów „w kontekście” całego, wielokomórkowego organizmu. Okazało się, że transfekcja mysich mioblastów z wykorzystaniem dsRNA wywołała dwa różne efekty: specyficzne wyciszenie ekspresji docelowego genu oraz odpowiedź zależną od kinazy PKR. W opisywanych badaniach wskazano jednak sposób, przy-

najmniej częściowego, ominięcia indukcji mechanizmów zależnych od PKR. Wcześniej wspomniano, że efekty aktywności PKR to część mechanizmów obronnych komórek ssaczych, uruchamianych w czasie infekcji wirusowej. Badacze postanowili wykorzystać naturalne cechy wirusów, chroniące je przed efektami aktywności PKR. Okazało się, że ekspresja białka K3L wirusa krowianki znosiła częściowo odpowiedź zależną od PKR. K3L jest cząsteczką naśladującą komórkowy substrat PKR — eukariotyczny czynnik inicjacji translacji eIF-2 α . K3L wiąże się z PKR, inhibując aktywność kinazy [64]. Zastosowanie wirusowych inhibitorów mogłoby być sposobem badania mechanizmów RNAi, indukowanych przez dsRNA, w komórkach ssaczych.

We wspomnianych badaniach udało się uzyskać stabilne wyciszenie ekspresjiżądanego genu. Opisywane do tej pory doświadczenia dotyczyły właściwie tylko wyciszania utrzymującego się przez krótki czas. Zastosowanie RNAi w terapii chorób człowieka wymagałoby natomiast w większości przypadków stabilnego, trwałego wyciszenia ekspresji zmutowanego allele docelowego genu. Stabilne RNAi obserwowano w mysich, nowotworowych komórkach zarodkowych, po transfekcji specyficznym wektorem. Wektor ten umożliwiał ekspresję ok. 500 nukleotydowych dsRNA o strukturze „spinki do włosów”; co ważniejsze — ulegał on integracji z genomem mysiej komórki. Uzyskane wyniki dają nadzieję na wychodowanie szeregu linii komórkowych, cechujących się brakiem funkcji wybranych genów. Pozwoliłoby to na analizę biochemiczną oraz obserwację fenotypu takich komórek w długich przedziałach czasowych. Ponieważ stabilne RNAi zaobserwowano w komórkach zarodkowych, to jest prawdopodobne, że w przyszłości uda się uzyskać zwierzęta pozbawione zupełnie funkcji konkretnego genu (ów). Jeśli to okazałoby się prawdą, powstałoby prawdopodobnie nowe możliwości tworzenia zwierzęcych modeli chorób człowieka.

VIII. Znaczenie biologiczne PTGS

Posttranskrypcyjne wyciszanie ekspresji genów, w tym RNAi, jest zjawiskiem silnie konserwowanym w procesie ewolucji. Sugeruje to jego udział w procesach warunkujących prawidłowe funkcjonowanie każdej eukariotycznej komórki. Inaktywacja szlaków PTGS/RNAi wpływa na co najmniej trzy różne mechanizmy komórkowe: (1) obronę przed infekcją wirusową, (2) rearanżacje genomu związane z ruchliwością transpozonów, (3) regulację rozwoju or-

ganizmów wielokomórkowych. Ponadto, sugeruje się związek RNAi z procesami określanymi jako NMD (ang. *Nonsense-Mediated Decay*) — degradacją transkryptów komórkowych, które zawierają przedwczesny kodon terminacji translacji [65].

Funkcje antywirusowe najlepiej poznano u roślin. Przykładem może być oporność na infekcję wirusową, występująca w roślinie zawierającej transgen pochodzenia wirusowego. Od chwili ustanowienia mechanizmów wyciszających ekspresję transgenu, wszystkie RNA zawierające sekwencje homologiczne do sekwencji transgenu (przede wszystkim RNA wirusowe) są degradowane [66]. Oczywiście mechanizmy wyciszające ekspresję genów zostają uruchomione także w przypadku bezpośredniej infekcji wirusowej. Wyciszenie to (VIGS, ang. *Virus-induced Gene Silencing*) może dotyczyć genów wirusowych oraz transgenów, lub genów komórkowych, jeśli zawierają one sekwencje spokrewnione z sekwencjami genów wirusa [67]. Ponadto, rośliny usprawniły swój system obronny wykształcając zdolność dostarczania sygnału wyciszającego ekspresję do wielu tkanek organizmu [46]. O znaczeniu, jakie mają opisane mechanizmy obronne, świadczy fakt produkowania przez niektóre wirusy białek, które zaburzają funkcjonowanie tych procesów. Przykładami mogą być białka: HC-Pro (ang. *Helper Component-Proteinase*) potywirusa oraz p25 wirusa PVX (ang. *Potato Virus X*). Rolą pierwszego z nich jest przede wszystkim zablokowanie mechanizmów wyciszających ekspresję [68]. Rolą drugiego — uniemożliwienie rozprzestrzenienia się efektu wyciszenia na wiele tkanek rośliny [69].

Trudno wnioskować na temat antywirusowych funkcji RNAi u ssaków. Specyficzną degradację RNA po wstrzyknięciu dsRNA obserwuje się w mysich zarodkach [70]. Natomiast ten sam zabieg powtórzony na komórkach dorosłych zwierząt powoduje zwykle aktywację odpowiedzi zależnej od PKR i RNazy L, mogącą prowadzić do śmierci komórki.

Analiza mutantów *C. elegans* w genach *mut-2*, *mut-7*, *rde-2*, *rde-3* sugerowała, że RNAi mogłoby być sposobem na „trzymanie w ryzach” ruchomych elementów genomu, jakimi są transpozony [35]. Wspomniane mutanty charakteryzowały się podwyższoną aktywnością transpozonów. Transpozony mogą być źródłem dsRNA. Posiadają one często sekwencje o charakterze odwróconych powtórzeń, co pozwalałoby transkryptom transpozonomowym przyjmować dwuniciową strukturę. dsRNA mogłoby też powstać ze złożenia dwóch transkryptów różnych genów, w które wbudował się transpozon. Jedynym warunkiem byłaby ekspresja tych genów z różnych

nici DNA. RNAi jest szczególnie efektywne w linii komórek płciowych nicienia. Możliwe, że dzięki temu rearanżacje genomu wprowadzone przez transpozony są z mniejszą częstością dziedziczone przez potomstwo [71]. Transpozony mogą zostać wyciszone, gdy stają się częścią heterochromatyny. Dlatego sugeruje się, że RNAi mogłoby pozytywnie wpływać na stabilność genomu poprzez taką właśnie inaktywację transpozonów. Jedną z korzyści byłoby ograniczenie częstości rekombinacji w obrębie sekwencji transpozonomowych, co zmniejszałoby prawdopodobieństwo wystąpienia rearanżacji w obrębie chromosomów [72]. Nie jest jednak jasne, w jaki sposób RNAi miałyby regulować transpozycję. Możliwe jest oddziaływanie na poziomie genomu, lub na etapie posttranskrypcyjnym np. poprzez degradację transkryptów genów kodujących transpozazy [12].

Pierwotnie zakładano, że procesy PTGS/RNAi powstały, aby chronić eukariotyczny genom przed „inwazją” obcego kwasu nukleinowego. Dziś wiadomo jednak, że mają one także swój udział w regulacji ekspresji genów, których produkty biorą udział w normalnym funkcjonowaniu komórek. U samców *Drosophila* mechanizm RNAi służy degradacji transkryptów *Stellate*. Degradacja ta jest niezbędnym warunkiem powstania funkcjonalnych spermatocytów i spermatyd [73]. Wspominano już wcześniej o miRNA, które biorą prawdopodobnie udział w regulacji ekspresji czynników transkrypcyjnych SCL u *Arabidopsis* [54]. Ponadto miRNA to przypuszczalnie ważne regulatory procesów wzrostu i rozwoju organizmów roślinnych [56, 74].

Opisując inaktywację transpozonów wspomniano, że regulacja, w której udział biorą mechanizmy RNAi, może dotyczyć poziomu organizacji chromatyny. Składniki molekularnej maszynierii RNAi okazały się konieczne dla zainicjowania procesu powstawania heterochromatyny w regionie *mat* (ang. *mating-type*) drożdży *Schizosaccharomyces pombe* [75]. Jest to zgodne z faktem wcześniejszego sklonowania krótkich heterochromatynowych siRNA [76]. Sekwencje do nich homologiczne zidentyfikowano w regionie *mat* *S. pombe* [75]. Możliwe, że zamiast wskazywać mRNA mające ulec degradacji, heterochromatynowe siRNA biorą udział w procesie modyfikacji histonów. Enzymy modyfikujące mogłyby być kierowane w obszar DNA komplementarny do sekwencji siRNA [76]. O udziale mechanizmów RNAi w modelowaniu struktury chromatyny może też świadczyć derepresja transgenów, wyciszonych na poziomie transkrypcji przez białka PcG (ang. *Polycomb Group*), w mutantach *mut-2* i *rde-2* *C. elegans* [35]. Białka PcG biorą udział w tworzeniu sta-

bilnych wzorów ekspresji genów, poprzez „przełączanie” chromatyny między stanem transkrypcyjnej aktywności i nieaktywności. Działają prawdopodobnie poprzez metylację histonów. Sugeruje się, że podstawową biologiczną funkcją RNAi mogłaby być przebudowa struktury chromatyny, zapewniająca stabilność genomu [12].

NMD [77] i RNAi to dwa różne procesy, mające na celu degradację komórkowych transkryptów o specyficznych właściwościach. W badaniach nad *C. elegans* wykazano, że może istnieć związek między tymi dwoma mechanizmami. U mutantów w genach *smg* (ang. *suppressor with morphological effect on genitalia*), których produkty białkowe są kluczowe w mechanizmie NMD, indukowano RNAi poprzez wstrzykiwanie *unc-54* (ang. *uncoordinated*) dsRNA. Osobniki u których rozwija się RNAi cechują się paraliżem mięśni ściany ciała, a stąd brakiem zdolności ruchu. U trzech z sześciu mutantów *smg* zaobserwowano początkowo RNAi, po czym stopniowy powrót do dzikiego fenotypu. Powrót do dzikiego fenotypu był równoznaczny z obecnością transkryptu *unc-54* na prawidłowym poziomie. Sugeruje się, że pierwsze etapy RNAi, ale nie sama degradacja docelowych transkryptów, mogłyby zależeć od białek SMG. Białka SMG miałyby brać udział w powielaniu cząsteczek dsRNA. Mogłoby się to odbywać poprzez indukowanie endonukleolitycznego cięcia już istniejącego dsRNA, lub dostarczanie jednoniciowych matryc dla polimerazy RdRP (sugeruje się obecność domeny helikazowej w niektórych białkach SMG) [65].

IX. Uwagi końcowe

Procesy posttranskrypcyjnego wyciszania ekspresji genów zależnego od RNA, wydają się być u większości *Eukaryota* bardzo podobne na poziomie molekularnym. Jednak w oparciu o podstawowy mechanizm powstał cały szereg pętli regulacyjnych, kontrolujących procesy rozwoju organizmu, stabilność genomu oraz warunkujących oporność roślin na infekcję wirusową. Cały czas identyfikowane są kolejne klasy małych cząsteczek RNA. Przypisuje się im specyficzne funkcje w nowo odkrywanych procesach. Jednak przykład siRNA oraz miRNA pokazuje, że cząsteczki te mogą w niektórych sytuacjach zamiennie sprawować swe funkcje. Tego typu obserwacje są podstawą pytań o zasadność klasyfikacji małych RNA na poszczególne klasy. Z powodu swej specyficzności względem docelowych transkryptów mechanizm RNAi staje się podstawą nowo podejmowanych prób terapii chorób człowieka. Ponadto nale-

ży się spodziewać, że w chwili, kiedy dostępne będą rutynowe techniki pozwalające na trwałą i bezpieczną dla komórki/organizmu ekspresję dsRNA, zyskamy prostszy sposób tworzenia “knockout’ów” genetycznych. Uprości to analizę funkcjonalną interesujących nas genów, w tym zaangażowanych w powstawanie chorób człowieka. Tempo, z jakim identyfikuje się nowe małe RNA pozwala przypuszczać, że większość związanych z nimi odkryć jest wciąż przed nami.

Podziękowania

Serdecznie dziękuję Panom: Profesorowi Jerzemu Balowi, dr Michałowi Milewskiemu oraz Profesorowi Tadeuszowi Mazurczakowi za cenne uwagi dotyczące tej pracy.

Artykuł otrzymano 5 maja 2003
Zaakceptowano do druku 20 lipca 2003

Piśmiennictwo

1. Wyszko E, Szaflarski W, Barciszewski J (2003) *Postepy Biochem* **49**: 2-8
2. Cerutti H (2003) *Trends Genet* **19**: 39-46
3. Hammond S M, Caudy A A, Hannon G J (2001) *Nat Rev Genet* **2**: 110-119
4. Jorgensen R (1990) *Trends Biotechnol* **8**: 340-344
5. Jorgensen R A, Cluster P D, English J, Que Q, Napoli C A (1996) *Plant Mol Biol* **31**: 957-973
6. Sharp P A (1999) *Genes Dev* **13**: 139-141
7. Zamore P D, Tuschl T, Sharp P A, Bartel D P (2000) *Cell* **101**: 25-33
8. Bernstein E, Caudy A A, Hammond S M, Hannon G J (2001) *Nature* **409**: 363-366
9. Nicholson A W (1999) *FEMS Microbiol Rev* **23**: 371-390
10. Filippov V, Solov'yev V, Filippova M, Gill S S (2000) *Gene* **245**: 213-221
11. Ketting R F, Fischer S E, Bernstein E, Sijen T, Hannon G J, Plasterk R H (2001) *Genes Dev* **15**: 2654-2659
12. Hannon G J (2002) *Nature* **418**: 244-251
13. Hammond S M, Bernstein E, Beach D, Hannon G J (2000) *Nature* **404**: 293-296
14. Nykanen A, Haley B, Zamore P D (2001) *Cell* **107**: 309-321
15. Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Luhrmann R, Tuschl T (2002) *Cell* **110**: 563-574
16. Elbashir S M, Lendeckel W, Tuschl T (2001) *Genes Dev* **15**: 188-200
17. Elbashir S M, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T (2001) *EMBO J* **20**: 6877-6888
18. Carmell M A, Xuan Z, Zhang M Q, Hannon G J (2002) *Genes Dev* **16**: 2733-2742
19. Kataoka Y, Takeichi M, Uemura T (2001) *Genes Cells* **6**: 313-325
20. Deng W, Lin H (2002) *Dev Cell* **2**: 819-830
21. Parrish S, Fleenor J, Xu S, Mello C, Fire A (2000) *Mol Cell* **6**: 1077-1087
22. Shuey D J, McCallus D E, Giordano T (2002) *Drug Discov Today* **7**: 1040-1046
23. Sharp P A (2001) *Genes Dev* **15**: 485-490
24. Svoboda P, Stein P, Hayashi H, Schultz R M (2000) *Development* **127**: 4147-4156

25. Vance V, Vaucheret H (2001) *Science* **292**: 2277-2280
26. Bitko V, Barik S (2001) *BMC Microbiol* **1**: 34
27. Zeng Y, Cullen B R (2002) *RNA* **8**: 855-860
28. Billy E, Brondani V, Zhang H, Muller U, Filipowicz W (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 14428-14433
29. Wesley S V, Helliwell C A, Smith N A, Wang M B, Rouse D T, Liu Q, Gooding P S, Singh S P, Abbott D, Stoutjesdijk P A, Robinson S P, Gleave A P, Green A G, Waterhouse P M (2001) *Plant J* **27**: 581-590
30. Kalidas S, Smith D P (2002) *Neuron* **33**: 177-184
31. Reed R, Hurt E (2002) *Cell* **108**: 523-531
32. Bosher J M, Dufourcq P, Sookharce S, Labouesse M (1999) *Genetics* **153**: 1245-1256
33. Wu-Scharf D, Jeong B, Zhang C, Cerutti H (2000) *Science* **290**: 1159-1162
34. Fire A, Xu S, Montgomery M K, Kostas S A, Driver S E, Mello C C (1998) *Nature* **391**: 806-811
35. Tabara H, Sarkissian M, Kelly W G, Fleenor J, Grishok A, Timmons L, Fire A, Mello C C (1999) *Cell* **99**: 123-132
36. Montgomery M K, Xu S, Fire A (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 15502-15507
37. Bucher G, Scholten J, Klingler M (2002) *Curr Biol* **12**: R85-R86
38. Grishok A, Tabara H, Mello C C (2000) *Science* **287**: 2494-2497
39. Plasterk R H (2002) *Science* **296**: 1263-1265
40. Sijen T, Fleenor J, Simmer F, Thijssen K L, Parrish S, Timmons L, Plasterk R H, Fire A (2001) *Cell* **107**: 465-476
41. Tijsterman M, Ketting R F, Okihara K L, Sijen T, Plasterk R H (2002) *Science* **295**: 694-697
42. Timmons L, Court D L, Fire A (2001) *Gene* **263**: 103-112
43. Tavernarakis N, Wang S L, Dorovkov M, Ryazanov A, Driscoll M (2000) *Nat Genet* **24**: 180-183
44. Christensen M, Estevez A, Yin X, Fox R, Morrison R, McDonnell M, Gleason C, Miller D M, III, Strange K (2002) *Neuron* **33**: 503-514
45. Winston W M, Molodowitch C, Hunter C P (2002) *Science* **295**: 2456-2459
46. Palauqui J C, Elmayan T, Pollien J M, Vaucheret H (1997) *EMBO J* **16**: 4738-4745
47. Dorlhac d B, Vincentz M, Chupeau Y, Vaucheret H (1994) *Mol Gen Genet* **243**: 613-621
48. Ketting R F, Fischer S E, Bernstein E, Sijen T, Hannon G J, Plasterk R H (2001) *Genes Dev* **15**: 2654-2659
49. Knight S W, Bass B L (2001) *Science* **293**: 2269-2271
50. Lee Y, Jeon K, Lee J T, Kim S, Kim V N (2002) *EMBO J* **21**: 4663-4670
51. Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V (1993) *Cell* **75**: 843-854
52. Reinhart B J, Slack F J, Basson M, Pasquinelli A E, Bettinger J C, Rougvie A E, Horvitz H R, Ruvkun G (2000) *Nature* **403**: 901-906
53. Hutvagner G, Zamore P D (2002) *Science* **297**: 2056-2060
54. Llave C, Xie Z, Kasschau K D, Carrington J C (2002) *Science* **297**: 2053-2056
55. Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, Abel L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G (2002) *Genes Dev* **16**: 720-728
56. Reinhart B J, Weinstein E G, Rhoades M W, Bartel B, Bartel D P (2002) *Genes Dev* **16**: 1616-1626
57. Dean N M (2001) *Curr Opin Biotechnol* **12**: 622-625
58. Casey B P, Glazer P M (2001) *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **67**: 163-192
59. Stark G R, Kerr I M, Williams B R, Silverman R H, Schreiber R D (1998) *Annu Rev Biochem* **67**: 227-264
60. Gil J, Esteban M (2000) *Apoptosis* **5**: 107-114
61. Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001) *Nature* **411**: 494-498
62. Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R (2002) *Science* **296**: 550-553
63. Paddison P J, Caudy A A, Hannon G J (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 1443-1448
64. Kawagishi-Kobayashi M, Cao C, Lu J, Ozato K, Dever T E (2000) *Virology* **276**: 424-434
65. Domeier M E, Morse D P, Knight S W, Portereiko M, Bass B L, Mango S E (2000) *Science* **289**: 1928-1931
66. Lindbo J A, Silva-Rosales L, Proebsting W M, Dougherty W G (1993) *Plant Cell* **5**: 1749-1759
67. Ruiz M T, Voinnet O, Baulcombe D C (1998) *Plant Cell* **10**: 937-946
68. Mallory A C, Ely L, Smith T H, Marathe R, Anandalakshmi R, Fagard M, Vaucheret H, Pruss G, Bowman L, Vance V B (2001) *Plant Cell* **13**: 571-583
69. Voinnet O, Lederer C, Baulcombe D C (2000) *Cell* **103**: 157-167
70. Wianny F, Zernicka-Goetz M (2000) *Nat Cell Biol* **2**: 70-75
71. Lin R, Avery L (1999) *Nature* **402**: 128-129
72. Henikoff S (2000) *Biochim Biophys Acta* **1470**: O1-O8
73. Aravin A A, Naumova N M, Tulin A V, Vagin V V, Rozovsky Y M, Gvozdev V A (2001) *Curr Biol* **11**: 1017-1027
74. Jacobsen S E, Running M P, Meyerowitz E M (1999) *Development* **126**: 5231-5243
75. Hall I M, Shankaranarayana G D, Noma K, Ayoob N, Cohen A, Grewal S I (2002) *Science* **297**: 2232-2237
76. Reinhart B J, Bartel D P (2002) *Science* **297**: 1831
77. Wilkinson M F, Shyu A B (2002) *Nat Cell Biol* **4**: E144-E147

Alternatywne wydłużanie telomerów

Alternative lengthening of telomeres

AGNIESZKA DETTLAFF-POKORA, BEATA SCHLICHTHOLZ

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Telomery oraz telomeraza
- III. ALT-alternatywne wydłużanie telomerów u ssaków – komórki ALT
- IV. Mechanizmy wydłużania telomerów w komórkach ALT
 - IV-1. Struktura telomeru w mechanizmie ALT
 - IV-2. Rekombinacja intra- i interchromosomowa
 - IV-3. Rola pozachromosomowego DNA telomerowego
- V. Telomeraza a ALT
- VI. ALT w komórkach prawidłowych
- VII. Implikacje kliniczne odkrycia ALT

Contents:

- I. Introduction
- II. Telomeres and telomerase
- III. Alternative telomeres lengthening in mammals – ALT cells
- IV. Mechanisms of telomeres lengthening in ALT-cells
 - IV-1. Structure of telomere in ALT mechanism
 - IV-2. Intra- and intertelomeric recombination
 - IV-3. Function of extrachromosomal telomeric DNA
- V. Telomerase and ALT
- VI. ALT in normal cells
- VII. Clinical implications of ALT discovery

Wykaz stosowanych skrótów: ALT — alternatywne wydłużanie telomerów; APB — ciała złożone z białka PML związane z fenotypem alternatywnego wydłużania telomerów; ECTR — pozachromosomowe DNA złożone z powtórzeń sekwencji telomerowej TTAGGG; FISH — hybrydyzacja fluorescencyjna *in situ*; MMR — naprawa błędnie sparowanych zasad; PML — białko związane z białaczką promielocytarną; PNB — ciała jądrowe złożone z białka PML; POT1 — białko telomerowe 1; RPA — białko replikacyjne A; hTER — podjednostka RNA ludzkiej telomerazy; hTERT — podjednostka katalityczna ludzkiej telomerazy o aktywności odwrotnej transkryptazy; TIN2 — białko 2 oddziałujące z białkiem TRF1; TRF1 — czynnik 1 wiążący sekwencje telomerowe; TRF2 — czynnik 2 wiążący sekwencje telomerowe

I. Wstęp

Stopniowe skracanie telomerów następujące wraz z każdym podziałem komórkowym uważane jest za podstawowy mechanizm kontroli ilości podziałów, jakie zdolna jest przejść pojedyncza komórka. Po przekroczeniu granicznej dla każdego chromosomu długości telomeru komórka ulega apoptozie z udziałem białek p53 i pRb. Enzymem mającym zdolność rekonstrukcji sekwencji telomerowych jest telomeraza. Aktywność telomerazy początkowo wydawała się być jednym z warunków zaiscicia procesu

transformacji nowotworowej. Aktywność telomerazy stwierdzono w około 85% nowotworów oraz linii komórek nowotworowych. Powstało jednak pytanie, jakie mechanizmy są odpowiedzialne za odbudowę telomerów w pozostałych 15% nowotworów. Wykazano wysoką korelację pomiędzy poziomem i lokalizacją białek rekombinacyjnych a występowaniem fenotypu alternatywnego wydłużania telomerów — ALT (ang. *Alternative Lengthening of Telomeres*). Odbudowywanie chromosomów poprzez rekombinację i replikację może stanowić mechanizm obronny komórki przed utratą DNA kodującego bezpośrednio przylegającego do telomeru. Mechanizmy alternatywnego wydłużania telomerów koncentrują na sobie w ostatnich latach uwagę badaczy zajmujących się zarówno badaniami podstawowymi w zakresie mechanizmów rekombinacji, jak i specjalistów od chemioterapii nowotworów.

II. Telomery oraz telomeraza

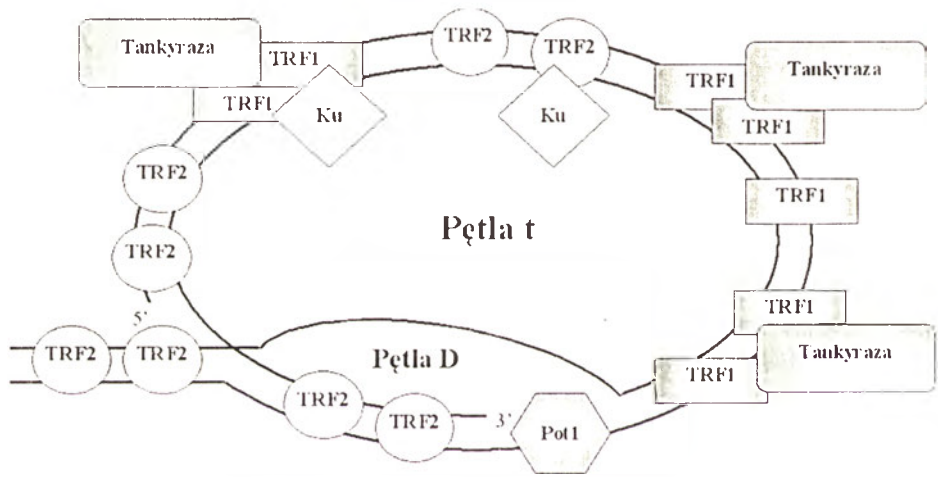
Telomery są zakończeniami chromosomów eukariotycznych u człowieka zbudowanymi z wielokrotnych (od setek do tysięcy razy) powtórzeń motywu 5'-TTAGGG-3' [1, 2]. Do podstawowych funkcji telomerów można zaliczyć ochronę DNA chromosomalnego przed degradacją w wyniku działania białek rozpoznających i naprawiających uszkodzenia DNA, takie jak wolne końce ssDNA. Telomery spełniają również istotną funkcję w przestrzennej i funkcjo-

Mgr, dr, Katedra i Zakład Biochemii AM w Gdańsku, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk; agnieszka_dettlaff-pokora@wp.pl

nalnej organizacji chromatyny jądrowej oraz mają wpływ na procesy transkrypcyjne. Wielokrotne powtórzenia tej samej sekwencji umożliwiają powstawanie na końcach telomerów wyższych struktur przestrzennego upakowania DNA w postaci pętli oraz odcinków zarówno jedno-, dwu- jak i wieloniciowego DNA [3]. Budowa przestrzenna telomeru wraz ze związanymi białkami ochrania wolny koniec 3' zarówno przed degradacją, jak i niekontrolowaną elongacją przez telomerazę. Podstawową strukturą występującą na końcu telomeru jest przypominająca lasso pętla t (ang.: *t loop*). Pętla t jest wysoce konserwatywna ewolucyjnie, została zaobserwowana u ludzi, gryzoni, jak i przedstawicieli *Protozoa* [4,5]. Ma ona długość od 1 kb u *Trypanosoma* do 18 kb w wątrobie myszy. Z kolei wolny koniec 3' DNA wypiera jedną z nici dsDNA tworząc pętlę D (ang. *displacement loop*) (Ryc. 1).

ściśle związane z reaktywacją enzymu wydłużającego telomery – telomerazy lub, według ostatnich doniesień, z aktywacją innych, odpowiadających telomerazie systemów odbudowujących końce chromosomów [6-8]. Transformacja ludzkich komórek somatycznych z wykorzystaniem dużego antygenu-T wirusa SV-40 powoduje powstanie populacji komórek, których telomery są skracane, aż do osiągnięcia krytycznej długości. W tym stadium następuje masowa apoptoza, której towarzyszy powstanie fuzji chromosomalnych z powodu dysfunkcji telomerów [9, 10]. Przeżywają tylko nieliczne komórki, w których nastąpiła aktywacja systemów odbudowujących telomery do bezpiecznej długości [11, 12].

Telomeraza jest wyspecjalizowaną nukleoproteiną o masie cząsteczkowej około 600 kDa mającą aktywność odwrotnej transkryptazy. Jest to enzym złożony z dwóch zasadniczych składników: podjed-



Ryc. 1. Kompleks telomerowy złożony z DNA oraz białek. Na końcu chromosomu DNA tworzy dwie pętle: t i D. Do pętli wiążą się białka, których funkcją jest zarówno ochrona i stabilizacja telomerów, jak i regulacja procesów replikacji, rekombinacji i transkrypcji.

Istotną rolę w powstawaniu oraz regulacji funkcji telomerów odgrywają białka trwale lub fakultatywnie z nimi związane. Podstawowym białkiem wpływającym na powstawanie i stabilizację pętli jest TRF2 (ang.: *Telomeric Repeat binding Factor 2*) białko wiążące dsDNA na połączeniach z ssDNA zapobiegające powstawaniu fuzji interchromosomalnych. Inne białka to m.in. TRF1 (ang.: *Telomeric Repeat binding Factor 1*) zaangażowane w utrzymanie długości telomerów oraz POT1 (ang.: *Protein of Telomeres 1*) chroniące koniec 3'. Poza białkami stabilizującymi i chroniącymi telomer istnieje wiele białek regulujących wiązanie tych pierwszych np. tankyraza (ang.: *TRF1-interacting, ANKYrin-related ADP-ribose polymerase*), TIN2 (ang.: *TRF1-Interacting Nuclear protein 2*) i białko Ku będące podjednostką kinazy białkowej zależnej od DNA [2]. Uważa się, iż uniesmiertelnienie komórek ludzkich jest

nostki białkowej hTERT (ang.: *human Telomerase Reverse Transcriptase*) o masie 127 kDa oraz składnika RNA hTR o długości 451 nukleotydów (ang.: *human Telomerase RNA*), który stanowi matrycę dla odwrotnej transkryptazy [2, 6]. Telomeraza jest enzymem, którego aktywność jest charakterystyczna dla komórek szybko i często dzielących się. U człowieka jest aktywna w większości tkanek w życiu embrionalnym, zaś u osobników dorosłych w komórkach pnia, takich jak komórki szpiku kostnego lub komórki rozrodcze skóry (komórki niezębate warstwy podstawnej naskórka) oraz w aktywowanych limfocytach [13-18]. Aktywność telomerazy wykazano w około 85% ludzkich nowotworów i linii komórek nowotworowych [19], gdzie stabilizacja i utrzymanie telomerów są podstawowymi wymogami zajścia procesu immortalizacji. Brak aktywności telomerazy stwierdzono w pozostałych 15% przypad-

ków (Tab. 1). Nasunęło to pytanie, jaki jest mechanizm wydłużania telomerów alternatywny do telomerazy.

III. ALT-alternatywne wydłużanie telomerów u ssaków – komórki ALT

Istnienie linii komórek nowotworowych nie wykazujących aktywności telomerazy wskazywało na występowanie innego mechanizmu odbudowywania

spowodowały powstanie kilku hipotez wyjaśniających proces ALT.

Dla nieśmiertelnych komórek ssaków nie wykazujących aktywności telomerazy charakterystyczny jest nietypowy fenotyp telomerów. W prawidłowej komórce ssaka telomery mają długość około 15 kpz. Są one skracane wraz z każdym przebytym podziałem komórkowym o 40-200 pz do osiągnięcia granicznej długości 5-8 kpz, po której to osiągnięciu komórka obumiera [45]. Komórka nowotworowa z

Tabela 1
Fenotyp ALT w nowotworach i liniach komórkowych (wg Henson JD, zmieniono)

	Nowotwór / Typ komórek	Linia nowotworowa	Literatura
guzy pierwotne w których stwierdzano fenotyp ALT	-glejak wielopostaciowy		[20]
	-adrenocortical carcinoma (rak kory nadnerczy)		[21]
	-czerniak złośliwy		[21]
	-rak piersi		[21]
	-rak płuc		[21]
	-rak jajnika		[21]
	-rak nerki		[22]
	-osteosarcoma (mięsak kościopochodny)		[21]
przykładowe linie komórek nowotworowych w których stwierdzono fenotyp ALT	fibroblasty	GM0637 (NSV)	[23]
		KB319	[24]
		LCS-4X2	[25]
		LCS-AF 1-3	[26]
		WI38-VA13/2RA	[27]
		SW26-1	[28]
		AT13LA (SV)	[29]
		AT18LA (SV)	[29]
		OUMS-24F	[30]
		KMST-6	[31]
	osteocyty	HMS50-E7	[32]
		GM847	[33]
		U2-OS	[21]
		ZK-58	[34]
	komórki mezotelialne	Saos-2	[21]
		MeT-4A	[21]
	komórki epitelialne	HIO107	[35]
		HIO117	[36]
		HIO118	[36]
		BET-3M	[21]
		SKOV-3	[37]
	keratinocyty	OKF6-D1/Δp53	[38]

zakończeń chromosomów. W latach osiemnastu podczaś badań nad muszką owocową *Drosophila melanogaster* stwierdzono obecność retrotranspozonów HeT-A i TART należących do rodziny LINEs włączających się do końcowych fragmentów chromosomów [39-41]. Podobnie w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae* zaobserwowano, że wprowadzone do części proksymalnej chromosomów liniowe plazmidy imitujące telomery przemieściły się na końce chromosomów [42-44]. Wskazywało to na rekombinacyjny charakter obserwowanego procesu, a dokładnie na rekombinację homologiczną [42]. Badania prowadzone w kolejnych latach

aktywną telomerazą ma homogenne telomery o długości około 10 kpz [46], zaś komórka ALT skrajnie heterogenne telomery od 3 do 50 kpz, ze średnią 20 kpz [24]. Ponadto istnieje wysoka zmienność fenotypu telomerów pomiędzy poszczególnymi komórkami jednej populacji ALT, co wykazano za pomocą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH-ang.: *Fluorescence In Situ Hybridization*). Użycie tej techniki pozwoliło stwierdzić istnienie granicznych przypadków, w których telomery były niezwykle długie, jak i występowanie chromosomów, w których nie wykryto telomerów [34, 47]. Takie komórki teoretycznie nie powinny przetrwać z uwagi na postę-

pującą erozję chromosomowej informacji genetycznej [48]. Istotne różnice stwierdzono również pomiędzy siostrzanymi chromatydami tego samego chromosomu. Zaobserwowano także zwiększoną częstość występowania rearanżacji chromosomalnych, występowanie połączeń międzychromosomowych, oraz megachromosomów powstałych w wyniku fuzji 3-6 chromosomów [34, 47, 49]. Jednym ze sposobów oceny tkanki bądź linii nowotworowej pod względem występowania fenotypu ALT jest pomiar średniej długości telomerów w badanej populacji komórek [50].

W komórkach ALT poziom nukleinowej składowej telomerazy — hTER jest bardzo niski, co dowodzi, że utrzymanie w tych komórkach telomerów nie jest zależne od ekspresji telomerazy [46]. Poza różnicami genetycznymi stwierdzono w komórkach ALT istnienie nietypowych ciałek jądrowych APB (ang. *ALT-associated PML Bodies*), będących odmianą ciałek PNB (ang. *PML Nuclear Bodies*). W jądrze komórkowym prawidłowej komórki (większości tkanek) ciała PNB są pierścieniowatymi ziarnistościami jądrowymi o średnicy od 0,5 do 1 μm [51] złożonymi z białka PML, oraz m.in. CBP, SUMO-1 i pRB [52-53]. Ciała te są dynamicznymi strukturami jądrowymi występującymi w interfazie raz uwalniającymi, a raz wiążącymi wyżej wymienione białka. Głównym składnikiem ciałek jest białko PML, któremu przypisuje się rolę w procesach immunologicznych, apoptozie, różnicowaniu komórek oraz transformacji nowotworowej m.in. poprzez regulację poziomu acetylacji p53 oraz szlaków sygnalizacyjnych białka Ras [54, 55]. Ilość oraz dynamika tworzenia i rozpadu ciałek PNB jest zależna od poziomu ekspresji, alternatywnego składania oraz modyfikacji potranslacyjnych białka PML.

Ciała APB odróżnia od ciałek PNB obecność dodatkowych białek zaangażowanych w procesy syntezy oraz rekombinacji DNA. Stwierdzono w nich obecność takich białek związanych z rekombinacją DNA (RAD52, RAD51 i RPA) [56-62], kompleks MRN (kompleks białek MRE11/RAD50/NBS1 zaangażowany m.in. w procesy rekombinacji homologicznej) [63-65], helikazy WRN i BLM należące do rodziny RecQ [66-70], oraz dwa białka telomerowe TRF1 i TRF2 [6]. Prawdopodobnie funkcją ciałek APB jest skupianie, kolokalizacja i modyfikacja białek zaangażowanych w proces alternatywnego wydłużania telomerów poprzez przestrzenne umożliwienie ich wzajemnych interakcji. Jest również możliwe, że ciała APB biorą udział w usuwaniu półproduktów ALT poprzez oddziaływanie z proteasomem 11S [71]. Ciała APB poza czynnikami

białkowymi zawierają również DNA [72]. Jest to tzw. pozachromosomalne DNA telomerowe: ECTR (ang. *Extrachromosomal Telomeric Repeats*), linio-wa forma dsDNA, a dokładnie pozachromosomalne DNA hybrydujące z sondą (TTAGGG)_n. W komórkach nieśmiertelnych, nie wykazujących aktywności telomerazy (np. w liniach fibroblastycznych KMST-1, VA-13 i SUSM-1) ECTR występuje zarówno w jądrze komórkowym, jak i w niewielkich ilościach w cytozolu. Brak go w komórkach, w których telomeraza jest aktywna oraz komórkach prawidłowych. ECTR, podobnie jak DNA telomerowe, występuje w kompleksie z TRF1 i innymi białkami telomerowymi [73, 74]. Wydaje się, iż DNA to jest uwalniane z chromosomów i utrzymuje się jako autonomiczny episom. Obecność w ciałkach ABP pozachromosomalnego DNA homologicznego do telomerowego DNA chromosomalnego pozostającego w kompleksie z białkami rekombinacyjnymi wskazuje na możliwy udział ciałek ABP w wydłużaniu telomerów zarówno poprzez rekombinację homologiczną, jak i integrację.

Ciała APB są strukturami charakterystycznymi dla komórek ALT, występują one tylko w komórkach nieśmiertelnych nie wykazujących aktywności telomerazy. Jak dotąd nie znaleziono ciałek APB ani w komórkach z aktywną telomerazą, ani w komórkach prawidłowych [72]. Należy tu zauważyć, że nie wszystkie komórki z 15% nie wykazujących aktywności telomerazy mają chromosomy wykazujące fenotyp ALT [39], może to być związane z faktem badania komórek o nie ustalonym ostatecznie fenotypie komórki nieśmiertelnej. Możliwe jest również, iż poza telomerazą i ALT istnieją inne mechanizmy wydłużania telomerów. Fenotyp ALT jest cechą recesywną, co stwierdzono poprzez fuzje komórek ALT z komórkami prawidłowymi. Komórki fuzyjne były śmiertelne i traciły telomery wraz z każdym podziałem komórkowym [33]. Wydaje się również, iż niektóre komórki fuzyjne wykazujące aktywność telomerazy posiadają represor ALT [33, 49], jak również niektóre komórki ALT posiadają represor dla telomerazy [75]. Prawdopodobnie geny represorów dla telomerazy są zlokalizowane u człowieka w zależności od rodzaju linii nowotworowej w chromosomie 6 i 7 i jest ich co najmniej 2 [26, 76].

IV. Mechanizmy wydłużania telomerów w komórkach ALT

Dynamika wydłużania telomerów w komórkach ALT jest bardzo wysoka. Zaobserwowano szybkie fluktuacje długości telomerów, w wyniku których

pojedyncze telomery były szybko i skokowo wydłużane nawet o >25 kpz, co stanowiło nawet ponad 100-krotne wydłużenie telomeru. Proces ten następował zarówno po osiągnięciu przez telomer granicznej długości około 200 pz, jak i w przypadku stosunkowo długich telomerów. Częstość występowania przejściowych fuzji międzychromosomowych była podobna do obserwowanej częstości szybkich zmian długości telomerów [24]. Badania na drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*, w których telomeraza, podobnie jak u ssaków, wydłuża telomery wykazały, że usunięcie tego enzymu powoduje erozję telomerów. Komórki takie w większości umierają apoptotycznie. Przeżywają tylko te, w których występuje efektywna ekspresja genu *Rad52* — genu kodującego białko konieczne dla zajścia rekombinacji [77]. U *S. cerevisiae* stwierdzono ponadto istnienie dwóch różniących się genetycznie szlaków rekombinacyjnego tworzenia telomerów. Nowe telomery drożdży pierwszego typu zawierały sekwencje subtelomerowe Y', oddalone od końca telomeru, oraz bardzo krótki odcinek wielokrotnych powtórzeń na końcu telomeru. Przeżycie tych komórek było zależne od obecności białka rad51. Telomery drożdży drugiego typu były długie i były złożone z wielokrotnych powtórzeń sekwencji telomerowych. Przeżycie tych komórek było zależne od kolejnego związanego z rekombinacją białka — rad50 [56, 78, 79].

W komórkach owadów telomery są odbudowywane poprzez retrotranspozycję dwóch typów transpozonów LINEs: HeT-A i TART, który to proces jest również rekombinacyjny [40, 41]. Obserwacje te w połączeniu z nowo poznanymi informacjami na temat składu ciałek ABP oraz istnieniem i lokalizacją pozachromosomowego DNA telomerowego nasunęły przypuszczenie, iż proces ALT również w komórkach ssaków jest prawdopodobnie procesem rekombinacyjnym. Powstało kilka hipotez dotyczących przebiegu ALT. Dla niektórych z hipotez znaleziono przynajmniej częściowe potwierdzenie i wydaje się, że proces ALT w rzeczywistości jest ich kompilacją.

IV-1. Struktura telomeru w mechanizmie ALT

Telomer, a przede wszystkim jego wolny koniec 3' rozdzielający nici DNA (Ryc. 1), tworzy przestrzenną strukturę, która teoretycznie mogłaby promować zarówno replikację, jak i rekombinację. Pętle t i D mogą odgrywać rolę w mechanizmie ALT poprzez replikację zależną od rekombinacji, prowadzącą do odbudowy telomeru na matrycy nici telomerowej według modelu obracającego się koła, z

wykorzystaniem końca 3' jako startera [80]. Występujące w obrębie telomeru białko POT1 jest inhibitorem replikacji, zaś w ciałkach APB występują białka rekombinacyjne, które mogą uczestniczyć w tym procesie. Początkowe założenie, że podstawową funkcją struktur obecnych na końcu chromosomu jest ochrona i stabilizacja DNA stoi w sprzeczności z tezą, jakoby struktury te sprzyjały tak dynamicznym procesom jak rekombinacja [4]. Wydaje się jednak, iż procesy takie mogą występować w komórkach nowotworowych, a być zablokowane w komórkach prawidłowych.

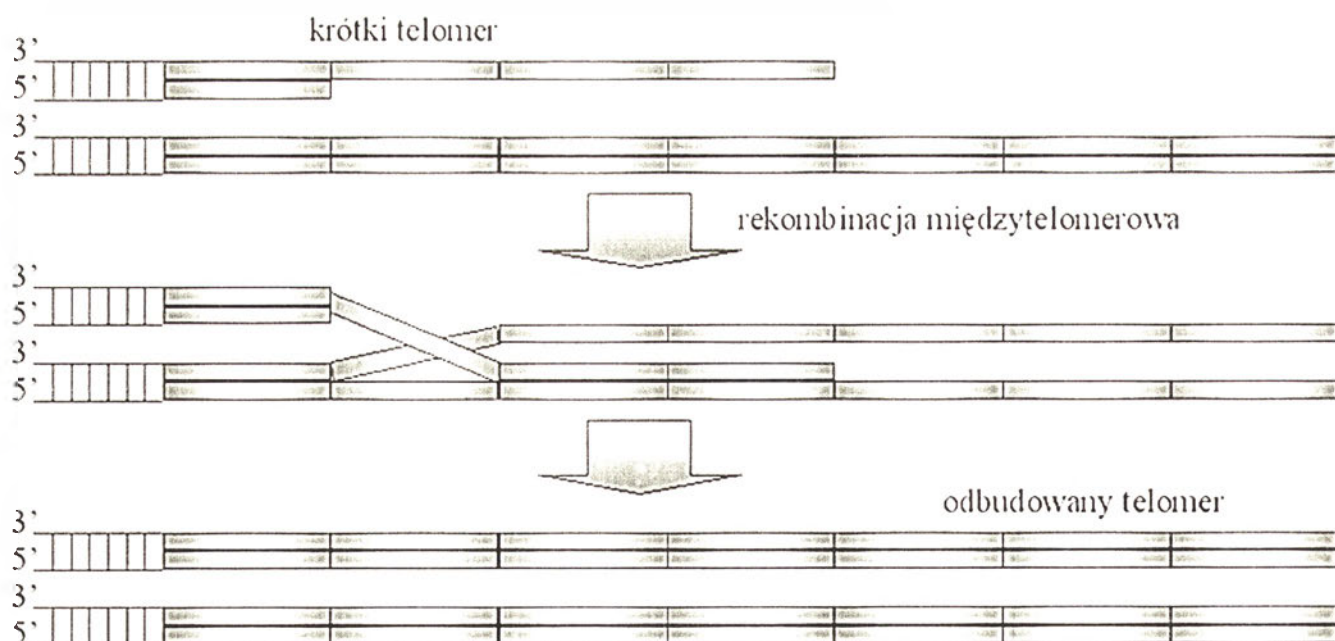
IV-2. Rekombinacja intra- i interchromosomowa

Występowanie analogicznych sekwencji nukleotydowych na końcu każdej chromatydy stwarza warunki dla rekombinacji homologicznej między telomerami tego samego lub różnych chromosomów. Taka rekombinacja została potwierdzona doświadczalnie z wykorzystaniem tzw. „DNA-tags”, czyli poprzez „znakowanie” telomerów i obserwacje propagacji znacznika w populacji komórek. Obserwowano wzrost liczby wyznakowanych telomerów wraz z ilością podziałów komórkowych, oraz efektywną propagację tylko tych „DNA-tags”, które wstawione zostały do telomeru dystalnie [81]. Proces ten nie występował w komórkach, w których była aktywna telomeraza. Wolny koniec 3' jednego telomeru dzięki homologii z DNA drugiego telomeru jest prawdopodobnie zdolny do zaatakowania jego dwuniciowej struktury. Umożliwia to replikację zależną od rekombinacji a co za tym idzie wydłużenie telomeru [82] (Ryc. 2). Wykonane doświadczenia nie mogą jednak wykluczyć możliwości propagacji „DNA-tags” poprzez pośrednią fazę ECTR.

Wykazano ponadto związek pomiędzy defektami systemu naprawy błędnie sparowanych zasad MMR (ang. *Mismatch Repair*), a występowaniem mechanizmu ALT u *S. cerevisiae* [83], co sugerowałoby hamowanie ALT przez ten system naprawczy. MMR może stanowić barierę dla wielu procesów zachodzących w obrębie telomeru, poprzez uniemożliwienie interakcji pomiędzy DNA a enzymami rekombinacyjnymi. Uszkodzenie MMR byłoby tu warunkiem koniecznym dla wystąpienia fenotypu ALT.

