

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

POLISH
ANATOMICAL
SOCIETY

POLISH SOCIETY
FOR CELL
BIOLOGY

VOL. 27, 2000

Suplement nr 15

Redaktorzy: M. Balińska i J. A. Siedlecki

NOWOTWORY:

BIOLOGIA, GENETYKA, IMMUNOLOGIA

CANCER: BIOLOGY, GENETICS, IMMUNOLOGY

Redaktorzy: Z. Osuchowska i J. Kawiak

RÓŻNICOWANIE KOMÓREK *EUKARYOTA*

DIFFERENTIATION OF EUKARYOTIC CELLS

**Postępy
Biologii
Komórki**

**Advances
in Cell
Biology**

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

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

Redaguje Kolegium – Editors:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Rada Redakcyjna – Advisory Board:

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

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

Wykaz recenzentów tomu 27 PBK z 2000 r. umieszczono na następnej stronie tego zeszytu.

Referees of the volume 27, 2000 is on following page.

© Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej – Foundation for Cell Biology and Molecular Biology
address: www.mol.uj.edu.pl/pbk

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

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

Ark. wyd. 13,0. Ark. druk. 11,0. Podpisano do druku w październiku 2000 r. Druk ukończono w październiku 2000

NOWOTWORY:
BIOLOGIA, GENETYKA, IMMUNOLOGIA
CANCER: BIOLOGY, GENETICS, IMMUNOLOGY

Redaktorzy
Małgorzata Balińska
Janusz A. Siedlecki

WPROWADZENIE

INTRODUCTION

W dniu 6 października 1999 r. odbyła się konferencja na temat: *Nowotwory: biologia, genetyka i immunologia* zorganizowana przez Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie i Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej. Konferencja wzbudziła ogromne zainteresowanie, przerastające oczekiwania organizatorów. Wzięło w niej udział ponad 300 naukowców z wielu ośrodków naukowych z całego kraju. Konferencję otworzył prof. Maciej Nałęcz – Dyrektor Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego i przewodniczący Międzynarodowej Rady Naukowej Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej, który życząc uczestnikom owocnych obrad podkreślił znaczenie i rolę różnych aspektów badań nad chorobami nowotworowymi będącymi pierwszą przyczyną zgonów w uprzemysłowionych społeczeństwach.

Program obrad był następujący:

- *Nowotwory a geny* – E. Bartnik (Uniwersytet Warszawski)
- *Układ immunologiczny a nowotwory* – Z. Pojda (Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie)
- *Procesy nowotworowe a apoptoza* – B. Grzelakowska-Sztabert (Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego)
- *Procesy starzenia się a nowotwory* – M. Balińska (Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego)
- *Czynniki angiogenne i antyangiogenne w nowotworach* – P. Janik, M. Małecki (Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie)
- *Lipidy w komórce nowotworowej* – S. Pikuła (Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego)
- *Metabolizm wapniowy w komórkach nowotworowych* – J. Duszyński (Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego)
- *Diagnostyka molekularna chorób nowotworowych* – J.A. Siedlecki (Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie)
- *Cytokiny a leczenie chorób nowotworowych* – A. Deptuła (Akademia Medyczna w Warszawie)
- *Immunoterapia nowotworów w układach modelowych i klinice* – J. Kawiak (Centrum Medyczne Podyplomowego Kształcenia)

Uczestnicy konferencji uzalali się na brak materiałów źródłowych do przedstawianych tematów, stąd zrodził się pomysł opublikowania przedstawianych referatów w formie artykułów wydanych jako suplement kwartalnika *Postępy Biologii Komórki*. Oddajemy więc w ręce Czytelników tom zawierający część omawianych na konferencji zagadnień. Jest on niestety niepełny, ale nie wszyscy autorzy zechcieli w formie artykułu przenieść na papier treść swego wystąpienia. Jednakże sądzimy, że i tak wiele zagadnień omawianych na konferencji znalazło odzwierciedlenie w oddawanym do rąk czytelnika Suplemencie. Artykuły podlegały weryfikacji przez redaktorów Suplementu, jednakże nie interweniowaliśmy w zakres i szczegółowość omawianych zagadnień, uważaliśmy bowiem, że zeszyt jako tom materiałów pokonferencyjnych powinien mieć różnorodną formę w zależności od inwencji autorów.