IV-3. Rola pozachromosomowego DNA telomerowego

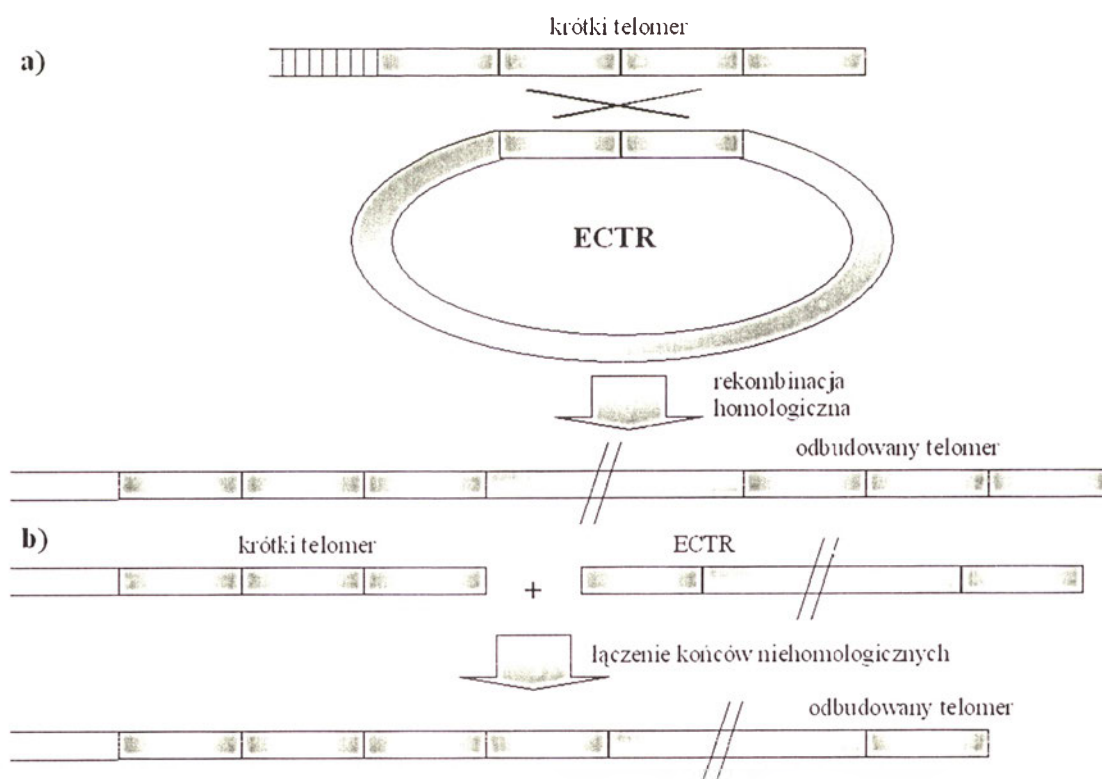
Wysoka dynamika zmian długości telomerów wskazywałaby na udział ECTR w procesach ALT poprzez integrację tego DNA do telomerów chromoso-



Ryc. 2. Wydłużanie telomeru poprzez rekombinację międzitelomerową. Wolny koniec 3' DNA oddziałuje z drugim telomerem i zostaje wykorzystany jako starter dla syntezy. Tak powstały długi koniec 3' zostaje następnie uzupełniony przez system replikacyjny.

mów lub łączenie końców ECTR z końcami chromosomów (Ryc. 3). Integracja poprzez rekombinację dużych fragmentów DNA do telomerów została za-

jest jednym z podstawowych mechanizmów utrzymania integralności DNA chromosomalnego. Retrotranspozycja jest procesem przypominającym inte-



Ryc. 3. Wydłużanie telomeru poprzez łączenie z pozachromosomalnym DNA telomerowym. a) integracja kolistej cząstki – pozachromosomalne DNA telomerowe wbudowuje się do istniejącego telomeru poprzez rekombinację homologiczną; b) wydłużenie telomerów poprzez łączenie końca telomeru z cząsteczką pozachromosomalnego DNA telomerowego.

obserwowana wcześniej m.in. u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, muszki owocowej i *Giardia lamblia* [40, 41, 84, 85]. Organizmy te posiadają retrotranspozony, których przenoszenie do telomerów

grację pozachromosomalnego DNA telomerowego i wydaje się, iż może on pełnić w komórkach ALT podobną rolę, jednakże jak dotąd nie znaleziono dla tej hipotezy potwierdzenia. Zaobserwowano jednak

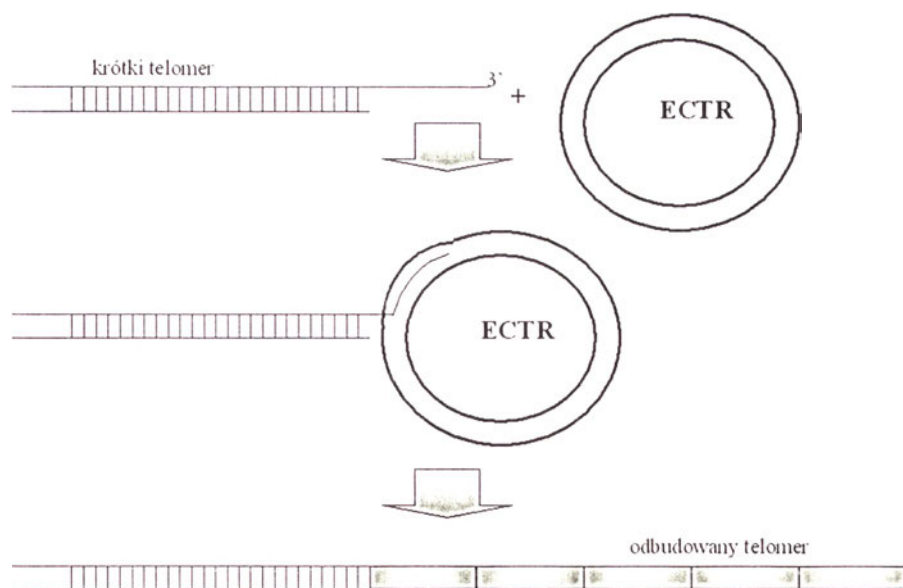
proces odwrotny, czyli szybkie skracanie telomerów TRD (ang.: *Telomeric Rapid Depletion*), który prawdopodobnie generuje ECTR [86,87]. Obecność DNA w ciałkach APB wraz z białkami rekombinacyjnymi sugeruje, że proces wstawiania pozachromosomowego DNA telomerowego jest możliwy. Jednak w świetle badań B u c h o l c i współpracowników [86] nie można stwierdzić jednoznacznie, czy obecność DNA w APB jest wymagana do zajścia ALT z wykorzystaniem mechanizmu integracyjnego, czy też jest produktem końcowym innych mechanizmów proponowanych dla ALT. Wydaje się jednak, że cząstki ECTR są za krótkie, aby przy ich wykorzystaniu do integracji możliwe były obserwowane bardzo duże zmiany długości telomerów. Istnieje także hipoteza doszukująca się roli ECTR w angażowaniu białek normalnie asocjujących z telomerami. Nie bez znaczenia jest też obserwacja, że ciała APB pojawiają się w fazach S/G2/M cyklu komórkowego, a więc wtedy, gdy zachodzi rekombinacja DNA [88].

Całkowicie odmienna od rekombinacyjnej jest teoria zakładająca użycie pozachromosomowego DNA telomerowego jako matrycy, na której odbudowywany jest telomer. ECTR jest cząstką liniowego dsDNA, uważa się jednak, że część tego DNA występuje w formie kolistej, co umożliwiłoby replikację zgodnie z modelem toczącego się koła. Według tej hipotezy wolny koniec 3' odpychałby jedną z nici dsDNA ECTR, tworząc widelki replikacyjne i używając drugiej nici DNA jako matrycy (Ryc. 4). Taki proces pozwalałby na szybkie wydłużanie telomerów do długości obserwowanych w komórkach ALT, jak również wyjaśniałby obserwowane wydłużanie

zarówno bardzo krótkich jak i średniej długości telomerów [87]. Proces nazwany „roll and spread” zaobserwowano u drożdży *Kluyveromyces lactis*, które były pozbawione funkcjonalnej telomerazy. Drożdże takie odtwarzały telomery poprzez syntezę jednego telomeru na matrycy plazmidu imitującego ECTR, a następnie użycie tego telomeru jako matrycy dla powstania pozostałych [89]. Można spekulować, iż proces ten jest możliwy w komórkach ssaków, jak na razie jest to tylko hipoteza. Jak dotąd nie prowadzono badań w tym kierunku.

V. Telomeraza a ALT

Niektóre komórki z aktywną telomerazą mają wydłużone i heterogenne telomery, charakterystyczne dla fenotypu komórek ALT, co może wskazywać na możliwość współistnienia w jednej komórce obydwu mechanizmów [76]. Stwierdzono m.in., że ektopowa ekspresja telomerazy w komórkach ALT, podobnie jak fuzja komórek ALT z komórkami z aktywną telomerazą, nie znosi w tych komórkach alternatywnego wydłużania telomerów [33, 49]. Chromosomy nie utraciły fenotypu telomerów charakterystycznego dla komórek ALT [27, 33, 36, 49]. Zaobserwowano także preferencyjne wydłużanie najkrótszych telomerów przez telomerazę [27]. Nie ma jednak zgody, co do represji ALT przez telomerazę. Pojawiają się zarówno doniesienia, iż nie jest ono hamowane [27, 33, 36], jak również, że najdłuższe telomery po wprowadzeniu białkowej składowej telomerazy są szybko skracane, a cały proces ALT hamowany [91]. Istnieje także różnica pomiędzy komórkami



Ryc. 4. Wydłużanie telomeru poprzez replikację w modelu obracającego się koła z wykorzystaniem ECTR jako matrycy. Wolny koniec 3' telomeru oddziałuje z kolistym ECTR i służy za starter replikacji. Model ten wyjaśniałby obserwowane duże zmiany długości pojedynczych telomerów.

z ektopową ekspresją telomerazy i komórkami fuzyjnymi. Zauważono, że w niektórych typach komórek fuzyjnych ALT jest hamowane, a długie telomery skracane, w odróżnieniu od komórek, do których wprowadzono gen białkowej części telomerazy [33, 49]. Możliwe jest, iż procesy ALT przebiegają w komórkach fuzyjnych i z ektopową ekspresją telomerazy na tyle wolniej, iż za pomocą badania tylko dynamiki zmian długości telomerów nie można w prawidłowy sposób ocenić wzajemnych relacji pomiędzy obydwojema mechanizmami wydłużania telomerów. Badania nad oceną częstości rekombinacji w tego typu komórkach są w dalszym ciągu prowadzone [92]. W komórkach o fenotypie ALT występuje metylacja wysp CpG w promotorze genu kodującego hTERT blokująca powstawanie białka, która nie występuje w komórkach prawidłowych [93]. Możliwe jest również, że zarówno telomeraza, jak i ALT (ECTR) angażują te same białka telomerowe, co doprowadza do kompetycji między procesami. To, który proces przeważy, zależy m.in. od typu komórek oraz sposobu ich immortalizacji. Wykazano również, że podwyższony poziom ekspresji jednego z wariantów splicingowych hTERT mRNA jest związany z występowaniem fenotypu ALT [94]. Białko to ma niską aktywność katalityczną spowodowaną brakiem kilku aminokwasów centrum katalitycznego [95]. Występuje ono także w komórkach prawidłowych i embrionalnych [94]. Początkowo uważano, że w jednej komórce będzie następował albo proces ALT, albo będzie aktywna telomeraza, wydaje się jednak, że w wielu przypadkach procesy te nie tylko się nie wykluczają, ale nawet uzupełniają.

VI. ALT w komórkach prawidłowych

Proces ALT nie jest prawdopodobnie ograniczony tylko do komórek nieśmiertelnych, zaobserwowano bowiem szybką utratę DNA telomerowego w starzejącej się hodowli ludzkich fibroblastów, gdzie stwierdzono wydłużenie najkrótszych telomerów kosztem długich. Zdolność fibroblastów do przetrwania zależała od średniej długości wszystkich telomerów, a nie od długości najkrótszych [96]. Wydaje się zatem, że prawidłowe komórki człowieka mogą mieć zdolność wydłużania telomerów bez udziału telomerazy, jest to jednak proces na tym etapie naszej wiedzy bardzo mało poznany i trudny do badania w organizmie ludzkim jako całości.

U myszy pozbawionych genu kodującego białkową część telomerazy, które teoretycznie nie powinny być żywotne z uwagi na zaburzenia rozwo-

jowe i dysfunkcję układu immunologicznego, stwierdzono występowanie fenotypu ALT. Myszy takie nie tylko nie wykazywały początkowo zaburzeń rozwojowych i odpornościowych, ale i były płodne nawet do sześciu generacji [97, 98]. Istnienie takich myszy dowodzi, iż mimo swej niewątpliwiej istotności dla rozwoju organizmu, zarówno w wydłużaniu telomerów, jak i innych funkcjach telomerazy związanych z utrzymaniem integralności genomu, nie jest to enzym niezbędny, a przynajmniej jego brak nie ujawnia się fenotypowo w pierwszych pokoleniach. Jest to jednak enzym istotny, bowiem myszy gromadziły stopniowo aberracje chromosomowe, aż do pojawienia się uszkodzeń i deformacji komórek rozrodczych, enterocytów oraz zaburzeń układu krwiotwórczego i odpowiedzi immunologicznej. Brak telomerazy stawał się śmiertelny po czterech-sześciu pokoleniach. Na podstawie tych doświadczeń można przypuszczać, że obydwa systemy wydłużania telomerów mogą się do pewnego stopnia zastępować, jednak obecność telomerazy jest niezbędna w przemianie pokoleń. System alternatywnego wydłużania telomerów był w stanie utrzymać krótkie telomery, jednak nie był w stanie zastąpić telomerazy w jej funkcjach związanych z zapobieganiem powstawaniu fuzji i innych aberracji międzychromosomowych.

VII. Implikacje kliniczne odkrycia ALT

Od momentu odkrycia telomeraza stała się obiektem intensywnych badań w celu znalezienia jej selektywnych inhibitorów o znaczeniu terapeutycznym. Fakt, że komórka nowotworowa musi posiadać mechanizm odbudowy telomerów w połączeniu z wynikami badań, w których stwierdzono aktywność telomerazy w ponad 80% ludzkich nowotworów sprawił, że enzym ten wydał się bardzo obiecującym celem chemioterapii nowotworów [99]. Odkrycie alternatywnego mechanizmu wydłużania telomerów, mogącego współistnieć w komórkach z aktywną telomerazą i mogącego występować w komórkach prawidłowych, podważyło celowość użycia inhibitorów telomerazy w leczeniu wszystkich zmian nowotworowych. Będąc obecnie na etapie badań klinicznych chemioterapeutyki wpływające na aktywność telomerazy mogą okazać się nieskuteczne, ponieważ niektóre komórki nowotworowe wykazują zdolność przełączenia się na inny mechanizm odbudowy telomerów. W przyszłości wskazane może być połączenie chemioterapii, skierowanej przeciwko aktywności telomerazy, z lekami wpływającymi na procesy rekombinacyjne, co jednak wydaje się trudne z uwa-

gi na istotne znaczenie tych ostatnich dla przeżycia komórek [100]. Komórki nowotworowe o fenotypie ALT wprowadzone do organizmów myszy z uszkodzonym układem immunologicznym mają obniżoną zdolność do tworzenia przerzutów, co wskazywałoby na możliwą mniejszą złośliwość nowotworów o fenotypie ALT [101, 102]. Stwierdzono również, że pacjenci cierpiący na glejaka wielopostaciowego mają dwa razy dłuższy czas przeżycia, gdy nowotwór ma fenotyp ALT [20]. Dłuższy czas przeżycia tych pacjentów może być przypuszczalnie związany z większą wrażliwością komórek ALT na radioterapię, jednak nie wykazano tego *in vitro*. Te doniesienia pozwalają przypuszczać, że pomimo odkrycia procesu alternatywnego wydłużania telomerów, należy kontynuować opracowywanie terapii opartych na hamowaniu aktywności telomerazy. Istnieje jednak potrzeba wykonania badań przesiewowych, aby określić znaczenie ALT dla różnych nowotworów, jak również kontynuowania badań podstawowych, aby lepiej poznać zachodzące w obrębie ludzkich telomerów procesy rekombinacyjne, a zarazem mieć szansę ich kontrolowania.

Podziękowania

Praca finansowana w ramach grantu KBN 0670/P05/2001/20

Artykuł otrzymano 19 maja 2003
Zaakceptowano do druku 29 września 2003

Piśmiennictwo

- Żarko-Podstawka M, Zakrzewska-Czerwińska J (1997) *Post Bioch* 43: 12-17
- Szalata M, Słomski R (2000) *Post Biol Kom* 14: 95-117
- Wellinger RJ, Sen D (1997) *Eur J Cancer* 11: 735-749
- Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T (1999) *Cell* 97: 503-514
- Munoz-Jordan JL, Cross GA, de Lange T, Griffith JD (2001) *EMBO J* 20: 579-588
- Błasiak J (1999) *Post Bioch* 45: 228-238
- Nowak J, Lewandowski K, Januszkiewicz D (2000) *Post Biol Kom* 14: 143-150
- Nowis D, Gołab J (2001) *Post Biol Kom* 28: 243-261
- Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart N G, Greider CW, Harley CB, Bacchetti S (1992) *EMBO J* 11: 1921-1929
- Ducray C, Pommier JP, Martins L, Boussin FD, Sabatier L (1999) *Oncogene* 18: 4211-4223
- Autexier C, Greider C W (1996) *Trends Biochem Sci* 21: 387-391
- Shay J W, Wright W E (1996) *Trends Genet* 12: 129-131
- Hiyama K, Hirai Y, Kyoizumi S, Akiyama M, Hiyama E, Piatyszek MA, Shay J W, Ishioka S, Yamakido M (1995) *J Immunol* 155: 3711-3715
- Buchkovich K J, Greider C W (1996) *Mol Biol Cell* 7: 1443-1445
- Yasumoto S, Kumimura C, Kikuchi C, Tahara H, Ohji H, Yamamoto H, Ide T, Uta k o j i T (1996) *Oncogene* 13: 433-439
- Harle-Bachor C, Boukamp P (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6476-6481
- Kyo S, Takakura M, Kohama T, Inoue M (1997) *Cancer Res* 57: 610-614
- Kannan S, Tahara H, Yokozaki H, Mathew B, Nalinakumari KR, Nair MK, Tahara E (1997) *Cancer Epidem Biomarkers Prevent* 6: 413-420
- Kim N W, Piatyszek M A, Prowse K R, Harley C B, West M D, Ho P L, Coviello G M, Wright W E, Weinrich S L, Shay J W (1994) *Science* 266: 2011-2015
- Hakin-Smith V, Jellinek D A, Levy D, Carroll T, Teo M, Timperley W R, McKay M J, Reddel R R, Royds J A (2003) *The Lancet* 361: 836-838
- Bryan T M, Engelzou A, Gupta J, Bacchetti S, Reddel R R (1995) *EMBO J* 14: 4240-4248
- Mehle C, Piatyszek M A, Ljunberg B, Shay J W, Roos G (1996) *Oncogene* 13: 161-166
- Xia S J, Shammass M A, Shmookler Reis R J (1996) *Mutat Res* 364: 1-11
- Murnane J P, Sabatier L, Marder B A, Morgan W F (1994) *EMBO J* 20: 579-588
- Gollahon L S, Kraus E, Wu T-A, Yim S O, Strong L C, Shay J W, Tainsky L A (1998) *Oncogene* 17: 709-717
- Kumata M, Shimizu M, Oshimura M, Uchida M, Tsutsui T (2002) *Int J Oncol* 21: 851-856
- Cerone M A, Londono-Vallejo J A, Bacchetti S (2001) *Hum Mol Genet* 10: 1945-1952
- Henderson S, Allsopp R, Spector D, Wang S-S, Harley C (1996) *J Cell Biol* 134: 1-12
- Sprung C N, Bryan T M, Reddel R R, Murnane J P (1997) *Mutat Res* 379: 177-184
- Sugihara S, Mihara K, Marunouchi T, Inoue H, Namba M (1996) *Hum Genet* 97: 1-6
- Nakabayashi K, Ogata T, Fujii M, Tahara H, Die T, Wadhwa R, Kaul S C, Mitsui Y, Ayusawa D (1997) *Exp Cell Res* 235: 345-353
- Shay J W, Tomlison G, Piatyszek M A, Gollahon L S (1995) *Mol Cell Biol* 15: 425-432
- Perrem K, Bryan T M, Englezou A, Hackl T, Moy E L, Reddel R R (1999) *Oncogene* 18: 3383-3390
- Scheel C, Schaefer K L, Jauch A, Keller M, Wai D, Brinkschmidt C, van Valen F, Boecker W, Dockhorn-Dworniczak B, Poremba C (2001) *Oncogene* 20: 3835-3844
- Grobelny J V, Godwin A K, Broccoli D (2000) *J Cell Sci* 113: 4577-4585
- Grobelny J V, Kulp-McEliece M, Broccoli D (2001) *Hum Mol Genet* 10: 1953-1961
- Gan Y, Mo Y, Johnston J, Lu J, Wientjes M G, Au J L (2002) *FEBS Lett* 527: 10-14
- Optiz O G, Suliman Y, Hahn W C, Harada H, Blum H E, Rustigi A K (2001) *J Clin Invest* 108: 725-732
- Bryan T M, Englezou A, Dalla-Pozza L, Dunham M A, Reddel R R (1997) *Nat Med* 3: 1271-1274
- Traverse K L, Pardue M L (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 8116-8120
- Biessmann H, Kasravi B, Bui T, Fujiwara G, Champion L E, Mason J M (1994) *Chromosoma* 103: 90-98
- Dunn B, Szauter P, Pardue M L, Szostak J W (1984) *Cell* 39: 191-201
- Pluta A F, Dani G M, Spear B B, Zakian V A (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 1475-1479
- Pluta A F, Zakian V A (1989) *Nature* 337: 429-433
- Allshire R C, Dempster M, Hastie N D (1989) *Nucleic Acids Res* 17: 4611-4627
- Bryan T M, Marusic L, Bacchetti S, Namba M, Reddel R R (1997) *Hum Mol Genet* 6: 921-926
- Lansdorp P M, Poon S, Chavez E, Dragowska V, Zijlmans M, Bryan T, Reddel R, Egholm M, Bachetti S, Martens U (1997) *Ciba Found Symp* 211: 209-218

48. McClintock B (1941) *Genetics* **26**: 234-282
49. Perrem K, Colgin LM, Neumann AA, Yeager TR, Reddel RR (2001) *Mol Cell Biol* **21**: 3862-3875
50. Bryant JE, Hutchings KG, Myozis RK, Griffith JK (1997) *Biotechniques* **23**: 476-478
51. Weis K, Rambaud S, Lavau C, Jansen J, Carvalho T, Carmo-Fonseca M, Lamond A, Dejean A (1994) *Cell* **76**: 345-356
52. Alcalay M, Tomassoni L, Colombo E, Stoldt S, Grignani F, Fagioli M, Szekely L, Helin K, Pelicci P G (1998) *Mol Cell Biol* **18**: 1084-1093
53. Mueller S, Matunis MJ, Dejean A (1998) *EMBO J* **17**: 61-70
54. La Morte VJ, Dyck JA, Ochs RL, Evans RM (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 4991-4996
55. Pearson M, Carbone R, Sebastiani C, Cioce M, Fagioli M, Saito S, Higashimoto Y, Appella E, Minucci S, Pandolfi PP, Pelicci PG (2000) *Nature* **406**: 207-210
56. Le S, Moore K, Haber JE, Greider CW (1999) *Genetics* **152**: 143-152
57. Rudin N, Sugarman E, Haber JE (1989) *Genetics* **122**: 519-534
58. McDonald JP, Rothstein R (1994) *Genetics* **137**: 393-405
59. Rattray AJ, Symington LS (1994) *Genetics* **138**: 587-595
60. Rattray AJ, Symington LS (1995) *Genetics* **139**: 45-56
61. Sugawara N, Ivanov EL, Fishman-Lobell J, Ray BL, Wu X, Haber JE (1995) *Nature* **373**: 84-86
62. Wold MS (1997) *Ann Rev Biochem* **66**: 61-92
63. Lombard DB, Guarente L (2000) *Cancer Res* **60**: 2331-2334
64. Wu G, Lee W-H, Chen P-L (2000) *J Biol Chem* **275**: 30618-30622
65. Zhu X-D, Kuster B, Mann M, Petrini JHJ, de Lange T (2000) *Nat Genet* **25**: 347-352
66. Stavropoulos DJ, Bradshaw PS, Li X, Pasic I, Truong K, Ikura M, Ungrin M, Meyn MS (2002) *Hum Mol Genet* **11**: 3135-3144
67. Kawabe T, Tsuyama N, Kitao S, Nishikawa K, Shimamoto A, Shiratori M, Matsumoto T, Anno K, Sato T, Mitsui Y, Seki M, Enomoto T, Goto M, Ellis N A, Die T, Furuichi Y, Sugimoto M (2000) *Oncogene* **19**: 4764-4772
68. Huang RP, Fan Y, Ni Z, Mercola D, Adamson ED (1997) *J Cell Biochem* **66**: 489-499
69. Suzuki N, Shiratori M, Goto M, Furuichi Y (1999) *Nucleic Acids Res* **27**: 2361-2368
70. Wu L, Davies SL, North PS, Goulaouic H, Riou JF, Turley H, Gatter KC, Hickson ID (2000) *J Biol Chem* **275**: 9636-9644
71. Lallemand-Breitenbach V, Zhu J, Puvion F, Koken M, Honore N, Doubeikovsky A, Duprez E, Pandolfi P P, Puvion E, Freemont P, De The H (2001) *J Exp Med* **193**: 1361-1372
72. Yeager TR, Neumann AA, Englezou A, Huschtscha LI, Noble JR, Reddel RR (1999) *Cancer Res* **59**: 4175-4179
73. Ogino H, Nakabayashi K, Suzuki M, Takahashi E-I, Fujii M, Suzuki T, Ayusawa D (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **248**: 223-227
74. Tokutake Y, Masumoto T, Watanabe T, Maeda S, Tahara H, Sakamoto S, Niida H, Sigumoto M, Ide T, Furuichi Y (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **247**: 765-772
75. Katoh M, Komeyama M, Kugoh H, Shimizu M, Oshimura M (1998) *Mol Carcinog* **21**: 17-25
76. Ogata T, Oshimura M, Namba M, Fujii M, Oishi M, Ayusawa D (1995) *Jpn J Cancer Res* **86**: 35-40
77. Nosek J, Tomaska L, Fukuhara H, Suyama Y, Kovac L (1998) *Trends Genet* **14**: 184-188
78. Teng CS, Chang J, McCowan B, Zakian AV (2000) *Mol Cell* **6**: 947-952
79. Lundblad V, Blackburn EH (1993) *Cell* **73**: 347-360
80. Reddel RR, Bryan TM, Colgin LM, Perrem KT, Yeager TR (2001) *Radiat Res* **155**: 194-200
81. Dunham MA, Neumann AA, Fasching CL, Reddel RR (2000) *Nat Genet* **26**: 447-450
82. Bosco G, Haber JE (1998) *Genetics* **150**: 1037-1047
83. Rizki A, Lundblad V (2001) *Nature* **411**: 713-716
84. Arkhipova IR, Morrison HG (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 14497-14502
85. Chan CS, Tye BK (1983) *J Mol Biol* **168**: 505-523
86. Bucholtz M, Park Y, Lustig AJ (2001) *Mol Cell Biol* **21**: 6559-6573
87. Teng CS, Zakian VA (1999) *Mol Cell Biol* **19**: 8083-8093
88. Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, Yamaguchi-Iwai Y, Shinohara A, Takeda S (1998) *EMBO J* **17**: 5497-5508
89. Natarajan S, McEachern MJ (2002) *Mol Cell Biol* **22**: 4512-4521
90. Bryan TM, Reddel RR (1997) *Eur J Cancer* **33**: 3868-3874
91. Ford LP, Zou Y, Pongracz K, Gryaznov SM, Shay JW, Wright WE (2001) *J Biol Chem* **276**: 32198-32203
92. Baird DM, Jeffreys AJ, Royle NJ (1995) *EMBO J* **14**: 5433-5443
93. Dessain SK, Yu H, Reddel RR, Beljersbergen RL, Weinberg RA (2000) *Cancer Res* **60**: 537-541
94. Kilian A, Bowtell DD, Abud HE, Hime GR, Venter D J, Kesse PK, Duncan EL, Reddel RR, Jefferson RA (1997) *Hum Mol Genet* **6**: 2011-2019
95. Colgin LM, Wilkinson C, Englezou A, Kilian A, Robinson MO, Reddel RR (2000) *Neoplasia* **2**: 426-432
96. Martens UM, Chavez EA, Poon SS, Schmoor C, Lansdorp PM (2000) *Exp Cell Res* **256**: 291-299
97. Herrera E, Martinez C, Blasco MA (2000) *EMBO J* **19**: 472-481
98. Lee HW, Blasco MA, Gottlieb GJ, Horner JW, Greider CW, DePinho RA (1998) *Nature* **392**: 569-574
99. Mergny J-L, Riou J-F, Mailliet P, Teulade-Fichou M-P, Gilson E (2002) *Nucl Acids Res* **30**: 839-865
100. Kim J-H, Lee GE, Kim J-C, Lee JH, Chung I K (2002) *Mol Cells* **13**: 228-236
101. Stewart SA, Hahn WC, O'Connor BF, Banner EN, Lundberg AS, Modha P, Mizuno H, Brooks MW, Fleming M, Zimonjic DB, Popescu NC, Weinberg RA (2002) *Proc Natl Acad Sci* **99**: 12606-12611
102. Chang S, Khoo CM, Naylor ML, Maser RS, DePinho RA (2003) *Genes Dev* **17**: 88-100

Inhibitor kinaz tyrozynowych STI571 — nadzieja na przełom w leczeniu białaczek?

Tyrosine kinase inhibitor STI571 — a breakthrough in leukemias treatment?

AGNIESZKA CZECHOWSKA¹, JANUSZ BŁASIAK²

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Onkogenne kinazy tyrozynowe
- III. Inhibitor STI571
- IV. Struktura kompleksu c-ABL:STI571
- V. STI571 w leczeniu białaczek
 - V-1. Rozwój strategii leczenia
 - V-2. Oporność i skutki uboczne
 - V-3. Oddziaływanie z innymi lekami
- VI. STI571 w leczeniu innych nowotworów
- VII. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Oncogene tyrosine kinases
- III. STI571 inhibitor
- IV. Structure of the c-ABL:STI571 complex
- V. STI571 in treatment of leukemias
 - V-1. Development of treatment strategy
 - V-2. Resistance and side effects
 - V-3. Interaction with other drugs
- VI. STI571 in treatment of other cancer
- VII. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: ABL, ARG, FLT-1, c-SRC, c-MET — niereceptorowe kinazy tyrozynowe; AGP — kwaśna glikoproteina α -1; ALK, HER-2, KDR — receptorowe kinazy tyrozynowe (RTK); ALL — ostra białaczka limfoblastyczna; AML — ostra białaczka szpikowa; Bcl-xl — białko hamujące apoptozę; BCR — region złamań chromosomu 22; CML — przewlekła białaczka szpikowa; CMML — przewlekła białaczka mieloblastyczna; DFG — peptyd asparagina-fenylalanina-glicyna; EGFR — receptor naskórkowego czynnika wzrostu; *erbB-2*, *RET* — protoonkogeny komórkowe; HU — hydroksymocznik; INF — interferon- α ; JAK — kinazy cytoplazmatyczne z rodziny Janus; KIT — receptor z aktywnością kinazy tyrozynowej; MAP — białka stowarzyszone z mikrotubulami; *MDR-1* — gen oporności wielolekowej; NPM — fosfoproteina jądrowa; PDFGR β — receptor czynnika wzrostu pochodzącego z płytek krwi; PKC, PKA — kinazy serynowo-treoninowe; Ph — chromosom Filadelfia; PgP — białko odpowiedzialne za oporność wielolekową; PTK — białkowe kinazy tyrozynowe; RAD51 — ludzki homolog bakteryjnego RecA biorący udział w naprawie DNA przez rekombinację homologiczną; SCF — czynnik wzrostu komórek pnia, ligand dla receptora c-KIT; STAT5, TEL, c-FOS — czynniki transkrypcyjne

I. Wprowadzenie

Realizacja projektu sekwencjonowania genomu człowieka przyniosła zaskakującą informację, że około 20% naszych genów koduje produkty biorące udział w przesyłaniu sygnałów w komórkach. Głównymi modulatorami tych procesów są reakcje fosforylacji/defosforylacji, w których reszta fosforanowa ulega enzymatycznemu przemieszczeniu z jednego białka komórki do drugiego, mogące aktywować i inaktywować sygnały. Fosforylacja może być prowadzona przez kinazy, a defosforylacja przez fosfatazy. Dotychczas opisano ponad 500 kinaz i 150 fosfataz. a jedną z grup kinaz są kinazy tyrozynowe (PTK) fosforylujące tyrozinę docelowego białka. Do tej pory poznano 90 takich kinaz, lecz można oczekiwać, że ich liczba jest większa. Enzymy te można sklasyfikować jako transbłonowe (receptorowe), przekazujące sygnały od receptorów błonowych do wnętrza komórki, oraz cytoplazmatyczne niereceptorowe kinazy tyrozynowe, przejmujące sygnały wewnątrzkomórkowe. Niektóre nowotwory złośliwe, przede wszystkim białaczki, charakteryzują się ekspresją białek wykazujących aktywność kinaz tyrozynowych, w tym BCR/ABL i c-KIT. W porównaniu z komórkami prawidłowymi, białka te wykazują zwiększoną aktywność enzymatyczną, w wyniku czego w

¹Studentka IV r. biochemii, ²prof. dr hab., Katedra Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź, e-mail januszb@biol.uni.lodz.pl

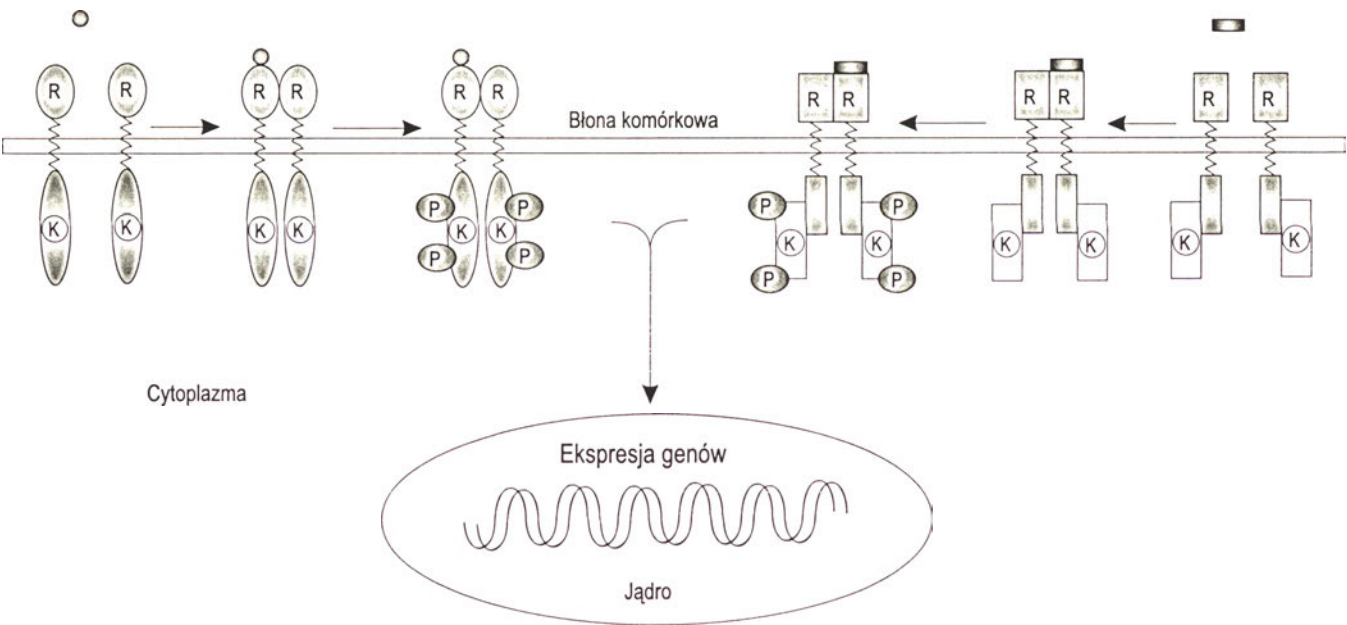
sposób niewłaściwy przejmują i przekształcają wewnątrzkomórkowe sygnały transkrypcji, proliferacji i apoptozy, zakłócając prawidłowy przebieg procesów komórkowych, tym samym przyczyniając się do powstawania fenotypu nowotworowego. Wydaje się zatem, że te i inne specyficzne dla nowotworów złośliwych białka o aktywności kinazy tyrozynowej mogą być celem molekularnej terapii skierowanej przeciwko tym chorobom. W tym kontekście wprowadzenie na rynek farmaceutyczny inhibitora przekazywania sygnałów, który preferencyjnie hamuje aktywność kinazy tyrozynowej produktów protoonkogenów *ABL*, *c-KIT* i płytkowego czynnika wzrostu można wiązać z nadzieją na przełom w leczeniu białaczek i innych nowotworów złośliwych.

II. Onkogenne kinazy tyrozynowe

W regulacji przesyłania sygnałów komórkowych biorą udział dwa rodzaje PTK: receptorowe i cytoplazmatyczne (Ryc. 1). Pierwsze są zakotwiczone w błonie komórkowej dzięki domenie transbłonowej o

do jądra, gdzie ulegną ekspresji określone geny. Wśród cytoplazmatycznych PTK wyróżnia się kinazy związane z określonymi receptorami, które ulegają aktywacji w wyniku przyłączenia liganda do receptora i kinazy wolne, aktywowane przez wpływ jonów do komórki lub w czasie przejścia komórki z jednego stadium cyklu komórkowego do drugiego. Mechanizm aktywacji i działania kinaz niereceptorowych jest prawie taki sam jak kinaz receptorowych. Cechą wspólną kinaz receptorowych i cytoplazmatycznych, związaną z pełnioną funkcją, jest obecność charakterystycznej domeny katalitycznej. Do jej najważniejszych elementów należy zaliczyć miejsce wiązania ATP, będącego donorem grup fosforanowych, i miejsce wiążące substrat, do którego kinaza przenosi grupy fosforanowe z ATP [1].

Aktywność fosforylacyjna kinaz tyrozynowych w komórce jest kontrolowana przez fosfatazy tyrozynowe, które odłączając grupy fosforanowe od kinaz oraz substratów kinaz, inaktywują je. Jednakże pewne mechanizmy umożliwiają kinazom wyłamywanie się spod tej kontroli i przesyłanie w sposób ciągły sy-



Ryc. 1. Przesyłanie sygnału przez kinazy tyrozynowe. Po lewej stronie — kinazy receptorowe, po prawej — cytoplazmatyczne związane z receptorami. K — domena katalityczna kinazy, P — grupa fosforanowa, R — receptor (na podstawie [1]).

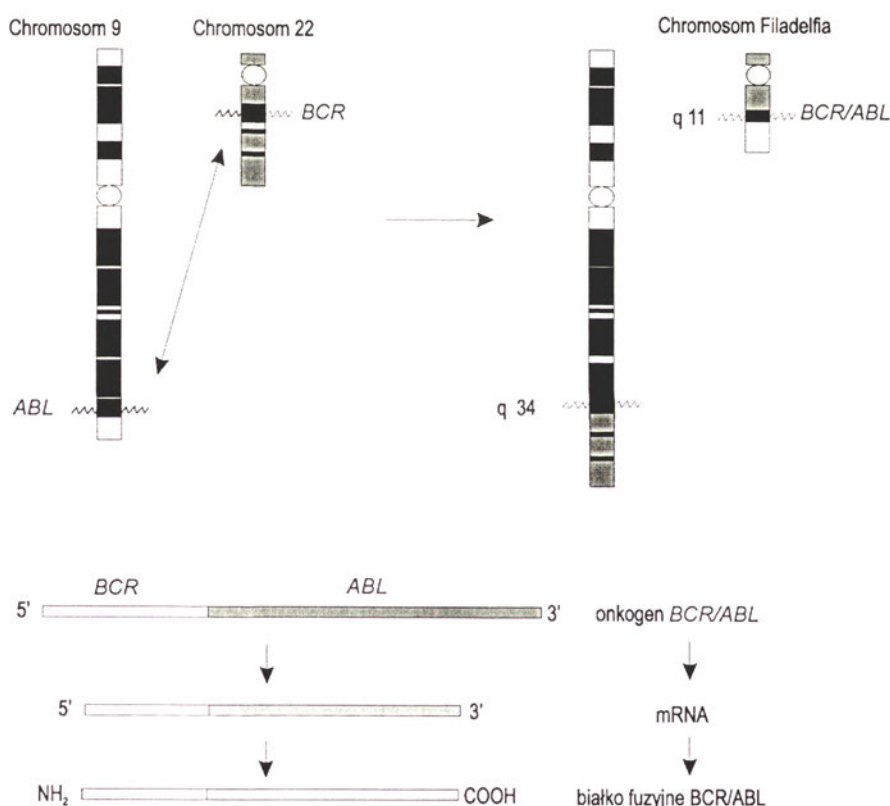
charakterze hydrofobowym i odbierają sygnały zewnątrzkomórkowe przez związanie liganda z domeną zewnątrzkomórkową, w wyniku czego następuje aktywacja domeny cytoplazmatycznej. Pierwszym etapem aktywacji jest dimeryzacja receptorów i zmiana ich konformacji, drugim — autofosforylacja. Procesy te zapoczątkowują kaskadę reakcji fosforylacji, w wyniku których aktywowane są kolejne białka do momentu, aż sygnał zostanie przekazany

gnału na przykład do proliferacji, czego efektem może być inicjacja transformacji nowotworowej. Onkogenny charakter kinaz może być spowodowany mutacjami. W wyniku translokacji chromosomowych, geny kinaz tyrozynowych ulegają fuzji z innymi genami, dając kinazy fuzyjne o zwiększonej aktywności w porównaniu z kinazami typu dzikiego. Natomiast do nabycia zdolności do dimeryzacji lub autofosforylacji, bez związania liganda z recepto-

rem, najczęściej przyczyniają się delecje lub mutacje punktowe w obrębie domeny zewnątrzkomórkowej, transbłonowej lub cytoplazmatycznej [1].

Podwyższoną aktywność onkogennej kinazy tyrozynowej, w stosunku do kinazy typu dzikiego, obserwuje się w przypadku produktu onkogenu *BCR/ABL*, występującego w niektórych białaczkach. Onkogen ten powstaje w wyniku translokacji między długimi ramionami chromosomów 9 i 22 (t(9;22) (q34;q11)) (Ryc. 2) [2]. Efektem jest powstanie chromosomu Filadelfia*, występującego w około 95% przypadków przewlekłej białaczki szpikowej (CML) i około 10% przypadków ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL) [3]. Pęknięcia w obu chromosomach, zapoczątkowujące translokację, mają miejsce w obrębie genów *BCR* i *c-ABL*. Ciągłość chromosomu 9 zostaje przerywana w protoonkogenie *c-ABL*, którego większy fragment jest przenoszony do *locus* genu *BCR* w

sie: 180, 185-190, 203, 210 i 230 kDa. Wszystkie te białka mają aktywność enzymatyczną kilkakrotnie większą od tej, jaką wykazuje kinaza *c-ABL*, jednak jej poziom jest zróżnicowany, co może być związane z różnymi postaciami białaczek [5]. Do cech odróżniających kinazę tyrozynową *BCR/ABL* od *c-ABL*, a mających prawdopodobnie duży wpływ na jej właściwości onkogenne, należy również zaliczyć: zdolność fosforylacji białek nie rozpoznawanych przez *c-ABL*, preferencyjna lokalizacja cytoplazmatyczna (*c-ABL* występuje w cytoplazmie, jak również w jądrze), stymulacja naprawy uszkodzeń DNA wywołanych przez leki przeciwnowotworowe oraz promieniowanie jonizujące, jak również hamowanie procesu apoptozy. Dodatkowo komórki *BCR/ABL*⁺, w porównaniu z komórkami prawidłowymi, wykazują proliferację niezależną od czynników wzrostu [3].



Ryc. 2. Powstanie chromosomu Filadelfia w wyniku translokacji pomiędzy chromosomami 9 i 22 (góra) dającej gen fuzyjny *BCR/ABL* ulegający ekspresji do onkogennej kinazy tyrozynowej *BCR/ABL* (dół).

chromosomie 22 [4]. Ponieważ pęknięcia te mogą powstawać w kilku różnych miejscach genów *BCR* i *c-ABL*, powstały gen fuzyjny *BCR/ABL* może mieć różną długość i kodować białka fuzyjne o różnej ma-

Oprócz fuzji z genem *BCR*, onkogen *c-ABL* może również ulegać połączeniu z genem *TEL* chromosomu 12. W wyniku tej translokacji powstaje onkogenna kinaza tyrozynowa *TEL/ABL*, indukująca transdukcję sygnału w sposób podobny do *BCR/ABL*. Onkogen *TEL/ABL* ulega ekspresji w białaczkach, głównie ALL i AML [1].

c-KIT jest onkogeną kinazą tyrozynową, należącą do grupy kinaz receptorowych. W jego budo-

wie wyróżnia się domeny cytoplazmatyczną, międzybłonową i zewnątrzkomórkową, wiążącą czynnik wzrostu odgrywający ważną rolę w procesie hematopoezy (SCF) [6, 7]. W wyniku przyłączenia liganda, do jądra komórkowego dociera sygnał do aktywacji genów biorących udział w regulacji wzrostu komórki. W przypadku raka jelita cienkiego obserwuje się spontaniczną dimeryzację i aktywację receptora, niezależną od obecności SCF [8]. Przyczyną jest mutacja w rejonie kodującym domenę transbłonową. Zmiana może mieć różny charakter, jednak najczęściej obserwuje się mutację, prowadzącą do zastąpienia glicyny przez walinę w pozycji 559 lub delecję siedmiu aminokwasów. Podobnie jak w przypadku genu *BCR/ABL*, zwiększona aktywność nadaje receptorowi c-KIT charakter onkogeny [6]. Mutację w obrębie c-KIT obserwuje się również w przypadku drobnokomórkowego raka płuc, raka prostaty, w guzach piersi, szyjki macicy i jajników [6, 8].

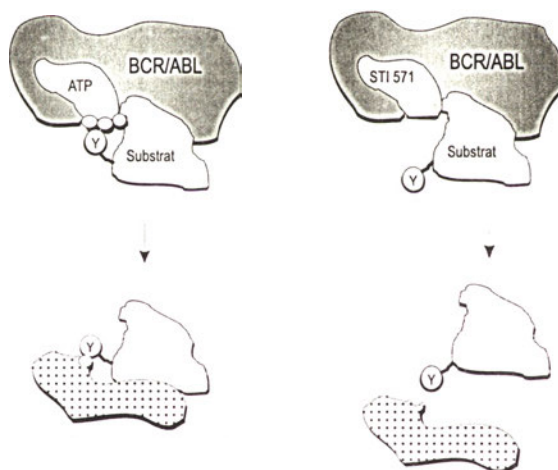
Do receptorowych kinaz tyrozynowych można również zaliczyć *PDGFR β* (receptor β czynnika wzrostu pochodzącego z płytek krwi) i *ALK*, które, podobnie jak c-ABL, mogą ulec fuzji z produktem innego genu — *PDGFR β* z *TEL*, a *ALK* z *NPM*, czego efektem jest inicjacja transformacji nowotworowej. Natomiast dla protoonkogenów *RET* i *erbB-2*, kodującego EGFR (receptor naskórkowego czynnika wzrostu), decydujące znaczenie ma mutacja punktowa prowadząca do zastąpienia jednego aminokwasu innym w domenie zewnątrzkomórkowej lub cytoplazmatycznej receptora *RET* oraz transbłonowej EGFR. Również delecja domeny zewnątrzkomórkowej EGFR może być przyczyną zwiększonej aktywności receptora, niezależnej od liganda, co wpływa na przesyłanie w sposób ciągły sygnału do wzrostu komórki [1].

Ze względu na związek onkogeny kinaz tyrozynowych z procesem nowotworzenia, hamowanie aktywności tych białek może mieć kluczowe znaczenie w leczeniu nowotworów. Miejsce wiążące ATP, ze względu na powszechność występowania w domenie katalitycznej kinaz, może być głównym celem leku skierowanego przeciwko onkogennej kinazie [9]. Pomimo tego, że miejsce wiążące ATP jest wysoce zachowanym motywem, udało się zaprojektować i zsyntetyzować wiele cząsteczek współzawodniczących z ATP, w tym: STI571 (Gleevec, Glivec, *imatinib mesylate*), hamujący aktywność c-ABL czy PKI 166, skierowany przeciwko EGFR i HER2. Kinazy wykazują duże podobieństwo w budowie, gdy są w konformacji aktywnej, jednak po przyjęciu konformacji nieaktywnej różnią się na tyle, by mogły zostać rozróżnione przez inhibitor. Dzięki temu możli-

we stało się selektywne hamowanie kinaz tyrozynowych przy użyciu małych cząsteczkowych inhibitorów o budowie zbliżonej do cząsteczki ATP [9, 10]. Alternatywną strategią może być użycie przeciwciał monoklonalnych, skierowanych przeciwko swoistym kinazom tyrozynowym, pełniącym rolę antygeny. Obecnie najlepiej poznany jest herceptin — przeciwciało monoklonalne skierowane przeciwko receptorowi Her-2/neu, którego zwiększony poziom obserwuje się w raku piersi [10].

III. Inhibitor STI571

Dzięki możliwości współzawodniczenia z cząsteczką ATP, inhibitor STI571 działa antagoniście względem niektórych kinaz tyrozynowych. Specyficzne hamowanie aktywności onkogennej kinazy tyrozynowej *BCR/ABL*, poprzez fizyczne blokowanie miejsca wiążącego ATP, uniemożliwia przenoszenie grup fosforanowych z ATP na tyrozinę substratu. W efekcie zapobiega to procesowi nieprawidłowego przekazywania sygnałów w komórkach białaczkowych (Ryc. 3), między innymi do podziałów komórkowych [11].

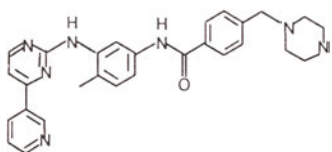


Ryc. 3. Mechanizm oddziaływania STI571 z onkogenną kinazą tyrozynową *BCR/ABL*. Obszar kropkowany — białko biorące udział w przesyłaniu sygnału, na które substrat kinazy *BCR/ABL* przenosi grupę fosforanową, Y — tyrozyna (na podstawie [11]).

Pierwotnie cząsteczka STI571 została nazwana CGP 57-148B, jednak ze względu na jej udział w hamowaniu przesyłania sygnału w komórce przez inaktywację onkogennej kinazy tyrozynowej c-ABL, nazwę zmieniono na STI571 (ang. *signal transduction inhibitor 571*) [11]. Lek ten został zaprojektowany przez firmę Novartis i jest znany jako Gleevec, Glivec lub *imatinib mesylate* [9].

Pod względem chemicznym, STI571 jest pochodną 2-fenylaminopirymidyny (Ryc. 4). Główny składnik tego związku został zidentyfikowany w

trakcie procesu poszukiwania inhibitorów kinazy białkowej C [9, 12-14]. Do rdzenia cząsteczki, który stanowi pochodna fenyloaminopirymidyny, z jednej strony został przyłączony pierścień pirydynowy w pozycji 4' pirymidyny, który zwiększył aktywność cząsteczki jako inhibitora w komórce. Z drugiej strony do pierścienia fenyłowego przyłączona jest grupa amidowa, odpowiedzialna za hamowanie aktywności kinaz tyrozynowych i grupa metylowa, znosząca niepożądaną aktywność przeciwko kinazie białkowej C. Elementem, zwiększającym zarówno rozpuszczalność jak i dostępność STI571 w komórce, okazał się być wysoce polarny łańcuch boczny, którym jest N-metylopiperazyna, przyłączona do grupy amidowej [14]. Wzór chemiczny takiej cząsteczki to $C_{30}H_{35}N_7SO_4$, natomiast jej masa molowa 589,7



Ryc. 4. Struktura chemiczna STI571.

g/mol. Średni czas półtrwania związku określa się na około 12-14 godzin [12].

W trakcie badania STI571 *in vitro*, wykryto jego aktywność jako inhibitora v-ABL. Nie stwierdzono natomiast hamowania fosforylacji kinaz serynowo-treoninowych (PKC, PKA), jak również innych kinaz tyrozynowych (EGFR, KDR, Flt-1, c-SRC, c-MET) [9, 15-17]. *In vivo*, oprócz hamowania autofosforylacji kinazy tyrozynowej v-ABL, inhibitor STI571 jest aktywny względem białek fuzyjnych ABL, takich jak: p210 BCR/ABL, p185 BCR/ABL i TEL/ABL. STI571 preferencyjnie hamuje sygnał pochodzący od zaktywowanego przez ligand receptora PDGFR β , autofosforylację receptora c-KIT oraz aktywację kinaz MAP w komórkach MO7e [9]. W obecności STI571 blokowana jest też ekspresja mRNA czynnika transkrypcyjnego c-FOS [12]. Ostatnio przeprowadzone badania dowiodły również wrażliwość kinazy ARG na STI571 [14].

Hamowanie autofosforylacji kinazy BCR/ABL jest ściśle związane z aktywnością antyproliferacyjną STI571. Proliferacja komórek wykazujących ekspresję onkogenu *BCR/ABL* może być selektywnie zablokowana przez inhibitor STI571, co kieruje je na drogę apoptozy. Również nowo powstałe komórki białaczkowe ze zidentyfikowanym chromosomem Filadelfia (Ph⁺), u pacjentów z CML i ALL wykazują wrażliwość na działanie antyproliferacyjne STI571 [9, 18, 19]. Indukcja apoptozy jest wynikiem hamowania aktywności białka STAT5 (ang. *signal*

transducer and activator of transcription 5), która jest podwyższona w komórkach wykazujących ekspresję onkogenu *BCR/ABL* [14, 20, 21]. Obecność STI571 zmniejsza zdolność STAT5 do aktywowania ekspresji antyapoptotycznego białka Bcl-x1 [14].

IV. Struktura kompleksu c-ABL:STI571

Dzięki badaniom krystalograficznym możliwe stało się dokładne opisanie sposobu przyłączania się inhibitora do kinazy, trójwymiarowej struktury kompleksu c-ABL:STI571, typu wiązań, które tworzy STI571 z c-ABL, jak również wyjaśnienie od czego zależy selektywność działania STI571 [22].

Cząsteczka inhibitora specyficznie rozpoznaje nieaktywną i nieufosforylowaną formę kinazy tyrozynowej c-ABL. Przyjęcie konformacji nieaktywnej odgrywa decydującą rolę w selektywnym przyłączeniu STI571, ponieważ taka konformacja różni się od konformacji nieaktywnej innych kinaz, takich jak c-SRC, względem których STI571 jest nieaktywny [23]. Różnice między konformacjami kinaz dotyczą głównie pętli aktywacyjnej. W przypadku konformacji aktywnej, pętla ta przyjmuje postać otwartą, w której jej część C-końcowa jest odsunięta od centrum katalitycznego, tworząc platformę ułatwiającą związanie substratu. Poza tym, taka konformacja otwarta umożliwia interakcję Asp w pozycji 381, będącej składnikiem ściśle zachowanego motywu DFG (Asp-Phe-Gly) w odcinku N-końcowym pętli, z jonami magnezu, koordynującymi grupy fosforanowe ATP. STI571 nie może zakotwiczyć się w domenie katalitycznej aktywnej kinazy c-ABL, gdyż zarówno pierścień fenyłowy jak i piperazynowy inhibitora kolidowałby z niektórymi aminokwasami pętli aktywacyjnej, a szczególnie z Asp-381 i Leu-384. W przypadku konformacji nieaktywnej, tworzącej kompleks z STI571, położenie pętli aktywacyjnej zmienia się w znaczący sposób. Część pętli, głównie ta otaczająca Tyr-393, która w tej strukturze jest nieufosforylowana, naśladuje substrat przyłączony do domeny katalitycznej c-ABL, czego efektem jest blokowanie miejsca aktywacji. Odcinek N-końcowy pętli, zawierający motyw Asp-Phe-Gly, ulega obróceniu w stosunku do aktywnej konformacji, w wyniku czego Phe-382 w motywie DFG, zamiast Asp-381, zostaje skierowana w stronę miejsca wiążącego ATP i właśnie ta zmiana położenia aminokwasów ma decydujące znaczenie dla wiązania STI571 [22, 24, 25].

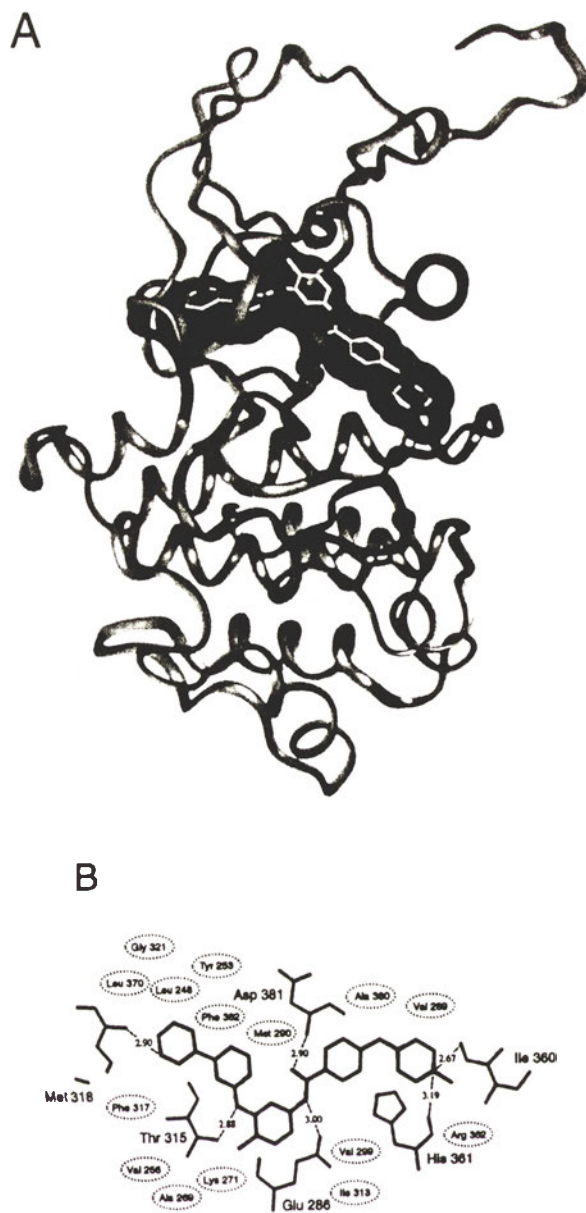
Domena katalityczna c-ABL, podobnie jak u innych kinaz tyrozynowych, ma strukturę, w której można wyróżnić płatek C (ang. *C-lobe*) i płatek N.

jednak największe znaczenie ma region międzypłatkowy, łączący oba płatki, gdyż zawiera on centrum katalityczne i kieszonkę dla ATP. Częsteczka inhibitora rozpoznaje domenę katalityczną i przyłącza się do szczeliny międzypłatkowej, w miejscu wiązania ATP, uniemożliwiając tym samym przejście kinazy c-ABL z konformacji nieaktywnej w aktywną (Ryc. 5A). Miejsce przyłączenia się pierścienia adeniny ATP zajmuje pierścień pirymidyny i pirydyny STI571, natomiast pozostała część inhibitora penetruje rdzeń kinazy. Ogólna liczba oddziaływań między inhibitorem a kinazą c-ABL wynosi 21, w tym 6 stanowią oddziaływania wodorowe, a 15 — van der Waalsa (Ryc. 5B). Jedno wiązanie wodorowe, utworzone w kompleksie c-ABL:STI571 przypomina jedno z dwóch wiązań jakie tworzy cząsteczka ATP z kinazą, a mianowicie wiązanie między azotem N1 pierścienia adeniny, a azotem grupy amidowej Met-318 w c-ABL. Brak drugiego z wiązań ze strony STI571, podobnego do tego tworzonego przez ATP, jest prawdopodobnie przyczyną umiejscowienia cząsteczki inhibitora bliżej wejścia do domeny katalitycznej, w porównaniu z pozycją wewnątrz tej domeny innych inhibitorów małocząsteczkowych [22].

W przypadku onkogennej kinazy tyrozynowej BCR/ABL, pętla aktywacyjna jest ufosforylowana i przyjmuje konformację otwartą, której STI571 nie rozpoznaje i nie jest w stanie inaktywować. Tak więc przyłączenie cząsteczki inhibitora jest możliwe dopiero po działaniu fosfataz komórkowych, neutralizujących na krótki okres aktywność BCR/ABL poprzez odłączenie grupy fosforanowej. Dopiero forma defosforyzowana jest wrażliwa na inhibitor STI571 i w wyniku jego przyłączenia ulega inaktywacji. Inną możliwością inaktywacji kinazy jest natychmiastowe przyłączenie się STI571 do nowo zsyntetyzowanego białka fuzyjnego BCR/ABL, zanim ulegnie ono aktywacji poprzez przyłączenie grupy fosforanowej [22].

V. STI571 w leczeniu białaczek

Największych możliwości zastosowania STI571 należy oczekiwać w przewlekłej białaczce szpikowej (CML) i ostrej białaczce limfoblastycznej (ALL) z wykrytym chromosomem Filadelfia, ze względu na obecność onkogennej kinazy tyrozynowej BCR/ABL, wykazującej wrażliwość na STI571. W CML możemy wyróżnić trzy fazy: pierwsza — faza przewlekła — trwa średnio od 4 do 6 lat. Druga — faza przyspieszona, trwająca do 1 roku, razem z trzecią — blastyczną, w której średni czas przeżycia wy-



Ryc. 5. A. Struktura kompleksu c-ABL:STI571. B. Schematyczny diagram przedstawiający oddziaływania pomiędzy STI571 a C-ABL. Wiązania wodorowe są przedstawione linią kropkowaną, natomiast pozycje aminokwasów białka tworzące wiązania van der Waalsa z inhibitorem są zaznaczone w kółeczku z kropkowanej linii (reprodukowano z *Cancer Res* 2002; 62: 4236-4243, za zgodą autora i wydawnictwa).

nosi 2-6 miesięcy, składają się na zaawansowaną fazę choroby [14].

V-1. Rozwój strategii leczenia

Od momentu zidentyfikowania głównego składnika inhibitora, które miało miejsce w 1990 roku, do zaaprobowania STI571 jako leku przeciw CML w USA minęło 11 lat. Zwykle czas ten jest o kilka lat dłuższy. Szczególnie krótki okazał się okres od rozpoczęcia pierwszych badań klinicznych nad STI571

do pojawienia się tego leku w sprzedaży, który wyniósł niecałe trzy lata [14].

Rok 1990 można uznać za początek historii STI571, bowiem wtedy, w trakcie poszukiwań inhibitorów białkowej kinazy C, zidentyfikowano główny składnik inhibitora — fenyloaminopirymidynę, która wykazuje właściwości podobne do leków przeciwnowotworowych i ma prostą budowę chemiczną (Ryc. 6) [14]. Wykorzystanie różnorodności podstawników w pozycji 4' pierścienia pirymidynowego i wprowadzenie grupy metylowej w pozycji 6' pierścienia fenyłowego doprowadziło do powstania związku, który utracił aktywność wobec białkowych kinaz C, a zyskał wobec kinaz tyrozynowych v-ABL, c-KIT i PDGFR [9]. Pierwsza partia STI571 została wyprodukowana w roku 1992 [14].

Aktywność inhibitora STI571 *in vivo* wykazano po raz pierwszy w roku 1996 w transformowanych komórkach myszy. Tydzień po wprowadzeniu syngenicznym myszom komórek linii limfoidalnej 32D, transformowanych genem *BCR/ABL*, rozpoczęto podawanie leku raz dziennie w dawce 2,5-50 mg/kg. Zaobserwowano zależne od dawki zahamowanie wzrostu nowotworu [14, 15]. Natomiast u myszy z implantowanymi komórkami KU812, którym podawano lek trzy razy dziennie w dawce 160 mg/kg przez 11 dni, obserwowano zablokowanie fosforylacji tyrozyny białka fuzyjnego BCR/ABL. W efekcie zwierzęta przeżywały, a nowotwór się nie rozwijał. Wyniki tych badań wskazują, że STI 571 może być aktywny u myszy mogących być traktowanych jako

modelowy układ ludzkiej przewlekłej białaczki szpikowej [9, 14, 26].

Badania kliniczne nad aktywnością STI571 u pacjentów chorych na CML rozpoczęto w czerwcu 1998 roku [14, 27, 28]. Pierwsza faza badań dotyczyła chorych w fazie przewlekłej, a później również blastycznej CML i polegała na podawaniu dawek od 25 do 1000 mg. Nie udało się określić dawki leku, powyżej której obserwowane byłyby efekty uboczne, aczkolwiek zaobserwowano pojawianie się takich efektów przy dawce 750 mg i wyższej [8, 14]. Najistotniejszy był jednak fakt, że 98% pacjentów osiągnęło całkowitą odpowiedź hematologiczną tzn. poziom białych krwinek we krwi powrócił do normy przy dawce 300 mg i wyższej [9, 14]. U dużej części pacjentów (w 65-99% przypadków) obserwowano również odpowiedź cytogenetyczną polegającą na zaniku chromosomu Filadelfia [9]. Na podstawie modelu matematycznego, opisującego relacje pomiędzy dawką leku, a odpowiedzią organizmu, ustalono, że optymalną ilością leku, która wywoła odpowiedź wynosi 400 mg i więcej. W czerwcu 1999 roku rozpoczęto drugą fazę badań. Udział w niej wzięło 532 pacjentów z późną fazą przewlekłą CML, u których wcześniejsza terapia interferonem zakończyła się niepowodzeniem. Chorym podawano lek w dawce 400 mg. Natomiast 235 pacjentom z przyspieszoną fazą CML i 260 pacjentom z kryzysem blastycznym podawano 600 mg STI571. Częstość odpowiedzi hematologicznej i cytogenetycznej zależała od fazy rozwoju choroby — rozpoczęcie podawania



Ryc. 6. Rozwój strategii stosowania STI571 (na podstawie [14]).

leku na wcześniejszym etapie rozwoju CML było związane z wyższą częstością [14].

Po przeprowadzonej w 2000 roku trzeciej fazie badań, w Stanach Zjednoczonych STI571 został zgłoszony przez firmę Novartis jako nowy lek przeciwko CML. Zdarzenie to miało miejsce w lutym 2001 roku, a już 10 maja 2001 roku STI571 został zaakceptowany przez FDA jako nowy lek w terapii przewlekłej białaczki szpikowej. W Europie i Japonii decyzję taką podjęto w październiku 2001 roku. W wyniku przeprowadzonych badań z udziałem pacjentów z nowotworami przewodu pokarmowego, w styczniu 2002 roku STI571 został wprowadzony w Stanach Zjednoczonych jako lek także przeciwko tego rodzaju nowotworom [14].

V-2. Oporność i skutki uboczne

Pomimo faktu, iż STI571 jest w stanie wywołać odpowiedź hematologiczną, jak i cytogenetyczną u większości pacjentów z CML, to niestety dzieli on z innymi lekami przeciwnowotworowymi niepożądane cechy, do których należy rozwój oporności czy wywoływanie niekorzystnych skutków ubocznych.

Zjawisko nabywania przez komórki nowotworowe oporności na selektywnie działające leki, do których należy STI571, związane jest w głównej mierze z niestabilnością genetyczną i liczbą komórek nowotworowych silnie proliferujących. Pierwszy z wymienionych czynników przyczynia się do powstawania różnych mutacji, w tym również tych odpowiedzialnych za oporność. Efektem może być powstanie klonu komórek niewrażliwych na lek. Tak więc stosowanie chemioterapii, mającej na celu zwiększenie niestabilności genetycznej komórek nowotworowych, przyczynia się prawdopodobnie do niepowodzeń w terapii lekami selektywnymi. Natomiast duża liczba komórek nowotworowych wiąże się z większym prawdopodobieństwem wystąpienia w jednej z nich mutacji odpowiedzialnych za oporność. Fakt ten wyjaśnia, dlaczego rozwój oporności dotyczy głównie pacjentów rozpoczynających terapię w zaawansowanej fazie choroby [29].

W CML mutacje punktowe mogą leżeć u podstaw mechanizmów oporności zależnych od BCR/ABL [14]. Badania pacjentów leczonych przy użyciu STI571, u których po pierwotnej odpowiedzi hematologicznej nastąpił nawrót choroby, dowiodły pojawienia się u części z nich mutacji punktowych w domenie katalitycznej BCR/ABL. Jedną z nich okazała się mutacja T315I [30, 31]. Efektem jej jest zmiana położenia treoniny, która w typie dzikim tworzy

wiązania wodorowe z STI571, co ostatecznie uniemożliwia wiązanie inhibitora z domeną katalityczną zmienionej kinazy. Jednocześnie mutacja ta nie wpływa na wiązanie cząsteczki ATP, wobec czego, pomimo obecności inhibitora, białko fuzyjne BCR/ABL wykazuje wysoką aktywność enzymatyczną [32]. Inna mutacja punktowa, odkryta w ALL z chromosomem Filadelfia, polegała na podstawieniu kwasu glutaminowego w pozycji 255 lizyną (E255K). Podobnie jak we wcześniejszym przypadku, zmiany konformacyjne kinazy wpływają negatywnie jedynie na wiązanie STI571 [32-34]. Wykryto też inne mutacje punktowe w obrębie miejsca wiążącego ATP, które mogą przyczyniać się do powstania oporności na STI571, a należą do nich: M244V, Q252H, Y253H, Y253F, E255K, E255V, M351T oraz E355G. Mutacja w obrębie pętli aktywacyjnej dotyczy pozycji 396 i polega na zamianie histydyny na argininę [35].

Do innych przyczyn rozwoju oporności wobec STI571, związanych z reaktywacją kinazy BCR/ABL, należy amplifikacja genu *BCR/ABL*. W kilku przypadkach nawrotu choroby po terapii STI571 obserwowano pojawienie się dodatkowych chromosomów Filadelfia i chromosomów pierścieniowych z wieloma kopiami genu *BCR/ABL* [30]. Również stymulacja naprawy DNA przez BCR/ABL może przyczyniać się do rozwoju oporności [36-38]. Pęknięcia dwuniciowe DNA mogą być naprawiane poprzez rekombinację homologiczną z udziałem białka RAD51. W przypadku komórek białaczkowych, wykazujących ekspresję *BCR/ABL*, onkogenna kinaza tyrozynowa BCR/ABL oddziałuje z białkiem RAD51 i w ten sposób zwiększa efektywność naprawy pęknięć dwuniciowych, które mogą być wprowadzane przez różne leki przeciwnowotworowe oraz promieniowanie jonizujące [2].

Przyczyny rozwoju oporności upatruje się również w zwiększonej ekspresji genu *MDR-1*, kodującego białko odpowiedzialne za oporność wielolekową, PgP, dla którego STI571 jest substratem [14]. Efektem zwiększonej ekspresji tego białka może być zmniejszone pobieranie leku przez komórkę [39, 40]. Zastosowanie werapamilu (inhibitor PgP), w przypadku komórek LAMA84, wykazujących zwiększoną ekspresję PgP i oporność względem STI571, zwiększa wrażliwość tych komórek na lek [14].

Najwięcej kontrowersji budzi obecnie mechanizm oporności związany z łąčeniem się STI571 z białkiem AGP (ang. α -1 acid glycoprotein — kwaśna glikoproteina α -1) obecnym w surowicy. W przypadku zwiększenia poziomu AGP we krwi, cały STI571

mógłby być związany, a tym samym byłby niedostępny dla komórek białaczkowych [14, 41].

Ostatnio rozpatruje się również mechanizmy oporności niezwiązane z onkogeną kinazą BCR/ABL, w których oporność rozwija się, pomimo inaktywacji białka fuzyjnego. Zaliczyć można do nich nieprawidłową ekspresję genów niezwiązanych z BCR/ABL, która prowadzi do aktywacji szlaków przesyłania sygnału, w sposób niezależny od BCR/ABL lub aktywacji innych szlaków przekazywania sygnału [14].

Drugą negatywną cechą STI571 jest wywoływanie skutków ubocznych. Wśród łagodniejszych, ale częściej występujących wyróżniamy nudności, wymioty i kurecz mięśni, natomiast do rzadszych, lecz poważniejszych zalicza się uszkodzenia wątroby, neuropenię i trombopenię [14].

V-3. Oddziaływania z innymi lekami

Stosowanie w terapii przeciwnowotworowej jednego leku może być związane z rozwojem oporności. Aby temu zapobiec, stosuje się kombinację dwóch lub więcej leków, co oprócz opóźnienia nabywania oporności może wiązać się z efektem synergistycznym. Niektóre leki przeciwnowotworowe w połączeniu z innymi mają działanie jedynie addytywne, a czasami wręcz antagonistyczne [42].

Tradycyjne leczenie CML polega na transplantacji allogenicznych komórek macierzystych, terapii interferonem- α (INF) lub hydroksymocznikiem (HU). Transplantacja daje największą szansę przeżycia (około 65%), jednak ze względu na małą liczbę dawców, może poddać się jej tylko jedna trzecia chorych. Ogólny poziom wyleczenia jest bardzo niski (<20%) [43]. Dużą nadzieją dla chorych na CML stał się więc STI571. Jednak ze względu na możliwość rozwoju oporności i zbyt małą efektywność działania u niektórych pacjentów, coraz częściej pod uwagę brane jest leczenie z zastosowaniem dodatkowych leków przeciwbiałaczkowych. W celu potwierdzenia korzystnego wpływu na terapię kombinacji STI571 z innym lekiem, jak również wykluczenia antagonizmu obu związków, przeprowadzone zostały badania na liniach komórkowych wykazujących ekspresję onkogenu *BCR/ABL*. Pod uwagę brano oddziaływania STI571 z trzema grupami leków. Pierwszą grupę stanowią tradycyjne leki przeciwbiałaczkowe używane głównie w pierwszej fazie choroby, drugą chemioterapeutyki i promieniowanie jonizujące, natomiast ostatnia to czynniki biologiczne i nowe leki, które są obecnie testowane [42]. Połączenie STI571 z lekami pierwszej fazy choroby dotyczy interfe-

nu α , arabinozydu cytozyny (Ara-C), hydroksymocznika i busulfanu. W przypadku dwóch pierwszych leków, obserwuje się efekt synergistyczny lub addytywny. Obydwa w połączeniu z STI571 wzmagają aktywność antyproliferacyjną inhibitora i powodują wzrost frakcji komórek apoptycznych. Natomiast efekt hydroksymocznika lub busulfanu w połączeniu z STI571 ma charakter addytywny, a w niektórych przypadkach antagonistyczny, w związku z czym takie kombinacje nie mają zastosowania w klinice [42-44].

Chemioterapeutyki używane są powszechnie w terapii zaawansowanej fazy CML, choć czasami podawane są pacjentom w fazie przewlekłej. Efekt synergistyczny terapii kombinowanej z STI571 zaobserwowano dla nimustyny, decitabiny, karboplatyny, gemcitabiny, mafosfamidu, mitoksantronu i treosulfanu. W zależności od linii komórkowych i warunków eksperymentu dla daunorubicyny, winkrystyny i etopozytu efekt jest synergistyczny lub addytywny. Jedynie metotreksat i topotekan wpływają antagonistycznie na działanie STI571 [42, 44-46]. Choć obserwowany jest efekt synergistyczny, terapia kombinowana z chemioterapeutykami związana jest z szeregiem skutków ubocznych. W celu wyeliminowania tych niekorzystnych wpływów na organizm, często pod uwagę brane są związki, pełniące funkcję ochronne względem komórek prawidłowych. Takim czynnikiem może być amifostyna, która zwiększa poziom uszkodzeń DNA w komórkach *BCR/ABL*⁺ wywoływanych przez idarubicynę i jednocześnie działa ochronnie na komórki prawidłowe. Niestety w obecności STI571 amifostyna traci swoje korzystne właściwości. Wydaje się, że zastosowanie kombinacji STI571 z innymi lekami stworzy możliwość zmniejszenia efektów ubocznych chemioterapii [47]. Jeśli chodzi o promieniowanie γ , to w połączeniu z STI571 zaobserwowano silny efekt synergistyczny [42, 44].

Ostatnia grupa, to w głównej mierze inhibitory przesyłania sygnału, w tym: transferazy farnesyli, kinazy fosfatydyloinozytolu, kinazy JAK-2 i kinazy cyklino-zależnych, dla których obserwuje się efekt synergistyczny [42, 48]. Homoharringtonina - cytotoksyczny alkaloid hamujący przejście komórki z fazy G1 w S i z fazy G2 w M, jak również trójtlenek arsenu mogą działać synergistycznie lub addytywnie z STI571. Jedynym antagonistą okazał się inhibitor proteosomu, który powszechnie wywiera cytotoksyczny efekt na komórki nowotworowe [42].

Ponieważ mutacje w domenie katalitycznej kinazy c-ABL są częstą przyczyną oporności, szczególnie w fazie zaawansowanej choroby, zastosowanie

kombinacji STI571 z innym inhibitorem, na przykład PD180970, zmniejsza prawdopodobieństwo rozwoju oporności [42, 49].

VI. STI571 w leczeniu innych nowotworów

Dzięki różnorodności kinaz tyrozynowych, z którymi STI571 może oddziaływać, można rozważać stosowanie inhibitora w leczeniu nowotworów innych niż białaczki.

Białko c-KIT jest drugim, po kinazie BCR/ABL, ważnym celem STI571. Pełni ono funkcję błonowego receptora SCF (ang. *stem cell factor*). W przypadku kilku nowotworów stwierdzono zwiększoną aktywność c-KIT, niezależną od obecności liganda, będącą wynikiem mutacji w obrębie genu kodującego to białko. Do tych chorób należą nowotwory złośliwe przewodu pokarmowego, pochodzące prawdopodobnie od tego samego prekursora, co śródmiąższowe komórki Cajala [8, 14]. W trakcie badań *in vitro* na komórkach, wykazujących ekspresję genu c-KIT, stwierdzono zablokowanie fosforylacji receptora c-KIT i zahamowanie wzrostu komórek [50]. Badania kliniczne potwierdziły aktywność STI571 u pacjentów z guzami przewodu pokarmowego [51]. Obecnie prowadzone są badania kliniczne nad aktywnością STI571 u pacjentów z ekspresją c-KIT chorych na drobnokomórkowego raka płuc i ostrą białaczkę szpikową (AML) [14].

Trzecim, głównym celem STI571 jest receptora kinaza tyrozynowa PDGFR β . Zwiększoną aktywność tego receptora, niezależną od obecności liganda, opisano w przypadku przewlekłej białaczki mieloblastycznej (CMML, ang. *chronic myelomonocytic leukaemia*). Powstaje ona w wyniku translokacji chromosomalnej t(5;12), efektem której jest gen fuzyjny *TEL/PDGFR β* . Powstały w ten sposób receptor TEL/PDGFR β wykazuje wrażliwość na STI571 w badaniach *in vitro* i *in vivo*. Również w badaniach klinicznych u pacjentów z tą formą białaczki obserwuje się odpowiedź hematologiczną i cytogenetyczną po terapii STI571. Do innych nowotworów związanych z receptorem PDGF należą glejaki czy rak prostaty. Podobnie, jak poprzednio wspomniane choroby, poddawane są one badaniom klinicznym z inhibitorem kinaz tyrozynowych STI571 [14].

VII. Uwagi końcowe

Wśród możliwych strategii użycia STI571 w leczeniu białaczek charakteryzujących się ekspresją chromosomu Filadelfia, na plan pierwszy wybija się łącznie stosowanie inhibitora z tradycyjnymi chemio-

terapeutykami. Rozważane jest również połączenie STI571 z nowymi środkami terapii — przeciwciałami monoklonalnymi, modulacją odpowiedzi immunologicznej, wprowadzaniem limfocytów, czy interferonem α . Innymi przykładami terapii skierowanej przeciwko BCR/ABL są oligonukleotydy antysensowe, rybozymy i szczepionki przeciwrakowe i wydaje się, że STI571 mógłby być z powodzeniem wykorzystany jako pozytywny modulator takich strategii. Drugim, obok łącznego działania z innymi terapeutykami, wyzwaniem dla stosowania STI571 jest przełamywanie oporności komórek białaczkowych na ten związek. Wydaje się, istnieją szerokie możliwości wykorzystania STI571 w leczeniu innych nowotworów niż białaczki. Wymaga to jednak identyfikacji w tych chorobach kinaz tyrozynowych mających znaczenie dla nabywania fenotypu nowotworowego.

Wyniki badań przeprowadzonych w ostatnim czasie sugerują, że inhibitory kinaz tyrozynowych mogą być rozważane nie tylko jako środki terapii nowotworowej, ale także jako czynniki prewencji nowotworów. Genisteina, naturalny inhibitor kinaz tyrozynowych występująca w soi, może być odpowiedzialna za zmniejszoną częstość raka prostaty o wysokiej złośliwości, w krajach, w których stanowi ona ważny składnik diety. Genisteina może działać poprzez zwiększanie adhezji komórek nowotworowych, zmniejszając tym samym prawdopodobieństwo tworzenia przerzutów. Podobne działanie wykazywały inhibitory receptora nabłonkowego czynnika wzrostu. To, czy STI571 mógłby zostać wykorzystany w jakiś sposób w prewencji, jest oczywiście sprawą otwartą i wymagającą badań, jednakże przykład genisteiny i inhibitora EGFR, mogą być przesłankami do podjęcia takich badań.

Podziękowania

Praca wykonana w ramach projektu 3 P04A 032 25

Artykuł otrzymano 7 kwietnia 2003

Zaakceptowano do druku 3 lipca 2003

Piśmiennictwo

1. Kolibaba K S, Druker B J (1997) *Biochim Biophys Acta* **1333**: 217-248
2. Rowley J D (1973) *Nature* **243**: 290-293
3. Majsterek I, Błasiak J (2002) *Post Bioch* **48**: 156-166
4. Rowley J D (1990) *Cancer* **65**: 2178-2184
5. Lampert F, Harbott J, Ritterbach J (1991) *Klin Padiatr* **202**: 311-318
6. Linnekin D (1999) *IJBCB* **31**: 1053-1074
7. Ashman K L (1999) *IJBCB* **31**: 1037-1051

8. Verweij J, Judson I, van Oosterom A (2001) *Eur J Cancer* **37**: 1816-1819
9. Traxler P, Bold G, Buchdunger E, Caravatti G, Furet P, Manley P, O'Reilly T, Wood J, Zimmermann J (2001) *Med Res Rev* **21**: 499-512
10. Sawyers C L (2002) *Curr Opin Genet Dev* **12**: 111-115
11. Goldman J M (2000) *Lancet* **355**: 1031-1032
12. Drucker B J, Lydon N B (2000) *J Clin Inv* **105**: 3-7
13. Zimmermann J, Buchdunger E, Mett H, Meyer T, Lydon N, Traxler P (1996) *Bioorg Med. Chem Lett* **6**: 1221-1226
14. Capdeville R, Buchdunger E, Zimmermann J, Matter A (2002) *Nature Rev* **1**: 493-502
15. Drucker B J, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal G M, Fanning S, Zimmermann J, Lydon N B (1996) *Nat Med* **2**: 561-566
16. Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Mueller M, Drucker B J, Lydon N B (1996) *Cancer Res* **56**: 100-104
17. Buchdunger E, Cioffi C L, Law N, Stover D, Ohno-Jones S, Drucker B J, Lydon N B (2000) *J Pharmacol Exp Ther* **295**: 139-145
18. Beran M, Cao X, Estrov Z, Jeha Sjin G, O'Brien S, Talpaz M, Arlinghaus R B, Lydon N B, Kantarjian H (1998) *Clin Cancer Res* **4**: 1661-1672
19. Deininger M W N, Goldman J M, Lydon N B, Melo J V (1997) *Blood* **90**: 3691-3698
20. Goldman J M (1997) *Curr Opin Hematol* **4**: 277-285
21. Wisniewski D, Lambek C L, Liu C, Strife A, Veach D R, Nagar B, Yaung M A, Schindler T, Bornmann W G, Bertino J R, Kuriyan J, Clarkson B (2002) *Cancer Res* **62**: 4244-4255
22. Nagar B, Bornmann W G, Pellicena P, Schindler T, Veach D R, Miller W T, Clarkson B, Kuriyan J (2002) *Cancer Res* **62**: 4236-4243
23. Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller W T, Clarkson B, Kuriyan J (2000) *Science* **289**: 1938-1942
24. Knighton D R, Zheng J H, Ten Eyck L F, Ashford V A, Xuong N H, Taylor S S, Sowadski J M (1991) *Science* **253**: 407-414
25. Yamaguchi H, Hendrickson W A (1996) *Nature* **384**: 484-489
26. Le Coutre P, Mologni L, Cleris L, Marchesi E, Buchdunger E, Giardini R, Formelli F, Gambacorti-Passerini C (1999) *J Natl Cancer Inst* **91**: 163-168
27. Mughal T J, Goldman M J (2001) *Eur J Cancer* **37**: 561-568
28. Drucker B J, Talpaz M, Resta D J, Peng B, Buchdunger E, Ford J M, Lydon N B, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers C L (2001) *N Engl J Med* **344**: 1031-1037
29. Blagosklonny M V (2002) *Leukemia* **16**: 570-572
30. Gorre M E, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao N, Sawyers C L (2001) *Science* **293**: 876-880
31. Gorre M E, Shah N, Ellwood K, Nicoll J, Sawyers C L (2001) *Science* **293**: 2163a
32. Hofmann W K, Jones L C, Lemp N A, de Vos S, Gschaidmeier H, Hoelzer D, Ottmann O G, Koefler H P (2002) *Blood* **99**: 1869-1862
33. Barthe C, Cony-Makhoul P, Melo J V, Mahon J R (2001) *Science* **293**: 2163a
34. Hochhaus A, Kreil S, Corbin A, La Rosee P, Lahaye T, Berger U, Cross N C P, Linkesch W, Drucker B J, Hehlmann R (2001) *Science* **293**: 2163a
35. Hochhaus A, Kreil S, Corbin A, La Rosee P, Lahaye T, Berger U, Cross N C P, Linkesch W, Drucker B J, Hehlmann R (2002) *Leukemia* **16**: 2190-2196
36. Slupianek A, Hoser G, Majsterek I, Bronisz A, Malecki M, Fishel R, Blasiak J, Skorski, T (2002) *Mol Cell Biol* **22**: 4189-4201
37. Majsterek I, Blasiak J, Mlynarski W, Hoser G, Skorski T (2002) *Cell Biol Int* **26**: 363-370
38. Hoser G, Majsterek I, Romana DE, Slupianek A, Blasiak J, Skorski T (2003) *Leukemia Res* **27**: 267-273
39. Mahon F X, Deininger M W N, Schultheis B, Chabrol J, Reiffers J, Goldman J M, Melo J V (2000) *Blood* **96**: 1070-1079
40. Weisberg E, Griffin J D (2000) *Blood* **95**: 3498-3505
41. Gambacorti-Passerini C, Corneo G (2001) *Science* **293**: 2163a
42. Topaly J, Zeller W J, Fruehauf S (2002) *Br J Haemat* **119**: 3-14
43. Thiesing J T, Ohno-Jones S, Kolibaba K S, Drucker B J (2000) *Blood* **96**: 3195-3199
44. Topaly J, Fruehauf S, Ho A D, Zeller W J (2002) *Br J Haemat* **86**: 1487-1493
45. Fruehauf S, Topaly J, Laufs S, Zeller W J, Ho A D (2001) *Blood* **98**: 257b
46. Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Mano H, Sato Y, Honma Y, Furukawa Y (2001) *Blood* **97**: 1999-2007
47. Blasiak J, Gloc E, Pertyński T, Drzewoski J (2002) *Anti-Cancer Drugs* **13**: 1055-1060
48. Topaly J, Schad M, Zeller W J, Ho A D, Fruehauf S (2001b) *Blood* **98**: 617a
49. Dorsey J, Jove R, Kraker A J, Wu J (2000) *Cancer Res* **60**: 3127-3131
50. Attoub S, Rivat C, Rodrigues S, Van Bocxlaer S, Bedin M, Bruyneel E, Louvet C, Kornprobst M, Andre T, Marcel M, Mester J, Gespach C (2002) *Cancer Res* **62**: 4879-4883
51. Van Oosterom Allan, Judson I R, Verweij J, Stroobants S, Dumez H, di Paola E D, Sciort R, Van Glabbeke M, Dimitrijevic S, Nielsen O S (2002) *Eur J Cancer* **38**: S83-S87

Prokoagulant nowotworowy: charakterystyka biochemiczna oraz wpływ na rozwój choroby nowotworowej

Cancer procoagulant: biochemical characteristics and the influence on the development of neoplastic disease

MAŁGORZATA KAMOCKA¹, WOJCIECH P. MIELICKI²

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Charakterystyka prokoagulantu nowotworowego (CP)
 - II-1. Aktywność enzymatyczna CP (EC 3.4.22.26)
 - II-2. Struktura cząsteczki CP
 - II-3. Substraty dla CP
 - II-4. Występowanie CP
- III. Prokoagulant nowotworowy w chorobie nowotworowej
 - III-1. Wpływ CP na zaburzenia krzepnięcia krwi
 - III-2. CP jako nowy marker nowotworowy
 - III-3. Znaczenie CP dla wzrostu komórki nowotworowej
- IV. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: CCA-1 — aktywność prokoagulacyjna pochodząca z komórki nowotworowej; CP — prokoagulant nowotworowy; DFP — fluorofosforan diizopropylu; ECM — macierz zewnątrzkomórkowa; ELISA — test immunoenzymatyczny; PAR — receptory aktywowane proteolitycznie; PML — białaczka promielocytarna; PMSF-fenylometylosulfofluorek; TF — czynnik tkankowy

I. Wprowadzenie

Podwyższony potencjał proteolityczny, istotny między innymi dla migracji komórek, odgrywa kluczową rolę w przebiegu wielu procesów, zarówno fizjologicznych, jak i patologicznych. W przypadku nowotworów złośliwych stanowi podstawę ich inwazji i tworzenia przerzutów. Przyjmuje się, że krytyczną rolę w tym procesie odgrywa zjawisko degradacji składników macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) i błony podstawnej oraz kontrolowana adhe-

Contents:

- I. Introduction
- II. Characteristics of cancer procoagulant (CP)
 - II-1. Enzymatic activity of CP (EC 3.4.22.26)
 - II-2. Structure of CP molecule
 - II-3. Substrates for CP
 - II-4. Source of CP
- III. Cancer procoagulant in neoplastic disease
 - III-1. Effect of CP on blood coagulation disorders
 - III-2. CP as a new tumor marker
 - III-2. Influence of CP on the growth of neoplastic cell
- IV. Conclusion

zja do elementów ECM i innych komórek. W proces degradacji składników ECM zaangażowane są liczne proteazy uwalniane przez komórki nowotworowe i przylegające do guza komórki stromy [1-4]. Istotną rolę w tym procesie pełnią proteazy cysteinowe. Doświadczalnie wykazano nawet antynowotworowe działanie niektórych inhibitorów proteaz cysteinowych [5].

Proteazy cysteinowe występujące u ssaków można podzielić na dwie nadrodziny, z których pierwszą stanowią kaspazy, a drugą nadrodzina papainy. Kaspazy nie wykazują podobieństwa strukturalnego z nadrodziną papainy, jedyną cechą wspólną jest występowanie cysteiny w centrum aktywnym [5]. Nadrodzinę papainy dzieli się na trzy rodziny: kalpainy, hydrolazy bleomycyny i rodzinę papainy do której zaliczane są m.in. katepsyny.

Proteazą cysteinową, nie należącą jednak do żadnej z wymienianych wcześniej nadrodzin, jest również prokoagulant nowotworowy (ang. *CP: Cancer Procoagulant*). Wciąż brak wyczerpującej charakterystyki tego białka. Wydaje się jednak, że pełni ono istotną rolę w procesach wzrostu komórki nowotworowej, a co za tym idzie, w rozwoju choroby. Poniżej przedstawione zostaną poznane właściwości fizyko-

¹Mgr, ²dr hab, Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Katedra Chemii Farmaceutycznej i Biochemii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, 91-403 Łódź, ul. Muszyńskiego 1; tel. 042 677 9127, e-mail: mielicki@poczta.onet.pl

chemiczne CP, a także dane na temat jego roli w rozwoju nowotworu.

II. Charakterystyka prokoagulantu nowotworowego (CP)

II-1. Aktywność enzymatyczna CP (EC 3.4.22.26)

Aktywność prokoagulantu, mogącego bezpośrednio aktywować czynnik X osocznego układu krzepnięcia krwi, a zatem różnego od czynnika tkankowego (TF), opisana została po raz pierwszy w 1975 roku przez Gordona i wsp. [6]. Prokoagulant ten wykryty został w ekstrakcie z tkanki nowotworowej (doświadczalny rak V2 królika), nazwany więc został prokoagulantem nowotworowym (CP).

Ze względu na hamowanie aktywności prokoagulacyjnej przez preparaty diizopropylodifluorofosforanu (DFP), CP początkowo zaliczony został przez swoich odkrywców do grupy proteaz serynowych. W trakcie dalszych badań wykazano, że jest on jednak endopeptydazą cysteinową, a obserwowane wcześniej hamowanie przez DFP w rzeczywistości powodowane było przez niezdefiniowane zanieczyszczenia stosowanych preparatów handlowych tego inhibitora [7].

Do chwili obecnej poznano wiele inhibitorów, specyficznie lub niespecyficznie hamujących proteazy cysteinowe, jak i o szerokim spektrum działania, hamujących aktywność prokoagulacyjną CP (Tabela 1). Do grupy inhibitorów proteinaz cysteinowych należą: jodoacetamid, jony rtęci, E-64, jony cynku, peptydylodiazometyloketony i sole peptydylosulfoniowe [8]. Co ciekawe, stwierdzono, że E-64, uważany zazwyczaj za inhibitor nieodwracalny, hamuje aktywność prokoagulantu nowotworowego w sposób kompetycyjny [9, 10], a zatem odwracalny. Jedyną poznaną dotychczas proteazą cysteinową hamowaną odwracalnie przez E-64 jest clostripaina pochodząca z *Clostridium histolyticum* [11].