Druk materiałów jest możliwy dzięki finansowemu wsparciu Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Polskiej Akademii Nauk i Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej, jak również częściowo firm wystawiających swoje produkty podczas Konferencji: Alexim/Becton Dickinson, Bicker, Biokom System, Biomed, Biomibo, HVL-Holding AG, INC Biomedicals, Inlab, InterMedic, JW. Electronics, Kendro, Kucharczyk – Techniki Elektroforetyczne, Polatom, Polygen, Prospecta, Symbios.

Małgorzata Balińska i Janusz Siedlecki

NOWOTWORY A GENY

GENES AND CANCER

Ewa BARTNIK, Anna LORENC*

Zakład Genetyki Uniwersytetu Warszawskiego i Instytut Biochemii i Biofizyki
PAN, Warszawa; * Studium Medycyny Molekularnej – studentka

Streszczenie: W artykule omówiono syntetycznie geny związane z procesem powstawania nowotworów. Krótko omówiono supresory nowotworów i onkogeny, a także minimalną liczbę zmian potrzebnych po to, by normalna komórka stała się komórką nowotworową. Wspomniano także o zmianach wykrytych w mitochondrialnym DNA w guzach.

(*Postępy Biologii Komórki* 2000; *Supl. 15*: 5–8)

Słowa kluczowe: nowotwory, onkogeny, geny supresorowe, cykl komórkowy

Summary: In the article a short description is given of genes involved in the development of neoplasia including tumour suppressors and oncogenes as well as the minimal number of changes required to transform a normal cell into a neoplastic one. Changes detected in mitochondrial DNA in solid tumours are also mentioned.

(*Advances in Cell Biology* 2000; *Suppl. 15*: 5–8)

Key words: cancer, oncogenes, suppressor genes, cell cycle

Przy ilości pojawiających się obecnie w literaturze artykułów dotyczących mechanizmów powstawania nowotworów pisanie jeszcze jednego może wydać się przesadą. Artykuł ten jest pewnym rozwinięciem wystąpienia na sympozjum „Nowotwory: biologia, genetyka i immunologia” w październiku 1999 r. i dotyczy przede wszystkim spraw związanych z genetyką. Podana na końcu lista literatury jest celowo bardzo krótka, pozycji jest na tyle mało, że na ogół nie będą cytowane w tekście.

Po to, aby normalna komórka stała się komórką nowotworową, musi zajść w niej szereg zmian – najlepiej jest to poznane dla raka jelita grubego. Zmiany te bądź uaktywniają, bądź unieczynnają geny związane w szerokim sensie tego słowa

z regulacją podziału komórki. Geny te mogą kodować białka działające w cyklu komórkowym, w transdukcji sygnału, regulacji transkrypcji, procesach naprawy DNA itp. itd. Bardzo ogólnie geny te dzieli się – zgodnie z tradycją – na onkogeny i supresory nowotworów. Rozróżnienie w zasadzie opiera się na tym, czy w nowotworach brak jest produktu genu (wtedy stosuje się nazwę supresory nowotworów) czy też wręcz przeciwnie w nowotworach obecne są zmutowane produkty genu (wtedy mówi się o onkogenach). To rozróżnienie nigdy nie było zbyt szczęśliwe, ale chyba już się przyjęło.

Wiele z genów z grupy onkogenów wykryto, ponieważ były porywane przez wirusy rakotwórcze z grupy retrowirusów lub też wykrywano ich amplifikację czy translokacje w różnych nowotworach. Bardzo wiele z tych genów jest związanych z transdukcją sygnału – przenoszeniem informacji od otoczenia do wnętrza komórki, kodują one (w formie nie zmutowanej zwanej protoonkogenami) czynniki wzrostowe i ich receptory, różne kinazy przekazujące sygnały w komórce, czynniki transkrypcyjne.

Wiele genów supresorowych wykrywano poszukując mutacji w rodzinach obarczonych predyspozycjami do różnych typów nowotworów. W pewnym uproszczeniu, osoba przychodząca na świat z mutacją w jednym genie supresora ma o jeden etap mniej do przebycia po to, by pojawił się u niej nowotwór. Produkty najbardziej znanych genów z tej rodziny – *RB* i *p53* – są też obiektami ataku przez rakotwórcze wirusy, których materiałem genetycznym jest DNA. Produkty tych dwóch genów są podstawowymi regulatorami cyklu komórkowego. Produkt genu *p53* odgrywa też ważną rolę w procesie komórkowego „harakiri” – apoptozy; proces ten stanowi zabezpieczenie przed nienormalnością – komórka, w której są jakieś defekty (na poziomie np. DNA), powinna nie dzielić się, tylko przejść przez apoptozę.

Produkty innej grupy genów biorą udział w procesach naprawy DNA, m.in. naprawy przez wycinanie, naprawy nie sparowanych zasad itp.

Od szeregu lat niesłychanie modna stała się telomeraza – enzym, odpowiedzialny za odbudowywanie końców chromosomów po ich nieuniknionym skracaniu się po podziałach komórkowych. Enzym ten jest nieczynny w większości normalnych dojrzałych komórek i czynny w przeważającej większości nowotworów.

W zasadzie należy postawić dwa pytania: jaka jest minimalna liczba zmian, które muszą zajść po to, by normalna komórka stała się komórką nowotworową i drugie pytanie: jakie zmiany są obecne w typowych nowotworach ludzkich?

Na oba pytania odpowiedzi udzieliły niedawno opublikowane prace [5,6]. Minimalna liczba zmian to zmutowanie genu *RAS*, wprowadzenie genu wirusa SV40T (którego produkt unieczynnia *p53* i *Rb*) i uaktywnienie telomerazy. To daje komórki, które powodują nowotwory u myszy. Tym niemniej może to nie być takie proste. Bardzo podobny eksperyment, gdzie zamiast T z SV40 zastosowano geny *E6* i *E7* z wirusa brodawczaka HPV16, które też unieczynniają *p53* i *pRB*, nie doprowadził do powstania komórek o cechach komórek nowotworowych [8]. Co więcej,

badania nowotworów jelita grubego analizujące globalne zmiany w DNA sugerują, że zachodzi bardzo wiele zmian w komórkach nawet we wczesnych stadiach powstawania nowotworu – podawane jest szacunkowo około 11000 zmian [10]. Oczywiście nie wszystkie muszą być potrzebne do powstania nowotworu, ale czy naprawdę wystarczy tak mało zmian?

Łatwiej odpowiedzieć na pytanie, co musi być zmienione w komórce normalnej, po to by powstał nowotwór. Opowiedź podali Hanahan i Weinberg [6] – są 4 zmiany podstawowe (ucieczka przed apoptozą brak zapotrzebowania na sygnały wzrostowe z zewnątrz, niewrażliwość na sygnały z zewnątrz związane z hamowaniem wzrostu i nieograniczona zdolność do replikacji) oraz 2 dodatkowe – zdolność do powodowania angiogenezy (czyli ukrwienia, bardzo ważne przy guzach litych, które bez tego mają bardzo ograniczone możliwości rozrostu) oraz zdolność do inwazji tkanek i przerzutowania. W zasadzie w tej pracy omawiane są wyłącznie zmiany z pierwszych czterech kategorii.

Znanych jest już bardzo wiele genów związanych z powstawaniem nowotworów. Ze względu na nasze zainteresowania dodamy jeszcze jedną grupę genów, które w zasadzie do niedawna nie były w ogóle brane pod uwagę – geny związane z mitochondriami. Niedawno doniesiono o klonalnych mutacjach w mitochondrialnym DNA w nowotworach jelita grubego [9]. Mutacje te są różne, ale wykryto je w 7 z 10 badanych guzów, a nie były obecne w normalnych tkankach przylegających do guza. Ze względu na kluczową rolę mitochondriów w procesie apoptozy być może mutacje te w jakiś sposób wpływają na podatność komórek na apoptozę.