Z grupy inhibitorów proteaz o szerokim spektrum działania, aktywność CP hamują PMSF, leupeptyna i antypaina [12, 13]. Naturalne osocze inhibitory proteazowe, jak α_1 -antytrypsyna, α_1 -antychymotrypsyna, α_2 -makroglobulina i antytrombina III/heparyna nie wpływają w sposób istotny na aktywność CP. Nie zaobserwowano również hamowania aktywności prokoagulantu przez cystatynę, która jest silnym inhibitorem proteaz cysteinowych np. papainy, czy katepsyny B.

Stwierdzono, że z wyjątkiem jonów rtęci, większość inhibitorów prokoagulantu działa skuteczniej w obecności jonów CN^- oraz niewielkiego stężenia

Tabela 1

Inhibitory proteaz hamujące lub nie hamujące aktywności prokoagulantu nowotworowego (CP) [8,12,13]

Inhibitory proteinaz silnie hamujące aktywność CP	Inhibitory proteinaz nie hamujące, lub słabo hamujące aktywność CP
Jodoacetamid	α_1 -Antytrypsyna
E-64	α_1 -Antychymotrypsyna
HgCl_2	α_2 -Makroglobulina
Ketony peptydylodiazometylowe	Antytrombina III/heparyna
Ketony peptydylochlorometylowe	DFP
Ketony peptydylotrifluorometylowe	CBZ-Val-Phe-H
Sole peptydylodimetylosulfoniowe	Cystamina
Leupeptyna	Cystatyna
Antypaina	
PMSF	
2-winylopirydyna	

cysteiny, wprowadzającej do środowiska reakcji wolne grupy sulfhydrylowe (-SH) [13].

Aktywność CP wymaga bezwzględnie obecności w środowisku reakcji jonów wapniowych (Ca^{2+}), których optymalne stężenie wynosi około 7 mmol/L przy pH w zakresie 6,9-7,2 [14]. Jony Mg^{2+} , Mn^{2+} i Cd^{2+} mogą zastępować jony wapniowe aktywując prokoagulant, natomiast jony Fe^{2+} , Zn^{2+} , Sn^{2+} i Cu^{2+} działają jako inhibitory tego enzymu [10, 15]. Jony metali dwuwartościowych nie biorą bezpośrednio udziału w reakcji aktywacji czynnika X przez CP, odpowiedzialne są jednak za prawidłową (aktywną) strukturę przestrzenną cząsteczki prokoagulantu. Po związaniu prokoagulantu nowotworowego na podłożu stałym przez przeciwciała monoklonalne, które nie hamowało jego aktywności, obserwowano brak jakiegokolwiek wpływu jonów diwalentnych na aktywność CP [15]. Prawdopodobnie immunoimobilizacja prokoagulantu w wystarczający sposób zmieniała jego konformację, prowadząc do aktywacji centrum aktywnego tego enzymu.

II-2. Struktura cząsteczki CP

Z uwagi na trudności związane z wyizolowaniem homogennego preparatu prokoagulantu nowotworowego nie udało się do tej pory określić jego struktury: nieznana jest jego sekwencja aminokwasów, nie wyizolowano mRNA, nieznany jest również gen kodujący to białko.

Według F a l a n g i i G o r d o n a [16] CP jest jednolącuchową proteazą cysteinową o masie cząsteczkowej 68 kDa, punkcie izoelektrycznym 4,8, składającą się z 674 aminokwasów, wśród których przeważają: seryna (19,1%), glicyna (18,7%) i kwas glutaminowy (12,5%). W cząsteczce CP nie stwierdzono obecności węglowodanów.

Pośrednio wykazano, że prokoagulant nowotworowy zawiera w cząsteczce kwas γ -karboksylglutaminowy (Gla). Stwierdzono, że niedobór witaminy K, indukowany farmakologicznie warfaryną u królików obciążonych guzem V2, powodował utratę właściwości enzymatycznych prokoagulantu nowotworowego, mimo że antygen CP był obecny w badanych ekstraktach z tego guza. Doświadczenie to sugeruje, że CP może ulegać potranslacyjnej modyfikacji, polegającej na katalizowanym przez zależną od witaminy K γ -karboksylazę przyłączeniu dodatkowej reszty karboksylowej do glutaminianu w łańcuchu polipeptydowym prokoagulantu [17].

Domeny białek zawierające reszty Gla odpowiedzialne są za wiązanie metali dwuwartościowych (najczęściej jonów Ca^{2+}). Wykazano, że w cząstecz-

ce prokoagulantu występuje miejsce wiążące jony metali o wysokim powinowactwie do wapnia i manganu, oraz inne, o wysokim powinowactwie do manganu i kadmu [10, 15].

II-3. Substraty dla CP

Jedynym poznanym dotychczas fizjologicznym substratem dla CP jest czynnik X układu krzepnięcia krwi. Prokoagulant nowotworowy aktywuje go *in vitro* hydrolizując wiązanie peptydowe pomiędzy Tyr-21, a Asp-22 [18]. Inne znane aktywatory czynnika X, jak czynnik IXa, TF/VIIa i jad żmii Russela, zrywają w czynniku X wiązanie peptydowe przy argininie-52, zatem czynnik Xa powstały pod wpływem CP różni się budową od czynnika Xa powstałego pod wpływem innych aktywatorów.

Syntetycznymi substratami dla CP są peptydy zawierające argininę lub lizynę w pozycji P1 i prolinę w pozycji P2 (Tabela 2). Sekwencja: -Pro-Arg- lub -Pro-Lys- od N-końca hydrolizowanego wiązania jest raczej charakterystyczna dla proteaz serynowych, a nie cysteinowych. Również syntetyczne substraty peptydowe dla proteaz cysteinowych (katepsyny i papainy) nie są hydrolizowane przez CP. Nie obserwowano także żadnej aktywności amidolitycznej CP wobec sekwencji podobnej do tej, jaką rozpoznaje trombina w fibrynogenie, a w doświadczeniach *in vitro* oczyszczony prokoagulant nie hydrolizował fibrynogenu ani protrombiny [19]. Co ciekawe, CP nie hydrolizuje również substratów chromogennych o sekwencji x-Pro-Tyr-pNA, którą rozpoznaje w swym wysokocząsteczkowym, naturalnym substracie, jakim jest czynnik X (-Lys^(P3)-Pro^(P2)-Tyr^(P1)-). Wydaje się więc, że prokoagulant nowotworowy rozpoznaje więcej niż dwupeptyd od N-końca hydrolizowanego wiązania, wymagając ponadto odpowiedniej konformacji przestrzennej substratu [19].

II-4. Występowanie CP

Aktywność bezpośredniego aktywatora czynnika X, nazwanego prokoagulantem nowotworowym, została początkowo opisana w ekstraktach z guzów V2 królika (pierwsze źródło wyizolowanego CP) oraz ludzkiego raka nerki, okrężnicy, sutka i pochwy [6]. Aktywność CP scharakteryzowano następnie w płynie owodniowym i ekstraktach z błon płodowych człowieka, które obecnie są najczęściej głównym źródłem prokoagulantu [20, 21]. Nie stwierdzono obecności CP w żadnej innej, poza błonami płodowymi, tkance prawidłowej [22-24]. Obecność proko-

agulant nowotworowego potwierdzono natomiast w ekstraktach z wielu różnych typów nowotworów, zarówno ludzkich, jak i zwierzęcych oraz w medium hodowlanym komórek transformowanych [7, 20, 25, 26]. Oprócz guzów litych aktywność CP opisano również w ekstraktach z komórek blastycznych ostrej białaczki nieлимfatycznej oraz ostrej białaczki limfoblastycznej [27-29].

Tabela 2

Syntetyczne, peptydowe substraty chromogenne dla nowotworowego prokoagulantu

Substraty hydrolizowane przez CP	Substraty nie hydrolizowane przez CP
N-p-Tos-Gly-Pro-Lys-pNA	Ac-Phe-Gly-pNA
H-D-Ala-Pro-Arg-pNA	N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA
H-D-Ile-Pro-Arg-pNA	N-Suc-Ala-Ala-Pro-Abu-pNA
>Glu-Pro-Arg-pNA	MeO-Suc-Arg-Pro-Tyr-pNA
N-p-Tos-Gly-Pro-Arg-pNA	MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA
D-Phe-Pip-Arg-pNA	Bz-Arg-pNA
MeS-D-CHA-But-Arg-pNA	Boc-Ala-Ala-Pro-Ala-pNA
Sar-Pro-Arg-pNA	N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA
Z-Val-Pro-Arg-pNA	>Glu-Pro-Val-pNA
Z-Arg-Arg-pNA	N-Suc-Ala-Ala-Pro-Met-pNA
Val-Pro-Arg-pNA	N-Suc-Ala-Ala-Pro-Lcu-pNA
Lcu-Pro-Arg-pNA	H-Gly-Phe-pNA
Z-Lcu-Pro-Arg-pNA	Bz-Phe-Val-Arg-pNA
>Glu-Phe-Lys-pNA	

Przeciwciała poliklonalne, uzyskane z surowicy królików immunizowanych oczyszczonym CP człowieka, rozpoznawało antygen w 92% ekstraktów z różnych nowotworów złośliwych i 25% zmian łagodnych [30]. Donati i wsp. [25] wykazali ponadto, że aktywność CP jest około 4-krotnie wyższa w ekstraktach z przerzutów ludzkiego czerniaka niż w ekstraktach ze zmian pierwotnych u tego samego pacjenta. Wskazywać to może na powiązania poziomu ekspresji CP ze stopniem inwazyjności oraz szybkością proliferacji komórek nowotworowych.

Enzymatyczna i immunologiczna charakterystyka CP pochodzącego z różnych gatunków i tkanek jest bardzo podobna. CP z ludzkiego czerniaka, ludzkich komórek leukemicznych, mysiego czerniaka B16, mięsaka JW i raka płuc Lewisa jest immunologicznie i enzymatycznie zgodny z prokoagulantem izolowanym z guza V2 królika [25-27]. Wskazuje to na wy-

soki stopień homologii międzygatunkowej oraz konserwatyzm ewolucyjny tego białka.

III. Prokoagulant nowotworowy w chorobie nowotworowej

Rola prokoagulantu nowotworowego w rozwoju choroby nowotworowej nie jest do końca wyjaśnio-

na. Znane są jednak dane wskazujące na związek pomiędzy ekspresją tej proteazy a wzrostem nowotworu. Przypuszcza się, że CP może pełnić rolę czynnika wzrostowego dla komórek nowotworowych lub w inny sposób regulować wzrost tych komórek. Z uwagi na ekspresję CP jedynie w komórkach neoplastycznych sugeruje się, że mógłby on znaleźć zastosowanie w diagnostyce onkologicznej jako nowy marker nowotworowy. Dotychczas brak danych wyjaśniających, czy CP ma związek z proteolizą macierzy zewnątrzkomórkowej, bądź tworzeniem tzw. „kokonu” fibryny wokół guza.

III-1. Wpływ CP na zaburzenia układu krzepnięcia krwi

Komórki nowotworowe ściśle oddziałują z układem hemostazy poprzez wywoływanie aktywno-

ści prokoagulacyjnej, produkcję białek fibrynolitycznych i czynników zapalnych (cytokin) oraz interakcję z komórkami gospodarza. Efektem tych oddziaływań są często zaburzenia układu krzepnięcia krwi [31-36]. Prokoagulant nowotworowy, aktywujący *in vitro* czynnik X krzepnięcia, mógłby być jednym z czynników odpowiedzialnych za zaburzenia tego układu.

Oprócz CP do czynników prokoagulacyjnych istotnych w chorobie nowotworowej zaliczyć można dobrze już poznany i opisany czynnik tkankowy (TF) oraz stosunkowo niedawno odkryty CCA-1 (ang. *cancer cell-derived blood coagulating activity 1*) [37].

Podwyższoną aktywność prokoagulantu lub zwiększony poziom antygenu CP wykazano w surowicy pacjentów z różnymi typami nowotworów złośliwych [38-42]. Jednakże zmiany parametrów hemostazy wskazujące na aktywację osocznego układu krzepnięcia krwi występują częściej u chorych z zaawansowanym nowotworem, podczas gdy wzrost aktywności/poziomu antygenu CP jest charakterystyczny raczej dla wczesnego stadium rozwoju nowotworu [40, 43]. Wydaje się więc, że CP nie odgrywa *in vivo* znaczącej roli w aktywacji osocznego układu krzepnięcia krwi u pacjentów z chorobą nowotworową.

Niedawno wykazano, że CP może nasilać adhezję płytek krwi do kolagenu i fibrynogenu [44]. Stymuluje kaskadę kwasu arachidonowego (produkcję tromboksanu A₂) i produkcję wolnych rodników w krwinkach płytkowych [45]. Indukuje sekrecję nukleotydów adeninowych i białek w sposób zależny od dawki, a ilość uwolnionych czynników jest mniejsza niż po aktywacji przez trombinę. CP nie powoduje agregacji płytek i nie wpływa na agregację indukowaną trombiną [46]. Mechanizm działania prokoagulantu nowotworowego na płytki krwi nie jest jeszcze dokładnie wyjaśniony. Stwierdzono, że stymulowanej przez CP adhezji płytek do fibrynogenu towarzyszy aktywacja kinazy fosfatydylo-inozytolowej [47]. Jest ponadto możliwe, że, podobnie jak trombina, prokoagulant działa na płytki za pośrednictwem receptora klasy PAR-1 (ang. *proteolytically activated receptor 1*). Powszechność występowania receptorów tej klasy sugeruje, że prokoagulant nowotworowy mógłby stymulować szereg innych komórek, w tym nowotworowe.

III-2. CP jako nowy marker nowotworowy

Szereg danych doświadczalnych wskazuje na możliwość wykorzystania prokoagulantu nowotwo-

rowego w diagnostyce onkologicznej. W niektórych doświadczeniach oznaczano stężenie antygenu CP metodą immunoenzymatyczną, w innych zaś analizowano poziom jego aktywności enzymatycznej, czyli zdolności do aktywacji czynnika X. Niezależnie od stosowanej metody wykazano, że zarówno poziom aktywności jak i stężenie antygenu prokoagulantu zazwyczaj jest podwyższone w surowicy pacjentów z chorobą nowotworową w porównaniu z wartościami obserwowanymi w surowicy osób zdrowych (poziom tła). Wzrost ten nie zawsze jest wyraźny, u niektórych chorych jednak obserwowane wartości przekraczają poziom tła kilku lub kilkunastokrotnie. Dotychczas nie udało się uchwycić generalnej zależności między poziomem CP a rodzajem, lokalizacją lub stopniem zaawansowania choroby.

Gordon i Benson [38] wykazali, że u 92 % pacjentów z różnymi nowotworami złośliwymi obserwuje się podwyższony poziom aktywności CP w surowicy (czułość testu = 92%). Jednocześnie niski poziom CP obserwowano u 75% osób bez stwierdzonej choroby nowotworowej, lub ze zmianami łagodnymi (specyficzność testu = 75%). Czuość i specyficzność stosowanych obecnie rutynowo markerów nowotworowych jest zazwyczaj niższa [48].

Rucińska i wsp. [39] stwierdzili we wszystkich badanych surowicach pacjentów z rakiem płuca, sutka, przełyku i okrężnicy znacząco wyższy poziom aktywności prokoagulantu niż w surowicach pacjentów zdrowych, przy specyficzności testu wynoszącej 85%. Aktywność CP podniesiona była również w surowicy chorych z rakiem przewodu pokarmowego, a poziom jej wzrastał wraz ze stopniem zaawansowania choroby [49].

Aktywność CP w surowicy szczurów obciążonych przeszczepialnym nabłoniakiem Guerin we wczesnych stadiach rozwoju była proporcjonalna do wielkości guza. Jednak w zaawansowanym stadium choroby aktywność ta spadała, osiągając poziom zbliżony do aktywności w grupie szczurów kontrolnych [50]. Podobną zależność obserwowano w surowicy pacjentek z rakiem sutka. Około 75% kobiet z wczesnym stadium rozwoju choroby (I i II) miało podwyższony poziom CP w surowicy, podczas gdy pacjentki w stadium III lub IV miały prawidłowy poziom aktywności tego prokoagulantu [40]. Istnieją jednak prace wskazujące na wysoki poziom CP również w zaawansowanym stadium nowotworu. Poziom taki obserwowano u chorych z rakiem płuca w stadium klinicznym II i III oraz rakiem okrężnicy w stadium klinicznym D [39].

Potencjalną użyteczność prokoagulantu nowotworowego jako markera zmian nowotworowych po-

twierdząc również analizy stężenia antygenu CP w ludzkiej surowicy. U 81% pacjentów z różnymi nowotworami złośliwymi stwierdzono za pomocą testu ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) wzrost stężenia CP w surowicy, podczas gdy stężenie tego białka było prawidłowe u 91% ludzi zdrowych i 80% pacjentów ze zmianami łagodnymi. Interesująca jest obserwacja, że w grupie chorych z nowotworami złośliwymi we wczesnym stadium rozwoju, test ELISA dał wynik pozytywny we wszystkich przypadkach [41]. K o z w i c h i wsp. [42] przebadali grupę ponad 800 osób: zdrowych, ze zmianami łagodnymi i nowotworami złośliwymi. Ogólnie u ponad 85% pacjentów z nowotworem zaobserwowano podwyższone stężenie antygenu CP w surowicy, częściej jednak wzrost ten występował u chorych w początkowych stadiach choroby. Obserwacje te podkreślają użyteczność CP jako markera wczesnych zmian nowotworowych.

III-3. Znaczenie CP dla wzrostu komórki nowotworowej

Istnieją dane wskazujące na istotne powiązania między poziomem aktywności/antygeny prokoagulant nowotworowego a rozwojem nowotworu. Nie jest dotychczas jasne, czy ekspresja CP jest cechą pierwotną, bezpośrednio wynikającą z nowotworowej transformacji komórki, czy też wtórną, zachodzącą pod wpływem innych czynników związanych z procesem nowotworzenia.

S k r z y d l e w s k a i wsp. [51] sugerują, że w przypadku raków przewodu pokarmowego obserwowane upośledzenie potencjału antyoksydacyjnego komórki może być związane z ułatwieniem kancerogennego działania reaktywnych form tlenu, związaną z tym nadmierną peroksydacją lipidów oraz ekspresją prokoagulant nowotworowego.

F a l a n g a i wsp. [52] wykazali, że ekspresja CP w komórkach białaczki promielocytarnej (PML) związana jest z nowotworowym fenotypem tych komórek. Indukowana przez kwas całkowicie *trans* retinowy transformacja komórek PML do fenotypu prawidłowego hamowała ekspresję CP w tych komórkach. Warto zaznaczyć, że ekspresja czynnika tkankowego była stała i nie zmieniała się wraz ze zmianą fenotypu komórki na prawidłowy.

U chorych leczonych na ostrą białaczkę szpikową stwierdzono w trakcie remisji choroby znaczny spadek aktywności CP w szpiku, podczas gdy wyraźny wzrost tej aktywności obserwowano już na kilka miesięcy przed nawrotem choroby [53]. Opisano również spadek poziomu aktywności prokoagulant

nowotworowego w surowicy pacjentów po całkowitej resekcji złośliwego guza płuca, podczas gdy nie-radykalne usunięcie zmiany nowotworowej bądź obecność przerzutów nie wpływało w sposób istotny na aktywność CP [39]. Podobną zależność opisano u pacjentów poddawanych leczeniu operacyjnemu z powodu raka żołądka, przełyku i jelita grubego [54].

Znaczenie CP dla rozwoju nowotworu potwierdzają również inne dane eksperymentalne. Dodanie do hodowli komórek raka płuc H345 przeciwciała przeciwko CP obniżało ich przeżywalność o 50% [55]. U myszy wcześniej immunizowanych oczyszczonym antygenem CP, po podaniu zawiesiny komórek czerniaka B16, obserwowano znacząco niższą ilość kolonii płucnych czerniaka niż w grupie myszy kontrolnych (nieimmunizowanych, lub immunizowanych innym białkiem) [56].

IV. Podsumowanie

Wydaje się, że prokoagulant nowotworowy może odgrywać istotną rolę w rozwoju nowotworu, być może jako antygen stowarzyszony, niezbędny dla jego wzrostu. Mechanizm interakcji CP z komórką nowotworową nie jest jednak jeszcze wyjaśniony. Wyniki wstępnych badań sugerują wpływ CP na proces adhezji komórek nowotworowych do białek macierzy zewnątrzkomórkowej [57]. Być może w ten właśnie sposób CP promuje rozwój nowotworu, zaś jego aktywność prokoagulacyjna nie odgrywa istotnej roli w aktywacji układu krzepnięcia krwi u chorych na raka. Z uwagi jednak na swoje właściwości prokoagulant nowotworowy mógłby znaleźć w przyszłości zastosowanie w diagnostyce onkologicznej jako nowy marker wczesnej fazy choroby, a być może, jako np. cel do ukierunkowanego immunotargetingu, również w terapii choroby nowotworowej.

Podziękowanie

Praca była finansowana przez KBN (grant 3 P05A 115 23) oraz przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi (temat nr. 502-13-751).

*Artykuł otrzymano 24 lutego 2003
Zaakceptowano do druku 31 lipca 2003*

Piśmiennictwo

1. Boyd D (1996) *Cancer Metast Rev* **15**: 77-89
2. Johnsen M, Lund LR, Romer J, Almholzt K, Dano K (1998) *Curr Opin Cell Biol* **10**: 667-671
3. Werb Z, Vu TH, Rinkenberger J, Caussens LM (1999) *APMIS* **107**: 11-18

4. Przybyłowska K, Błasiak J (2001) *Post Biochem* **47**: 212-223
5. Berdowska I, Siewiński M (2000) *Post Biochem* **46**: 73-84
6. Gordon SG, Franks JJ, Lewis B (1975) *Thromb Res (Suppl)* **6**: 127-137
7. Gordon SG (1981) *J Histochem Cytochem* **29**: 457-463
8. Falanga A, Shaw E, Donati MB, Consonni R, Barbui T, Gordon S (1989) *Thromb Res (Suppl)* **54**: 389-398
9. Barrett AJ, Kambhavi AA, Brown MA, Kirschke H, Knight CG, Tamai M, Hanada K (1982) *Biochem J* **201**: 189-198
10. Mielicki WP, Sobolewska M (2001) *Cancer Res, Therapy Control* **11**: 135-141
11. Kambhavi AA, Buttle DJ, Rauber P, Barrett AJ (1991) *FEBS Lett* **283**: 277-280
12. Moore WR (1992) *Biochem Biophys Res Commun* **184**: 819-824
13. Mielicki WP, Tagawa M, Gordon SG (1994) *Thromb Haemost* **71**: 456-60
14. Mielicki WP, Gordon SG (1993) *Blood Coagul Fibrinolysis* **4**: 441-446
15. Mielicki WP, Kozwicz DL, Kramer LC, Gordon SG (1994) *Arch Biochem Biophys* **314**: 165-170
16. Falanga A, Gordon SG (1985) *Biochemistry* **24**: 5558-5567
17. Roncaglioni MC, Dalessandro AP, Casali B, Vermeer C, Donati MB (1986) *Haemostasis* **16**: 259-299
18. Gordon SG, Mourad AM (1991) *Blood Coagul Fibrinolysis* **2**: 735-739
19. Mielicki WP, Mielicka E, Gordon SG (1997) *Thromb Res* **87**: 251-256
20. Falanga A, Gordon SG (1985) *Biochim Biophys Acta* **831**: 161-165
21. Gordon SG, Hasiba U, Cross BA, Poole MA, Falanga A (1985) *Blood* **66**: 1261-1265
22. Gordon SG, Franks JJ, Lewis BJ (1979) *J Natl Cancer Inst* **62**: 773-776
23. Gordon SG, Chelladurai M (1992) *Cancer and Metastasis Rev* **11**: 267-282
24. Gordon SG (1992) *Seminars in Thromb Haemost* **18**: 424-433
25. Donati MB, Gambacorti-Passerini C, Casali B, Falanga A, Vannotti P, Fossati G, Semeraro N, Gordon SG (1986) *Cancer Res* **46**: 6471-6474
26. Falanga A, Bolognese Delessandro AP, Casali B, Roncaglioni MC, Donati MB (1987) *Int J Cancer* **39**: 774-777
27. Falanga A, Alessio MG, Donati MG, Barburi T (1988) *Blood* **71**: 870-875
28. Alessio MG, Falanga A, Consonni R, Bassan R, Minetti B, Donati MB, Barbui T (1990) *Eur J Haematol* **45**: 78-81
29. Pogliani EM, Lanzafame C, Bucciarelli P, Corneo G (1991) *Haematologica* **76**: 562-527
30. Mielicki WP, Tenderenda M, Wierzbicki R (1997) *Biomed Lett* **56**: 151-157
31. Gouin-Thibault I, Achkar A, Samama MM (2001) *Acta Haematol* **106**: 33-42
32. Giordano P, Del Vecchio GC, Santoro N, Arcamone G, Coppola B, Altomare M, Schettini F, Iolascon A, De Mattia D (2000) *Pediatr Hematol Oncol* **17**: 667-672
33. Hillen HF (2000) *Ann Oncol* **11**: 273-276
34. Otten HM, Prins MH (2001) *Haemostasis* **31**: 32-33
35. Piccioli A, Prandoni P (2001) *Haemostasis* **31**: 37-39
36. Levi M (2001) *Haemostasis* **31**: 47-48
37. Inufusa H, Adachi T, Suzuki M, Ando O, Ohta T, Kurimto M, Nakatani Y, Nakamura M, Yasumoti M (1998) *Cancer* **82**: 1563-1569
38. Gordon SG, Benson B (1989) *Thromb Res (Suppl)* **56**: 431-440
39. Rucińska M, Furman M, Skrzydlewski Z, Zaremba E (1997) *Acta Biochim Pol* **44**: 109-112
40. Mielicki WP, Tenderenda M, Rutkowski P, Chojnowski K (1999) *Cancer Lett* **146**: 61-66
41. Gordon SG, Cross BA (1990) *Cancer Res* **50**: 6229-6234
42. Kozwicz DL, Kramer LC, Mielicki WP, Fotopoulos SS, Gordon SG (1994) *Cancer* **74**: 1367-1376
43. Rutkowski P, Chojnowski K, Tenderenda M, Mielicki WP (1999) *Nowotwory* **49**: 411-415
44. Olas B, Mielicki WP, Wachowicz B, Krajewski T (1999) *Thromb Res* **94**: 199-203
45. Olas B, Wachowicz B, Mielicki WP, Buczyński A (2000) *Thromb Res* **97**: 169-175
46. Olas B, Wachowicz B, Mielicki WP (2001) *Cancer Lett* **169**: 165-171
47. Olas B, Wachowicz B, Mielicki WP (2001) *Platelets* **12**: 431-435
48. Szymendera J, Góźdz S (1995) *Nowotwory* **45**: 369-383
49. Kożusko B, Skrzydlewski Z, Sułkowska M, Snarska J, Kozłowski M, Skrzydlewska E, Zalewski B (2001) *Pol Merkurys Lek* **11**: 218-220
50. Mielicki WP, Wierzbicki R (1990) *Int J Cancer* **45**: 125-126
51. Skrzydlewska E, Kożusko B, Sułkowska M, Bogdan Z, Kozłowski M, Snarska J, Puchalski Z, Sułkowski S, Skrzydlewski Z (2003) *Hepato-gastroenterology* **50**: 126-131
52. Falanga A, Consonni R, Marchetti M, Locatelli G, Garattini E, Passerini CG, Gordon SG (1998) *Blood* **92**: 143-151
53. Donati MB, Falanga A, Consonni R, Alessio MG, Bassan R, Buelli M, Borin L, Catani L, Pogliani E, Gugliotta L, et al. (1990) *Thromb Haemost* **64**: 11-16
54. Kożusko B, Skrzydlewska E, Snarska J, Kozłowski M, Zalewski B, Skrzydlewski Z (2001) *Folia Histochem Cytobiol* **39**: 104-105
55. Gordon SG, Tagawa M (1993) *Cancer Res* **53**: 453
56. Kramer LC, Drisko J, Gordon SG (1993) *Proc Ann Ses Univ Colorado Cancer Ctr* **3**: 53
57. Sobolewska M, Kunat M, Mielicki WP. (2002) *Streszczenia XXXVIII Zjazdu PTBiochem*, Wrocław, str.168

Proces sekrecji w płytkach krwi

Secretory process in blood platelets

TOMASZ ZIELIŃSKI¹, BARBARA WACHOWICZ²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Sekrecja związków zmagazynowanych w płytkach krwi
- III. Molekularny mechanizm sekrecji w płytkach krwi
- IV. Regulacja procesu sekrecyjnego w płytkach krwi
- V. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Secretion of the compounds stored in blood platelets
- III. Molecular mechanism of the secretion in blood platelets
- IV. Regulation of the secretory process in blood platelets
- V. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: β -TG — beta-tromboglobulina; CaMK — kinaza zależna od jonów wapnia i kalmoduliny; CHS — zespół Chediak'a-Higashi; CTAP — peptyd aktywujący tkankę łączną; ECGF — czynnik wzrostu komórek śródbłónki; EGF — naskórkowy czynnik wzrostu; HPS — zespół Hernan-sky'ego-Pudlak; GPS — zespół „szarych płytek”; IGF — insuli-nopodobny czynnik wzrostu; MARCKS — mirystylowany bo-gaty w alaninę substrat kinazy białkowej C; NAP-2 — peptyd aktywujący neutrofile; NSF — czynnik wrażliwy na działanie N-etylomaleimidu; OCS — układ kanalików otwartych; PAI — inhibitor aktywatora plazminogenu; PDGF — płytkopochodny czynnik wzrostu; PIP_2 — bisfosforan fosfatydyloinozytolu; PKC — kinaza białkowa C; PSP — płytkowe białko Sec1; RANTES — chemokina ulegająca ekspresji podczas aktywacji limfocytów T; SNAP-23 i 25 — białka synaptosomów, α i γ -SNAP — rozpuszczalne białka wiążące NSF, SNARE — re-ceptory dla rozpuszczalnych białek wiążących NSF; TGF- β — transformujący czynnik wzrostu; TF — czynnik tkankowy; TFPI — inhibitor zewnątrzpo pochodnego układu aktywacji krzep-nięcia krwi; VAMP — białka związane z błoną ziarnistości, VEGF — naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu; vWF — czynnik von Willebranda.

I. Wstęp

Płytki krwi, najmniejsze, bezjądrzaste składniki morfotyczne krwi ssaków, są wrażliwe na różnorod-ne fizjologiczne i нефizjologiczne czynniki po-chodzące z otaczającego je środowiska. Rozbudowa-ny powierzchniowy system receptorów (białek i gli-koprotein) rozpoznaje obecne w środowisku specy-

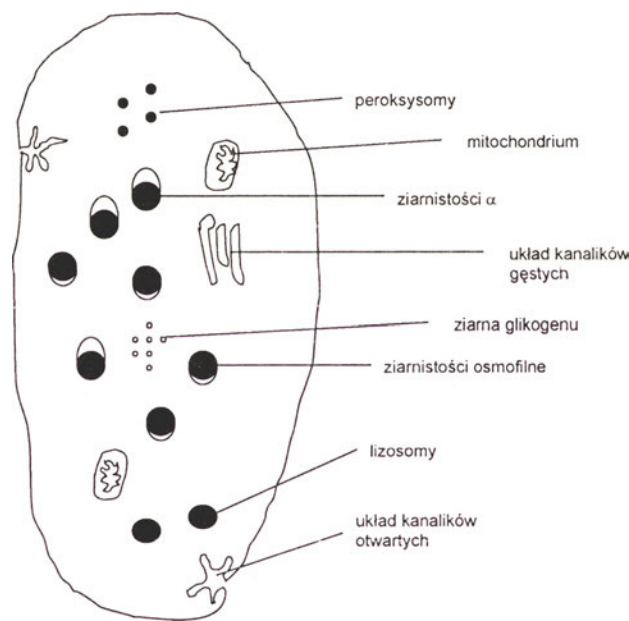
ficzne czynniki stymulujące płytki krwi. Do agoni-stów o znaczeniu fizjologicznym należą zarówno związki obecne w środowisku pozakomórkowym, ta-kie jak trombina, ADP, tromboksan A2 czy czynnik aktywujący płytki, jak i związki obce dla organizmu, takie jak niektóre leki, jady węzów czy lipopolisa-charydy bakteryjne [1-3]. Agonistami płytek są także białka adhezyjne macierzy zewnątrzkomórkowej: kolagen, fibronektyna, witronektyna czy trombo-spondyna [4]. Oddziaływanie agonisty ze specyficz-nym receptorem inicjuje proces przekazywania sy-gnału, polegający m. in. na hydrolizie fosfolipidów błonowych płytki, zmianach metabolizmu fosfoino-zytoli, wzroście wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia, procesach fosforylacji i defosforyla-cji wielu białek, w tym kinaz serynowo-treonino-wych i tyrozynowych, co w efekcie prowadzi do ak-tywacji płytek [5, 6]. Aktywacja zaczyna się od zmian w morfologii i ultrastrukturze płytek, spowo-dowanych reorganizacją ich cytoszkieletu. Reorga-nizacja cytoszkieletu polega na depolimeryzacji włókien aktyny warstwy rdzeniowej znajdującej się w bezpośrednim sąsiedztwie błony, polimeryzacji mikrotubul i polimeryzacji tzw. długich włókien ak-tyny oraz powstawaniu włókien stresowych aktyny [7, 8]. Zmiany w obrębie cytoszkieletu prowadzą do zmian kształtu płytki, wytwarzania filopodiów i pseudopodiów oraz do zwiększenia liczby recepto-rów na powierzchni płytek w następstwie przemiesz-czenia do błony części ich puli cytoplazmatycznej. W odpowiedzi na działanie zewnątrzkomórkowych agonistów pobudzone płytki krwi ulegają zwiększo-nej adhezji do białek macierzy zewnątrzkomórkowej i tworzą agregaty, co prowadzi do powstawania pier-wotnego czopu hemostatycznego [9].

¹Dr, ²prof. dr hab., Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biochemii Ogólnej, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16, tel. 6354482 e-mail: wachbar@biol.uni.lodz.pl

Hemostaza jest zespołem procesów umożliwiających utrzymanie płynności krążącej krwi oraz chroniących organizm przed utratą komórek i białek krwi z naczyń krwionośnych. Składnikami układu hemostatycznego są białka biorące udział w procesach krzepnięcia krwi i fibrynolizy, płytki krwi, komórki śródbłonka i leukocyty [11]. Udział płytek krwi w procesie krzepnięcia krwi jest ich najważniejszą fizjologiczną funkcją, opisaną ponad sto lat temu. Funkcję tę u kręgowców pełnią jądrowe komórki zwane trombocytami. Pozbawione jądra płytki krwi ssaków uczestniczą, oprócz krzepnięcia, również w innych fizjologicznych procesach. Płytki stanowią pierwszą linię obrony przed wynaczynieniem krwi obwodowej po przerwaniu ciągłości ściany naczynia krwionośnego. Następuje wówczas natychmiastowa (trwająca sekundy) adhezja płytek do białek macierzy podśródbłonkowej, z których najważniejsze role spełniają kolagen i wiążący się z nim oraz zmieniający swą konformację czynnik von Willebranda (vWf) [12]. Zmiana ta umożliwia wiązanie vWf do receptorów GPIb-V-IX i integryn $\alpha_{IIb}\beta_3$ na powierzchni płytek. Sygnały pochodzące od tych receptorów prowadzą do zmiany kształtu, adhezji i rozplaszczania (ang. *spreading*) płytek krwi na powierzchni warstwy podśródbłonkowej, dzięki czemu powstaje przylegająca do niej warstwa płytek [13]. Następuje też zmiana konformacji integryn płytki $\alpha_{IIb}\beta_3$, umożliwiającą przyłączenie fibrynogenu. Receptory te rozpoznają sekwencje aminokwasowe RGD obecne w łańcuchu α fibrynogenu i KQAGDV obecne w łańcuchu γ tego białka. Fibrynogen łączy integryny sąsiadujących ze sobą płytek, powstają ich agregaty, co daje początek tworzeniu pierwotnego czopu hemostatycznego [14]. Podczas aktywacji płytek krwi na ich powierzchni dochodzi do ekspozycji ujemnie naładowanych amidofosfolipidów, fosfatydyloetanolaminy i fosfatydyloseryny, co ma kluczowe znaczenie dla przebiegu procesu krzepnięcia krwi [15]. Fosfolipidy te stanowią zależne od jonów wapnia miejsce wiązania przez płytki wielu enzymów, zymogenów i kofaktorów procesu krzepnięcia krwi (zymogeny: czynniki IX, X, V, VIII, protrombina, aktywne czynniki Xa, IXa, Va, VIIa) [16]. Na powierzchni płytek krwi powstają aktywne kompleksy tenazy (kompleks czynnika IXa, jego kofaktora — czynnika VIIa, X, jonów wapnia i fosfolipidów) oraz protrombinazy (kompleks czynnika Xa, jego kofaktora, czynnika Va, protrombina, jonów wapnia i fosfolipidów) produkujące duże ilości odpowiednio: czynnika Xa i trombiny, niezbędnych do prawidłowego przebiegu procesu krzepnięcia krwi [17]. Podczas aktywacji płytki krwi eksponują na

swojej powierzchni czynnik tkankowy (ang. *tissue factor*, **TF**). Nie wiadomo jednak, czy płytkowy TF może brać udział w inicjowaniu procesu krzepnięcia krwi [18]. Podczas aktywacji płytek następuje również odłączanie od płytek krwi mikrocząsteczek (ang. *microparticles*) obdarzonych właściwościami prokoagulacyjnymi. Mikrocząsteczki są otoczone błoną pęcherzykami o średnicy od 100 nm do 1 μ m. Pochodzą głównie z fosfolipidów błony wewnętrznej i błon ziarnistości płytki [19].

W płytkach krwi obecne są nieliczne mitochondria, siateczka śródplazmatyczna, układ kanalików gęstych i układ kanalików otwartych. Występują też liczne ziarnistości specyficzne dla tych komórek (ziarnistości α , i ziarnistości osmofilne o dużej gęstości elektronowej [β]) oraz lizosomy [γ], peroksy-somy [δ] i ziarna glikogenu [10]. Większość związków zmagazynowanych w ziarnistościach płytek jest syntetyzowana w megakariocytach. Schemat struktury wewnętrznej płytki przedstawiono na ryc. 1.



Ryc. 1. Schemat struktury wewnętrznej płytki krwi.

II. Sekrecja związków zmagazynowanych w płytkach krwi

Podczas aktywacji płytek dochodzi drogą egzocytozy do sekrecji związków zmagazynowanych w ziarnistościach α , ziarnistościach osmofilnych i lizosomach. Uwolnione z ziarnistości związki potęgują aktywację płytek, wpływając jednocześnie na wiele funkcji innych komórek: proliferację, adhezję, chemotaksję i aktywację [20]. Ziarnistości α są bogatym źródłem m. in. białek biorących udział w procesach

krzepnięcia i fibrynolizy (fibrynogen, czynniki krzepnięcia V, VI i XI, PAI1) oraz białek adhezyjnych (fibronektyna, witronektyna, trombospondyna), chemokin (płytkowy czynnik 4, PF4, czynnik aktywujący neutrofile — 2, NAP-2) i mitogenów (czynniki wzrostu: płytkopochodny — PDGF, transformujący — TGF, insulinopochodny — IGF, naczyniowo-śródbłonkowy — VEGF). Ziarnistości osmofilne magazynują szereg niskocząsteczkowych związków, głównie nukleotydy adeninowe: ADP i ATP, a także serotoninę i jony wapnia. Enzymy takie jak katepsyna D, karboksypeptydazy, β -glukuronidaza, β -galaktozydaza [21], które znajdują się w lizosomach, są uwalniane dopiero pod wpływem silnych agonistów. Uwalnianie z pobudzonych płytek krwi związki o ważnym znaczeniu biologicznym zestawiono w tabeli 1. Rodzaj i ilość związków uwolnionych z płytek krwi zależy od rodzaju i stężenia agonisty, liczby i dostępności jego receptorów na powierzchni płytek oraz od obecności w środowisku pozakomórkowym innych związków działających synergistycznie lub antagonistycznie w stosunku do agonistów.

Uwalnianie związków biologicznie czynnych z płytek krwi zachodzi na drodze egzocytozy. Sekrecja

jest procesem niezbędnym dla prawidłowej fizjologicznej odpowiedzi płytek krwi na działanie agonistów. Genetycznie uwarunkowane niedobory związków biologicznie czynnych magazynowanych w ziarnistościach oraz zaburzenia polegające na braku niektórych typów ziarnistości prowadzą do częściowej lub całkowitej utraty funkcji płytek jako komórek czynnych w hemostazie (tabela 2). Jak dotąd mechanizm sekrecji nie został jeszcze w pełni wyjaśniony. Sekrecja związków z ziarnistości zachodzi w ciągu kilku sekund po pobudzeniu płytek krwi. W tym czasie dochodzi do centralizacji ziarnistości, a następnie ich fuzji z błoną komórkową płytek bądź błoną tzw. otwartego układu kanalików będącego systemem inwaginacji błony oraz do uwolnienia poza komórkę związków zmagazynowanych w ziarnistościach [22]. Niezbędne dla sekrecji są zmiany w obrębie cytoszkieletu, m. in. depolimeryzacja włókien aktyny stanowiących część cytoszkieletu błonowego płytek, co może ułatwiać przemieszczanie się ziarnistości, polimeryzacja mikrotubul niezbędna dla centralizacji ziarnistości oraz polimeryzacja włókien stresowych aktomiozyny [23-25]. Uważa się, że sekrecja podczas aktywacji płytek pozostaje pod kontrolą dwóch głównych czynników

Tabela 1

Biologicznie aktywne związki uwalniane z różnych typów ziarnistości sekrecyjnych płytek krwi (na podst. [52])

Rodzaj ziarnistości	Związki zmagazynowane w ziarnistościach płytek
Ziarnistości α	chemokiny: CTAP-III, β -TG, NAP-2, RANTES; mitogeny: PDGF, TGF- β , ECGF, EGF, IGF, VEGF; białka adhezyjne: vWF, witronektyna, fibronektyna, trombospondyna; białka układu krzepnięcia: fibrynogen, czynniki V, VII, XI, XII, białko S, kininogeny, plazminogen; inhibitory proteaz: α 2-makroglobulina, α 2-antytrypsyna, α 2-antypłazmina, PAI-1, TFPI, inhibitor C1; inne: albumina transferyna, immunoglobuliny klas IgG, IgE i IgM
Ziarnistości osmofilne	nukleotydy: ADP, ATP, GDP, GTP; serotonina, jony wapnia i magnezu, pirofosforan
Lizosomy	enzymy proteolityczne: karboksypeptydazy A i B, katepsyny D i E, kolagenaza, fosfataza kwaśna, sulfataza arylowa; glikohydrolazy: heparynaza, β -glukuronidaza, β -galaktozydaza, β -glicerofosfataza, β -D-glukozydaza, β -D-fukozydaza, α -D-mannozydaza

wewnątrzkomórkowych: jonów wapnia i aktywnej kinazy białkowej C (PKC), które są niezbędne dla tego procesu i działają synergistycznie [26, 27]. Jony wapnia i PKC mają wpływ na struktury cytoszkieletu, ale działają w różny sposób. Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} aktywuje scinderynę, białko kapturujące aktynę, dzięki czemu uniemożliwiona jest dalsza polimeryzacja aktyny. Efekt ten hamowany jest przez fosfatydyloinozytolobisfosforan, PIP_2 [28]. Kinaza białkowa C fosforyluje zaś białko MARCKS (ang. *mirystylated alanine-rich protein C-kinase substrate*, 85kDa), które jest niezbędne dla wiązania krzyżowego włókien aktyny i ich polimeryzacji. Jednoczesne zahamowanie aktywacji PKC i obniżenie stężenia wewnątrzkomórkowych jonów wapnia hamuje sekrecję [26, 27, 29, 30]. W innych komórkach sekrecyjnych takich jak neurocyty, komórki chromaffinowe czy PC12, jony wapnia i PKC kontrolują poszczególne etapy egzocytocy, w tym również fuzję ziarnistości z błonami. Dokonuje się to dzięki białkom wrażliwym na wzrost stężenia jonów wapnia oraz białkom, które stanowią substraty dla PKC. Białkami wrażliwymi na wzrost stężenia jonów wapnia są wewnątrzkomórkowe enzymy biorące udział w przekazywaniu sygnału, aktywowane przez jony wapnia. Do tych enzymów zalicza się fosfolipazę $\text{C}\gamma 2$, fosfolipazę A_2 , PKC. W komórkach sekrecyjnych białka cytoplazmatyczne i błonowe zawierające domeny C2 kinazy białkowej C, wiążące jony wapnia i fosfolipid, biorą udział w zmianach konformacyjnych i przekształceniach w obrębie tzw. kompleksów SNARE (ang. *soluble N-ethylmaleimide attachment receptors*) i bezpośrednio, w procesie fuzji błon [31]. Do tych białek zalicza się synaptotagminę, białka Munc13 (ang. *murine homolog of unc13*) i Doc2. Ich obecności nie stwierdzono jak dotąd w płytkach [32]. Substratami PKC są również białka cytoszkieletu i białka będące składnikami kompleksów SNARE, tj. syntaksyny i SNAP-25 (ang. *synaptosomal-associated proteins*) oraz białka regulujące [33-35]. Proces sekrecji w płytkach krwi jest podobny do procesu sekrecji zachodzącego w innych komórkach sekrecyjnych. Zachodzi przy udziale innych, choć należących do tej samej grupy, białek. Inny jest także w płytkach krwi mechanizm inicjowania procesu sekrecji i, prawdopodobnie, jego regulacji [22].

III. Molekularny mechanizm sekrecji w płytkach krwi

Mechanizm procesu sekrecyjnego jest konserwatywny. Proces zachodzący w płytkach krwi wykazuje

znaczne podobieństwa do procesu sekrecyjnego, jaki ma miejsce w komórkach sekrecyjnych innego typu, w neurocytach, komórkach neuroendokrynnych, komórkach wydzielniczych trzustki czy komórkach niższych organizmów, tj. komórkach drożdży, komórkach wydzielniczych *Drosophila melanogaster* [22, 36]. Mechanizm sekrecji próbuje wyjaśnić hipoteza oparta na tworzeniu trójskładnikowych kompleksów białkowych, znanych jako kompleksy SNARE. Hipoteza ta zakłada istnienie trzech rodzajów białek, których wzajemne interakcje umożliwiają połączenie białkowych i lipidowych składników błon ziarnistości i błony cytoplazmatycznej oraz uwolnienie zawartości ziarnistości do przestrzeni pozakomórkowej [37]. Białka te tworzą kompleks przy udziale charakterystycznych motywów tzw. SNARE, obejmujących ok. 60 reszt aminokwasowych [38]. Do składników kompleksu SNARE należą: 1] v-SNARE (ang. *vesicle-associated SNARE*), 2] t-SNARE (ang. *target SNARE*) i 3] składniki rozpuszczalne kompleksów SNARE. Wszystkie rodzaje składników kompleksów SNARE występują w płytkach krwi.