Inny przykład dotyczący zmian w mitochondriach w procesie powstawania nowotworów dotyczy mutacji w genie jądrowym, którego produkt obecny jest w mitochondriach jako część oksydoreduktazy bursztynian-ubichinon. Mutacje w tym genie prowadzą do rodzinnego powstawania przyzwojaków (paraganglioma) – niezłośliwych nowotworów głowy i szyi. Jak piszą autorzy pracy [1], „*These findings indicate that mitochondria play an important role in the pathogenesis of certain tumors*”.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BAYSAL BE i wsp. Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science* 2000; **287**: 848–851.
- [2] BROWN MA, SOLOMON E. Studies on inherited cancers: outcomes and challenges of 25 years. *Trends Genet* 1997; **13**: 202–206.
- [3] CAVALLI LR, LIANG BC. Mutagenesis, tumorigenicity, and apoptosis: are the mitochondria involved? *Mut Res* 1998; **398**: 19–26.
- [4] CLEAVER JE, HUL TNER ML Transcription-related human disorders. *Am J Human Genet* 1995; **56**: 1257–1261.

- [5] HAHN WC, COUNTER CM, LUNDBERG AS, BEIJERSBERGEN RL, BROOKS MW, WEINBERG RA. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 1999; **400**: 464–468.
- [6] HANAHAN D, WEINBERG RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 1999; **100**: 57–70.
- [7] KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1991; **87**: 159–170.
- [8] MORALES CP i wsp. Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nature Genet* 1999; **21**: 115–118.
- [9] POLYAK K i wsp. Somatic mutations in the mitochondrial genome of colorectal tumors. *Nature Genet* 1998; **20**: 291–293.
- [10] STOLER DL i wsp. The onset and extent of genetic instability in sporadic colorectal tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 15121–15126.

Adres autora: Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

APOPTOZA I NOWOTWORY

APOPTOSIS AND TUMORS

Barbara GRZELAKOWSKA-SZTABERT

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

Streszczenie: Przedstawiono ogólną charakterystykę przebiegu apoptozy, w tym mechanizmów aktywacji kaspaz i endonukleaz, głównych wykonawców apoptozy. Podkreślono udział w tych procesach mitochondriów i uwalnianych z nich białek – prokaspazy 9, cytochromu c i czynnika AIF. Podano też informację o układach błonowych odbierających sygnały apoptotyczne, o różnych białkach regulujących przebieg apoptozy, w tym białkach z rodzin BCL2/BAX i IAP i wskazano na występowanie w komórkach nowotworowych zaburzeń w ich ekspresji i właściwościach. Omówiono także najlepiej, jak dotąd, poznany szlak apoptotyczny indukowany i regulowany przez białka supresorowe p53 i pRb oraz onkogenne białko c-MYC.

(*Postępy Biologii Komórki 2000; Supl. 15: 9–43*)

Słowa kluczowe: apoptoza, receptory błonowe, ligandy, mitochondria, kaspazy, endonukleazy, BCL-2/BAX, p53, pRb, c-MYC.

Summary: General characteristics of apoptosis and mechanisms leading to activation of caspases and endonucleases, the main executors of apoptosis is described. The crucial role in these processes of mitochondria and the proteins released from them – procaspase 9, cytochrom c and AIF factor is also shown. Information is also presented about membrane receptors, their ligands as well as various regulatory proteins, those from BCL-2/BAX and IAPs families included. It is pointed out that changes in the level of expression and/or properties of regulatory proteins characterize various tumor cells. The apoptotic pathway induced and regulated by suppressor (p53, pRb) and oncogenic (c-MYC) proteins was also depicted.

(*Advances in Cell Biology 2000; Suppl. 15: 9–43*)

Key words: apoptosis, membrane receptors, ligands, mitochondria, caspases, endonucleases, BCL-2/BAX, p53, pRb, c-MYC

Wykaz stosowanych skrótów: **AIF** (*apoptosis inducing factor*) – czynnik indukujący apoptozę; **Apaf-1** (*apoptosis protease activating factor*) – czynnik uczestniczący w aktywacji proteaz apoptotycznych; **ARF** – jedno z białek kodowanych przez gen *INK-a*; regulator funkcjonowania białek MDM2 i p53; **BCL-2/BAX** – rodzina endogennych białkowych regulatorów apoptozy; **BCL-2**, **BCL-X_L** – białka

antyapoptotyczne; **BAX, BIK, BAK, BAD** – białka proapoptotyczne; **BAG** – białka wiążące się z **BCL-2**; **CAD** (*caspase activating DNase*) – DNaza aktywowana przez kaspazy; **ICAD/DFE** (*inhibitor of CAD/DNA fragmentation factor*) – białkowy inhibitor CAD; **CDK4/6** – kinazy białkowe regulujące cykl komórkowy; **p16, p21** – białkowe inhibitory kinaz CDK; **DD** – domena śmierci (*death domain*); **DED** (*effector death domain*) – efektorowa domena śmierci; **DISC** (*death-induced signalling complex*) – podbłonowy kompleks inicjujący apoptozę; **FAS** – antygen powierzchniowy, jeden z receptorów z nadrodziny TNF; **FAS-L** – ligand receptora FAS; **FADD, TRADD** – białka adaptorowe; **FLICE** – kaspaza 8; **FLIP** (*fllice-inhibitory protein*) – inhibitor kaspazy 8; **FLASH** (*fllice-associated huge protein*) – białko wiążące się z kaspazą 8; **FAP-1** (*FAS-associated phosphatase-1*) – fosfataza wiążąca się z FAS; **HSP27, HSP70** – białka szoku cieplnego; **IAP** (*inhibitory apoptosis proteins*) – białka hamujące apoptozę; **AP-1, NFκB; p53, FKHL-1, STAT, IGF-1, E2F-1** – czynniki transkrypcyjne; **MDM2** (*murine double minute 2*) – regulator stabilności p53, ligaza ubikwitynowa; **PIGs** (*p53-induced genes*) – geny indukowane przez p53; **PTEN** – fosfataza, regulator aktywności kinazy białkowej Akt; **SODD** (*silencer of death domain*) – białko wiążące się z domeną śmierci; **TNF-α** (*tumour necrosis factor*) – czynnik martwicy nowotworu; **TNF-R1/R2** – błonowe receptory TNF; **TRAF** (*TNF-receptor associated protein*) – białko wiążące się z receptorami TNF; **TRAIL/KILLER** – jeden z receptorów z nadrodziny TNF; **c-MYC, c-RAS, c-ABL** – białka kodowane przez protoonkogeny *c-myc, c-ras, c-abl*; **p53, pRb** – białka kodowane przez geny supresorowe *p53, Rb*.

Apoptoza to genetycznie uwarunkowany proces fizjologiczny, rozpoznawany jako charakterystyczne zmiany biochemiczne i morfologiczne komórek, prowadzący poprzez proteolityczną i nukleolityczną degradację składników komórki do jej śmierci. W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie apoptozą, jako istotnym czynnikiem przyczyniającym się do powstawania i rozwoju nowotworów. Obecnie uważa się, że pojawienie się i rozwój nowotworu to nie tylko wynik nagromadzenia się w komórkach zmian genetycznych powstałych w konsekwencji nadekspresji lub mutacji protoonkogenów, czy też utraty lub zmian genów supresorowych. Równie istotnym czynnikiem w tych procesach jest obniżenie zdolności komórek do prawidłowego przeprowadzania programu umierania – apoptozy, jako odpowiedzi na bodźce pochodzące z otaczającego środowiska. Może to prowadzić do nieprawidłowego zwiększenia żywotności komórek, wydłużania ich życia i utrwalania już zaistniałych mutacji. Przyczyniać się może także do wystąpienia zakłóceń przebiegu cyklu komórkowego i pojawienia się oporności komórek na działanie cytostatyków.