1] v-SNARE są integralnymi białkami typu I błon ziarnistości, o krótkiej domenie wewnętrznej i długiej zewnętrznej, nazywane inaczej białkami VAMP (ang. *vesicle-associated membrane proteins*), ok. 18 kDa w komórkach nerwowych i ok. 14 kDa w płytkach [39]. W płytkach krwi występują tylko niektóre z 15 znanych białek VAMP obecnych w innych komórkach. Płytkowe białko VAMP3 (cellubrewina) bierze udział w egzocytozie ziarnistości α i ziarnistości osmofilnych, natomiast VAMP8 uczestniczy tylko w procesie egzocytozy ziarnistości osmofilnych płytek [40]

2] Białka t-SNARE należące do kompleksu SNARE obejmują dwa typy białek: białka integralne typu I błony cytoplazmatycznej tworzące tzw. rodzinę 8 syntaksyn (~ 35 kDa) [41] oraz białka SNAP, SNAP-23 i SNAP-25. W płytkach krwi występują podobne w budowie syntaksyny 2 i 4 (33 kDa). Syntaksyna 2 bierze udział w sekrecji ziarnistości osmofilnych, natomiast syntaksyny 2 i 4 — w sekrecji ziarnistości α i lizosomów [41]. Syntaksyny odgrywają podstawową rolę w oddziaływaniu z pozostałymi składnikami kompleksów SNARE. Ich wiązanie odbywa się za pomocą domeny H3, o strukturze „coiled-coil” leżącej w pobliżu C-końca cząsteczki. Domena H3 wiąże także białko błon ziarnistości, synaptotagminę (65 kDa). Istnienia synaptotagminy nie wykazano jednak w płytkach [42]. Z kolei z fragmentem N-końcowym i centralnym cząsteczek syntaksyn wiąże się neuronalne białko

Sec 1 i jego płytkowy odpowiednik PSP (ang. *platelet Sec1 protein*, 68 kDa) [43]. Centralnie położone domeny cząsteczek białek SNAP-23 i SNAP-25 (23 i 25 kDa) łączą się z błoną cytoplazmatyczną za pomocą reszt kwasu palmitynowego. Fragmenty N-końcowe białek SNAP-23 i SNAP-25 mają zdolność przyłączania syntaksyn, gdy ich końce -COOH wiążą białka VAMP [43, 44]. W płytkach krwi wykazano jedynie istnienie białka SNAP-23 [45], którego stopień asocjacji z błoną wzrasta podczas aktywacji płytek.

3] Do składników rozpuszczalnych kompleksów SNARE należy czynnik NSF (ang. *N-ethylmaleimide sensitive factor*, 83 kDa) endogenna, cytoplazmatyczna ATP-aza [48] oraz rozpuszczalne receptory NSF, tzw. białka α i γ -SNAP (ang. *soluble NSF-attachment proteins*, 32 kDa), które po przyłączeniu NSF, wiążą składniki błonowe SNARE [46, 47]. W płytkach krwi występują jedynie białka NSF i γ -SNAP.

Tabela 2

Genetycznie uwarunkowane schorzenia związane z niedoborem w płytkach krwi ziarnistości lub zawartych w nich substancji i konsekwencje dla funkcjonowania płytek (na podst. [77])

Rodzaj schorzenia	Objawy defektu w płytkach krwi	Konsekwencje defektu dla płytek krwi i układu krzepnięcia
zespół Chediak'a-Higashi (CHS)	brak ziarnistości osmofilnych	obniżona reaktywność, brak sekrecji ADP, słabo zaznaczona druga faza agregacji, przedłużony czas krwawienia i krzepnięcia
zespół Hermanskiego - Pudlak (HPS)	J.w.	J.w.
zespół „szarych płytek” (ang. <i>gray platelet syndrome</i> , GPS)	obecność nielicznych prekursorów zamiast ziarnistości α , obecność płytek o olbrzymich rozmiarach	obniżona reaktywność, trombocytopenia, obniżona ilość receptorów dla fibrynogenu na powierzchni płytek, obniżona sekrecja serotoniny
zespół "pustej kieszeni" (ang. <i>empty sack syndrome</i>)	obniżona ilość związków zmagazynowanych w ziarnistościach osmofilnych	obniżona reaktywność
zespoły $\alpha\text{IIb-SPD}$ (ang. <i>storage pool diseases</i>)	brak ziarnistości α i osmofilnych	brak agregacji płytek w odpowiedzi na działanie agonistów, brak ekspresji selektyny P na powierzchni pobudzonych płytek

Hipoteza SNARE zakłada, że w płytkach krwi poszczególne białka SNARE wchodzą ze sobą w interakcje lub odłączają się od siebie w trzech głównych etapach (w neurocytach są to cztery etapy). Umożliwia to fuzję błon ziarnistości z błoną cytoplazmatyczną i prowadzi do sekrecji. Pierwszym etapem procesu sekrecji jest „*docking*”, w którym następuje zbliżenie błon ziarnistości do błony cytoplazmatycznej (lub błony układu kanalików otwartych), dzięki czemu białka vSNARE i t-SNARE łączą się ze sobą tworząc kompleks dwuskładnikowy o stałej sedymentacji 6S [48]. Mechanizm kierujący specyficznym rozpoznawaniem się białek t-SNARE i v-SNARE i wymuszający ich połączenie nie jest znany. Etap I („*docking*”) wymaga dostarczenia energii pochodzącej z hydrolizy GTP, przy udziale białek Rab. W płytkach w sekrecji związków z ziarnistości α uczestniczą białka Rab4 i Rab27, a w sekrecji z ziarnistości osmofilnych — białko ral [49-51]. Udział jonów wapnia i białek wrażliwych na zmiany stężenia

Ca²⁺ w procesie sekrecji zachodzącym w płytkach krwi jest kontrowersyjny. Drugim etapem sekrecji

czenie PSP w obrębie kompleksu 6S, co prawdopodobnie umożliwia tworzenie kompleksu 20S [53].

Tabela 3

Porównanie procesu sekrecyjnego w komórkach nerwowych i w płytkach krwi

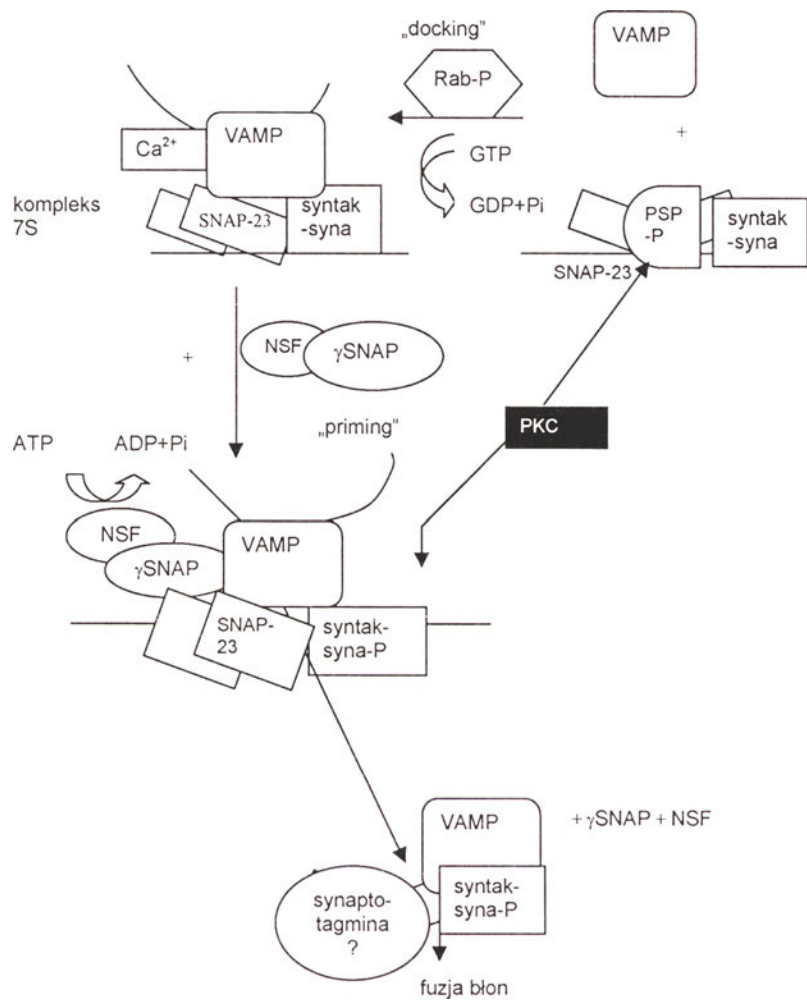
	Komórki nerwowe	Płytki krwi
Sygnał inicjujący sekrecję	Depolaryzacja błony komórki	Aktywacja komórki przy udziale receptorów
Zródło jonów wapnia	Napływ poprzez błonowe kanały jonowe	Uwalnianie z układu kanalików gęstych
Skala czasowa procesu	0,0002-0,05 s.	2-5 s.
Znaczenie kompleksów białkowych SNARE	Niezbędne	Niezbędne
"Docking"	Występuje	Występuje
"Priming"	Występuje	Występuje
Fuzja błony komórkowej z błoną ziarnistości	Występuje	Występuje
"Triggering"	Występuje	Nie występuje
Znaczenie kinazy białkowej C	Kluczowe: kieruje przekształceniami kompleksów SNARE	Kluczowe: kieruje przekształceniami kompleksów SNARE
Znaczenie jonów wapnia	Kluczowe	Kluczowe, ale niewyjaśnione
Znaczenie „czujników poziomu wapnia”	Kluczowe: udział w przekształcenach w obrębie kompleksów SNARE i w fuzji błon	Nieznane, prawdopodobnie udział w regulacji tworzenia kompleksów SNARE
Znaczenie aneksyn	Udział w fuzji błon podczas egzocytozy	Nieznane, reorganizacja cytoszkieletu ?
Wtórna endocytoza uwolnionych związków	Odgrywa ważną rolę w procesie sekrecji	Ma miejsce jedynie w przypadku serotoniny

jest „*priming*”. Polega on na przyłączeniu rozpuszczalnych składników SNARE do kompleksu 6S. Powstaje w ten sposób kompleks trójskładnikowy o stałej sedymentacji 20S [52]. Etap II („*priming*”) jest wymuszony wewnątrzcząsteczkowymi przekształceniami w obrębie kompleksu 6S, które prawdopodobnie dokonują się przy udziale kinazy białkowej C. W komórkach niepobudzonych syntaksyna jest połączona z białkiem PSP w sposób, który uniemożliwia tworzenie kompleksu 20S. Na skutek fosforylacji seryny w sekwencji aminokwasowej KSIR (Lys-Ser-Ile-Arg) białka PSP następuje przemiesz-

Kinaza białkowa C fosforyluje także syntaksynę. Fosforylacja syntaksyny osłabia jej wiązanie z pozostałymi składnikami kompleksu i może mieć znaczenie w zapoczątkowaniu rozpadu kompleksu SNARE [54]. Na etapie II („*priming*”) następuje hydroliza ATP przy udziale białka NSF, a energia pochodząca z tej reakcji jest wykorzystywana do osłabienia oddziaływań rozpuszczalnych i błonowych składników SNARE, co w konsekwencji prowadzi do rozpadu całego kompleksu i uwalniania składników rozpuszczalnych [55]. W końcowym etapie sekrecji w płytkach (III) następuje fuzja błon ziarnistości z błoną

cytoplazmatyczną (lub OCS) i uwolnienie zawartości ziarnistości do przestrzeni pozakomórkowej przy jednoczesnym odłączeniu białka SNAP-23 od pozostałych składników kompleksu [56]. Procesy te zilustrowano na rycinie 2. Dotychczas nie wiadomo, jakie mechanizmy odpowiadają za fuzję lipidów błon ziarnistości z błoną cytoplazmatyczną. W komór-

W procesie prawidłowego usuwania błon ziarnistości z cytoplazmy po uwolnieniu związków z ziarnistości bierze udział kalpaina, odcinająca fragmenty C-końcowe białka SNAP-23. Zahamowanie jej aktywności powoduje nagromadzenie błon ziarnistości w cytoplazmie. Powstają wówczas charakterystyczne struktury, zawierające odcinki błon, połączone ze



Ryc. 2. Przypuszczalny mechanizm sekrecji w płytkach krwi. Proces sekrecji polega na utworzeniu trójskładnikowych kompleksów SNARE o stałych sedymentacji 7 i 20S, dzięki czemu dochodzi do fuzji błon ziarnistości z błoną cytoplazmatyczną (lub błonami OCS). W pierwszym etapie („docking”) dochodzi do zależnego od energii pochodzącej z hydrolizy GTP do GDP połączenia białek tSNARE (syntaksyna i SNAP-23) i vSNARE (VAMP) i powstania kompleksu 7S. Kinaza białkowa C fosforyluje wówczas białko inhibitorowe PSP co umożliwia białku SNAP-23 wchodzenie w interakcję z syntaksyną i białkiem VAMP. W drugim etapie („priming”) następuje zależne od jonów wapnia przyłączenie rozpuszczalnych składników kompleksu SNARE (NSF i γ-SNAP) do składników błonowych SNARE — powstaje kompleks 20S. Pod wpływem PKC, które fosforyluje syntaksynę, dochodzi do wewnątrzcząsteczkowych przekształceń w obrębie kompleksu SNARE. Jednocześnie następuje hydroliza ATP do ADP, katalizowana przez NSF, co prowadzi do osłabienia interakcji w obrębie kompleksu, i w konsekwencji do jego rozpadu oraz fuzji błon ziarnistości z błoną cytoplazmatyczną (etap 3). Rola i obecność funkcjonalnego odpowiednika synaptotagminy (białka biorącego bezpośredni udział w fuzji) w płytkach krwi jest przedmiotem kontrowersji (na podst. [13] i [43]).

kach nerwowych fuzja jest prawdopodobnie wynikiem zależnej od jonów wapnia penetracji synaptotagminy do błony komórkowej, co umożliwia połączenie lipidów jednej z warstw błony ziarnistości z warstwą błony komórkowej i powstawanie przejściowego stanu hemifuzji [57]. Jak dotąd, w płytkach nie odnaleziono strukturalnego lub funkcjonalnego odpowiednika synaptotagminy.

sobą dzięki wzajemnej interakcji wolnych odcinków C-końcowych białek SNAP-23 [58].

Mechanizm procesu sekrecji w płytkach krwi wykazuje istotne podobieństwo do sekrecji zachodzącej w komórkach nerwowych. Główne składniki tworzących się kompleksów SNARE, o stałych sedymentacji 6S i 20S, są niemal identyczne, podobna jest również kolejność etapów sekrecji. Różnica po-

lega na tym, że w płytkach krwi, w przeciwieństwie do neurocytów, nie występuje pomiędzy etapem II a III dodatkowy etap, tzw. „*triggering*”, polegający na zależnym od napływu zewnątrzkomórkowych jonów wapnia ostatecznym przygotowaniu ziarnistości do fuzji z błoną cytoplazmatyczną [59]. Mechanizmy kierujące przekształceniami i zmianami konformacyjnymi białek w obrębie kompleksu SNARE zostały poznane i opisane w innych typach komórek; w płytkach są jeszcze nieznane.

IV. Regulacja procesu sekrecyjnego a płytki krwi

Podczas aktywacji płytek następuje szybki wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego jonów wapnia z ok. 100 nM do ok. 2-5 μ M [60]. Nie wiadomo jednak, czy w płytkach występują białka wrażliwe na wzrost stężenia wapnia, które mają zdolność modulowania procesu sekrecji. W neurocytach takimi białkami są: synaptotagmina, rabfilina 3A i białko Doc2. Białka te zawierają po dwie domeny C2, wiążące jony wapnia i fosfolipidy. Domeny C2 synaptotagminy mogą wiązać też syntaksynę i SNAP-25 [61]. Przy ich udziale w obecności jonów wapnia synaptotagmina może ulec oligomeryzacji, co ułatwia temu białku penetrowanie błony komórkowej [62]. Rabfilina (66 kDa), związana z błoną ziarnistości za pomocą swego białka, jest efektem dla aktywnej, związanej z GTP, formy Rab3A i łączy się z nią swym fragmentem N-kończowym [63]. Białko Doc2 (44 kDa) wchodzi w interakcję z białkiem cytoszkieletu — dyneiną [64]. Interakcje te częściowo wyjaśniają związek między zmianami w obrębie cytoszkieletu komórki a aktywacją kompleksu SNARE. Białko Doc2 podczas sekrecji ulega przemieszczeniu z cytoplazmy do błony komórkowej, gdzie wchodzi w interakcję z Sec1. Takie połączenie osłabia oddziaływanie Sec1 z syntaksyną [65]. Ma to znaczenie na wczesnym etapie tworzenia kompleksów SNARE. Żadne z opisanych białek nie występuje jednak w płytkach krwi. W komórkach sekrecyjnych takich jak komórki chromaffinowe czy komórki śródbłonna w procesie egzocytozy uczestniczą też aneksyny A2 i A7 [66, 67]. Aneksyny stanowią rodzinę licznych białek, charakteryzujących się obecnością w ich regionie C-kończowym konserwatywnej domeny wiążącej jony wapnia i fosfolipidy oraz zmiennej domeny w obszarze N-kończowym cząsteczki [68]. Podczas stymulacji komórek dochodzi do połączenia aneksyn z fosfolipidami błony komórkowej i, przypuszczalnie, z fosfolipidami błon ziarnistości. Wykazano, że domeny N-końcowe aneksyn A2 łączą się z obecnymi w cyto-

plazmie białkami rodziny S100, na skutek czego mogą powstawać heterotetrameryczne kompleksy zawierające po dwie cząsteczki aneksyn i białek S100, co prawdopodobnie sprzyja fuzji błon [69]. W płytkach krwi nie stwierdzono występowania aneksyny A2, natomiast wykazano, że płytki zawierają aneksynę A5 i niewielkie ilości aneksyn A1 oraz A4 [70, 71]. Podczas aktywacji płytek następuje przemieszczenie aneksyny A5 do błony oraz jej połączenie z cytoszkieletem błonowym poprzez γ -aktynę [72]. Prawdopodobnie aneksyna A5 bierze udział w reorganizacji cytoszkieletu podczas aktywacji płytek, nie wiadomo jednak, czy uczestniczy w procesie egzocytozy. Zarówno w komórkach nerwowych jak i w płytkach krwi występuje białko Munc 18, wiążące jony wapnia i fosfolipidy oraz przyłączające syntaksyny. Znaczenie tego białka jest przedmiotem spekulacji. Wykazano, że w płytkach interakcja białka Munc 18 z syntaksyną 4 hamuje sekrecję [73].

Rola białek wrażliwych na zmiany stężenia wapnia w płytkach ciągle budzi kontrowersje. Jony wapnia mogą aktywować kluczowe enzymy biorące udział w przekazywaniu sygnału inicjującego sekrecję: fosfolipazę C oraz konwencjonalne formy kinazy białkowej C, zależne od jonów wapnia i diacyloglicerolu. Porównanie procesu sekrecyjnego w komórkach nerwowych i w płytkach krwi przedstawiono w tabeli 3.

Wydaje się, że kluczową rolę w regulacji procesu sekrecji w płytkach odgrywa białkowa kinaza C. Wykazano, że zahamowanie aktywności PKC blokuje sekrecję [74]. PKC oprócz fosforylacji PSP i syntaksyny, istotnych na etapach „*docking*” i „*priming*”, fosforyluje także niektóre białka Rab obecne w płytkach. Fosforylacja zmienia powinowactwo Rab do GDP na korzyść wiązania GTP. Wykazano ponadto, że inhibitory wiązania GTP do Rab całkowicie hamują sekrecję z ziarnistości α ale nie z ziarnistości osmofilnych [75]. Wskazuje to na możliwość odmiennych mechanizmów sekrecji białek zmagazynowanych w poszczególnych typach ziarnistości.

Istnieje także możliwość modulowania aktywności syntaksyn płytkowych przez kinazę białkową A i kinazę zależną od wapnia i kalmoduliny (CaMKII) [76]. Chociaż nie wykazano ich wpływu na proces sekrecji w płytkach, wiadomo, że są one zdolne do fosforylacji syntaksyn.

V. Uwagi końcowe

Sekrecja jest procesem o podstawowym znaczeniu dla prawidłowej odpowiedzi płytek krwi na

działanie agonistów. Mechanizm tego procesu jest konserwatywny i może zachodzić w płytkach w podobny sposób jak w innych komórkach organizmu. Dokładne poznanie molekularnych podstaw procesu sekrecji w płytkach krwi pozwoli na lepsze zrozumienie mechanizmów kontrolujących sekrecję substancji zawartych w różnych typach ziarnistości płytek, o ważnych właściwościach biologicznych. Związki pochodzące z ziarnistości płytek mają istotne znaczenie w fizjologii układu krwionośnego.

Artykuł otrzymano 17 lutego 2003
Zaakceptowano do druku 25 sierpnia 2003

Piśmiennictwo

1. Siess W (1989) *Physiol Rev* **69**: 58-69
2. Peterson SN (1994) *Ann NY Acad Sci* **714**: 53-59
3. Hourani SMO, Hall DA (1994) *Trends Pharmacol Sci* **15**: 103-108
4. Moroi M, Jung SM (1997) *Thromb Haemost* **78**: 439-444
5. O'Rourke FA, Halenda SP, Zavoico GB, Feinstein MB (1985) *J Biol Chem* **260**: 956-1003
6. Blockmans D, Deckmyn H, Vermeylen J (1995) *Blood Rev* **9**: 143
7. Menche D, Israel A, Karpatkin S (1980) *J Clin Invest* **66**: 284-291
8. Patterson RL, van Rossum DB, Gill DL (1999) *Cell* **98**: 475-485
9. Holmsen H (1994) W: Colman RW, Hirsch J, Marder VJ, Salzman EW (red.) *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. PA, Lippincott, Philadelphia, str. 524-528
10. White JG (1994) W: Bloom AL, Forbes CD, Thomas DP, Tuddenham EGD (red.) *Haemostasis and Thrombosis*. Churchill Livingstone, Edinburgh, UK, str. 49-69
11. Solum NO (1999) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**: 2841-2846.
12. McEver RP (2001) *Thromb Haemost* **86**: 746-756.
13. Williamson D, Giuliano S, Jackson SP (1999) *Aust N Z J Med* **29**: 452-461.
14. Plow EF, Byzova T (1999) *Coron Artery Dis* **10**: 547-551.
15. Heemskerk JW, Bevers EM, Lindhout T (2002) *Thromb Haemost* **88**: 186-193.
16. Kalafatis M, Swords NA, Rand MD, Mann KG (1994) *Biochim Biophys Acta* **1227**: 113-129.
17. McGee MP, Li LC, Hensler M (1992) *J Exp Med* **176**: 27-35.
18. Muller I, Klocke A, Alex M, Kotzsch M, Luther T, Morgenstern E (2003) *FASEB J* **17**: 476-478.
19. Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ (1999) *Blood* **94**: 3791-3799.
20. Crawford N, Scrutton MC (1994) W: Bloom AL, Forbes CD, Thomas DP, Tuddenham EGD (red.) *Haemostasis and Thrombosis*. Churchill Livingstone, Edinburgh, UK, str. 89-110
21. Ferro-Novick S, Jahn R (1994) *Nature* **370**: 191-19
22. Reed GL, Fitzgerald ML, Polgar J (2000) *Blood* **96**: 3334-3342
23. Bearer EL (1995) *Cell Motil Cytoskel* **30**: 50-68
24. Fox JE (1993) *Thromb Haemost* **70**: 884-893
25. Berry S, Dawicki DD, Agarwai KC, Steiner M (1989) *Biochim Biophys Acta* **1012**: 46-56
26. Marcu ZG, Zhang L, Nau-Staudt K, Trifaro JM (1996) *Blood* **86**: 20-29
27. Gerst JE (1997) *Cell Mol Life Sci* **55**: 707-734
28. Takenawa T, Itoh T, Fukami K (1999) *Chem Phys Lipids* **98**: 13-22
29. Elzagallaai A, Rose SD, Trifaro JM (2000) *Blood* **95**: 894-902
30. Walker TR, Watson SP (1993) *Biochem J* **289**: 277-282
31. Davis AF, Bai I, Fasshauer D, Wolowick MJ, Lewis JL, Chapman ER (1999) *Neuron* **24**: 363-376
32. Lemons PP, Chen D, Bernstein A, Bennett MK, Whiteheart SW (1997) *Blood* **90**: 1490-1500
33. Gerrard JM, Beattie LL, Park J, Israels SJ, Mac Nicol A, Lint D, Cragoe EJ jr (1989) *Blood* **74**: 2405-2413
34. Shimazaki Y, Nishiki T, Omori A, Sekiguchi M, Kamata Y, Kozaki S, Takahashi M (1996) *J Biol Chem* **271**: 14548-14553
35. Fujita Y, Sasaki T, Fukui K, Kotani H, Kimura T, Hata Y, Sudhof TC, Scheller RH, Takai Y (1996) *J Biol Chem* **271**: 7265-7268
36. Sollner TH, Rothman JE (1996) *Experientia* **52**: 1021-1025
37. Pevsner J, Hsu S-C, Braun JEA, Calakos N, Ting AA, Bennett MK, Scheller RH (1994) *Neuron* **13**: 353-363
38. Sollner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst R, Rothman JE (1993) *Cell* **75**: 409-418
39. Flaumenhaft R, Croce K, Chen E, Furie B, Furie BC (1999) *J Biol Chem* **274**: 2492-2501
40. Polgar J, Chung SH, Reed GL (2002) *Blood* **108**: 1081-1083
41. Reed GL, Hough AK, Fitzgerald MN (1999) *Blood* **93**: 2617-2626
42. Geppert M, Sudhof TC (1999) *Ann Rev Biochem* **68**: 863-911
43. Volchuk A, Matsumoto Y, He L, Liu Z, Habermann E, Trimble W, Klip A (1994) *Biochem J* **304**: 139-145
44. Jacobsson G, Bean AJ, Scheller RH, Juntti-Berggren L, Deeney JT, Berggren PO, Meister B (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 12487-12491
45. Chen D, Bernstein AM, Lemons PP, Whiteheart SW (2000) *Blood* **95**: 921-929
46. Polgar J, Reed GL (1999) *Blood* **94**: 1313-1318
47. Pevsner J, Hsu SC, Braun JE, Calakos N, Ting AE, Bennett MK, Scheller RH (1994) *Neuron* **13**: 353-361
48. Lin RC, Scheller RH (1997) *Neuron* **19**: 1087-1094
49. Detter JC, Zhang Q, Mules EH, Novak EK, Mishra VS (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 4144-4149
50. Shirakawa R, Yoshioka A, Horiuchi H, Nischio-ka H, Tabushi A (2000) *J Biol Chem* **275**: 33844-33849
51. Mark BL, Jikina O, Bhullar AP (1996) *Biochem Biophys Acta* **1314**: 157-166
52. Rendu F, Brohard-Bohn B (2001) *Platelets* **12**: 261-273
53. Reed GL, Hough AK, Fitzgerald ML (1999) *Blood* **93**: 2617-2626
54. Chung SH, Polgar J, Reed GL (2000) *J Biol Chem* **275**: 25286-25291
55. Morimoto T, Ogihara S (1996) *J Cell Sci* **109**: 113-118
56. Jahn R, Grubmuller H (2002) *Curr Opin Cell Biol* **14**: 488-95
57. Nagano F, Orita S, Sasaki T, Naito A, Sakaguchi G, Maeda M, Watanabe T, Kominami E, Uchigama Y, Takai Y (1998) *J Biol Chem* **273**: 30065-30068
58. Rutledge T, Whiteheart SW (2002) *J Biol Chem* **277**: 37009-37015
59. Calakos N, Scheller RH (1996) *Physiol Rev* **76**: 1-29
60. Sage SO, Reast R, Rink TJ (1990) *Biochem J* **265**: 675-680
61. Perin M, Fried VA, Mignery GA, Jahn R, Sudhof TC (1990) *Nature* **345**: 260-263
62. Fukuda M, Katayama E, Mikoshiba K (2002) *J Biol Chem* **277**: 29315-29320

63. Nagano F, Orita S, Sasaki T, Naito A, Sakaguchi G, Maeda M, Watanabe T, Kominami E, Uchiyama Y, Takai Y (1998) *J Biol Chem* **273**: 30065-30076
64. Duncan RR, Betz A, Shipston MJ, Brose N, Cho-ot RH (1998) *J Biol Chem* **274**: 27347-27350
65. Orita S, Naito A, Sakaguchi G (1997) *J Biol Chem* **272**: 16081-16084
66. König J, Prenen J, Nilius B, Gerke V (1998) *J Biol Chem* **273**: 19679-19684.
67. Caohuy H, Srivastava M, Pollard HB (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 10797-10802.
68. Gerke V, Moss SE (2002) *Physiol Rev* **82**: 331-371
69. Lewit-Bentley A, Rety S, Sopkova-De Oliveira, Santos J, Gerke V (2000) *Cell Biol Int* **24**: 799-802.
70. Murphy CT, Peers SH, Forder RA, Flower RJ, Carey F, Westwick J (1992) *Biochem Biophys Res Commun* **189**: 1739-1746.
71. Eldering JA, Kocher M, Clemetson JM, Clemetson K J, Frey FJ, Frey BM (1993) *FEBS Lett* **318**: 231-234.
72. Tzima E, Trotter PJ, Orchard MA, Walker JH (2000) *Eur J Biochem* **267**: 4720-4730.
73. Hounig A, Polgar J, Reed GL (2003) *J Biol Chem* **278**: 19627-19633.
74. Chung SH, Polgar J, Reed GL (2000) *J Biol Chem* **275**: 25286-25291
75. Foster LJ, Yeung B, Mohtashami M, Ross K, Trimble WS, Klip A (1998) *Biochemistry* **37**: 11089-11096
76. Risinger C, Bennett MK (1999) *J Neurochem* **72**: 614-624
77. Rao AK (1998) *Am J Med Sci* **316**: 69-76

Metabolizm fosfolipidów inozytolowych w płytkach krwi

Metabolism of phosphoinositides in blood platelets

BEATA OLAS

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Metabolizm fosfolipidów inozytolowych w płytkach krwi
 - II-1. Klasa I kinazy 3-fosfatydyloinozytolu
 - II-2. Klasa II i III kinazy 3-fosfatydyloinozytolu
- III. Drogi działania kinazy 3-fosfatydyloinozytolu w płytkach krwi
- IV. Rola kolagenu w regulacji aktywności kinazy 3-fosfatydyloinozytolu w płytkach
- V. Rola białkowej kinazy C w regulacji aktywności kinazy 3-fosfatydyloinozytolu w płytkach
- VI. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Metabolism of phosphoinositides in blood platelets
 - II-1. Class I PI-3K
 - II-2. Class II and III PI-3K
- III. 3-Kinase phosphoinositide pathways in blood platelets
- IV. Role of collagen in regulation of platelet PI-3K activity
- V. Role of protein kinase C in regulation of PI-3K activity in platelets
- VI. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: ADP — adenozyndifosforan; ATP — adenozyntrifosforan; BH — ang. *breakpoint-chester-region homology domain*; cAMP — cykliczny adenozynomonofosforan; cGMP — cykliczny guanozynomonofosforan; CP — fosfataza kreatyny; CPK — fosfokinaza kreatyny; CRP — ang. *collagen-related peptide*; DAG — diacyloglicerol; Domeny PH — (ang. *pleckstrin homology*) — domeny homologiczne do sekwencji aminokwasowych w białku plekstrynie; Domeny SH — (ang. *Src homology*) — domeny homologii z białkami Src; IAS — ang. *inhibitors of autocrine stimulation*; Ins(1,4,5)P₃ — inozytolotrifosforan; ITAM — (ang. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*); PAF — czynnik aktywujący płytki (ang. *platelet activating factor*); PC — fosfatydylocholina; PDGF — płytkopochodny czynnik wzrostu (ang. *platelet derived growth factor*); PE — fosfatydyloetanolamina; PI-3K — kinaza 3-fosfatydyloinozytolu; PI-4K — 4-kinaza fosfatydyloinozytolu; PKC — kinaza białkowa C; PLC — fosfolipaza C; PLCβ₂ — fosfolipaza C typu β₂; PLCγ₂ — fosfolipaza C typu γ₂; PLD — fosfolipaza D; PS — fosfatydyloseryna; PtdIns — fosfatydyloinozytol; PtdIns(3)P — fosfatydyloinozytolo(3)fosforan; PtdIns(3,4)P₂ — fosfatydyloinozytolo(3,4)bisfosforan; PtdIns(3,4,5)P₃ — fosfatydyloinozytolo(3,4,5)trifosforan; PtdIns(4)P — fosfatydyloinozytolo(4)fosforan; PtdIns(4,5)P₂ — fosfatydyloinozytolo(4,5)bisfosforan; PtdIns(5)P — fosfatydyloinozytolo(5)fosforan; TRAP — ang. *thrombin receptor activating peptide*; TXA₂ — tromboksan A₂

I. Wstęp

Błona plazmatyczna płytek krwi, podobnie jak innych typów komórek, ma budowę dynamiczną i podlegającą ciągłym zmianom. Zawiera ponad 30% lipidów, około 57% białek i około 8% cukrów. Jest strukturą bardzo aktywną metabolicznie, a w jej obrębie zachodzą procesy o istotnym znaczeniu dla funkcji i metabolizmu płytki krwi. Ważną rolę pełnią ułożone asymetrycznie fosfolipidy błony płytek stanowiące około $\frac{3}{4}$ wszystkich lipidów. Większość sfingomieliny i fosfatydylocholiny (PC) znajduje się po stronie zewnętrznej, gdzie nie ma fosfatydyloseryny (PS) i fosfatydyloinozytolu (PtdIns). Kwas arachidonowy błony plazmatycznej stanowi ponad połowę całkowitej jego zawartości w płytce. Występuje przede wszystkim w fosfatydyloetanolaminie (PE) i fosfatydyloinozytolu, a jest nieobecny w sfingomielinie. W małych ilościach występuje w fosfatydylocholinie. Głównymi składnikami fosfolipidowymi płytek są: PC (36-39 mol%), PE (28-30 mol%), sfingomielina (19-24 mol%), PS (9-10 mol%) i PtdIns (2-4 mol%). Przemiana fosfolipidów błony, głównie fosfatydyloinozytolu zawierającego kwas arachidonowy, zachodzi bardzo intensywnie w pobudzonych płytkach krwi.

Przemiany fosfolipidów w błonie plazmatycznej indukowane sygnałami zewnętrznymi, m. in. trombiną, kolagenem, tromboksanem A₂ (TXA₂) czy czynnikiem aktywującym płytki (PAF, ang. *platelet*

Dr, Katedra Biochemii Ogólnej, Uniwersytet Łódzki, Banacha 12/16, 90-237 Łódź, tel/fax: 0-42-6354484; e-mail: olasb@biol.uni.lodz.pl

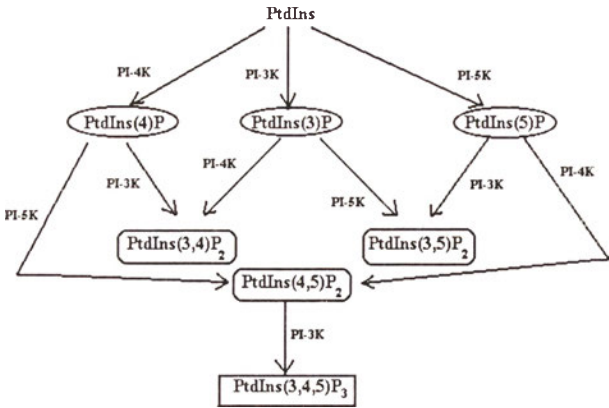
activating factor) są źródłem wielu biologicznych mediatorów i cząstek sygnałowych przekazujących w komórce informacje docierające do niej ze środowiska zewnętrznego. W płytkach krwi, podobnie jak w innych komórkach, cykliczny guanozynomonofosforan (cGMP), cykliczny adenozylationofosforan (cAMP), fosforany inozytoli, diacyloglicerol, metabolity kwasu arachidonowego i jony wapnia jako grupa tzw. wtórnych przekaźników przekazują sygnały zewnątrzkomórkowe do wnętrza komórki. Jednym z bardziej uniwersalnych i powszechnych mechanizmów przekazywania informacji także w płytkach krwi jest kaskada przemian inicjowana hydrolizą fosfatydyloinozytoli w wewnętrznej warstwie błony plazmatycznej. Hydrolizie fosfolipidów inozytolowych towarzyszy zawsze zwiększenie stężenia jonów wapnia w komórce [1-8]. Dokładny udział pochodnych inozytoli w przekazywaniu informacji w różnych typach komórek został omówiony przez Barańską [9].

Różne molekularne formy fosfatydyloinozytoli zawierają najczęściej kwas stearynowy w pozycji sn-1 i kwas arachidonowy w pozycji sn-2 szkieletu glicerolowego. Fosfatydyloinozytol jest jedynym fosfolipidem, który w obecności ATP i odpowiednich kinaz ulega fosforylacji. W komórkach eukariotycznych może powstawać siedem różnych form ufosforylowanego fosfatydyloinozytoli: trzy monofosforany (fosfatydyloinozytolo(3)fosforan (PtdIns(3)P), fosfatydyloinozytolo(4)fosforan (PtdIns(4)P), fosfatydyloinozytolo(5)fosforan (PtdIns(5)P)); trzy bisfosforany (fosfatydyloinozytolo(4,5)bisfosforan (PtdIns(4,5)P₂), fosfatydyloinozytolo(3,4)bisfosforan (PtdIns(3,4)P₂), fosfatydyloinozytolo(3,5)bisfosforan (PtdIns(3,5)P₂)) i jeden trifosforan - fosfatydyloinozytolo(3,4,5)trifosforan (PtdIns(3,4,5)P₃) (Ryc. 1).

II. Metabolizm fosfolipidów inozytolowych w płytkach krwi

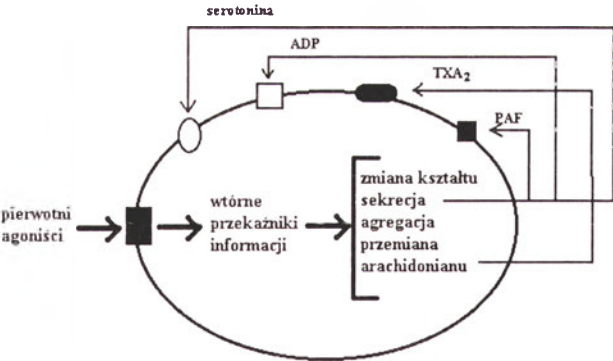
Płytki krwi dzięki wyjątkowo rozwiniętemu systemowi receptorów w błonie reagują na różne bodźce zewnętrzne, ulegają aktywacji i spełniają dwie zasadnicze funkcje w hemostazie. Pierwszą z nich jest tworzenie hemostatycznych czopów płytkowych, a drugą funkcją jest udział w reakcjach krzepnięcia krwi. Aktywacja płytek wywołana różnorodnymi czynnikami jest złożonym i wieloetapowym procesem, którego oznakami są: adhezja, zmiana kształtu płytki, sekrecja i tworzenie agregatów płytkowych. Do fizjologicznych agonistów płytek krwi należą: trombina, kolagen, adrenalina, wazopresyna, PAF i

ADP pochodzące z płytek krwi i uszkodzonych komórek krwi oraz śródbłonka. Do dalszej aktywacji (tzw. autokrynnnej stymulacji płytek krwi) mogą przyczyniać się substancje uwalniane z samych płytek krwi tj. serotonina, ADP, tromboksan A₂ i PAF (Ryc. 2) [1-8].



Ryc. 1. Drogi powstawania ufosforylowanych fosfatydyloinozytoli w komórkach eukariotycznych.

Przyłączenie fizjologicznych agonistów płytkowych m. in. trombiny, kolagenu, TXA₂, ADP czy PAF do specyficznych receptorów obecnych na powierzchni błony płytek powoduje aktywację fosfoli-

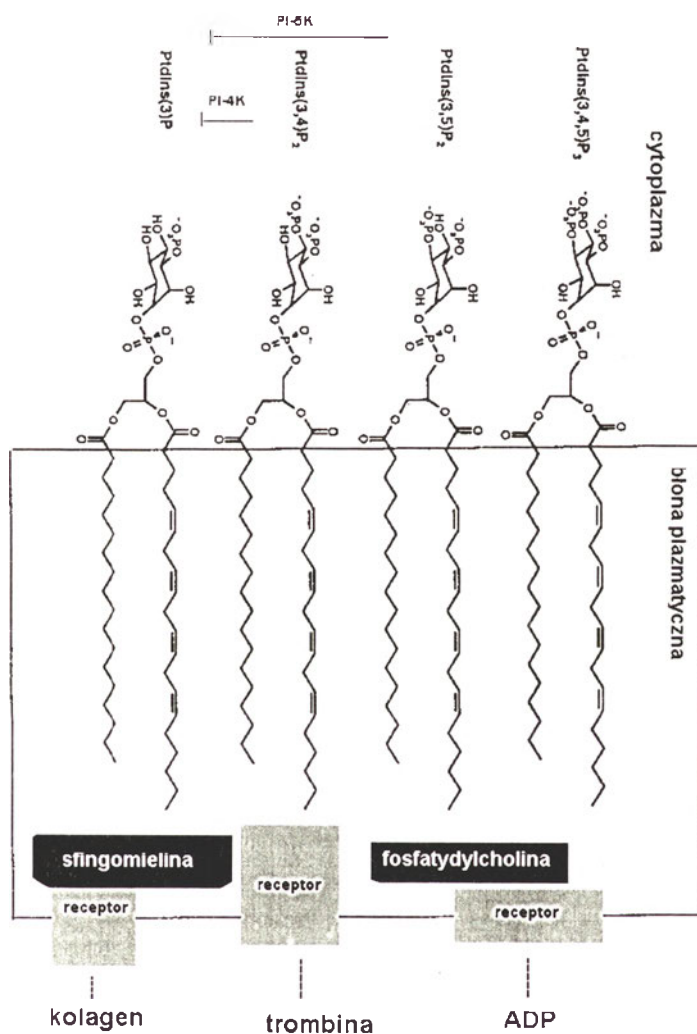


Ryc. 2. Autokrynnna stymulacja płytek krwi. Aktywacja płytek krwi wywołana pierwotnymi agonistami (trombina, kolagen) indukuje sekrecję oraz syntezę wielu dodatkowych płytkowych aktywatorów (PAF, TXA₂, serotonina, ADP), które potęgują aktywację płytek krwi.

pazy C (PLC) (EC 3.1.4.3) swoście hydrolizującej fosfolipidy inozytowe. W płytkach krwi obecne są dwie izoformy PLC: PLCβ₂ i PLCγ₂ [3]. PLCβ₂ aktywowana jest przez mechanizm zależny od białek G: podjednostki α białek G_q i/lub kompleksu podjedno-

stek $\beta\gamma$ białek G_i , natomiast $PLC\gamma_2$ ulega aktywacji z udziałem niereceptorowych kinaz białkowych. $PLC\beta_2$ i $PLC\gamma_2$ prowadzą do hydrolizy fosfatydyloinozytolo(4,5)bisfosforanu i powstania dwóch wtórnych przekaźników informacji: diacyloglicerolu (DAG) oraz inozytolotrifosforanu ($Ins(1,4,5)P_3$) [3]. Diacyloglicerol jako związek hydrofobowy pozostaje w błonie plazmatycznej, ale przemieszczając się w niej może aktywować kinazę białkową C (PKC; EC

Wzrost stężenia DAG jest krótkotrwały, gdyż jest on natychmiast przekształcany do kwasu fosfatydowego z udziałem kinazy diacyloglicerolowej. Reakcja ta jest odwracalna, ale tworzenie kwasu fosfatydowego jest szybsze od jego rozkładu. Związek ten ulega przemianie do cytydylomonofosforanu kwasu fosfatydowego, który z kolei reaguje z wolnym inozytlem dając fosfatydyloinozytol zamykający cykl przemiany. $Ins(1,4,5)P_3$ natomiast, jako związek roz-



Ryc. 3. Struktura chemiczna fosfatydyloinozytoli ufosforylowanych w pozycji 3 inozytoli: $PtdIns(3)P$, $PtdIns(3,4)P_2$, $PtdIns(3,5)P_2$ i $PtdIns(3,4,5)P_3$. Fosfatydyloinozytolo(3)fosforan ($PtdIns(3)P$) z udziałem 4-kinazy PI jest przekształcany do fosfatydyloinozytolo(3,4)bisfosforanu ($PtdIns(3,4)P_2$), a 5-kinaza PI prowadzi do wytworzenia fosfatydyloinozytolo(3,5)bisfosforanu ($PtdIns(3,5)P_2$). Hydrofobowe grupy acylowe fosfatydyloinozytoli obecne są w wewnętrznej części błony plazmatycznej, natomiast część hydrofilowa tych związków znajduje się w cytoplazmie. Ponadto większość sfingomielinu i fosfatydylocholinu znajduje się po stronie zewnętrznej błony, gdzie nie ma fosfatydyloinozytoli (wg. [6], zmodyfikowano).

2.7.1.37), która fosforyluje przede wszystkim plekstrynę. Fosforylacja plekstryny jest niezbędna dla procesu sekrecji wielu związków biologicznie czynnych zmagazynowanych w specyficznych ziarnistościach płytkowych. Uwalnianie do osocza swoiste białka płytkowe — czynnik płytkowy 4, β -tromboglobuliny czy przemieszczenie P-selektyny wraz z błonami α -ziarnistości na powierzchnię płytek jest uważane za wskaźnik aktywacji płytek krwi *in vivo*.

puszczalny w środowisku wodnym, dyfunduje do cytoplazmy i jest odpowiedzialny za wzrost stężenia jonów wapnia w cytoplazmie. Wzrost stężenia jonów wapnia jest niezbędny m.in. do aktywacji fosfolipazy A_2 (PLA_2) (EC 3.1.1.4) uruchamiającej kaskadę kwasu arachidonowego i do stymulacji kinazy lekkiego łańcucha miozyny (EC 2.7.1.117) [1-8]. Fosfatydyloinozytolo(4,5)bisfosforan w płytce odgrywa nie tylko istotną rolę jako prekursor lipidowych

wtórnych przekazników (DAG i $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$), ale także jako regulator reorganizacji cytoszkieletu, w tym filamentów aktynowych [10].

Gdy na płytkę krwi działają agoniści (m. in. trombina, kolagen, tromboksan A_2 , ADP czy PAF) może nastąpić nie tylko hydroliza $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, lecz również dalsza fosforylacja tego fosfolipidu. Kinaza 3-fosfatydyloinozytolu (PI-3K) (EC 2.7.1.137) wprowadza grupę fosforanową z ATP na grupę $-\text{OH}$ w pozycję 3 pierścienia inozytolu; fosfatydyloinozytole ufosforylowane w pozycji 3 inozytolu nie podlegają hydrolizie z udziałem poznanych izoform fosfolipazy C i nie są substratami, z których powstają wtórne przekazywanie informacji. Strukturę chemiczną fosfatydyloinozytoli ufosforylowanych w pozycji 3 inozytolu przedstawia rycina 3. Kinazy 3-fosfatydyloinozytolu ze względu na selektywną specyficzność substratową w warunkach *in vitro* i w oparciu o ich budowę strukturalną podzielono na trzy klasy: klasę I, II i III [11-13]. Krótką charakterystykę kinaz 3-fosfatydyloinozytolu w płytkach krwi przedstawia tabela 1.

II-1. Klasa I kinazy 3-fosfatydyloinozytolu

Do klasy I PI-3K należą enzymy będące heterodimerami posiadającymi część regulatorową i katalityczną fosforylującą grupę $-\text{OH}$ w pozycji 3 PtdIns , $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ i $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$; w warunkach *in vitro* preferowanym substratem tej klasy PI-3K jest $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$. W klasie I można wyróżnić 2 grupy: grupę A i B. Enzymy klasy IA zbudowane są z podjednostki katalitycznej ($\text{p}100\alpha$, $\text{p}100\beta$ i $\text{p}110\delta$) i z białek regulatorowych $\text{p}85$ (50-85 kDa), takich jak $\text{p}85$ i $\text{p}85$. Podjednostki regulatorowe posiadają: dwie domeny SH2 (ang. *Src homology*), które reagują z ufosforylowaną tyrozyną, jedną domenę SH3, domenę BH (ang. *breakpoint-cluster-region homology domain*) i dwa regiony bogate w reszty proliny [14]. W płytkach krwi obecne są PI-3K (tzw. $\text{p}85/\text{PI-3K}$) klasy IA posiadające podjednostki katalityczne $\text{p}110\alpha$ i $\text{p}110\beta$ połączone z podjednostkami regulatorowymi $\text{p}85\alpha$ i $\text{p}85\beta$ [4]. W czasie aktywacji płytek krwi wywołanej trombiną czy syntetycznym peptydem (SFLLRN), zwanym TRAP (ang. *thrombin receptor activating peptide*), dochodzi do wzrostu aktywności $\text{p}85/\text{PI-3K}$ w immunoprecypitatach rozpuszczalnych w Tritonie X-100 i we frakcji cytoszkieletu błon komórkowych nierozpuszczalnej w Tritonie X-100. Wskazuje to na przemieszczenie się PI-3K do frakcji błonowej. W płytkach krwi niestymulowanych tylko niewielkie ilości $\text{p}85/\text{PI-3K}$ połączone są z cytoszkieletem błon płytek [4, 15],

natomiast w czasie aktywacji płytek krwi $\text{p}85/\text{PI-3K}$ ulega przemieszczeniu do frakcji cytoszkieletu błon komórkowych. Podczas aktywacji płytek krwi trombiną ważną rolę w przekazywaniu sygnału zewnątrzkomórkowego, gdy fibrynogen przyłączy się do integraliny $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, spełnia oddziaływanie $\text{p}85/\text{PI-3K}$ z cytoszkieletem (m. in. α -aktyniną) oraz wytwarzanie $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$ [16]. W czasie przekazywania sygnału zewnątrzkomórkowego obserwuje się również fosforylację reszt tyrozynowych białka Cbl, co jest powiązane z działaniem PI-3K oraz kinazy Syk [17]. Stymulacja płytek krwi słabym agonistą — ADP powoduje odwracalne przemieszczenie $\text{p}85/\text{PI-3K}$ do cytoszkieletu, ale bez wytwarzania $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$ [18]. Uważa się, że przemieszczenie $\text{p}85/\text{PI-3K}$ klasy IA do cytoszkieletu nie odgrywa istotnej roli w aktywacji enzymu [16]. Obecne w płytkach krwi białka Rho należące do „małych” białek G mogą być też efektorami i regulatorami $\text{p}85/\text{PI-3K}$ [19] oraz 4-kinazy fosfatydyloinozytolu (EC 2.7.1.67) [20].

W płytkach krwi PI-3K klasy IB (tzw. $\text{PI-3K}\gamma$) są aktywowane przez podjednostki $\beta\gamma$ białek G [16, 21]. $\text{PI-3K}\gamma$ posiada podjednostkę katalityczną $\text{p}110$, zawierającą miejsce wiązania białka Ras i domenę homologiczną do plekstryny (PH, ang. *pleckstrin homology*) w N-końcowej części białka. W płytkach krwi kinazy 3-fosfatydyloinozytolu klasy IB obecne są w cytosolu. Zhang i wsp. [16] wykazali, że w czasie aktywacji płytek krwi trombiną dochodzi do przemieszczenia $\text{PI-3K}\gamma$ do cytoszkieletu. Tang i Downs [22] z cytosolu płytek krwi świni wyizolowali dwie różne $\text{PI-3K}\gamma$. Jedna z nich aktywowana przez podjednostki $\beta\gamma$ białek G o stężeniu $1\text{ }\mu\text{M}$ odpowiedzialna jest za fosforylację grupy $-\text{OH}$ w pozycji 3 inozytolu PtdIns , $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ i $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$; preferowanym substratem dla tej kinazy jest $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$. Druga $\text{PI-3K}\gamma$ nie jest aktywowana przez podjednostki $\beta\gamma$ białek G, ale z udziałem receptora dla płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGF) należącego do receptorów kinazy tyrozynowej [22]. W płytkach krwi traktowanych LY294001 - inhibitorem obu kinaz należących do klasy I, dochodzi do hamowania transportu jonów Ca^{2+} wywołanego działaniem trombiny [20, 23].

II-2. Klasa II i III kinazy 3-fosfatydyloinozytolu

Kinaza 3-fosfatydyloinozytolu klasy II zbudowana jest z olbrzymich katalitycznych podjednostek (170-220 kDa), zawierających C2 domenę w C-końcowej części białka. Fosforyluje ona głównie PtdIns i $\text{PtdIns}(4)\text{P}$, jakkolwiek $\text{PI-3K-C2}\alpha$ także może fosforylować $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ w obecności fosfatydy-

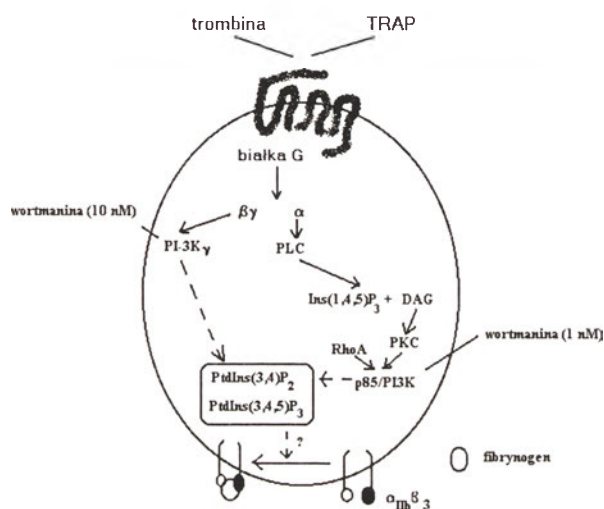
loseryny [11, 12]. W płytkach krwi obecna jest również izoforma kinazy 3-fosfatydyloinozytolu klasy II tzw. HsC2-PI-3K, a wzrost jej aktywności obserwuje się podczas akumulowania PtdIns(3)P w komórce. Proces ten jest hamowany przez wortmaninę ($IC_{50}=7nM$).

Budowa i rola PI-3K klasy III nie jest dostatecznie poznana. Wiadomo jedynie, że substratem dla PI-3K klasy III jest fosfatydyloinozytol, z którego powstaje fosfatydyloinozytolo(3)fosforan [24, 25]. Do tej pory w płytkach krwi nie udało się zidentyfikować PI-3K klasy III.

III. Drogi działania kinazy 3-fosfatydyloinozytolu w płytkach krwi

W płytkach krwi, podobnie jak i w innych komórkach, tworzenie różnych form fosfatydyloinozytolu ufosforylowanego w pozycji 3 inozytolu jest kontrolowane przez wiele kinaz oraz fosfataz. Aktywacja płytek krwi silnym agonistą — trombiną czy TRAP prowadzi do tworzenia fosfatydyloinozytolo(3,4)bisfosforanu i fosfatydyloinozytolo(3,4,5)trifosforanu. Proces ten jest hamowany przez nieodwracalny i specyficzny inhibitor kinazy 3-fosfatydyloinozytolu — wortmaninę [15, 21, 26]. Reakcja hamowania przez wortmaninę jest obserwowana również w innych komórkach, np. linii komórkowej CHRF-288 pochodzącej z megakariocytów [26]. W płytkach krwi wortmanina o stężeniu 1 nM hamuje aktywność p85/PI-3K, natomiast w wyższym stężeniu (10 nM) hamuje aktywność kinazy PI-3K γ (Ryc. 4) [4]. Sugeruje się, że PI-3K odgrywa istotną rolę w odwracalnej (początkowej) fazie agregacji płytek krwi wywołanej nie tylko trombiną, ale również czynnikiem aktywującym płytki (PAF) [27]. Wortmanina może hamować agregację płytek krwi stymulowaną kolagenem lub konwulksyną (glikoproteina wyizolowana z jadu węży) m. in. poprzez modulowanie funkcji integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$ i/lub w mechanizmie niezależnym od PI-3K. Wyniki badań wskazują, że wortmanina nie jest jednak specyficznym inhibitorem PI-3K w płytkach aktywowanych kolagenem czy konwulksyną [28]. W płytkach stymulowanych trombiną zaobserwowano, że kinazy pp60^{c-src} i p59^{lyn} [29] oraz pp125^{FAK} [30-33] tworzą kompleksy z PI-3K. Natomiast „małe” białka G — białka Rac — aktywują kinazę PI-5K i przyczyniają się do powstania PtdIns(4,5)P₂ [34]. Trombina, jak i TRAP indukują syntezę PtdIns(3,4,5)P₃ już po 15-30 sekundach działania, a produkcja PtdIns(3,4)P₂ następuje po wytworzeniu PtdIns(3,4,5)P₃. Najwyższy poziom PtdIns(3,4)P₂ jest osiągnięty po 4-5 minu-

tach działania agonisty [4, 35, 36]. Kolejność tworzenia różnych ufosforylowanych w pozycji 3 inozytolu budzi wiele kontrowersji. Cunningham i wsp. [37] sugerują następującą kolejność: PtdIns→PtdIns(3)P→PtdIns(3,4)P₂→PtdIns(3,4,5)P₃. Carter i wsp. [38] oraz Hawkins i wsp. [39] uważają natomiast, że ma miejsce inna kolejność powstawania: PtdIns(4,5)P₂→PtdIns(3,4,5)P₃→PtdIns(3,4)P₂ ze względu na działanie 5-fosfatazy katalizującej proces defosforylacji PtdIns(3,4,5)P₃. PtdIns(3,4)P₂ może również powstawać w wyniku działania PI-3K, która może fosforylować PtdIns(4)P. Rozbieżności wyników badania kolejności



Ryc. 4. Regulacja PI-3K w płytkach krwi aktywowanych trombiną lub TRAP. Trombina czy TRAP po połączeniu z receptorem serpinowym (zbudowanym z 7 domen transbłonowych) z udziałem podjednostki α białek G_q aktywują fosfolipazę C (PLC β_2), co prowadzi do powstania dwóch wtórnych przekazników: diacyloglicerolu (DAG) i 1,4,5 — trifosforanu inozytolu (Ins(1,4,5)P₃). DAG pobudza białkową kinazę C (PKC), a Ins(1,4,5)P₃ stymuluje napływ jonów Ca^{2+} do cytoplazmy. Białkowa kinaza C wraz z „małymi” białkami G — białkami RhoA indukuje aktywację p85/PI-3K. W przekazywaniu sygnału do płytki krwi, po przyłączeniu trombiny czy TRAP do specyficznego receptora, uczestniczą także podjednostki $\beta\gamma$ białka G_q , które są odpowiedzialne za aktywację innej izoformy kinazy 3-fosfatydyloinozytolu, tzn. PI-3K γ . PI-3K γ i p85/PI-3K wytwarzają PtdIns(3,4)P₂ i PtdIns(3,4,5)P₃, które w płytce są prawdopodobnie niezbędne dla przyłączenia fibrynogenu do integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$. Dalsze objaśnienia w tekście.

fosforylowania fosfatydyloinozytoli w płytkach krwi mogą wynikać z różnego czasu działania agonisty. Cunningham i wsp. [37] inkubowali płytki krwi z trombiną przez 10 minut, natomiast Carter i wsp. [38] stosowali bardzo krótki czas działania agonisty, bo zaledwie 20-60 sekund. Jeżeli stężenie płytek krwi było wysokie ($\sim 1,1 \times 10^9$ płytek/ml) i zastosowano wysoką dawkę trombiny (3 j/ml) przez 10 minut, to dochodziło do tworzenia agregatów płytko-

wych i sekrecji fibrynogenu z α -ziarnistości płytkowych [40]. Powodowało to opóźnione gromadzenie PtdIns(3)P powstającego w wyniku działania kinazy 3-fosfatydyloinozytolu klasy II na fosfatydyloinozytol. W płytkach krwi obecna jest ponadto kinaza PI-4K, która fosforyluje grupę –OH w pozycji 4 inozytolu PtdIns(3)P i prowadzi do powstania PtdIns(3,4)P₂ [41]. Tworzenie PtdIns(3,4)P₂ w płytkach

Natomiast zastosowanie inhibitorów wiązania fibrynogenu do integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$ powodowało hamowanie wytwarzania PtdIns(3,4)P₂ o około 60% [44]. Podobne zahamowanie było także obserwowane w obecności antagonisty receptora dla TXA₂ — SQ 29.548. W obecności antagonistów PAF lub serotoniny był obserwowany bardzo słaby efekt lub brak wpływu na produkcję fosfolipidów inozytolowych. W obecno-

Tabela 1

Charakterystyka kinaz 3-fosfatydyloinozytolu w płytkach krwi (kompilacja danych z: [4, 15, 16, 21])

Klasa kinazy 3-fosfatydyloinozytolu		Budowa kinazy 3-fosfatydyloinozytolu
Klasa I	Klasa IA (tzw. p85/PI-3K)	Podjednostka katalityczna — p110 α , p110 β Podjednostka regulatorowa — p85 α , p85 β
	Klasa IB (tzw. PI-3K γ)	Podjednostka katalityczna p110 γ
Klasa II (tzw. HsC2-PI-3K)		Podjednostka katalityczna (170-220 kDa) (?)

krwi po krótkotrwałej stymulacji trombiną (20-60 sekund) może wskazywać, że szybciej działa PI-4K niż PI-3K, ponieważ PtdIns(4)P jest fosforylowany przed PtdIns(3)P. Dlatego też kolejność zdarzeń może być następująca: PtdIns(4)P→PtdIns(3,4)P₂ i/lub PtdIns(4,5)P₂→PtdIns(3,4,5)P₃→PtdIns(3,4)P₂.

Stymulacja płytek krwi fizjologicznymi aktywatorami (trombiną czy kolagenem) powoduje wytwarzanie oraz sekrecję różnych płytkowych aktywatorów wzmagających działanie pierwotnych agonistów i indukujących autokrynną stymulację płytek [1-8]. Zastosowanie inhibitorów autokrynnnej stymulacji płytek krwi (IAS, ang. *inhibitors of autocrine stimulation*) pozwoliło ocenić, jak przebiegają szlaki przekazywania sygnałów w płytkach krwi aktywowanych kolagenem czy trombiną [42]. Do inhibitorów IAS należą: (1) układ fosfataza kreatyny/fosfokinaza kreatyny (CP/CPK), który przekształca ADP w ATP (antagonista receptorów dla ADP), (2) SQ 29.548 — antagonistą tromboksanu A₂, (3) peptyd RGDS chroniący przed przyłączeniem fibrynogenu do integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$, (4) cyproheptadyna — antagonistą serotoniny i (5) BN 52021 — antagonistą PAF [42]. Jeżeli płytki krwi aktywowano trombiną, to IAS znosiły syntezę PtdIns(3,4)P₂ i PtdIns(3,4,5)P₃, natomiast podczas aktywacji kolagenem stosowane IAS nie miały istotnego wpływu na tworzenie tych fosfolipidów. W płytkach krwi aktywowanych trombiną najsilniejszym inhibitorem kinazy 3-fosfatydyloinozytolu okazał się system CP/CPK, gdyż powstawanie PtdIns(3,4)P₂ było zahamowane w 78% [43].

ści inhibitorów cyklooksygenazy (m. in. kwasu acetylosalicylowego, który hamuje tworzenie TXA₂), słaby aktywator płytek krwi — ADP stymulował produkcję zarówno PtdIns(3,4)P₂ jak i PtdIns(3,4,5)P₃. Analog TXA₂ — U46619 i kwas lizofosfatydowy indukowały także syntezę PtdIns(3,4)P₂ i PtdIns(3,4,5)P₃ w płytkach krwi [4]. Wydaje się, że sam ADP nie ma wpływu na tworzenie fosfoinozytoli ufosforylowanych w pozycji 3 inozytolu [18, 43], jednak prawdopodobnie wytwarzanie w znacznych ilościach tych fosfolipidów w płytkach krwi aktywowanych trombiną zależy od autokrynnych agonistów płytek, np. ADP. Może to być wynikiem synergistycznego działania trombiny i ADP na płytki krwi. Na błonie płytek obecne są co najmniej 3 typy receptorów dla ADP: receptor metabotropowy P2Y_i (połączony z białkami G_i) [45, 46], receptor P2Y_{ADP} (połączony z białkami G_i lub G_q) [47] i receptor P2X₁ (umożliwia napływ jonów Ca²⁺ ze środowiska do cytoplazmy komórek) [48]. Szczegółowa interakcja ADP z płytkowymi receptorami została opisana przez Olas [49].

IV. Rola kolagenu w regulacji aktywności płytkowej kinazy 3-fosfatydyloinozytolu

Integralną częścią procesu przekazywania sygnałów w płytkach krwi aktywowanych kolagenem jest nie tylko fosforylacja tyrozyny, ale również fosforylacja inozytolu, w której ważną rolę spełnia PI-3K [42]. Kolagen indukuje aktywację płytek krwi

poprzez receptor GPVI. Przyłączenie kolagenu do GPVI powoduje aktywację kinazy Src oraz fosforylację cząsteczek tyrozyny w motywie ITAM (ang. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) w łańcuchu γ receptora Fc, co jest niezbędne do aktywacji PLC γ_2 . Trombina natomiast nie powoduje fosforylacji łańcucha γ receptora Fc [50]. Gibbins i wsp. [50, 51] opisali, że w czasie aktywacji płytek krwi kolagenem dochodzi do interakcji podjednostki regulatorowej (p85) kinazy 3-fosfatydyloinozytolu z ufosforylowaną tyrozyną w motywie ITAM łańcucha γ receptora Fc.

Produkty działania PI-3K odgrywają istotną rolę w translokacji i aktywacji PLC γ_2 w różnych typach komórek. W komórkach jądrazystych, np. limfocytach domeny PH i SH2 w PLC γ_2 mogą wiązać PtdIns(3,4,5)P₃ i umożliwiać przemieszczenie fosfolipazy C [52, 53, 54]. W płytkach krwi aktywowanych kolagenem szczególną funkcję spełniają fosfolipidowe produkty PI-3K [55, 56]. Inhibitory PI-3K (wortmanina czy LY294002) silnie redukują aktywność płytkowej PLC γ_2 . Inhibitory te nie chronią przed fosforylacją tyrozyny w PLC γ_2 , ale znoszą jej przemieszczenie, co obserwowano po dodaniu egzogenego PtdIns(3,4,5)P₃ do płytek krwi [56]. Płytkowa PLC γ_2 jest zdolna do interakcji z PtdIns(3,4,5)P₃, chociaż rola tego procesu nie jest jasna. Ostatnio stwierdzono, że wprowadzenie domen PH czy SH2 pochodzących z PLC γ_2 do komórek PC12 nie powoduje wiązania ich z PtdIns(3,4,5)P₃ [57]. Wytwarzanie dużych ilości PtdIns(3,4)P₂ i PtdIns(3,4,5)P₃ w płytkach krwi oraz aktywacja PI-3K jest niezbędna dla maksymalnej stymulacji aktywności PLC γ_2 po aktywacji receptora GPVI peptydem podobnym do kolagenu (CRP, ang. *collagen-related peptide*) [55]. Stwierdzono również, że interakcja kolagenu z integryną $\alpha_2\beta_1$ obecną na powierzchni błony płytkowej jest odpowiedzialna za uruchomienie produkcji fosfolipidów inozytolowych, hamowanej przez wortmaninę [58].

Produkty działania PI-3K — bisfosforany fosfatydyloinozytolu (PtdIns(3,4)P₂ lub PtdIns(3,5)P₂) mogą spełniać rolę specyficznego kofaktora dla płytkowej fosfolipazy D (PLD) (EC 3.1.4.4). Aktywność PLD wzrasta w obecności tych fosfolipidów, natomiast nie ulega zmianie w obecności monofosforanów fosfatydyloinozytolu czy fosfatydyloinozytolu. Rola bisfosforanów fosfatydyloinozytolu, jako kofaktora PLD może zapewniać łączność pomiędzy różnymi enzymami (PLC, PLD i PI-3K) uczestniczącymi w przekazywaniu sygnałów w płytkach krwi.

Podobnie jak GPVI, udział w wytwarzaniu fosfoinozytolu w płytkach krwi bierze receptor FC γ IIA (receptor fragmentu Fc immunoglobuliny G). Receptor FC γ IIA uczestniczy w aktywacji kinazy Syk, PLC γ_2 , podjednostki p85 PI-3K, co w konsekwencji prowadzi do produkcji PtdIns(3,4)P₂ i PtdIns(3,4,5)P₃ [56, 59, 60]. Receptor FC γ IIA stymuluje aktywność PLC γ_2 nawet w obecności wortmaniny, natomiast peptyd o sekwencji RGDS nie ma istotnego wpływu na aktywność PLC γ_2 [55, 58].

Interakcja receptora GPIIb/IX/V z czynnikiem von Willebranda indukuje też połączenie PI-3K z cytoszkieletem oraz wywołuje jej aktywację [61].

V. Rola białkowej kinazy C w regulacji aktywności kinazy 3-fosfatydyloinozytolu w płytkach

Białkowa kinaza C uczestniczy w procesach przekazywania sygnału w płytkach krwi, fosforylując m. in. 4-kinazy fosfatydyloinozytolu, w wyniku czego dostarcza prekursorów dla PI-3K. PKC jest niezbędna do wytwarzania w płytkach krwi fosfatydyloinozytolu, posiadających ufosforylowaną grupę –OH w pozycji 3 inozytolu. Właściwości te stwierdzono na podstawie następujących obserwacji: (1) w płytkach krwi stymulowanych trombiną zahamowanie aktywności PKC jest połączone z redukcją ilości powstających PtdIns(3,4)P₂ i PtdIns(3,4,5)P₃ [62], (2) estry forbolu stymulują PKC, która indukuje syntezę tych fosfolipidów, nawet przy braku aktywatora płytkowego — trombiny [15], (3) octan mirystynianu forbolu stymuluje p85/PI-3K, ale nie aktywuje PI-3K γ , a stymulacja płytek krwi przez estry forbolu jest hamowana przez peptyd o sekwencji RGDS, przy obniżeniu wytwarzania PtdIns(3,4)P₂ o około 80% [15]. Ponadto stwierdzono, że w płytkach krwi PtdIns(3,4,5)P₃ promuje fosforylację plekstryny (p47) głównego substratu PKC, hamowanej w obecności wortmaniny [63]. Chociaż funkcja plekstryny w warunkach *in vivo* nie jest w pełni wyjaśniona, sugeruje się, że plekstryna może mieć wpływ na szlaki przekazywania sygnałów z udziałem PLC, PI-3K czy fosfataz inozytolowych. Ufosforylowana plekstryna hamując aktywność kinazy 3-fosfatydyloinozytolu blokuje tworzenie produktów działania PI-3K biorących udział w mechanizmach aktywacji płytek [64, 65].

VI. Uwagi końcowe

Mechanizmy przekazywania sygnałów w płytkach krwi są bardzo złożone. Pomimo różnic w

strukturze chemicznej, właściwościach i wielkości cząsteczki różnych fizjologicznych stymulatorów, aktywność biologiczna przejawiająca się m. in. adhezją, sekrecją czy agregacją płytek jest natychmiastowa i taka sama. Aktywność biologiczna płytek krwi uzależniona jest od szlaku przekazywania sygnału i tworzenia różnych wtórnych przekazników informacji. Produkty działania kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (zarówno ufosforylowane fosfatydyloinozytyle, jak i ufosforylowane białka) są powiązane bezpośrednio z przekaznictwem sygnału w płytkach krwi. Istotną rolę w aktywacji płytek krwi spełniają nie tylko kinazy fosfatydyloinozytolu, ale także fosfatazy inozytolowe, przeprowadzające defosforylację Ptd-Ins(3,4,5)P₃ i prowadzą do powstania PtdIns(3,4)P₂, który z kolei uczestniczy w stabilizowaniu agregatów płytkowych [66].

Podziękowania

Praca finansowana z badań własnych UŁ 505/448.

Artykuł otrzymano 31 marca 2003

Zaakceptowano do druku 31 lipca 2003

Piśmiennictwo

- Blockmans D, Deckmyn H, Vermeylen J (1995) *Blood Rev* **9**: 143-156
- Kroll MH, Schafer AJ (1995) *Immunopharmacology* **29**: 31-65
- Levy-Toledano S (1999) *Haemostasis* **29**: 4-15
- Rittenhouse SE (1996) *Blood* **12**: 4401-4414
- Ryningen A, Holmsen H (1999) W: Gundu H, Rao R (red) *Platelet Physiology and Pharmacology*. Kluwer Academic Publishers, Norwell, 1-22
- Selheim F, Holmsen H, Vassbotn FS (2000) *Platelets* **11**: 69-82
- White GC (2000) *Blood Coagul Fibrinol* **11**: 53
- Wu K (1996) *J Internal Med* **239**: 17-34
- Barańska J (1995) W: Konarska L (red) *Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce*. PWN, Warszawa, str. 138-153
- Takenawa T, Itoh T, Fukami K. (1999) *Chem Phys Lipids* **98**: 13-22.
- Domin J, Pages F, Volinia S, Rittenhouse SE, Zveleb il MJ, Stein RC, Waterfield MD (1997) *Biochem J* **326**: 139-147
- Domin J, Waterfield MD (1997) *FEBS Lett* **410**: 91-95
- Wymann MP, Pirola L (1998) *Biochim Biophys Acta* **1436**: 127-150
- Rubio I, Rodriguea-Viciana P, Downward J, Wetzker R (1997) *Biochem J* **326**: 891-985
- Zhang J (1996) *J Biol Chem* **271**: 6265-6272
- Zhang J, Fry MJ, Watfield MD, Jaken S, Liao L, Fox JE, Rittenhouse SE (1992) *Biol Chem* **267**: 4686-4692
- Saci A, Rendu F, Bachelot-Loza Ch (2000) *Biochem J* **351**: 669-676
- Gachet C, Payrastre B, Guinebault C, Trumel C, Ohlmann P, Mauc G, Cazenave JP, Plantavid M, Chap H (1997) *J Biol Chem* **272**: 4850-4854
- Zhang J, King WG, Dillon S, Hall A, Feig L, Rittenhouse SE (1993) *J Biol Chem* **268**: 22251-22254
- Rosado JA, Sage SO (2000) *J Biol Chem* **275**: 9110-9113
- Zhang J, Shattil SJ, Cunningham MC, Rittenhouse SE (1996) *J Biol Chem* **271**: 6265-6272
- Tang X, Downes CP (1997) *J Biol Chem* **272**: 14193-14199
- Lu PJ, Hsu AL, Wang DS, Chen CS (1998) *Biochemistry* **37**: 9776-9783
- Corvera S, Czech MP (1998) *Trends Cell Biol* **8**: 442-446
- Fruman DA, Rameh LE, Cantley LC (1999) *Cell* **97**: 817-820
- Vemuri GS, Zhang J, Huang R, Keen JH, Rittenhouse SE (1996) *Biochem J* **314**: 805-810
- Lauener RW, Stevens ChM, Sayed MR, Salari H, Duranio V (1999) *Biochim Biophys Acta* **1999**: 197-208
- Lagrué AH, Francischetti JMB, Guimaraes JA (1999) *FEBS Lett* **448**: 95-100
- Gutkind JS, Lacal PM, Robbins KC (1990) *Mol Cell Biol* **10**: 3806-3812
- Ji P, Haimovich B (1999) *Biochim Biophys Acta* **1448**: 543-552
- Haimovich B, Lipfert L, Brugge JS, Shattil SJ (1993) *J Biol Chem* **268**: 15868-177
- Rankin S, Hooshmand-Rad R, Claesson-Welsh L, Rozen gurt E (1996) *J Biol Chem* **271**: 7829-7834
- Norman RG and Augustine JA (1998) *Blood* **91**: 930-939
- Zheng Y, Baghrodia S, Cerione RA (1994) *J Biol Chem* **269**: 18727-18730
- Nolan RD, Lapetina EG (1990) *J Biol Chem* **265**: 2441-2445
- Sultan C, Breton M, Mauc G, Grondin P, Plantavid M, Chap H (1990) *Biochem J* **269**: 831-834
- Cunningham TW, Lips DL, Bansal VS, Caldwell KK, Mitchell CA, Majerus PW (1990) *J Biol Chem* **265**: 21676-21683
- Carter AN, Huang R, Sorisky A, Downes CP, Rittenhouse SE (1994) *Biochem J* **301**: 415-420
- Hawkins PT, Jackson TR, Stephens LR (1992) *Nature* **358**: 157-159
- Holmsen H, Day HJ, Setkowsky CA (1972) *Biochem J* **129**: 67-82
- Yamamoto K, Graziani A, Carpenter C, Cantley LC, Lapetina EG (1990) *J Biol Chem* **265**: 22086-22089
- Ryningen A, Holmsen H (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **245**: 757-763
- Selheim F, Idose R, Fukami M, Holmsen H, Vassbotn FS (1999) *Biochem Biophys Res Commun* **263**: 780-785
- Sultan C, Plantavid M, Bachelot C, Grondin P, Breton M, Mauc G, Levy TS, C a e n J P, C h a p H (1991) *J Biol Chem* **266**: 23554-23557
- Leon C, Hechler B, Vial C, Leray C, Cazanave JP, Gachet C (1997) *FEBS Lett* **403**: 26-30
- Mills DCB (1996) *Thromb Haemost* **76**: 835-856
- Hourani SM (1996) *J Automatic Pharmacol* **16**: 243-298
- Vial C, Hechler B, Leon C, Casenave JP, Gachet C (1997) *Thromb Haemost* **78**: 1500-1504
- Olas B (2001) *Acta Haematol Polon* **32**: 393-405
- Gibbins J, Asselin J, Farndale R, Barnes M, Law CL, Watson SP (1996) *J Biol Chem* **271**: 18095-18099
- Gibbins JM, Briddon S, Shutes A, van VM, van-de WJ, Saito T, Watson SP (1998) *J Biol Chem* **273**: 34437-34443
- Falasca M, Logan SK, Lehto VP, Baccante G, Lemmon MA, Schlessinger J (1998) *EMBRO J* **17**: 414-422
- Bae YS, Cantley LG, Chen CS, Kim S, Kwon KS, Rhee SG (1998) *J Biol Chem* **273**: 4465-4469
- Rameh LE, Rhee SG, Spokes K, Kazlauskas A, Cantley LC, Cantley LG (1998) *J Biol Chem* **273**: 23750-23757
- Pasquet JM, Bobe R, Gross B, Gratacap MP, Tomlison MG, Payrastre B, Watson SP (1999) *Biochem J* **342**: 171-177
- Gratacap MP, Payrastre B, Viala C, Mauc G, Plantavid M, Chap H (1998) *J Biol Chem* **273**: 24314-24321
- Bobe R, Wilde JL, Maseberger P, Venkateswarlu K, Cullen PJ, Siess W, Watson SP (2000) *J Biol Chem* **275**: 8016-8026
- Jung SM, Moroi M (2000) *J Biol Chem* **275**: 8016-8026

59. Chacko G W, Brandt J T, Coggeshall K M, Anderson C L (1996) *J Biol Chem* **271**: 10775-10781
60. Saci A, Pain S, Rendu F, Bachelot-Loza C (1999) *J Biol Chem* **22**: 1898-1904
61. Jackson S P, Schoenwaelder S M, Yuan Y, Rabinowitz I, Salem H H, Mitchell C A (1994) *J Biol Chem* **269**: 27093-27099
62. King W G, Kucera G L, Sorisky A, Zhang J, Rittenhouse S E (1991) *Biochem J* **278**: 475-480
63. Zhang J, Falck J R, Reddy K K, Abrams C S, Zhao W (1995) *J Biol Chem* **270**: 22807-22810
64. Abrams C S, Zhang J, Downes C P, Tang X, Zhao W, Rittenhouse S E (1996) *J Biol Chem* **271**: 25192-25197
65. Abrams C S, Zhao W, Belmonte E, Brass L F (1995) *J Biol Chem* **270**: 23317-23321
66. Giuriato S, Payraastre B, Drayer L, Plantavid M, Woscholski R, Parker P, Erneux C (1997) *J Biol Chem* **272**: 26857-26863

Układ genów interleukiny-1 w fizjologii gonady męskiej

Interleukin-1 gene system in physiology of human testis

NATALIA ROZWADOWSKA, DOROTA FISZER, MACIEJ KURPISZ

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Interleukina-1
- III. Antagonista receptorowy (IL-1RA)
- IV. Receptory IL-1 (IL-1RI i IL-1RII)
- V. Konwertaza IL-1 β i kalpaina
- VI. Interleukina-18
- VII. Transdukcja sygnału
- VIII. System IL-1 w gonadzie męskiej
 - IX-1. Lokalizacja ekspresji
 - IX-2. Sugerowana funkcja IL-1 w gonadzie męskiej
- X. Podsumowanie

Contents:

- I. Introduction
- II. Interleukin-1
- III. Receptor antagonist (IL-1RA)
- IV. Receptors for IL-1 (IL-1RI and IL-1RII)
- V. Interleukin-1 β Converting Enzyme (ICE) and calpain
- VI. Interleukin-18
- VII. Signal transduction
- VIII. IL-1 system in human testis
 - IX-1. Localization of expression
 - IX-2. Proposed function of IL-1 in human testis
- X. Summary

Wykaz skrótów: AcPL — cząsteczka zasocjowana z receptorem IL-18; ICE — ang. *Interleukin-1 Converting Enzyme* — proteaza cysteinowa — kaspaza-1; IL-1 α — interleukina-1 alfa; IL-1 β — interleukina-1 beta; IL-18 — interleukina-18; pIL-18 — prekursorowa forma IL-18; IL-1RA — antagonist receptoru interleukiny-1; IL-1RacP — cząsteczka zasocjowana z receptorem IL-1; IL-1RI — receptor I dla interleukiny-1; IL-1RII — receptor II dla interleukiny-1; IL-2 — interleukina-2; IL-4 — interleukina-4; INF γ — interferon gamma; IRAK1/2 — Kinazy 1/2 zasocjowane z receptorem IL-1; MyD88 — białko różnicowania szpiku 88; NF κ B — ang. *nuclear factor kappa B* — czynnik transkrypcyjny B; NIK — kinaza indukująca NF κ B; TIR — Toll/IL-1R motyw; TNF — ang. *tumor necrosis factor* — czynnik martwicy nowotworu; TRAF6 — czynnik 6 zasocjowany z receptorem dla czynnika martwicy nowotworu; LPS — lipopolisacharyd; G-CSF — czynnik stymulujący kolonizację granulocytów; M-CSF — czynnik stymulujący kolonizację makrofagów

I. Wstęp

Spermatogeneza jest niezmiernie skomplikowanym a jednocześnie precyzyjnym procesem, który prowadzi do powstawania wysoko wyspecjalizowanych, haploidalnych męskich komórek rozrodczych z diploidalnej komórki macierzystej. Badania z lat

ostatnich przynoszą liczne informacje o udziale interleukiny-1 (IL-1) w lokalnej kontroli czynności gonady męskiej. Dotyczy to w szczególności udziału tej cytokiny w stymulacji wzrostu i różnicowania komórek gametogenicznych. Dostarczanych jest coraz więcej dowodów na to, że interleukina-1 (IL-1) ma znaczący wpływ na aktywność męskich komórek rozrodczych. Działania takie mają: interleukina-1 α (IL-1 α), interleukina-1 β (IL-1 β), receptor I (IL-1RI), receptor II (IL-1RII), antagonist receptorowy (IL-1RA) i konwertaza (ICE — ang. *Interleukin-1 Converting Enzyme*), zwana także kaspazą-1, oraz interleukina-18 (IL-18) wraz z homologicznym układem receptorowym.

II. Interleukina-1

Interleukina-1 jest jednym z głównych czynników stanu zapalnego. Wydzielana głównie przez makrofagi i monocyty jest czynnikiem stymulującym wiele procesów biologicznych. Wśród nich można wyróżnić: stymulację proliferacji limfocytów T, różnicowanie limfocytów B, pobudzanie uwalniania czynników stymulujących kolonizację granulocytów (G-CSF) i makrofagów (M-CSF) oraz wzmaganie wydzielania histaminy i produkcji prostaglandyn.

W genomie człowieka istnieją dwa różne geny kodujące interleukinę-1: *IL-1 α* i *IL-1 β* , wywodzące się od wspólnego genu (*proIL-1*), które powstały prawdopodobnie na skutek duplikacji [1]. Geny

Mgr, dr, prof. dr hab.; Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań; nataliacz@wp.pl, fiszdor@man.poznan.pl, kurpimac@man.poznan.pl

IL-1 sklonowano w 1985 i zmapowano na chromosomie 2 (2q14; 2q21). Białka przez nie kodowane są syntetyzowane jako białka prekursorowe o masie 31 kDa, które w wyniku działania proteazy stają się formami dojrzalymi o masie 17 kDa. *IL-1 α* i *IL-1 β* posiadają tylko 26% homologii w sekwencji aminokwasów, jednakże ich struktura przestrzenna wykazuje znaczne podobieństwo, a dotyczy to w szczególności aminokwasów odpowiedzialnych za tworzenie struktur wiążących receptor. Oba białka prekursorowe pozbawione są sekwencji liderowych, a mechanizm ich transportu na zewnątrz komórki nie jest do końca poznany. Większość syntetyzowanej *IL-1* pozostaje w cytoplazmie, a niewielka część wędruje na powierzchnię komórki, gdzie przekształca się w tzw. formę błonową [2]. Enzymy odpowiedzialne za aktywację *IL-1 α* i *IL-1 β* to odpowiednio kalpaina i ICE (ang. *Interleukin-1 converting enzyme*). W przeciwieństwie do *IL-1 α* , druga forma *IL-1* musi zostać zaktywowana w wyniku enzymatycznego działania proteazy (ICE) na pierwotny produkt translacji. Pomimo, że oba białka mają miejsca glikozylacji, proces ten nie ma wpływu na aktywność *IL-1*. Być może pełni on rolę przy wiązaniu się błonowej *IL-1* do receptorów na makrofagach [3]. Ciekawym wydaje się również fakt, iż odcinany N-koniec interleukiny-1 α zawiera sekwencję liderową kierującą białko do jądra komórki. Nadekspresja tego peptydu o masie 16kDa w komórkach hodowanych *in vitro* powodowała ich transformację w komórki nowotworowe [4].

III. Antagonista receptorowy (*IL-1RA*)

Antagonista receptorowy jest trzecim białkiem wiążącym się z receptorami *IL-1* (*IL-1RI* i *IL-1RII*). Jego wiązanie blokuje receptor, nie powoduje transdukcji sygnału do wewnątrz komórki i w efekcie powoduje zahamowanie odpowiedzi na wydzielaną parakrynowo *IL-1* [5]. Istnieją trzy formy *IL-1RA* — jedna forma wydzielana na zewnątrz komórki i dwie formy wewnątrzkomórkowe. Formy te powstają w wyniku korzystania przez polimerazę RNA z dwóch alternatywnych promotorów (formy zewnętrznej i wewnątrzkomórkowej), a różne białka wewnątrzkomórkowe powstają w wyniku alternatywnego składania transkryptu [6]. Badania porównawcze genów dla *IL-1 α* , *IL-1 β* i *IL-1RA* doprowadziły do ustalenia ich drzewa genealogicznego. Sugeruje się, że wszystkie te geny wywodzą się od wspólnego przodka (jego struktura pozostaje nieznana), a jego formy powstały na skutek częściowej duplikacji. Pierwsza z duplikacji miała miejsce ok. 3,5

mln lat temu i stworzyła dwa geny *pralIL-1* (α i β) oraz *IL-1RA*, druga zmiana pojawiła się ok. 2,8 lat temu i podzieliła *IL-1* na α i β [7]. *IL-1RA* łączy z *IL-1 β* 26% podobieństwo sekwencji, a główna różnica polega na obecności sekwencji liderowej na N-koncu polipeptydu *IL-1RA* pozwalającym na klasyczną sekrecję białka (przez aparat Golgiego).

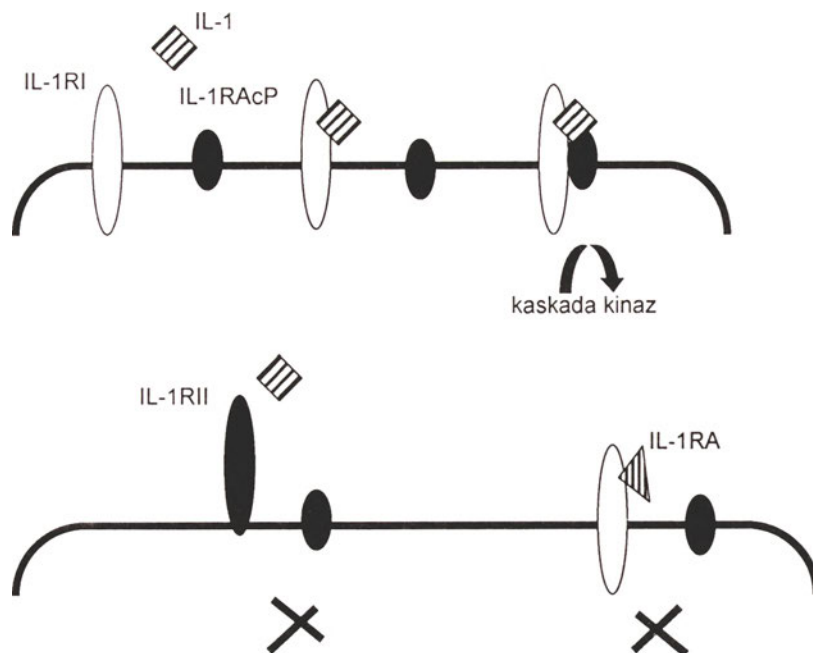
Badania prowadzone na zwierzętach doświadczalnych pokazały, że *IL-1RA* blokuje aktywność *IL-1* zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Wprowadzenie do krwioobiegu królika interleukiny 1 [8], powodowało podciśnienie, któremu można było zapobiec poprzez wcześniejsze podanie *IL-1RA*. Stwierdzono także łagodniejszy przebieg ostrych i przewlekłych chorób zapalnych przy podawaniu *IL-1RA*. Podanie antagonisty receptorowego zdrowym ochotnikom nie wywoływało żadnych reakcji [9].

IV. Receptory *IL-1* (*IL-1RI* i *IL-1RII*)

Dotychczas zidentyfikowano dwa geny kodujące białka receptorowe dla *IL-1*, *IL-1RI* (75 kD) i *IL-1RII* (38 kD) [10]. *IL-1RI* o masie 80 kDa ma większe powinowactwo wiązania do *IL-1 α* , a *IL-1RII* o masie 68 kDa wykazuje przewagę do wiązania *IL-1 β* [11]. Oba białka należą do rodziny immunoglobulin, zawierają trzy domeny o charakterystycznej budowie przestrzennej zawierającej dwa motywy typu struktury β (ang. *β sheet*) połączone mostkiem dwusiarczkowym i oba ulegają glikozylacji, która wydaje się być kluczowa dla powinowactwa receptor-ligand [12]. Łańcuch polipeptydowy składa się z trzech odcinków: (1) zewnątrzkomórkowego — wiążącego *IL-1*, (2) transbłonowego i (3) wewnątrzkomórkowego — odpowiedzialnego za transdukcję sygnału. Właśnie w trzecim odcinku występuje główna różnica w budowie *IL-1RI* i *IL-1RII*; receptor drugi posiada bardzo krótki odcinek cytosolowy niezdolny do przekazywania sygnału. Wydaje się, że *IL-1RII* funkcjonuje jako receptor-przynęta (ang. *decoy receptor*), stanowiąc negatywny regulator aktywności *IL-1* uniemożliwiający wiązanie ligandu do *IL-1RI* [13] (Ryc.1). Ekspresja mRNA dla *IL-1RI* podlega regulacji: ujemnej przez *IL-1* i dodatniej przez kortykosteroidy, nabłonkowy czynnik wzrostu, *IL-4* i *IL-2*. Pomimo dowodów na istnienie regulacji ekspresji genu *IL-1RI*, ostatnie badania ujawniły brak w sekwencji elementów regulacyjnych TATA i CAAT oraz fakt, że region promotorowy *IL-1RI* przypomina region genów kodujących białka konstytutywne (ang. *housekeeping genes*) [3]. Układ receptorowy *IL-1* jest bardzo wydajny, do wywołania efektu wystarczy zajęcie tylko około 2%-

10% receptorów ze średnio 200 znajdujących się na powierzchni komórki [14] (patrz Ryc.1).

somie 11 [16]. Gen nie zawiera sekwencji typu TATA ani CAAT, zawiera natomiast inne sekwencje



Ryc.1. Schemat działania systemu receptorowego IL-1 (szczegółowy opis w tekście); IL-1- interleukina-1; IL-1RA — antagonist receptorowy interleukyny-1; IL-1RI — receptor I interleukyny-1; IL-1RII — receptor II interleukyny-1.

V. Konwertaza IL-1 β i kalpaina

Obie formy IL-1, jak wyżej wspomniano, są wytwarzane przez aparat translacyjny w formie prekursorowej. IL-1 α jest aktywna zarówno w postaci prekursora, jak i formy dojrzałej, natomiast IL-1 β do swej aktywacji wymaga cięcia proteolitycznego. Cięcia tego dokonuje enzym ICE (ang. *IL-1 β Converting Enzyme*). Ostatnio odkryto, że ICE dokonuje rozszczepienia także prekursorowej formy IL-18. Konwertaza-1 należy do nowo odkrytej rodziny proteaz cysteinowych, które wymagają przy miejscu cięcia obecności kwasu asparaginowego [15]. W pIL-1 β znajdują się dwa miejsca dla działania enzymu przy Asp²⁷ i Asp¹¹⁶. Dojrzała IL-1 β znajduje się prawie wyłącznie poza komórką, więc prawdopodobnie trawienie enzymatyczne połączone jest z uwalnianiem tej cytokiny. ICE złożony jest z dwóch podjednostek p20 i p10 tworzących heterodimer, obie jednostki powstają przez autoproteolizę proenzymu (45 kDa). Z użyciem analizy krystalograficznej ustalono, że aktywny kompleks enzymatyczny złożony jest z dwóch związanych z błoną komórkową heterodimerów, tworzących tetramer, obróconych w stosunku do siebie o 180°. ICE jest kodowany przez pojedynczy gen (*il-1 β c*) o długości ok. 10,5 kbp i złożony z dziewięciu intronów i 10 eksonów, które w genomie ludzkim zlokalizowano na chromo-

regulacyjne (np. miejsce wiązania NF κ B). Transkrypty dla ICE powstają na skutek alternatywnego składania, tworząc pięć różnych cząsteczek mRNA, które mogą ulegać translacji do pięciu izoform enzymu. Do tej pory nie udało się ustalić funkcjonalnego znaczenia istnienia różnych form ICE. Gen konwertazy dla IL-1 β ulega konstytutywnej ekspresji w monocytach. Jako proenzym znajduje się w cytoplazmie, a jako aktywny enzym w błonie komórkowej.