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA SZLAKÓW APOPTOTYCZNYCH

Apoptoza stanowi odpowiedź komórki na działanie wielu czynników stresogennych, w tym zwłaszcza na uszkodzenia DNA, wywołane bardzo różnymi związkami stosowanymi w chemioterapii nowotworów czy też promieniowaniem γ i UV. Do induktorów apoptozy zalicza się też niedotlenienie, szok termiczny, usunięcie czynników wzrostowych, perturbacje przebiegu cyklu komórkowego, aktywację

określonych receptorów błonowych i wiele innych. Po tej najwcześniejszej fazie indukcji apoptozy, „prywatnej” jak to określa Kroemer [106], dla komórek określonych typów następują już fazy wspólne, polegające w fazie efektorowej na odebraniu i amplifikacji sygnału do apoptozy, a następnie przekazaniu informacji do wielu białek – wykonawców apoptozy. W fazie wykonawczej, degradacyjnej przeprowadzają one proteolizę różnych białek komórkowych, nukleolityczną degradację DNA, uczestniczą w przekształceniach błony komórkowej. W efekcie następuje rozpad komórek na ciała apoptotyczne. Zagadnienia te zostały szczegółowo omówione w wielu zagranicznych i polskich artykułach przeglądowych [42,62,86,96,139,224].

Pytanie, co jest sygnałem wywołującym w komórce rozpoczęcie procesów nieodwracalnie prowadzących do jej samounicestwienia, przewija się od początku badań mechanizmów apoptozy. Obecnie uważa się, że zmiany integralności błon mitochondrialnych, wartości potencjału błonowego mitochondriów, wzrost produkcji wolnych rodników tlenowych i uwalnianie z mitochondriów pewnych czynników apoptogennych mogą być sygnałami odbieranymi przez białka efektorowe [13,56,107,135,167,193]. Za kluczową rolę zmian mitochondrialnych w apoptozie przemawiają także obserwacje wskazujące na niezbędność mitochondriów do wywoływania w układach bezkomórkowych aktywacji kaspaz i endonukleaz, hamowanie apoptozy przez związki stabilizujące błony mitochondrialne, a także udział w regulacji aktywacji kaspaz (i w efekcie apoptozy), zakotwiczonych w błonach mitochondrialnych białek z rodziny BCL-2/BAX. Proponuje się ostatnio nawet nazywanie poszczególnych faz apoptozy fazą premitochondrialną, mitochondrialną i postmitochondrialną [107,193]. Znane są jednakże przypadki apoptozy przebiegające, jak się wydaje, bez udziału mitochondriów [158].