ICE wykazuje znaczną homologię (28%) do rodziny genów *ced-3* (występujących u nicieni *C.elegans*), których produkty są niezbędne w procesie apoptozy. Wysłunęto hipotezę, że ICE jest odpowiednikiem Ced-3 ssaków. Doświadczenia prowadzone przez różnych autorów wykazały, że w zależności od warunków przeprowadzanych badań zablokowanie aktywności enzymatycznej ICE hamowało, bądź nie, programowaną śmierć komórek [44]. Obserwacje prowadzone na myszach „knock-out” z „wyłączonym” genem kodującym ICE dały możliwość poznania funkcji tego enzymu. Myszy takie miały znacznie obniżoną zdolność do produkcji dojrzałej IL-1 β (95%), poza tym były płodne i nie miały wad rozwojowych. Interesujące jest, że myszy te miały także znacznie obniżony poziom (o ok. 90%) IL-1 α (po stymulacji LPS), co tłumaczono istnieniem nowego, nie poznanego do tej pory, mechanizmu transportu IL-1 α na zewnątrz komórki. Jednak

tymocyty izolowane ze wspomnianych wyżej myszy „knock-out” w odróżnieniu od tymocytów myszy typu dzikiego nie odpowiadały apoptozą na stymulację przeciwciałami anty-Fas.

Następnym krokiem było utworzenie szczepu myszy, które charakteryzowały się nadprodukcją (ang. *overexpression*) ICE. Z powodu częstej letalności płodów nie udało się uzyskać osobników z nadekspresją ICE we wszystkich tkankach. Myszy z wysoką ekspresją ICE tylko w keratynocytach (tylko heterozygoty — homozygoty są letalne) wykazują chroniczne zapalenie skóry, owrzodzenia i deformacje uszu oraz powiek. Badania potwierdziły, że zmiany te są spowodowane podwyższoną apoptozą. Myszy te mają znacznie wyższy poziom IL-1 β i IL-18 niż myszy kontrolne.

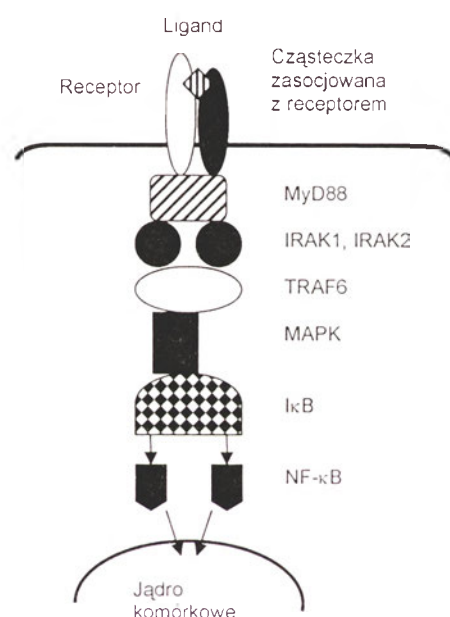
VI. IL-18

Interleukina-18, początkowo zwana czynnikiem indukującym powstawanie interferonu gamma (ang. *INF- γ -inducing factor*), jest najmłodszą interleukiną zaliczaną do rodziny IL-1. Łączy ją z IL-1 nie tylko podobieństwo strukturalne, ale i funkcjonalne. Nie zawiera ona sekwencji liderowej, jest wytwarzana w nieaktywnej formie (uaktywnienie następuje w wyniku trawienia kaspazą-1). IL-18 indukuje ekspresję INF γ , TNF, IL-1, kilku chemokinin i ligandu Fas. Receptorem IL-18 jest IL-18R (członek rodziny receptorów IL-1), jego wspomagającym białkiem (podobnym do IL-1RacP) jest AcPL — będący również członkiem wyżej wspomnianej rodziny. Cytokina 18 pełni ważną rolę w odpowiedzi immunologicznej typu Th-1. Jest wytwarzana głównie przez monocyty, makrofagi i keratynocyty, a wraz z IL-12 współdziała w stymulowaniu makrofagów do produkcji interferonu γ [17].

VII. Transdukcja sygnału

Kaskada sygnałowa używana przez receptory z rodziny IL-1 (IL-1R oraz IL-18R), występuje w komórkach ssaków (naczelne, gryzonie), owadów (*Drosophila*), a nawet roślin. Receptory z tej rodziny mają ten sam plan budowy i zawierają charakterystyczną domenę TIR (ang. *Toll/IL-1R domain*). Kaskada sygnałowa składa się z receptora [cząsteczka wiążąca ligand cytokinowy i cząsteczka zasocjowana z receptorem dla interleukiny-1 (IL-1RacP)], molekuł IRAK1 i IRAK2 (ang. *IL-1 receptor associated kinase*) — kinaz związanych z receptorem IL-1, cząsteczki adaptorowej TRAF6. Do kaskady należy jeszcze jedno białko o interesującej budowie,

MyD88 zawierające tzw. domenę śmierci (ang. *death domain*). Nadekspresja dominującej, nieczynnej formy tego białka powoduje, że komórki są bardziej odporne na apoptozę indukowaną cytokinami. TRAF6 fosforyluje NIK (ang. *NF- κ B inducing kinase*), która z kolei przyłącza reszty fosforanowe do IKK-1 i IKK-2 — kinaz hamujących I κ B. Ufosforylowane I κ B uwalniają aktywny czynnik NF- κ B, co powoduje rozpoczęcie ekspresji odpowiednich genów. Doświadczenia wykazały, że powyższa kaskada sygnałowa może również doprowadzić do uaktywnienia innego czynnika transkrypcyjnego jakim jest AP-1 — punktem kontrolnym decydującym o efekcie końcowym sygnału wydaje się być białko TRAF-6 [18]. Kaskada sygnałowa przedstawiona została na Ryc. 2.



Ryc.2 Schemat kaskady sygnałowej receptorów z rodziny Toll (szczegółowy opis w tekście) IRAK1/2 — Kinazy 1/2 zasocjowane z receptorem IL-1; MyD88 — białko różnicowania szpiku 88; NF κ B — ang. *nuclear factor kappa B* — czynnik transkrypcyjny κ B; MAPK — kinaza białkowa aktywowana przez mitogeny; TRAF6 — czynnik połączony z receptorem czynnika martwicy nowotworu; I κ B — białko hamujące κ B.

VIII. Rola IL-1 w funkcjonowaniu gonady męskiej

Badania ostatnich lat ujawniły, że IL-1 pełni istotną rolę w funkcjonowaniu gonady męskiej. Wyniki uzyskane do tej pory opierają się przede wszystkim na doświadczeniach prowadzonych na zwierzętach (mysz, szczur), a tylko pojedyncze doniesienia opisują ten problem w odniesieniu do człowieka.

IL-1 posiada zdolność do stymulowania proliferacji mysich tymocytów. Zaobserwowano, że ekstrakty z gonady szczura i człowieka wykazywały po-

dobne właściwości mitogenne. Stąd wyciągnięto wniosek, że w gonadzie męskiej znajduje się substancja podobna do IL-1 (tIL-1). Na podstawie biochemicznych właściwości IL-1 pochodzącej z jądra (masa cząsteczkowa 17 kDa, punkt izoelektryczny pI 5,7) przypuszcza się, że tIL-1 jest homologiczna do IL-1 α , a przeprowadzone ostatnio badania ujawniły istnienie co najmniej trzech bioaktywnych izoform IL-1 występujących w gonadzie męskiej [19].

Nagromadzone wyniki doświadczeń coraz częściej dowodzą, że IL-1 może być wytwarzana przez zdrowe tkanki w fizjologicznych, niezapalnych warunkach oraz przez komórki inne niż zaktywowane monocyty. W tych tkankach pełni ona funkcję czynnika wzrostu (np. IL-1 stymuluje replikację DNA w chondrocytach) [20].

VIII-1. Lokalizacja białek

Miejsce powstawania IL-1 w gonadzie męskiej nadal pozostaje sporne. Eksperymenty *in vitro* na hodowanych komórkach człowieka ujawniły, że IL-1 jest wytwarzana zarówno w komórkach Leydiga jak i Sertolego. Udowodnione zostało, że zarówno IL-1 α jak i β ulegają ekspresji w ludzkiej, fizjologicznie prawidłowej gonadzie męskiej [21]. W kompartmentie zewnątrzkanalikowym przeważa ekspresja IL-1 β nad IL-1 α , natomiast w przedziale wewnątrzkanalikowym sytuacja jest odwrotna [22]. Ekspresja IL-1 wewnątrz kanalików może zachodzić zarówno w obu wyżej wspomnianych typach komórek, tj. somatycznych jądra, jak i generatywnych. Doświadczenia prowadzone przez różne grupy badawcze nie przyniosły ostatecznego rozwiązania tego problemu. W eksperymentach *in vitro*, w kulturze komórek Sertolego (zanieczyszczonej komórkami gametogenicznymi) uzyskano trzykrotnie wyższy poziom bioaktywności IL-1 niż w analogicznej hodowli po uprzednim usunięciu komórek germinalnych [23]. Badania przy pomocy techniki hybrydyzacji *in situ* ujawniły, że synteza mRNA dla IL-1 α w kanalikule plemnikotwórczym u szczura zachodzi przede wszystkim przy podstawie kanalików — być może w komórkach Sertolego, niestety czułość tej techniki nie pozwoliła wykluczyć jednoznacznie komórek premeiotycznych jako alternatywnego źródła IL-1 α [24].

Przeprowadzono także doświadczenia na szczurach, które wskazują jako miejsce produkcji IL-1 komórki rozrodcze — przede wszystkim spermatocyty w pachytenie i wczesne okrągłe spermatydy [21]. Dokładne ustalenie miejsca syntezy IL-1 w śródmiaższu jest problematyczne ze względu na znajdujące się tam makrofagi jądrowe, stanowiące ok.

20% populacji komórek śródmiaższu, co może zniekształcać obraz opisywanych obserwacji. Doświadczenia *in vitro* z hodowanymi ludzkimi komórkami Leydiga sugerują, że komórki te mogą być źródłem obydwu form interleukiny [23]. Badania prowadzone przez S a n t a n o s i wsp. wykazały, że żaden z genów systemu IL-1 nie ulega ekspresji w dojrzałych gametach męskich — plemnikach [25].

Wykonano badania mające na celu ustalenie ekspresji obydwu receptorów w gonadzie męskiej. Badania prowadzono metodą RT-PCR na materiale pochodzącym od szczura, myszy i człowieka, oraz na frakcjach składających się z komórek Leydiga, Sertolego, spermatocytów, spermatyd, a w kontroli pozytywnej — makrofagów. Analiza wykazała, że zarówno w komórkach mysich jak i szczurzych, w każdej z tych frakcji komórkowych dochodziło do ekspresji genów IL-1RI i IL-1RII. W komórkach ludzkich nie zidentyfikowano transkryptów dla tych genów w komórkach gametogenicznych (spermatydach i spermatocytach), podczas gdy były one obecne w komórkach Sertolego i Leydiga [26]. Wcześniejsze prace donosiły o bardzo niskiej gęstości występowania receptora dla IL-1 we wnętrzu kanalików plemnikotwórczych gryzoni. Wyniki uzyskano znając receptor [125 I]IL-1 α i oceniając go po uprzedniej autoradiografii pod mikroskopem [27]. Także G o m e z i M o r e l [26] ocenili, że w kompartmentie wewnątrzkanalikowym zachodzi najniższa ekspresja genu dla IL-1RI. Obecność IL-1RI na poziomie białka, opierając się na badaniu wiązania wyznaczonego ligandu w śródmiaższu jądra u myszy opisał już T a k a o [27]. Badania makrofagów jądrowych wykazały, że są one mniej wrażliwe na wysokie stężenia IL-1 niż makrofagi izolowane z płynu otrzewnowego, natomiast stwierdzono także obecność receptora dla interleukiny-1 na komórkach Leydiga. Ponadto badania prowadzone w laboratoriach francuskich wykazały, że do ekspresji IL-1RI w kompartmentie zewnątrzkanalikowym, obok komórek Leydiga i makrofagów jądrowych, są zdolne również komórki wchodzące w skład ścian naczyń krwionośnych w śródmiaższu [26]. Ponieważ transkrypty dla receptora IL-1 zaobserwowano także wewnątrz kanalików sieci jądra i nabłonku przewodów najądrza (ang. *epididymal duct*) (a wiadomo, że interleukina-1 powoduje zwiększenie przepuszczalności ścian naczyń w gonadzie), postawiono tezę, że obecność IL-1 może być związana z ułatwianiem wymiany wielu substancji pomiędzy krwią a płynem z kanalików sieci jądra. Lokalizacja IL-1RI w interstycjum może być związana również z funkcją, jaką sieć jądra pełni w jego systemie obronnym. Ta hipo-

teza poparta jest obserwacją inicjacji gromadzenia się limfocytów w przypadku autoimmunologicznego zapalenia jądra właśnie w rejonie sieci.

VIII-2. Sugerowana rola IL-1 w funkcjonowaniu gonady męskiej

Zaobserwowano wzrost stężenia IL-1 podczas dojrzewania szczurów aż do momentu osiągnięcia przez nie dojrzałości płciowej, kiedy to poziom produkowanej IL-1 pozostaje stały [14]. Funkcja IL-1 w gonadzie męskiej jest przedmiotem intensywnie prowadzonych badań na zwierzętach i pozostaje nadal kwestią do wyjaśnienia. Sugerowana jest jej rola w parakrynej regulacji wzrostu i różnicowania komórek gametogenicznych podczas spermatogenezy. Doświadczenia przeprowadzone do tej pory pozwoliły ustalić, że tIL-1 wywołuje spadek aktywności aromatazy (zależnej od poziomu FSH) w komórkach Sertolego oraz obniżenie poziomu cAMP [29]. Badania wykonane na szczurach, których nabłonek plemnikotwórczy wykazuje cykliczność stadiów dojrzewania, wykazały, że stężenie/bioaktywność IL-1 α jest stała we wszystkich stadiach nabłonka za wyjątkiem stadium VII, w którym aktywność IL-1 α jest bardzo niska. Interesujące jest, że właśnie to stadium jest jedynym, w którym nie występują komórki replikujące DNA. Wyniki te potwierdziły wcześniejsze obserwacje H a k o v i r t y i wsp. [30], którzy poddali jądra szczurów napromienianiu i śledzili regenerację nabłonka plemnikotwórczego. Zauważyli oni zwiększoną aktywność IL-1 α w odcinkach kanalików zawierających dzielące się spermatogonie. Podanie gryzoniom rhIL-1 α (ludzkiej rekombinowanej IL-1 α) powodowało stymulację syntezy DNA w spermatogoniach. Wynik ten pozwolił przypuszczać, że IL-1 α może pełnić rolę czynnika wzrostu dla wczesnych komórek gametogenicznych [31]. Badania przeprowadzone przez S t e p h a n i i wsp. na hodowanych komórkach podporowych szczura wykazały, że dodanie do medium hodowanego wielu różnych substancji (np. testosteron, zymosan, TNF α) powoduje wzrost syntezy mRNA dla IL-1 α , stymulacji takiej nie wywołuje natomiast FSH. Podanie INF γ powodowało stymulację przy niższych stężeniach a hamowanie syntezy przy wyższych [32]. Autostymulacja komórek Sertolego przez rhIL-1 powodowała gwałtowne zwiększenie ilości transkryptów dla IL-1 α i IL-1RI, a ko-kultura komórek Sertolego z ciałkami resztkowymi podnosiła poziom mRNA dla IL-1 α i IL-1RI dwukrotnie [33]. Ostatnie obserwacje wskazują, że IL-1 α jest stymulatorem wzrostu dla niedojrzałych komórek Sertolego szczu-

ra. P e t e r s e n i wsp. dowodzą, że w tym zakresie cytokina ta jest bardziej aktywna niż dobrze poznany hormon FSH [34].

Funkcja IL-1 w śródmiaższu także nie jest do końca poznana. Komórki Leydiga posiadają na swojej powierzchni receptor IL-1RI [35]. Doświadczenia wykazały, że IL-1 β ma hamujący wpływ na zależną od LH syntezę testosteronu przez komórki śródmiaższa. Spadek ten może być wywołany poprzez: obniżenie wiązania luteotropiny do receptora, zmniejszenie hCG-zależnej syntezy cAMP oraz obniżenie poziomu mRNA dla enzymu P450scc (ang. *cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450*) [21]. Enzym ten zlokalizowany jest na wewnętrznej błonie mitochondrialnej i katalizuje przemianę cholesterolu do pregnenolonu rozpoczynając łańcuch reakcji chemicznych prowadzących do utworzenia testosteronu [36]. W doświadczeniach na gryzoniach O g i l v i e i wsp. zauważyli, że podanie IL-1 β do komory mózgu szczura (ang. *intracerebroventricular-icv*) obniża poziom białka StAR (ang. *steroidogenic acute regulatory protein*). Białko to uczestniczy w transporcie cholesterolu do wewnętrznej błony mitochondrialnej, gdzie rozpoczyna się proces przekształcania cholesterolu w testosteron [37]. Wcześniej udowodniono, że IL-1 α nie wykazuje aktywności pozwalającej na zmniejszenie poziomu mRNA dla StAR [38]. Jak wspomniano powyżej, dominującą formą IL-1 w interstycjum jest IL-1 β , jednak doświadczenia *in vitro* wykazały, że komórki Leydiga są zdolne do ekspresji genów dla obu interleukin (zarówno transkryptów jak i białek) [23]. Co więcej, dodanie do medium hodowanego IL-1 β powoduje wzrost poziomu ekspresji mRNA dla IL-1 α [39]. Pomimo, że dla obu form IL-1 istnieje tylko jeden funkcjonalny receptor, to zauważono różnice w odpowiedzi komórek Leydiga szczura na stymulację: ludzką rhIL-1 β , ludzką rhIL-1 α i mysią rhIL-1 α . Najniższą efektywność (ok. 100-krotnie) w obniżaniu produkcji testosteronu wykazywała ludzka IL-1; wydaje się więc, że odpowiedź komórek Leydiga na poszczególne formy IL-1 α jest gatunkowo specyficzna [40]. W badaniach prowadzonych przez grupę Soder a testowano różne formy IL-1 α (dojrzała IL-1 α , pro-IL-1 α i wariantu 24proIL-1 α) w stymulacji steroidogenezy hCG-zależnej. Doświadczenia *in vitro* wykazały, że tylko krótsza izoforma (alternatywnie składowana) wpływa stymulująco na hCG-zależną syntezę testosteronu, inne formy IL-1 hamowały tę ścieżkę syntezy hormonu [41]. Dalsze badania wykazały, że IL-1 β (i w mniejszym stopniu IL-1 α) posiadają zdolność do stymulacji syntezy DNA w komórkach Leydiga pochodzących od niedojrzałych szczurów. Po-

stawiono więc hipotezę, że IL-1 wpływa na proliferację komórek Leydiga u szczurów przed pokwitaniem [42]. Przypuszcza się, że IL-1 ma wpływ na hamowanie funkcji rozrodczych w sytuacjach stresowych, podczas zapaleń i infekcji (podwyższony poziom IL-1). Przedstawiono schematy możliwych mechanizmów działania interleukiny-1 [27]. Hamowanie procesów reprodukcyjnych mogłoby być inicjowane bezpośrednio przez IL-1 w jądrze (regulacja parakrynowa) lub poprzez centralny system nerwowy. Ta druga forma oddziaływań miałaby się opierać na hamowaniu przez IL-1 wydzielania GnRH, bądź poprzez stymulację sekrecji CRF (ang. *corticotropin-releasing factor*) i obniżenie wydzielania hormonu luteinizującego (LH).

Jak do tej pory brak jest publikacji dotyczących ekspresji czy funkcji IL-18 w jądrze, jednak ostatnie raporty konferencyjne świadczą, że cytokinę tę zidentyfikowano w komórkach germinalnych u szczura (począwszy od 10 dnia po urodzeniu), a po podaniu jej do hodowli komórek Leydiga *in vitro* zaobserwowano, że stymuluje ona syntezę testosteronu [43].

VII. Podsumowanie

Produkty genów tworzących rodzinę IL-1 powiązane są wieloma zależnościami i stanowią złożony układ biologiczny, który w gonadzie męskiej wydaje się być jeszcze bardziej skomplikowany ze względu na pełnione odmienne funkcje [44]. Prace z ostatnich lat donoszą o istnieniu nowych „członków” rodziny IL-1 (IL-1ε, γ, ν, ζ) [45] oraz różnych tkankowo specyficznych produktów alternatywnego składowania, izoform poznanych wcześniej genów systemu IL-1. Rozwija się także wiedza na temat współzależności i mechanizmów interakcji komórek Sertolego z komórkami gametogenicznymi.

Pomimo wszystkich doniesień o ważnej roli IL-1 w gonadzie męskiej, transgeniczne myszy z wyłączonym genem dla IL-1RI nie wykazywały odchyleń ani w poziomie stężenia testosteronu, ani w liczbie plemników w najądrzu. Same IL-1RI-/- (nullizygotyczne pod względem tego genu) nie wykazywały zmian behawioralnych, a kryte przez nie samice były ciężarne [35]. Doświadczenia te nie przekreślają jednak jednoznacznie badań prowadzonych nad układem IL-1 w gonadzie męskiej a być może wskazują jedynie na istnienie alternatywnych dróg regulacji spermatogenezy mogących kompensować braki w sygnalizacji poprzez IL-1.

Wiedza na temat oddziaływań para- i autokrynowych w gonadzie, komunikacji pomiędzy komórkami (tego samego jak i innego typu) jest ciągle niewy-

starzająca dla sformułowania ostatecznych wniosków. Wreszcie — układ genów IL-1 ciągle jest stale uzupełniany, a „nowi” członkowie w zadziwiający sposób łączą go z problematyką spermatogenezy.

Artykuł otrzymano 4 lipca 2002

Zaakceptowano do druku 25 sierpnia 2003

Piśmiennictwo

1. March CJ, Mosley B, Larsen A, Cerretti DP, Braedt G, Price V, Gillis S, Henney CS, Kronheim SR, Grabstein K (1985) *Nature* **315**: 641-646
2. Brody DT, Durum SK (1989) *J Immunol* **143**: 1183-1187
3. Dinarello CA *The Cytokine Handbook* 2nd edition Chapter 3, 31-54, 1994
4. Stevenson FT, Turek J, Lockley RM, Lovett DH (1997) *PNAS* **94**: 508-513
5. Eisenberg SP, Evans RJ, Arend WP, Verderber E, Brewer MT, Hannum CH, Thompson RC (1990) *Nature* **343**: 341-346
6. Arend AP, Gurhridge CJ (2000) *Ann Rheum Dis* **59**: i60-i64
7. Eisenberg SP, Brewer MT, Verderber E, Heimdal P, Brandhuber BJ, Thompson RC (1991) *Proc Natl Acad Sci* **88**: 5232-5236
8. Ohlsson K, Bjork P, Bergenfeldt M, Hageman R, Thompson RC (1990) *Nature* **348**: 550-552
9. Granowitz EV, Porat R, Mier JW., Pribble JP, Stiles DM, Bloedow DC, Catalano MA, Wolff SM, Dinarello CA (1992) *Cytokine* **4**: 353-60
10. Sims JE, Painter SL, Gow IR (1995) *Cytokine* **7**: 483-490
11. Sims JE, Acres RB, Grubin CE, McMahan CJ, Wignall JM, March CJ, Dower SK (1989) *Proc Natl Acad Sci* **86**: 8946-8950
12. Sims JE, March CJ, Cosman D, Widmer MB, MacDonald HR, McMahan CJ, Grubin CE, Wignall JM, Jackson JL, Call SM (1988) *Science* **241**: 585-589
13. Colotta F, Dower SK, Sims JE, Mantovani A (1994) *Immunol Today* **15**: 562-566
14. Sims JE, Geyle MA, Slack JL, Alderson MR, Bird TA, Giri JG, Colotta F, Re F, Mantovani A, Shanebeck K (1993) *Proc Natl Acad Sci* **90**: 6155-6159
15. Wilson KP, Balck JF, Thompson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, Mureko MA, Chambers SP, Aldape RA, Raybuck SA (1994) *Nature* **370**: 270-274
16. Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Van Ness K, Greenstreet TA, March CJ, Kronheim SR, Druck T, Cannizzaro LA (1992) *Science* **256**: 97-100
17. Dinarello CA (1999) *J Allergy Clin Immunol* **103**: 11-24
18. Daun JM, Fenton MF (2000) *J Int Cyt Research* **20**: 843-855
19. Sultanat, Svecnikov K, Soder O (2000) *Endocrinology* **141**: 4413-4418
20. Soder O, Madison K (1988) *Br J Rheumatol* **27**: 21-26
21. Janitz M, Fiszer D, Łukaszyk A, Skorupski W, Kurpisz M (1995) *Immunol Letters* **48**: 139-143
22. Rozwadowska N, Fiszer D, Kurpisz M (2001) *Adv Exp Med Biol* **495**: 177-180
23. Cudicini C, Lejeune H, Gomez E, Bosmans E, Ballet F, Saez J, Jegou B (1997) *J Clin Endocrinol Metabol* **82**: 1426-1433
24. Jonsson CK, Zwitterström RH, Holst M, Parvonen M, Soder O (1999) *Endocrinology* **140**: 3755-3761

25. de los Santos MJ, Anderson DJ, Rackowsky C, Simon C, Hill JA (1998) *Biol Reprod* **59**: 1419-1424
26. Gomez E, Morel G, Cavalier A, Lienard MO, Haour F, Courtens JL, Jegou B (1997) *Biol Reprod* **56**: 1513-26
27. Takao T, Mitchell WM, Tracey DE, De Souza EB (1990) *Endocrinology* **127**: 251-258
28. Gerard N, Syed V, Bardin W, Genetet N, Jegou B (1991) *Mol Cell Endocrinol* **82**: R13-R16
29. Khan SA, Nieschlag E (1991) *Mol Cell Endocrinol* **75**: 1-7
30. Hakovirta H, Penttilä TL, Pollanen P, Froysa B, Soder O, Parvinen M (1993) *Int J Androl* **16**: 159-164
31. Pollen P, Soder O, Parvinen M (1989) *Reprod Fertil Dev* **11**: 85-87
32. Stephan JP, Syed V, Jegou B (1997) *Mol Cell Endocrinol* **134**: 109-118
33. Wang JE, Josefsen GM, Hansson V, Haugen TB (1998) *Mol Cell Endocrinol* **137**: 139-144
34. Petersen C, Boitani C, Froysa B, Soder O (2002) *Mol Cell Endocrinol* **186**: 37-47
35. Cohen PE, Pollard JW (1998) *Endocrinology* **139**: 815-18
36. Lin T, Wang TL, Nagpal ML, Calkins JH, Chang WW, Chi R (1991) *Endocrinology* **129**: 1305-1311
37. Ogilvie KM, Held Hales K, Roberts ME, Hales DB, Rivier C (1999) *Biol Reprod* **60**: 527-533
38. Lin T, Wang D, Stocco DM. (1998) *J Endocrinol* **156**: 461-467
39. Wang DL, Nagpal ML, Calkins JH, Chang WW, Sigel MM, Lin T (1991) *Endocrinology* **129**: 2862-2866
40. Calkins JH, Guo H, Sigel MM, Lin T (1990) *Bioch Biophys Res Commun* **167**: 548-53
41. Svechnikov K, Sultana T, Soder O (2001) *Mol Cell Endocrinol* **182**: 193-201
42. Khan SA, Khan SJ, Dorrington JH. (1992) *Endocrinology* **131**: 1853-57
43. Strand M-L, Svechnikov KV, Soder O. (2002) 12th European Workshop on Molecular and Cellular Endocrinology of the Testis
44. Soder O, Sultana T, Jonsson C, Wahlgren A, Petersen C, Holst M (2000) *Andrologia* **32**: 52-55
45. Smith DE, Renshaw BR, Ketchum RR (2000) *J Biol Chem* **275**: 1169-1175

Budowa, mechanizm działania i funkcje biologiczne enzymów z rodziny pirofosfataz/fosfodiesteraz ektonukleotydów (E-NPP)

Structure, mode of action and biological role of Ecto-nucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase enzyme family

MARZENA WÓJCIK¹, BARBARA SZMALENBERG², MARIA KOZIOŁKIEWICZ³

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Budowa NPP
- III. Specyficzność substratowa
- IV. Aktywność enzymatyczna
- V. Mechanizm działania
- VI. Znaczenie biologiczne NPP
 - VI-1. Udział w przesyłaniu sygnału do wnętrza komórek
 - VI-2. Udział w przemianach zewnątrzkomórkowych nukleotydów
 - VI-3. Udział w procesie mineralizacji kości
 - VI-4. Udział w metastazie i angiogenezie
 - VI-5. Udział w mechanizmie oporności na insulinę
- VII. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Structure of NPP
- III. Substrate specificity
- IV. Enzyme activity
- V. Mode of action
- VI. Biological role of NPP
 - VI-1. Role in signal transduction into cells
 - VI-2. Role in metabolism of extracellular nucleotides
 - VI-3. Role in bone matrix mineralisation
 - VI-4. Role in metastasis and angiogenesis
 - VI-5. Role in insulin mechanism resistance
- VII. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: ATP-aza — adenozynotrifosfataza; A_{p3}A — diadenozynotrifosforan; CD38 — antygen powierzchniowy limfocytów T i B; DTT — ditiotritol; EDTA — kwas etylenodiaminotetraoctowy; FAD — dinukleotyd flawinoadeninowy; IL-1β — interleukina 1β; IRS — substrat dla receptora insulinowego; NAD⁺ — dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy; NMP — 5'-monofosforan nukleozydu; *p*-nitrofenylo-TMP — 5'-O-(*p*-nitrofenylo)fosforan tymidyny; PPi — pirofosforan; PTB — domena wiążąca fosfotyrozinę; TGFβ — transformujący czynnik β; UDP-galaktoza — difosfourydynogalaktoza; 3'-UTR — region na 3'-końcu mRNA nie ulegający translacji

I. Wstęp

NPP są enzymami z rodziny pirofosfataz/fosfodiesteraz ektonukleotydów (ang. *Ecto-nucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase*, E-NPP) [1], które wykazują zarówno aktywność pirofosfatazy nukleotydów (EC 3.6.1.9) jak i fosfodiesterazy typu I (EC 3.1.4.1). Pierwszym zidentyfikowanym białkiem NPP była błonowa glikoproteina PC-1 (NPP1), opisana jako antygen powierzchniowy limfocytów B w końcowym stadium ich różnicowania [2]. Kolejne badania wykazały, że NPP1 ulega również ekspresji w komórkach innych niż limfocyty, a mianowicie w komórkach wątroby, w śródbłonku naczyń włosowatych mózgu, w kanalikach dystalnych nerek, w najądrzu, w kanalikach ślinowych, a także w tkance kostnej i chrzęstnej (chondrocyty, osteocyty, osteoblasty) [3-6]. Obecnie przyjmuje się, iż ludzkie NPP1-5 wykazują zróżnicowaną ekspresję w po-

¹Dr, Polska Akademia Nauk, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych, Zakład Chemii Bioorganicznej, ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź, ²mgr, Katedra Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź, ³doc.dr hab, Instytut Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej, ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych, Zakład Chemii Bioorganicznej, ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź, e-mail: marzena@bio.cbmm.lodz.pl

szczególnych tkankach [3, 4] (Tabela 1). Ponadto, istnieje również zróżnicowanie w lokalizacji NPP w błonie komórkowej komórek spolaryzowanych. Lokalizacja ta ograniczona jest tylko do wyspecjalizowanych obszarów błony. W hepatocytach szczura

8q24.1 [4], natomiast geny *enpp4* i 5 białek NPP4 i 5 zidentyfikowano na chromosomie 6p11.2-21.1. Występowanie genów *enpp1* i 3 na tym samym chromosomie sugeruje, iż NPP1 i 3 powstały przez duplikację jednego genu. Nie jest więc zaskoczeniem, że

Tabela 1

Występowanie ludzkich NPP [3, 4]; (+ -białko ulega ekspresji; - -białko nie ulega ekspresji)

LOKALIZACJA NPP	NPP1	NPP2	NPP3	NPP4	NPP5
tkanka kostna	-	+	+	+	-
mózg	+	+	+	+	-
tkanka chrzęstna	+	-	+	-	-
jelito grube	+	+	+	+	-
serce	+	+	-	+	+
nerki	+	+	+	+	+
wątroba	+	-	+	+	-
pluca	-	+	+	+	-
m.szkieletowe	+	-	-	+	-
skóra	+	-	-	+	-
jelito cienkie	+	+	+	-	-
żołądek	-	+	+	-	-
jądra	+	+	+	+	+
jajniki	-	+	-	+	-
grasica	+	-	+	+	-
prostata	+	+	+	+	+
śledziona	+	+	-	-	-
trzustka	+	+	+	+	-

NPP1 jest zlokalizowane na powierzchni sorpcyjnej, natomiast NPP3 występuje przede wszystkim na powierzchni sekrecyjnej [3]. NPP1-3 występują również w formie rozpuszczalnej w osoczu oraz jadzie węży (m.in. *Crotalus adamanteus*) [3, 5, 7, 8].

Kluczowym momentem dla poznania budowy i funkcji NPP było ustalenie ich sekwencji aminokwasowej [7, 9-11], na podstawie której możliwe stało się określenie podobieństw do innych białek o znanej sekwencji [3, 11, 12], a także przeprowadzenie badań nad budową centrum aktywnego [13-15]. Efektem tych badań było poznanie mechanizmu działania NPP [3, 16] oraz ujednolicenie ich nazewnictwa (Tabela 2).

Celem tego artykułu jest przedstawienie aktualnego stanu wiedzy o enzymach z rodziny pirofosfataz/fosfodiesteraz ektonukleotydów ze szczególnym uwzględnieniem ich udziału w wielu procesach zewnątrzkomórkowych, takich jak transdukcja sygnału, przemiany zewnątrzkomórkowych nukleotydów, oporność na insulinę, mineralizacja kości, metastaza, angiogeneza.

II. Budowa NPP

Geny *enpp1* i 3 ludzkich białek NPP1 i 3 są zlokalizowane na chromosomie 6q22-q23 [3, 11], gen *enpp2* białka NPP2 znajduje się na chromosomie

białka te wykazują dużą homologię w budowie strukturalnej. Analogiczne zjawisko występuje w przypadku NPP4 i 5 [3].

Tabela 2

Nomenklatura NPP [3, 4]

OBECNA NAZWA	NAZWY WCZEŚNIEJSZE
NPP1	PC-I, MAFP, NPP-aza, PcaI Ly-41, fosfodiesteraza I, Nukleotydowa pirofosfataza I
NPP2	Autotaksyna (ATX), PD-I α , NPP α
NPP3	gp 130 ^{RB13-o} , B10, PD-I β , NPP β
NPP4	Brak
NPP5	Brak

NPP1-5 są glikoproteinami, które zawierają w swej sekwencji od 4 do 10 motywów Asn-X-Ser/Thr ulegających N-glikozylacji. NPP1-3 należą do glikoprotein typu II, natomiast NPP4 i 5 są glikoproteinami typu I. W przypadku glikoprotein typu II N-koniec łańcucha polipeptydowego stanowi domenę

wewnątrzkomórkową, podczas gdy C-koniec łańcucha polipeptydowego jest położony na zewnątrz komórki. Glikoproteiny typu I wykazują przeciwną orientację, czyli C-koniec łańcucha polipeptydowego znajduje się wewnątrz komórki, a jego N-koniec jest położony na zewnątrz błony komórkowej. Jednak niezależnie od orientacji w błonie komórkowej, NPP należą do ekto-enzymów, czyli białek których centrum katalityczne znajduje się w domenie zlokalizowanej na zewnątrz komórki.

NPP1 i 2 są homodimerami, zbudowanymi z dwóch identycznych podjednostek (każda o masie cząsteczkowej 115 kDa) połączonych wiązaniami dwusiarczkowymi, podczas gdy NPP3 jest monomerem [5, 11]. Cechami wspólnymi NPP1-3 jest obecność w ich strukturze zarówno domeny wewnątrzkomórkowej, transbłonowej, katalitycznej, jak i domeny o strukturze podobnej do somatomedyny B oraz domeny o strukturze zbliżonej do nukleaz [3]. Domena cytoplazmatyczna ludzkich białek NPP1-3 (N koniec) jest krótka (10-76aa) i odmienna dla każdego izoenzymu. Zawiera ona motyw AAASLLAP odpowiedzialny za właściwą lokalizację cząsteczki NPP1 w błonie komórek spolaryzowanych, np. hepatocytów [17]. Tuż nad powierzchnią błony komórkowej znajdują się dwie domeny o strukturze podobnej do somatomedyny B (peptydu, który powstaje w wyniku proteolitycznej degradacji witronektyny). Domeny te zawierają regiony bogate w reszty cysteiny, które są zaangażowane w proces dimeryzacji białka poprzez tworzenie wiązań dwusiarczkowych [3]. Ponadto, w przypadku NPP2 i 3 w domenie o strukturze podobnej do somatomedyny zidentyfikowano motyw Arg-Gly-Asp [3, 4, 18] — charakterystyczny dla witronektyny (białka obecnego w surowicy i macierzy zewnątrzkomórkowej, które pośredniczy w oddziaływaniu z integrynami w procesie adhezji komórek). Obecność domen o strukturze podobnej do somatomedyny B oraz obecność motywu Arg-Gly-Asp w sekwencji aminokwasowej NPP2 i 3, sugerują ich udział w adhezji komórek. W pobliżu C-końca NPP jest zlokalizowana domena wykazująca podobieństwo strukturalne do nukleazy. Przypuszcza się, że domena ta funkcjonuje jako fragment regulujący specyficzność substratową białka [3]. Najnowsze wyniki badań G i j s b e r s a i wsp. [19] wskazują, że obecność tej domeny w cząsteczce NPP warunkuje jej stabilność oraz prawidłową translokację do błony komórkowej. Ponadto, badania porównawcze sekwencji aminokwasowej PC-1 człowieka i myszy ujawniły, że C-terminalna domena zawiera sekwencję DXD/NXDGXXD charakterystyczną dla tzw.

„pętli” klasycznego motywu dłoni EF — motywu strukturalnego wielu białek, odpowiedzialnego za wiązanie jonów wapnia [12]. Sekwencja ta ma decydujące znaczenie dla aktywności enzymatycznej NPP1 i 3, ale prawdopodobnie nie wiąże jonów wapnia. Za wiązanie jonów metali dwuwartościowych (m.in. Ca^{2+} , Zn^{2+} lub Mg^{2+}), które stabilizują strukturę NPP i zwiększają ich odporność na denaturację termiczną [12], odpowiadają dwa regiony położone w pobliżu domeny katalitycznej (patrz poniżej).

Domena katalityczna jest położona pomiędzy C-terminalną domeną i domeną o strukturze zbliżonej do nukleaz. Domena katalityczna NPP1 zawiera Thr256 u człowieka i Thr238 u myszy, która pełni kluczową rolę w mechanizmie katalitycznym NPP [13-16]. W sąsiedztwie tej strategicznej treoniny znajduje się sześć aminokwasów: Asp376, His380, Asp218, Asp423, His424, His535 (u człowieka) [3] oraz: Asp358, His362, His517, His406, His405, Asp200 (u myszy) [16], które koordynują wiązanie dwóch jonów metali dwuwartościowych niezbędnych w procesie katalizy. Ponadto, NPP1 i 3 zawierają w domenie katalitycznej motyw Gly-X-Gly-X-X-Gly (X-oznacza dowolną resztę aminokwasową), odpowiedzialny za wiązanie dinukleotydów [3, 20].

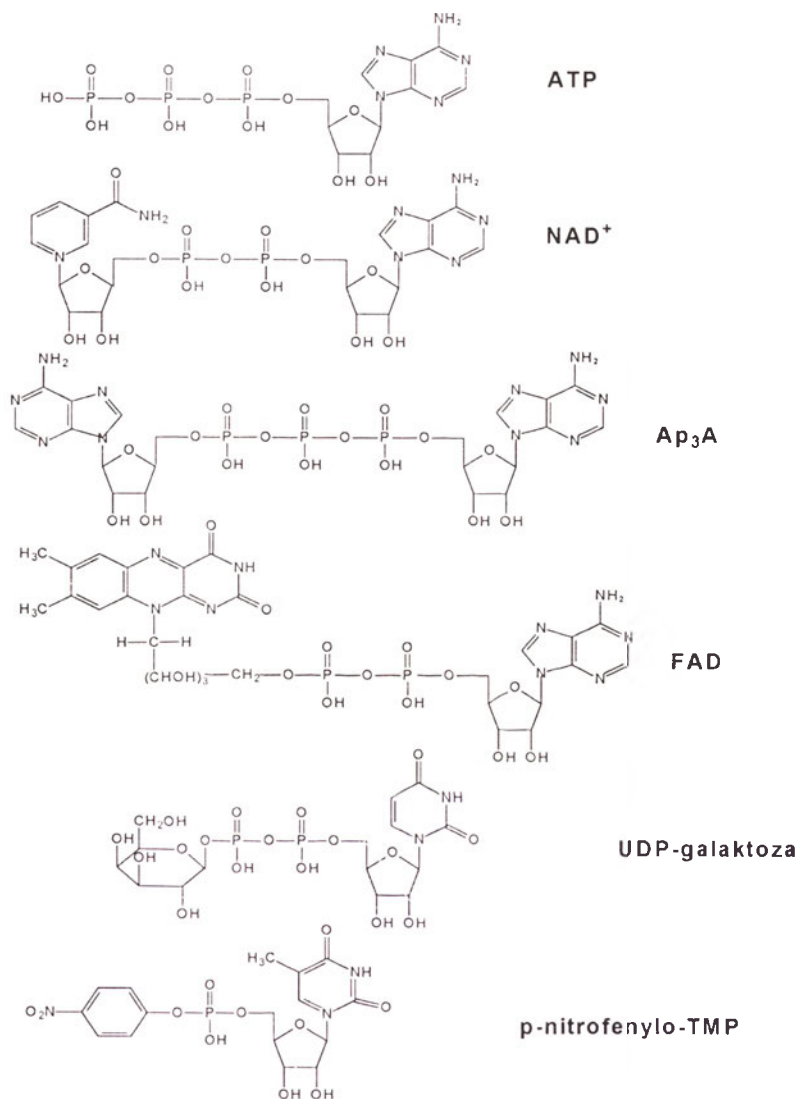
W porównaniu z ludzkimi NPP1-3 (863-925 aa), ludzkie NPP4 i 5 są mniejsze; zawierają, odpowiednio, 453 i 477 aminokwasów. Prawdopodobnie jest to spowodowane brakiem C-terminalnej domeny oraz domeny wykazującej podobieństwo strukturalne do somatomedyny B. Ponadto, C-końce łańcuchów polipeptydowych NPP4 i 5 są skrócone o 250 aminokwasów w stosunku do C-końca łańcuchów polipeptydowych NPP1-3 [16].

W tym miejscu należy podkreślić fakt, iż oprócz białka NPP1 związanego z błoną komórkową zidentyfikowano również jego formę rozpuszczalną [5]. Zarówno forma rozpuszczalna jak i błonowa mają takie same właściwości enzymatyczne oraz takie same miejsca glikozylacji [21]. Ustalono, że rozpuszczalna forma NPP1 o masie cząsteczkowej ~100kDa nie zawiera fragmentu bogatego w reszty cysteiny [4, 5] odpowiedzialnego za tworzenie wiązań dwusiarczkowych. Najprawdopodobniej rozpuszczalna forma PC-1 powstaje w wyniku proteolizy formy transmembranowej pomiędzy Pro152 i Ala153 [5], nie zaś w wyniku alternatywnego splicingu mRNA. Sugeruje się, że proteoliza zachodzi wewnątrz aparatu Golgiego, ponieważ stamtąd białko bardzo szybko może być wydzielane na zewnątrz [5].

III. Specyficzność substratowa białek NPP

NPP mają znacznie szerszą specyficzność substratową niż wewnątrzkomórkowe pirofosfatazy i fosfodiesterazy. Hydrolizują wiązania fosfodiesterowe i pirofosforanowe w nukleotydach, deoksyrybonukleotydach i ich pochodnych (Ryc. 1), uwalniając

otyldów/fosfodiesterazy typu I. Stwierdzono, że glikozoaminoglikany jak np. heparyna czy siarczan heparanu (obecne w przestrzeni zewnątrzkomórkowej) wiążą się z PC-1 w obecności jego substratu, co prowadzi do zahamowania aktywności fosfodiesterazy typu I [21]. Inhibitorami białek NPP są również EDTA, DTT [23], 2-merkaptioetanol [3] oraz imida-



Ryc. 1. Przykładowe substraty dla NPP [3, 6].

5'-monofosforany nukleozydów oraz pirofosforan lub fosforan [3]. NPP są również zdolne do hydrolizy wiązań fosfodiesterowych od 3'-końca w cząsteczkach RNA lub jednoniciowego DNA [5, 6] oraz wiązań siarkowo-fosforanowych w cząsteczce 3'-fosfoadenozyno 5'-fosfosiarczanu [3]. Wyniki najnowszych badań wskazują, że NPP2 (bardziej znane jako autotaksyna) ma nie tylko aktywność fosfodiesterazy, ale także lizofosfolipazy D, która degradowe lizofosfatydylocholinę z utworzeniem kwasu lizofosfatydowego [22]. Niezależnie od badań nad określeniem specyficzności substratowej NPP prowadzono poszukiwania inhibitorów pirofosfatazy nukle-

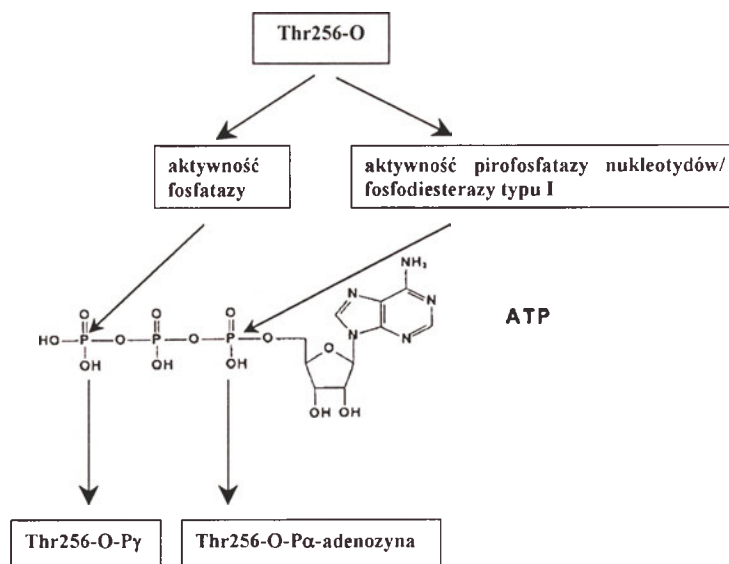
zol, który działa jako inhibitor niekompetycyjny [24]. Sugeruje się, że imidazol specyficznie hamuje drugi etap hydrolizy substratu katalizowanej przez NPP (25). Prawdopodobnie działa on jako analog histydyny, który chelatuje kation metalu dwuwartościowego oznaczonego jako MeI (Ryc. 3).