KASPAZY I ENDONUKLEAZY – GŁÓWNI EGZEKUTORZY APOPTOZY

Kaspazy

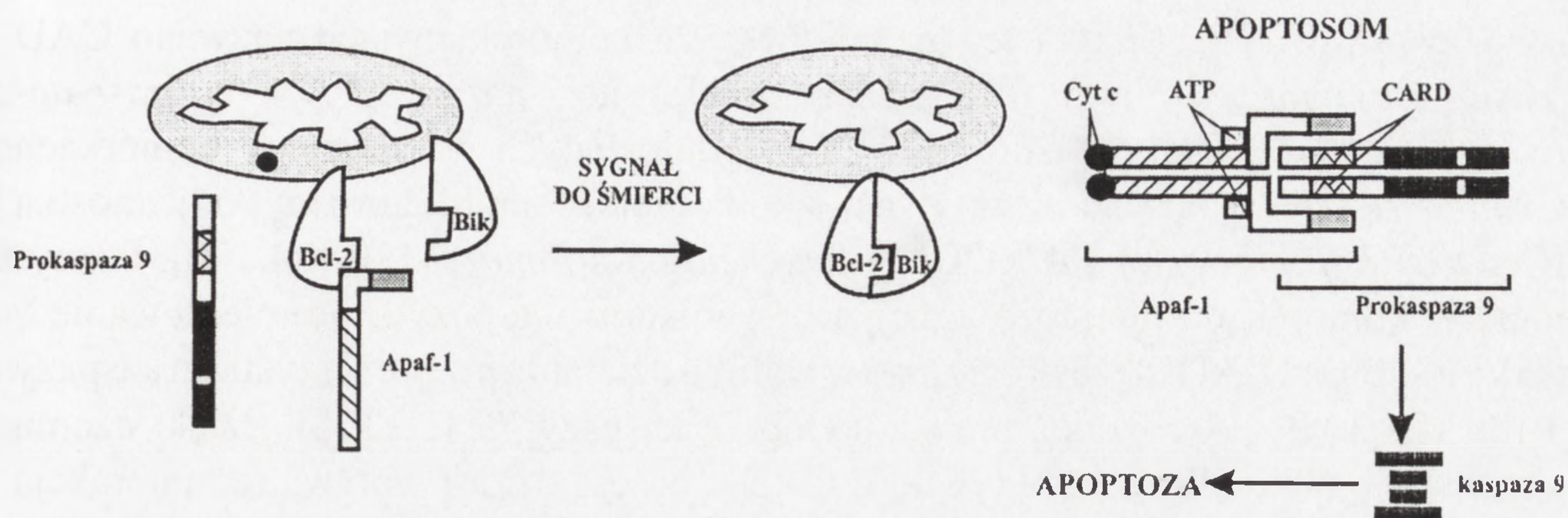
Kluczowym momentem w indukcji apoptozy jest aktywacja jej głównych wykonawców – proteaz cysteinowych – kaspaz oraz kilku endonukleaz. Kaspazy, których jak dotąd zidentyfikowano ponad 14, występują w komórkach jako nieaktywne proenzymy. Ze względu na szczególne cechy budowy cząsteczki, powszechne chociaż w znacznej mierze tkankowo zróżnicowane występowanie, a także na zdolność przeprowadzania proteolizy bardzo różnych strukturalnie i funkcjonalnie białek kaspazy wydają się być kluczowymi, choć nie jedynymi proteazami odpowiedzialnymi za przebieg apoptozy [144,213,226]. W różnych układach apopto-

tycznych również kalpajny, katepsyna, a także proteazy proteasomu mogą być istotne dla tego procesu [9,20,32,175,239]. Aktywną enzymatycznie formą kaspaz jest tetramer, który może powstać w wyniku autoproteolizy dwóch cząsteczek prokaspazy i składowania podjednostek, a także w wyniku działania innych kaspaz i proteaz jak np. proteazy serynowej cytotoksycznych limfocytów T, tzw. granzymu B.

Szczególnie dużo uwagi poświęcono badaniom aktywacji prokaspaz poprzez autoproteolizę. Może ona zachodzić w dwóch różnych kompleksach białkowych – w kompleksie DISC oraz w apoptosomie. DISC (*death-induced signalling complex*) to podbłonowy kompleks powstający po aktywacji i oligomeryzacji receptorów błonowych z nadrodziny TNF (*tumor necrosis factor*) [7,62,142,143,179,217]. W skład jego wchodzi cytoplazmatyczny fragment receptorów cytokin TNF α , FAS-L bądź TRAIL, charakteryzujący się obecnością tzw. domeny śmierci (DD, *death domain*), białka adaptorowe typu FADD lub TRADD, w których występuje tzw. efektorowa domena śmierci (DED, *death effector domain*) oraz najczęściej prokaspaza 8. W wyniku molekularnych przekształceń w kompleksie DISC dochodzi bardzo szybko do autoproteolizy prokaspazy 8 i utworzenia jej aktywnego tetramery, który przeprowadza następnie proteolizę dalszych kaspaz i innych białkowych substratów. W kompleksach podbłonowych ulega również aktywacji prawdopodobnie kaspaza 10 i 2, a także kaspazy „uczynniane” w wyniku aktywacji receptorów TRAIL.