IV. Aktywność enzymatyczna

PC-1 (NPP1) zidentyfikowano jako enzym o aktywności fosfodiesterazy i pirofosfatazy [26] dopiero w 6 lat po określeniu jego sekwencji aminokwasowej. Antygenowi PC-1 przypisuje się także aktyw-

ność kinazy treoninowej, choć fakt ten nadal wzbudza wśród naukowców wiele kontrowersji. Eksperymenty wykazały, iż PC-1 jest kinazą treoninową zdolną zarówno do autofosforylacji, jak i do fosforylacji innych białek (histon H2A) [23]. Bell i wsp. [15] uważają jednak, że brak jest dostatecznych do-

tywności NPP, należy zwrócić uwagę na sposób wiązania niektórych związków (np. ATP), będących substratem zarówno dla fosfatazy, jak też dla pirofosfatazy nukleotydów/fosfodiesterazy typu I (Ryc. 2). W obydwu tych przypadkach grupa fosforanowa jest kowalencyjnie związana z treoniną cen-



Ryc. 2. Schemat ilustrujący pierwszy etap hydrolizy NTP przez NPP. Atak nukleofila (Thr256) na atom fosforu α cząsteczki NTP prowadzi do utworzenia produktu pośredniego Thr256-O-P α -nukleozyd (aktywność pirofosfatazy nukleotydów/fosfodiesterazy typu I), podczas gdy atak Thr256 na atom fosforu γ cząsteczki NTP prowadzi do powstania fosforylowanej treoniny jako produktu pośredniego (aktywność fosfatazy).

wodów na potwierdzenie tezy, jakoby PC-1 miało być klasyczną kinazą treoninową. Ich zdaniem zawierający ufosforylowaną treoninę enzym jest tylko produktem pośrednim w reakcji hydrolizy ATP. Analogicznie, dla NPP2 również został zaproponowany mechanizm reakcji, podczas której tworzy się ufosforylowany produkt pośredni [20]. Wykazano, że autofosforylacja ma miejsce przy submikromolowych stężeniach ATP, a dodanie nukleotydów adeninowych do ufosforylowanego białka powoduje jego natychmiastową defosforylację. Powyższa zależność sugerowałaby, iż fosforylacja treoniny służy zahamowaniu aktywności pirofosfatazowej w momencie gwałtownego spadku stężenia zewnątrzkomórkowego ATP [13, 23]. Najnowsze wyniki badań wskazują na to, iż fosforylacja treoniny nie zachodzi podczas reakcji katalizowanych przez klasyczne kinazy czy ATP-azy. Sugeruje się istnienie aktywności fosfatazowej PC-1, a fosforylowany enzym miałby być tutaj kowalencyjnym produktem pośrednim reakcji [16]. Według podobnego mechanizmu działa także alkaliczna fosfataza, co może przemawiać na korzyść powyższej hipotezy [27].

Aktywność pirofosfataz/fosfodiesteraz NPP oraz ich aktywność fosfatazowa związane są z tym samym centrum katalitycznym, w którym główną rolę pełni Thr256 [16]. Biorąc pod uwagę powyższe ak-

trum katalitycznego. Należy jednak podkreślić, iż w zależności od tego czy jest to fosfor α czy fosfor γ substratu powstaje, odpowiednio, produkt pośredni, w którym treonina Thr256 jest kowalencyjnie związana z AMP (Thr256-O-P α -nukleozyd) lub z fosforanem γ (Thr256-O-P γ) [3]. Innymi słowy, produkt pośredni Thr256-O-P α -nukleozyd powstaje w reakcji katalizowanej przez pirofosfatazę nukleotydów/fosfodiesterazę typu I (atak na fosfor α), natomiast produkt pośredni Thr256-O-P γ jest charakterystyczny dla reakcji fosfatazy i jest konsekwencją ataku cząsteczki nukleofila (czyli grupy hydroksylowej Thr256) na fosfor γ nukleotydu (np. ATP).

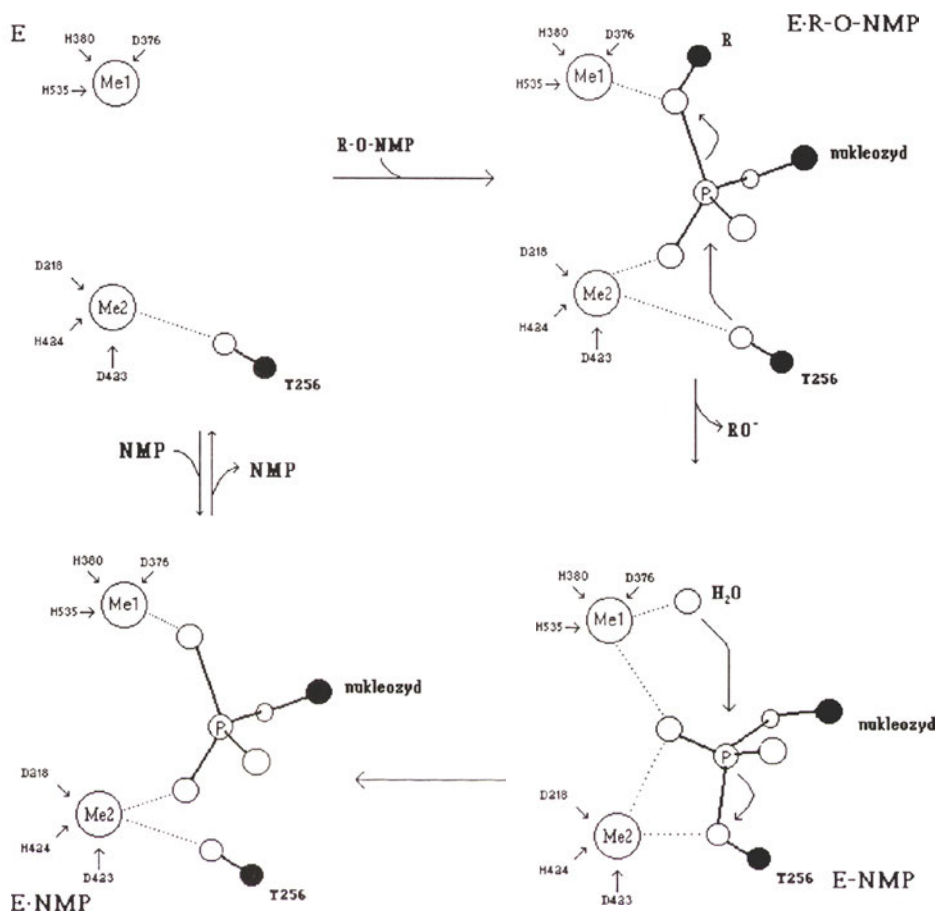
Wcześniejsze hipotezy, jakoby PC-1 było klasyczną kinazą i miało możliwość fosforylacji histonu H2A [23] mogły wynikać z faktu, iż NPP preferują w drugim etapie reakcji jako akceptor grupy fosforanowej raczej inne białko aniżeli wodę. Analogiczna sytuacja ma miejsce w przypadku reakcji hydrolizy katalizowanej przez pirofosfatazę nukleotydów/fosfodiesterazę typu I. Nukleotyd (inaczej: P α -nukleozyd) związany z Thr256 w pierwszym etapie reakcji, w drugim etapie jest przekazywany na alkohol (jeżeli jest on obecny w środowisku reakcji), który wykazuje większe powinowactwo do nukleotydu niż woda [28].

V. Mechanizm działania

Mechanizm działania NPP został zaproponowany na podstawie podobieństw, jakie wykazują one w budowie centrum katalitycznego do alkalicznej fosfatazy, arylosulfatazy i mutazy fosfoglicerynianowej (Ryc. 3) [16]. Reakcje katalizowane przez NPP są

przypadku zastosowania P-chiralnych analogów tiofosforanów przejawia się inwersją konfiguracji na atomie fosforu. Ponieważ każdej z tych dwóch reakcji towarzyszy inwersja, ostatecznym wynikiem stereochemicznym procesu katalizowanego przez NPP jest retencja konfiguracji na atomie fosforu [29].

W pierwszym etapie reakcji jon metalu oznaczony



Ryc. 3. Proponowany mechanizm reakcji dla NPP [15]. Hydroliza wiązań fosfodiesterowych katalizowana przez NPP przebiega z udziałem dwóch kationów dwuwartościowego metalu (Me1 i Me2). Pod nieobecność substratu, Me1 tworzy wiązania koordynacyjne z Asp376, His380, His535 podczas gdy Me2 jest koordynacyjnie związany z Asp218, His424, Asp423 oraz atomem tlenu grupy hydroksylowej Thr256. W pierwszym etapie katalizy Me2 aktywuje grupę hydroksylową Thr256, która staje się silnym nukleofilem i atakuje atom fosforu substratu (R-O-NMP) od strony przeciwnej do grupy odchodzącej (RO). Konsekwencją nukleofilowego ataku grupy hydroksylowej Thr256 na atom fosforu R-O-NMP jest utworzenie produktu pośredniego enzym-substrat (E-NMP), w którym NMP jest kowalencyjnie związany z enzymem, uwolnienie RO i inwersja konfiguracji na atomie fosforu. W drugim etapie katalizy zaktwowana przez Me1 cząsteczka wody atakuje atom fosforu kompleksu E-NMP czemu towarzyszy rozerwanie wiązania pomiędzy atomem fosforu NMP i atomem tlenu Thr256, inwersja konfiguracji na atomie fosforu oraz utworzenie kompleksu E-NMP, w którym NMP jest niekowalencyjnie związany z NPP. Następuje uwolnienie NMP, co prowadzi do regeneracji enzymu. R oznacza określony fragment strukturalny substratu, np. AMP w AP_2A , grupę fosforanową w ADP, PPi w ATP.

dwuetapowe i wymagają obecności dwóch kationów metalu dwuwartościowego Me1 i Me2, które są koordynacyjnie związane przez aminokwasy zlokalizowane w pobliżu centrum katalitycznego (Asp376, His380, Asp218, Asp423, His424, His535). W pierwszym etapie ma miejsce nukleofilowy atak grupy hydroksylowej Thr256 na atom fosforu wiązania fosfodiesterowego lub pirofosforanowego, natomiast w drugim atak innego nukleofila (np. cząsteczki wody) na atom fosforu produktu pośredniego, co w

jako Me2 związany przez Asp423, His424 i Asp218, aktywuje grupę hydroksylową Thr256, która staje się silnym nukleofilem. Dokonuje ona ataku na atom fosforu substratu (R-O-NMP) od strony przeciwnej do grupy odchodzącej (RO). Prowadzi to do utworzenia kowalencyjnego produktu pośredniego enzym-substrat (E-NMP).

Nukleofilem dokonującym ataku w drugim etapie reakcji jest cząsteczka wody (prawdopodobnie może to być także cząsteczka alkoholu lub innego białka

[23, 28]), którą aktywuje drugi z kationów Me1, koordynacyjnie związany przez His535, His380 i Asp376. Drugi atak na atom fosforu produktu pośredniego enzym-nukleotydu prowadzi do uwolnienia 5'-NMP i odtworzenia białka z wolną treoniną w centrum katalitycznym [16]. Proponowany powyżej mechanizm reakcji ma swoje uzasadnienie w poniższych faktach:

1. NPP są metaloenzymami - ich aktywność hamowana jest przez związki chelatujące, a może być przywrócona przez dodanie kationów Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} [12, 16, 26].

2. Treonina 256 centrum katalitycznego uczestniczy w tworzeniu kowalencyjnego produktu pośredniego enzym-substrat [13, 20].

3. Mutacja Thr256 lub któregośkolwiek z 6 aminokwasów zaangażowanych w wiązanie jonów metali Me1 i Me2 prowadzi do zahamowania aktywności enzymatycznej NPP [16].

4. Mutacja reszt aminokwasowych biorących udział w pierwszym etapie reakcji uniemożliwia tworzenie produktu pośredniego substrat-białko, natomiast mutacje reszt aminokwasowych zaangażowanych w etap drugi nie mają wpływu na utworzenie produktu pośredniego [3].

VI. Znaczenie biologiczne

NPP zaangażowane są w regulację wielu procesów zewnątrzkomórkowych. Do najważniejszych z nich należą: udział w transdukcji sygnałów komórkowych, przemiany zewnątrzkomórkowych nukleotydów, proces mineralizacji kości, udział w metastazie i angiogenezie, udział w powstawaniu oporności na insulinę.

VI-1. Udział w przesyłaniu sygnału do wnętrza komórek

Zewnątrzkomórkowe nukleotydy (zwłaszcza ATP) oraz produkty ich degradacji (głównie adenozyne), biorą udział w przekazywaniu sygnału do komórek poprzez receptory purynergiczne P1 i P2 [30]. Receptory te są obecne na powierzchni wielu typów komórek oraz w różnego rodzaju tkankach [31]. Sygnał przekazywany przez receptory purynergiczne wywołuje m.in. skurcz mięśni gładkich, odpowiedź immunologiczną oraz agregację płytek krwi [32]. Receptory P1 (dla których naturalnym agonistą jest adenozyne) podzielono na kilka podtypów: A_{1A} , A_{1B} , A_{2A} , A_{2B} , A_3 [33]. Podstawą takiego podziału był typ białka G, z którym dany receptor jest związany. Receptory A_1 oraz A_3 występują w połączeniu z

białkami G_i , które odpowiedzialne są za hamowanie cykazy adenylnowej oraz aktywację fosfolipaz C i A_2 . Receptory purynergiczne typu A_2 przekazują natomiast sygnał poprzez białka G_s , które aktywują cyklazę adenylnową.

Agonistami receptorów purynergicznych P2 są di- i trifosforany adenozyne lub urydyny (ATP, ADP, UTP lub UDP). Receptory P2 podzielono na dwie główne klasy: P2X oraz P2Y. Receptory P2X działają jako kanały jonowe w błonie komórkowej (tzw. receptory jonotropowe), natomiast receptory P2Y (tzw. receptory metabotropowe) są sprzężone z różnymi białkami G. Receptory P2Y1, P2Y2, P2Y4 oraz P2Y6 są sprzężone z białkiem G_q i aktywują fosfolipazę C, receptory P2Y12, P2Y13 oraz P2Y14 hamują aktywność cykazy adenylnowej za pośrednictwem białka G_i , natomiast receptor P2Y11 może działać za pośrednictwem zarówno białka G_q jak i białka G_s , aktywując fosfolipazę C lub cyklazę adenylnową [34].

Liczne ekto-enzymy obecne na powierzchni błony komórkowej (w tym również NPP) katalizują kolejne etapy degradacji trifosforanów nukleozydów (głównie ATP i UTP) do di- i monofosforanów nukleozydów (ADP, UDP, AMP i UMP) i ostatecznie do samych nukleozydów (adenozyne i urydyny) [35]. W ten sposób ekto-enzymy regulują stężenie nukleotydów i nukleozydów zewnątrzkomórkowych, które są agonistami receptorów P1 albo P2, a więc pośrednio sterują one transdukcją sygnałów komórkowych za pośrednictwem nukleotydów lub nukleozydów.

VI-2. Przemiany nukleotydów zewnątrzkomórkowych

Aktywnie dzielące się komórki, np. komórki układu immunologicznego wymagają dużych ilości puryn i pirymidyn do syntezy kwasów nukleinowych, ATP, NAD^+ , FAD. Nukleotydy są syntetyzowane *de novo*, ale mogą być również uwalniane z uszkodzonych komórek. W pierwszym etapie uwolnione z uszkodzonej komórki nukleotydy przekształcane są do di- lub monofosforanów nukleozydów, które następnie ulegają defosforylacji katalizowanej przez 5'-nukleotyduzę, z utworzeniem nukleozydów. Te ostatnie dzięki specyficznym białkowym transporterom trafiają do prawidłowo funkcjonujących komórek [36]. Niezależnie od tej drogi, nukleozydy mogą podlegać dalszym przemianom katalizowanym przez ekto-enzymy lub rozpuszczalne formy enzymów obecne na zewnątrz komórek, np. adenozyne może podlegać konwersji do inozyne, a następnie do hipoksantyny [35]. NPP stanowią istot-

ny element tej kaskady enzymatycznej i odpowiadają za bezpośrednią konwersję trifosforanów (np. ATP) do monofosforanów nukleozydów (np. AMP). W limfocytach T NPP1 stanowi część kaskady enzymatycznej, umożliwiającej powtórne wykorzystywanie nukleozydów przez komórkę. Pod wpływem związków zwiększających stężenie wewnątrzkomórkowego cAMP lub aktywujących kinazę białkową C, NPP1 ulega wzmożonej ekspresji, podobnie jak białko CD38 oraz 5'-nukleotydaza. Białko CD38 jest antygenem powierzchniowym limfocytów T i B. Ulega ono nadekspresji w początkowym i końcowym stadium różnicowania limfocytów, natomiast jego poziom jest niski w limfocytach krążących w układzie krwionośnym [37]. Białko CD38 jest również ektoenzymem zdolnym do hydrolizy NAD do nikotynamidu i ADP-rybozy [38]. Enzym o aktywności 5'-ektonukleotydaazy generuje powstanie adenozyyny i ortofosforanu z AMP. Skoordynowana regulacja ekspresji tych enzymów umożliwia ponowne wykorzystanie przez limfocyty adenozyyny i nikotynamidu, powstających w wyniku degradacji nukleotydów uwalnianych z uszkodzonych komórek. Zapewne wynika to z funkcji limfocytów, które często gromadzą się w miejscach o podwyższonym współczynniku uszkodzeń i śmiertelności komórek [39].

Wysoki poziom metabolizmu nukleotydów jest także charakterystyczny dla wątroby, która wydziela nukleotydy do krwi i żółci. W układzie krwionośnym są one pobierane przez erytrocyty, które nie są w stanie wyprodukować wystarczających ilości tych związków *de novo* [40]. Nukleotydy wydzielane do żółci ulegają hydrolizie do nukleozydów w reakcjach katalizowanych przez ektoenzymy obecne na powierzchni sekrecyjnej błony hepatocytu (NPP3 i 5'-nukleotydaza) [36]. Transport nukleozydów przez błonę komórkową do wnętrza hepatocytu odbywa się poprzez białkowe transportery nukleozydów.

Dla wielu typów komórek, włącznie z hepatocytami i komórkami układu odpornościowego, ATP jest toksyczny i powoduje apoptozę [36]. Degradacja zewnątrzkomórkowego ATP przez NPP może więc świadczyć o ich udziale w ochronie komórek przed toksycznym działaniem tego związku [3, 20].

VI-3. Proces mineralizacji kości

Geny kodujące NPP1-3 ulegają ekspresji w chondrocytach i osteoblastach [4, 41], przy czym poziom NPP1 w chondrocytach jest regulowany przez TGFβ i IL-1β (pierwsze z białek aktywuje ekspresję PC-1, natomiast drugie ją hamuje) [42]. Różna lokalizacja

NPP1-3 w chondrocytach i osteoblastach warunkuje różne funkcje tych białek w procesie mineralizacji kości [43]. Dotychczas stosunkowo dobrze poznano udział NPP1 w inicjacji procesu wapnienia kości. W warunkach fizjologicznych PC-1 degraduje zewnątrzkomórkowe 5'-trifosforany nukleozydów do 5'-fosforanów nukleozydów i pirofosforanu. Uwolniony PPi jest hydrolizowany do ortofosforanu przez niespecyficzną tkankowo alkaliczną fosfatazę (ang. *tissue-nonspecific alkaline phosphatase*, TNAP) — izoenzym ludzkiej alkalicznej fosfatazy (EC 3.1.3.1) [44, 45]. W dalszym etapie produkt hydrolizy — ortofosforan wraz z jonami wapnia tworzą kryształy hydroksyapatytu.

Na podstawie dotychczasowych badań można stwierdzić, że podstawowym warunkiem prawidłowego przebiegu mineralizacji kości jest zachowanie równowagi pomiędzy stężeniem zewnątrzkomórkowego pirofosforanu i ortofosforanu. Naruszenie tej równowagi może w wielu przypadkach doprowadzić do stanów chorobowych. Przykładowo, w warunkach podwyższonego poziomu PPi w przestrzeni zewnątrzkomórkowej tworzą się kryształy dihydratu pirofosforanu wapnia (ang. *calcium pyrophosphate dihydrate*, CPPD), których obecność przyczynia się do wapnienia chrząstki [43].

VI-4. Udział w metastazie i angiogenezie

NPP2 (autotaksyna) jako czynnik stymulujący ruch komórek jest zaangażowana w proces metastazy, czyli tworzenia przerzutów nowotworowych [46]. Zwiększa także potencjalną możliwość metastazy komórek zawierających onkogen *ras* [47]. Prawdopodobnie NPP2 przekazuje sygnał wiążąc się z receptorami integrynowymi poprzez motyw Arg-Gly-Asp, zlokalizowany w drugiej domenie somatomedyno-podobnej [3]. Receptory te związane są z białkami G, ponieważ stymulacja ruchu komórek przez NPP2 może być hamowana przez toksyny krztuśca i cholery [7]. Autotaksyna jest również czynnikiem wzmagającym proces angiogenezy, czyli tworzenia nowych naczyń krwionośnych, co w przypadku nowotworów sprzyja metastazie [48]. Najnowsze badania wskazują, że rozpuszczalna forma autotaksyny obecna w surowicy ludzkiej wykazuje aktywność lizofosfolipazy D i degraduje lizofosfatydylocholinę z utworzeniem kwasu lizofosfatydowego. Istnieją przypuszczenia, że udział autotaksyny w procesie metastazy jest raczej konsekwencją jej aktywności lizofosfolipazy D niż fosfodiesterazy/pirofosfatazy. Warto w tym miejscu podkreślić, że stężenie lizofosfatydylocholiny w osoczu wynosi

200 μM , podczas gdy stężenie ATP utrzymuje się na poziomie około 1.0 μM . Można więc sądzić, iż powstający kwas lizofosfatydowy stymuluje specyficzne receptory kwasu lizofosfatydowego Edg2 [22, 43].

VI-5. Udział w mechanizmie oporności na insulinę

Oporność na insulinę, pomimo występowania podwyższonych stężeń tego hormonu, występuje m. in. u osób otyłych lub chorych na cukrzycę typu II. Chorzy ci wykazują zmniejszoną liczbę receptorów insulinowych w komórkach docelowych dla tego hormonu, tj. w adypocytach, hepatocytach i komórkach mięśni szkieletowych. W nielicznych przypadkach chorzy wytwarzają również przeciwciała skierowane przeciwko własnym receptorom insulinowym, co uniemożliwia wiązanie się insuliny z właściwym receptorem. Nie są to oczywiście jedyne mechanizmy oporności na insulinę, ale zapewne te najlepiej poznane. Liczne dane wskazują na udział NPP1 w oporności na insulinę poprzez oddziaływanie z receptorem insulinowym [49-54].

Receptor insulinowy (IR) należy do dużej grupy receptorów o aktywności kinazy tyrozynowej. Jest heterotetramerem zbudowanym z dwóch podjednostek α odpowiedzialnych za wiązanie ligandu, oraz dwóch podjednostek β wykazujących aktywność enzymatyczną. Związanie insuliny powoduje aktywację jednej z dwóch podjednostek β , co prowadzi do autofosforylacji receptora. W pełni zaktywowany receptor insulinowy posiada kilka ufosforylowanych reszt tyrozynowych. Fosfotyrozyna w pozycji 960 podjednostki β tworzy motyw NPXpY, z którym wiąże się domena PTB (ang. *phosphotyrosine binding domain*) białek IRS (ang. *insulin receptor substrate*). Białka IRS stanowią grupę substratów dla zaktywowanego receptora insulinowego. Insulina, jak i inne czynniki wzrostu, wykorzystuje fosforylację i oddziaływanie białko-białko jako podstawowe procesy prowadzące do pobudzenia komórki. Ostatecznym efektem pobudzenia komórki przez insulinę jest m.in. transport glukozy, synteza glikogenu i białek, oraz inicjacja transkrypcji specyficznych genów [55].

NPP1 hamuje aktywność kinazową receptora insulinowego wiążąc się z jego podjednostką α . Za powyższą hipotezę przemawiają następujące fakty: NPP1 zostało wyizolowane z błony komórkowej razem z receptorem insulinowym oraz NPP1 nie wiąże się z receptorem insulinowym pozbawionym fragmentu łańcucha polipeptydowego podjednostki α (485-599 aa) [49].

Badania *in vitro* wykazały, że aktywność enzymatyczna receptora insulinowego ulega zahamowaniu w komórkach wykazujących nadekspresję NPP1. Dodanie przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko NPP1 powoduje zwiększenie aktywności enzymatycznej receptora insulinowego. Pojawia się więc możliwość zastosowania przeciwciał dla NPP1 w leczeniu oporności na insulinę [49].

Aktywność fosfodiesterazowa NPP1 nie jest odpowiedzialna za hamowanie aktywności enzymatycznej IR, ponieważ nieaktywne enzymatycznie NPP1 nadal jest zdolne do hamowania aktywności receptora [53]. Sugestia, jakoby NPP1 miało być niespecyficznym inhibitorem wszystkich kinaz białkowych, dzięki możliwości hydrolizy ich substratu – ATP [56], wydają się więc być bezpodstawne. Udział NPP1 w etiologii cukrzycy typu II jest jednak przez niektórych badaczy poddawany w wątpliwość. Istnieją nieliczne doniesienia, że oporność na insulinę nie jest skorelowana z nadekspresją NPP1 [57].

Niezwykle ciekawie przedstawia się zależność pomiędzy opornością na insulinę a poziomem rozpuszczalnej formy NPP1. U osób wykazujących oporność na insulinę stwierdzono podwyższoną ekspresję NPP1 w tkankach, ale znacznie obniżony poziom jego formy rozpuszczalnej w osoczu. Tłumaczy się to szybszą degradacją NPP1 w osoczu lub zahamowaniem procesu proteolizy formy błonowej. Pomiar poziomu białka NPP1 w osoczu może więc stanowić istotny czynnik diagnostyczny, pozwalający stwierdzić istnienie oporności na insulinę [52].

Wiadomo, iż oporność na insulinę ma również podłoże genetyczne, jakkolwiek geny odpowiedzialne za ten proces są bardzo słabo poznane [58, 59]. W eksonie 4 genu białka NPP1 zidentyfikowano polimorfizm (K173Q), który wydaje się mieć związek z insulinoopornością. Polimorfizm ten polega na transwersji A $\rightarrow$ C w pozycji pierwszej kodonu 173, co fenotypowo przejawia się zastąpieniem lizyny (K) przez glutaminę (Q). U osób będących nosicielami genotypu QK stwierdzono obniżony poziom aktywności enzymatycznej receptora insulinowego w stosunku do genotypu KK [60]. Również w innych eksperymentach potwierdzono, że białko posiadające w pozycji 173 glutaminę jest znacznie silniejszym inhibitorem aktywności enzymatycznej receptora insulinowego niż powszechniej występująca forma K173 NPP1 [61].

Nadekspresja NPP1 może również mieć podłoże genetyczne i związana jest z istnieniem w regionie 3'UTR trzech polimorfizmów: G2897A, G2906C oraz C2948T. Na podstawie tych polimorfizmów wyróżniono trzy haplotypy: A (2897G, 2906G, 2948C),

P (2897A, 2906C, 2948T) oraz N (2897A, 2906G, 2948T).

Region 3'UTR może regulować stabilność mRNA lub ewentualnie ekspresję genu. Zwiększona stabilność mRNA jest przyczyną występowania nadmiernych ilości NPP1 w tkankach, a to z kolei prowadzi do zahamowania aktywności receptora insulinowego i oporności organizmu na insulinę. Stwierdzono, że to haplotyp P jest odpowiedzialny za nadekspresję NPP1 i insulinooporność [62].

VII. Uwagi końcowe

Od momentu zidentyfikowania antygeny powierzchniowego jako PC-1 prowadzono intensywne badania nad budową i właściwościami NPP. Zastosowanie m.in. metod inżynierii genetycznej przyczyniło się do poznania ich pierwszorzędowej struktury, co w konsekwencji doprowadziło do zaliczenia glikoprotein NPP1-5 do jednej wspólnej rodziny pirofosfataz/fosfodiesteraz ektonukleotydów. NPP1-5 są obecne w większości tkanek. Ponadto, w niektórych komórkach (np. hepatocyty) występuje więcej niż jeden rodzaj białek NPP (NPP1 i 3). Prawdopodobnie różna lokalizacja komórkowa NPP1 i 3 bezpośrednio wpływa na ich specyfikę działania.

Wspólną cechą NPP1-3 jest ich zdolność do katalizowania hydrolizy wiązań fosfodiesterowych i siarkowo-fosforanowych. W aspekcie tych faktów, zaskoczeniem są wyniki uzyskane ostatnio przez Tokumurę i wsp. [22] wskazujące, iż NPP2 oprócz aktywności fosfodiesterazy posiada dodatkową aktywność lizofosfolipazy D. NPP2 degradowe lizofosfatydylocholinę z utworzeniem kwasu lizofosfatydowego i choliny. Przypuszcza się, że powstający kwas lizofosfatydowy aktywuje Rho-GTPazy poprzez wiązanie się z receptorem błonowym kwasu lizofosfatydowego, co w konsekwencji prowadzi do pobudzenia efektorów [43, 63] odpowiedzialnych za ruch komórki. W związku z tym sugeruje się udział NPP2 w procesie metastazy. To interesujące spostrzeżenie stało się punktem wyjścia do aktualnie prowadzonych badań, których celem jest uzyskanie odpowiedzi na następujące pytania: czy fosfatydylocholina jest również substratem dla pozostałych NPP oraz czy poziom ekspresji NPP w komórkach nowotworowych ulega zmianie w stosunku do poziomu ich ekspresji w komórkach prawidłowych?

Choć wiedza o NPP nadal nie jest pełna, to jednak w miarę upływu czasu z pewnością zostanie dokładnie poznany mechanizm ich działania w procesach metastazy, angiogenezy czy oporności na insulinę.

Podziękowania

Praca powstała podczas realizacji projektu badawczego nr PBZ-KBN 059/T09/05 finansowanego przez Komitet Badań Naukowych.

Artykuł otrzymano 3 kwietnia 2003
Zaakceptowano do druku 1 września 2003

Piśmiennictwo

1. Zimmermann H, Beaudoin AR, Bollen M, Goding JW, Guidotti G, Kirley TL, Robson SC, Sano K (2000) W: Vanduffel L, Lemmens R (red) *Ecto-ATPases and Related Nucleotides*. Shaker Publishing, Maastricht, The Netherlands, str. 9-20
2. Takahashi T, Old LJ, Boyse EA (1970) *J Exp Med* **131**: 1325-1341
3. Bollen M, Gijsbers R, Ceulemans H, Stalmans W, Stefan C (2000) *Critic Rev Biochem Mol Biol* **35**: 393-432
4. Goding JW, Terkeltaub R, Maurice M, Deterre P, Sali A, Belli SI (1998) *Immunol Rev* **161**: 11-26
5. Belli SI, van Driel IR, Goding JW (1993) *Eur J Biochem* **217**: 421-428
6. Belli SI, Goding JW (1994) *Eur J Biochem* **226**: 433-443
7. Murata J, Lee HY, Clair T, Krutzsch HC, Arestad AA, Sobel ME, Liotta LA, Stracke ML (1994) *J Biol Chem* **269**: 30479-30484
8. Stracke ML, Krutzsch HC, Unsworth EJ, Arestad A, Cioce V, Schiffman E, Liotta LA (1992) *J Biol Chem* **267**: 2524-2529
9. Starne PA, van Driel IR, Grego B, Simpson JR, Goding JW (1985) *J Immunol* **134**: 443-448
10. Deissler H, Lottspeich F, Rajewsky MF (1995) *J Biol Chem* **270**: 9849-9855
11. Buckley MF, Loveland KA, McKinsty WJ, Garson OM, Goding JW (1990) *J Biol Chem* **265**: 17506-17511
12. Belli SI, Sali A, Goding JW (1994) *Biochem J* **304**: 75-80
13. Stefan C, Stalmans W, Bollen M (1996) *Eur J Biochem* **241**: 338-342
14. Culp JS, Blytt HJ, Hermodson M, Butler LG (1985) *J Biol Chem* **260**: 8320-8324
15. Belli SI, Mercuri FA, Sali A, Goding JW (1995) *Eur J Biochem* **228**: 669-676
16. Gijsbers R, Ceulemans H, Stalmans W, Bollen M (2001) *J Biol Chem* **276**: 1361-1368
17. Bello V, Goding JW, Greengrass V, Sali A, Dubljevic V, Lenoir C, Trugnan G, Maurice M (2001) *Mol Biol Cell* **12**: 3004-3015
18. Preissner KT (1991) *Ann Rev Cell Biol* **7**: 275-310
19. Gijsbers R, Ceulemans H, Bollen M (2003) *Biochem J Immediate Publication*, www.biochemj.org
20. Clair T, Lee HY, Liotta LA, Stracke ML (1997) *J Biol Chem* **272**: 996-1001
21. Hosoda N, Hoshimo S, Kanda Y, Katada T (1999) *Eur J Biochem* **265**: 763-770
22. Tokumura A, Majima E, Kariya Y, Tominaga K, Kogure K, Yasuda K, Fukuzawa K (2002) *J Biol Chem* **277**: 39436-39442
23. Uriarte M, Stalmans W, Hickman S, Bollen M (1995) *Biochem J* **306**: 271-277
24. Moe OW, Butler LG (1983) *J Biol Chem* **258**: 6941-6946
25. Blytt HJ, Brotherton JE, Butler L (1985) *Anal Biochem* **147**: 517-520
26. Rebbe NF, Tong BD, Finley EM, Hickman S (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 5192-5196
27. Holtz KM, Stec B, Kantrowitz ER (1999) *J Biol Chem* **274**: 8351-8354

28. Ribeiro JM, Lopez-Gomez J, Vargeles JM, Costas MJ, Garcia-Diaz M, Fernandez A, Flores A, Cameselle JC (2000) *Biochem J* **346**: 25-31
29. Stec WJ, Koziolkiewicz M (2000) *Kosmos* **248**: 489-501
30. Lazarowski ER, Boucher RC, Harden TK (2000) *J Biol Chem* **275**: 31061-31068
31. Post SR, Jacobson JP, Insel PA (1996) *J Biol Chem* **271**: 2029-2032
32. Yoshioka K, Saitoh O, Nakata H (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 7617-7622
33. Linden J (1991) *FASEB J* **5**: 2668-2676
34. Ralevic V, Burnstock G (1998) *Pharmacol Rev* **50**: 413-492
35. Zimmermann H (2000) *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **362**: 299-309
36. Che M, Gatmaitan Z, Arias IM (1997) *FASEB J* **11**: 101-108
37. Reinherz EL, Kung PC, Goldstein G, Levey RH, Schlossman SF (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 1588-1592
38. Murray AW (1971) *Annu Rev Biochem* **40**: 811-826
39. Deterre P, Gelman L, Gary-Gouy H, Arrieumerlou C, Bertheliev V, Tixier JM, Ktorza S, Goding J, Schmitt C, Bismuth G (1996) *J Immunol* **157**: 1381-1388
40. Scott LJ, Delautier D, Meerson NR, Trugnan G, Goding JW, Maurice M (1997) *Hepatology* **25**: 995-1002
41. Goding JW (2000) *J Leukoc Biol* **67**: 285-311
42. Lotz M, Rosen F, McCabe G, Quach J, Blanco F, Dudler J, Solan J, Goding JW, Seegmiller JE, Terkeltaub R (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 10364-10368
43. Goding JW, Grobbsen B, Slegers H (2003) *Biochim Biophys Acta* **1638**: 1-19
44. Johnson KA, Hessle L, Vaingankar S, Wennberg C, Mauro S, Narisawa S, Goding JW, Sano K, Millan JL, Terkeltaub R (2000) *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* **279**: 1365-1377
45. Narisawa S, Frohlander N, Millan JL (1997) *Dev Dyn* **208**: 432-446
46. Kawagoe H, Stracke ML, Nakamura H, Sano K (1997) *Cancer Research* **57**: 2516-2521
47. Nam SW, Clair T, Campo CK, Lee HY, Liotta LA, Stracke ML (2000) *Oncogene* **19**: 241-247
48. Nam SW, Clair T, Young-Sik K, McMarlin A, Schiffmann E, Liotta LA, Stracke ML (2001) *Cancer Research* **61**: 6938-6944
49. Maddux BA, Goldfine ID (2000) *Diabetes* **49**: 13-19
50. Frittitta L, Youngren JF, Sbraccia P, Adamo MD, Buongiorno A, Vigneri R, Goldfine ID, Trischitta V (1997) *Diabetologia* **40**: 282-289
51. Frittitta L, Spampinato D, Solini A, Nosadini R, Goldfine ID, Vigneri R, Trischitta V (1998) *Diabetes* **47**: 1095-1100
52. Frittitta L, Comastra S, Baratta R, Costanzo BV, D'Adamo M, Graci S, Spampinato D, Maddux BA, Vigneri R, Ferrannini E, Trischitta V (1999) *J Clin Endocrinol Metab* **84**: 3620-3625
53. Grupe A, Alleman J, Goldfine ID, Sadick M, Stewart TA (1995) *J Biol Chem* **270**: 22085-22088
54. Youngren JF, Maddux BA, Sasson S, Sbraccia P, Tapscott EB, Swanson MS, Dohm GL, Goldfine ID (1996) *Diabetes* **45**: 1324-1328
55. Virkamäki A, Ueki K, Kahn RC (1999) *J Clin Invest* **103**: 931-943
56. Stefan C, Wera S, Stalmans W, Bollen M (1996) *Diabetes* **45**: 980-983
57. Sokoda H, Ogihara T, Anai M, Funaki M, Inukai K, Katagiri H, Fukushima Y, Onishi Y, Ono H, Yazaki Y, Kikuchi M, Oka Y, Asano T (1999) *Diabetes* **48**: 1365-1371
58. Kahan RC (1994) *Diabetes* **46**: 1066-1084
59. Bell GJ (1991) *Diabetes* **40**: 313-322
60. Pizzuti A, Frittitta L, Argiolas A, Baratta R, Goldfine ID, Bozzali M, Erolino T, Scarlato G, Iacoviello L, Vigneri R, Tassi V, Trischitta V (1999) *Diabetes* **48**: 1881-1884
61. Costanzo BV, Trischitta V, Di Paola R, Spampinato D, Pizzuti A, Vigneri R, Frittitta L (2001) *Diabetes* **50**: 831-836
62. Frittitta L, Erolino T, Bozzali M, Argiolas A, Graci S, Santagati MG, Spampinato D, Di Paola R, Cisternino C, Tassi V, Vigneri R, Pizzuti A, Trischitta V (2001) *Diabetes* **50**: 1952-1955
63. Roymans D, Slegers H (2001) *Eur J Biochem* **268**: 487-498

Wskazówki dla Autorów

Wydawany przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne kwartalnik „Postępy Biochemii” publikuje prace przeglądowe omawiające nowe osiągnięcia, koncepcje i kierunki badawcze w dziedzinie biochemii i nauk pokrewnych; publikuje też noty z historii biochemii, zasady polskiego słownictwa biochemicznego, recenzje nadesłanych książek oraz sprawozdania ze zjazdów, konferencji i szkół, w których biorą udział członkowie Towarzystwa.

Prace przeznaczone do publikacji w „Postępkach Biochemii” mogą mieć charakter artykułów monograficznych (do 20 stron tekstu licząc piśmiennictwo i tabele), minireviews (do 10 stron tekstu), oraz krótkich not o najnowszych osiągnięciach i poglądach (do 5 stron tekstu).

Autorzy artykułu odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podawanych informacji oraz poprawność cytowanego piśmiennictwa. Ujęcie prac winno być syntetyczne, a przedstawione zagadnienia zilustrowane za pomocą tabel, rycin: wykresy, schematy, reakcje, wzory i fotografie.

Wskazany jest podział artykułów monograficznych na rozdziały i podrozdziały, których rzeczowe tytuły tworzą spis treści. Zgodnie z przyjętą konwencją rozdziały noszą cyfry rzymskie, podrozdziały odpowiednio rzymskie i arabskie, np. I-1, I-2. Poprawność logiczna i stylistyczna tekstu warunkuje jego jednoznaczność i czytelność. Autorzy przeto winni unikać składni obcojęzycznej, gwary laboratoryjnej, a także ograniczać stosowanie doraźnie tworzonych skrótów, nawet jeśli bywają używane w pracach specjalistycznych. Każda z nadesłanych do Redakcji prac podlega ocenie specjalistów i opracowaniu redakcyjnemu. Redakcja zastrzega sobie możliwość skrócenia tekstu i wprowadzenia zmian nie wpływających na treść pracy, deklaruje też gotowość konsultowania tekstu z Autorami.

Przekazanie artykułu do redakcji jest równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była i nie będzie publikowana w innym czasopiśmie, jeżeli zostanie ogłoszona w „Postępkach Biochemii”. W przypadku, gdy Autor(zy) zamierza(ją) włączyć do swego artykułu ilustracje publikowane przez autorów prac cytowanych, należy uzyskać i przekazać nam odpowiednią zgodę na przedruk.

Redakcja prosi Autorów o przestrzeganie następujących wskazówek szczegółowych:

TEKST: prosimy o nadsyłanie dwóch egzemplarzy wydruku oraz dyskietki z tekstem zapisanym jako *.doc w formacie IBM PC. Wydruk powinien być jednostronny z lewym marginesem około 4 cm, z zachowaniem podwójnego odstępu między wierszami, z użyciem czcionki Arial CE 11 lub 12. W przypadku stosowania w tekście liter alfabetu greckiego prosimy o wpisanie ółówek na marginesie ich fonetycznego brzmienia.

Strona informacyjna jest nienumerowana, zawiera imiona i nazwisko (a) Autora (ów), nazwy, adresy, telefony, adresy e-mail zakładów, w których pracują Autorzy, adres do korespondencji,

tytuł artykułu w języku polskim i angielskim oraz – w prawym dolnym rogu: liczbę tabel, rycin, wzorów i fotografii oraz skrócony tytuł pracy, zamieszczany na okładce czasopisma (do 25 znaków).

Strona 1 (tytułowa) zawiera imiona i nazwiska Autorów, tytuł pracy w języku polskim i angielskim, rzeczowy spis treści też w obu językach, tytuł naukowy każdego z Autorów i ich miejsce pracy z adresem pocztowym i adresem e-mail oraz wykaz stosowanych skrótów w porządku alfabetycznym.

Kolejno numerowane dalsze strony obejmują tekst pracy, piśmiennictwo, tabele, podpisy i objaśnienia rycin, wzorów i fotografii.

PIŚMIENNICTWO: Wykaz piśmiennictwa obejmuje prace w kolejności ich cytowania w tekście, zaznacza się je liczbami porządkowymi ujętymi w nawiasy kwadratowe, np. [3, 7, 9-26]. Odnosiłki bibliograficzne powinny mieć nową, uproszczoną formę. Sposób cytowania czasopism (1), monografii (2), rozdziałów z książek jednotomowych (3), rozdziałów z tomów serii opracowanych przez tych samych redaktorów (4), rozdziałów z tomów serii opracowanych przez różnych redaktorów (5) wskazują poniżej podane przykłady.

1. Hildebrandt GR, Aronson NN (1980) *Biochim Biophys Acta* 631: 499-502
2. Bostock CJ, Summer AT (1978) *The Eucaryotic Chromosome*, Elsevier, North-Holland, Amsterdam
3. Norberth T, Piscator M (1979) W: Friberg L, Nordberg GF, Von VB (red) *Handbook on the Toxicology of Metals*. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, s. 541-553
4. Dele J, Kesters K (1975) W: Florkin M, Stoltz EH (red) *Comprehensive Biochemistry* t. 29B. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, s. 1-7
5. Franks NP, Lieb WR (1981) W: Knight C G (red) *Research Monographs in Cell and Tissue Physiology*, t. 7. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, s. 243-272

ILUSTRACJE: ryciny powinny być zapisane na dyskietce jako: *.tif, lub *.cdr, lub *.psd, lub *.eps. Fotografie czarno-białe (kontrastowe) powinny być wykonane na papierze matowym. Istnieje możliwość wykonania reprodukcji barwnych, ale ich koszty ponoszą Autorzy. Na rycinach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz posługiwać się skrótami. Osie wykresów powinny być opatrzone napisem łatwo zrozumiałym. Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny podejmuje wydawca. Ilustracji nie należy włączać w tekst maszynopisu, lecz odpowiednio ponumerować: ryciny noszą cyfry arabskiej, wzory zaś rzymskie. Na marginesie tekstu należy zaznaczyć ołówkiem preferowane miejsce umieszczenia ryciny czy wzoru. Słowne objaśnienia znaków graficznych można umieścić w podpisie pod ryciną, rysunkowe zaś jedynie na planszy ryciny. Tytuły i objaśnienia rycin sporządza się w postaci oddzielnego wykazu. Wydruki ilustracji należy na odwrocie podpisać imieniem i nazwiskiem pierwszego z Autorów i pierwszym słowem tytułu pracy oraz oznaczyć „górną-dół” (ołówkiem, na odwrocie). Ze względu na wewnętrzną spójność artykułu wskazane jest konstruowanie oryginalnych rycin i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa.

Wydruk i załączniki (w dwu egzemplarzach) oraz dyskietkę, właściwie zabezpieczone przed uszkodzeniem w czasie transportu, prosimy przesać na adres:

Redakcja kwartalnika „Postępy Biochemii”
Polskie Towarzystwo Biochemiczne
ul. Pasteura 3
02-093 Warszawa

KOMUNIKAT ZARZĄDU GŁÓWNEGO

POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

Dotyczący składek członkowskich i prenumeraty „Postępów Biochemii” w roku 2003

Składka członkowska w 2003 roku wynosi:

dla Członków rzeczywistych 80.- zł.

dla Członków studentów 40.- zł

w tym roczna prenumerata „Postępów Biochemii”.

Małżeństwa mogą opłacać składki w wysokości 80. + 40. = 120 zł.

Członkowie, którzy opłacą składkę członkowską do 30 czerwca 2003, mają zapewnioną bezpłatną prenumeratę kwartalnika Polskiego Towarzystwa Biochemicznego „Postępy Biochemii”. Członkowie, którzy opłacą składkę po tym terminie, będą mogli otrzymywać kwartalnik do czasu wyczerpania się zapasów magazynowych.

Powyższe zmiany nie dotyczą Członków Honorowych Towarzystwa.

Natomiast Członkowie-Emeryci – nadal zwolnieni z opłacania składki członkowskiej – płacą za prenumeratę „Postępów Biochemii” 30.- zł.

Osoby niebędące członkami Towarzystwa mogą być prenumeratorami „Postępów Biochemii”. Koszt w 2003 roku — 80 zł.

Biblioteki płacą za prenumeratę „Postępów Biochemii” w roku 2003 120.- zł.

Prosimy o wnoszenie opłat bez wezwania na nasze konto w BPH PBK S.A. III Oddz. Warszawa nr 11101053-411050000371.

Jolanta Barańska

Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

ZAPROSZENIE

Jeżeli chciałabyś/chciałbyś zapisać się na listę e-mailową Polskiego Towarzystwa Biochemicznego wyślij e-mail na adres: infoptbioch@nencki.gov.pl. W polu „subject”, umieść swoje nazwisko i imię (w takiej kolejności i bez polskich znaków diakrytycznych) oraz adres e-mailu. Wysyłając taki mail zgadzasz się na to, aby na Twój adres e-mailowy przychodziły informacje ZG, listy pojedynczych lub grup członków do ogółu członków, informacje z FEBS o zjazdach i kursach oraz materiały reklamowe. Lista będzie rozsyłać materiały kontrolowane przez moderatora, którym będzie Adam Szewczyk, sekretarz Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, tak więc nie będzie Ci grozić zalew śmieciowej poczty i zawirusowanych „attachmentów”. Mam nadzieję, że tą drogą poprawi się stan poinformowania naszych członków o różnych wydarzeniach naukowych, stypendiach, kursach i wreszcie o aktywności poszczególnych oddziałów naszego Towarzystwa. Być może również „Listy do biochemików” redagowane przez p. Teresę Wesołowską będą obok wersji drukowanej kolportowane przez naszą listę. Zapraszam także do odwiedzenia strony [www](http://rcin.org.pl) naszego Towarzystwa

Adam Szewczyk

Sekretarz Zarządu Głównego
Polskiego Towarzystwa Biochemicznego