Ostatnio sugeruje się, że do aktywacji kaspazy 8 w kompleksie podbłonowym DISC niezbędna jest obecność w nim białka FLASH (*Flice-associated-huge protein*) [83,129]. Białko to w niestymulowanych do apoptozy komórkach wiąże prokaspazę 8, kontroluje prawdopodobnie jej konformację oraz stężenie i zapobiega autoaktywacji w nieobecności liganda. Dopiero zadziałanie sygnału do apoptozy – związanie FAS-L – powoduje odłączenie białka FLASH, utworzenie kompleksu DISC i powstanie tetramery aktywnej kaspazy 8. Nie ma, jak dotąd, danych na temat ekspresji białka FLASH w komórkach nowotworowych.

Apoptosom, drugi kompleks białkowy, w którym dochodzi do autoproteolizy kaspaz, tworzy się po zaktywowaniu mitochondriów. W jego formowaniu biorą udział uwalniane z mitochondriów do cytoplazmy prokaspaza 9, cytochrom c oraz jedna z izoform białka Apaf-1 (*Apoptosis protease activating factor*) (rys. 1). W kompleksie tym, po uaktywnieniu Apaf-1 poprzez związanie z cytochromem c i na koszt energii pochodzącej z ATP (lub dATP), dochodzi do utworzenia aktywnego tetramery kaspazy 9, która z kolei aktywuje kaspazy wykonawcze zwłaszcza kaspazę 3 i 7 [2,161]. Aktywacja kaspazy 9 jest niezbędna dla uruchamiania *in vivo* kaskady kaspaz w apoptozie indukowanej promieniowaniem γ , proapoptycznymi białkami z rodziny BCL-2/BAX, a także wieloma lekami. Zarodki myszy pozbawione genu kodującego kaspazę 9 giną przed urodzeniem, przede wszystkim ze względu na obniżenie procesów apoptotycznych, zwłaszcza w komórkach układu nerwowego i odpornościowego [109]. Nie wiadomo jak dotąd, czy również inne



RYSUNEK 1. Model aktywacji prokaspazy 9 w apoptosomie; zaznaczony udział anty- i proapoptotycznych białek (BCL-X_L i BIK) w regulacji tego procesu (wg [2], zmodyf.)

prokaspazy są aktywowane w apoptosomie, ale pewne cechy budowy ich cząsteczek (obecność domeny CARD, *caspase recruitment domain*) przemawiają za tą możliwością.

W komórkach indukowanych do apoptozy niewątpliwie dochodzi do współdziałania omówionych powyżej szlaków aktywacji kaspaz. Przemawiają za tym wyniki badań apoptozy indukowanej w różnych komórkach leukemicznych bądź to poprzez aktywację receptora FAS [16], bądź też etopozyd lub staurosporynę [192]. Sugerują one, że powiązania szlaków aktywacji kaspaz mają miejsce na etapie poprzedzającym uwalnianie cytochromu c. Wykazano bowiem, że kaspaza 8 aktywowana w szlaku błonowym przeprowadza rozkład i w efekcie aktywuje występujący w cytoplazmie czynnik(i), który następnie promuje uwalnianie z mitochondriów cytochromu c. Prowadzi to do zintensyfikowania sygnału apoptotycznego i aktywacji większej liczby kaspaz. Sugeruje się, że czynnikiem takim mogłoby być proapoptotyczne białko BID. Należy przypuszczać, że może mieć miejsce także i sytuacja odwrotna: zaktywowane w szlaku mitochondrialnym kaspazy, np. kaspaza 3 przeprowadzają proteolizę i aktywację prokaspazy 8 [192].

Endonukleazy

Endonukleazy, to druga obok kaspaz grupa enzymów uczestniczących w realizacji programu apoptozy. Chociaż degradacja DNA na duże i/lub internukleosomalne fragmenty jest jednym z najwcześniej poznanych i uznanych wyznaczników apoptozy, to identyfikacja enzymów przeprowadzających rozkład DNA nastęrczała od lat wiele trudności. Postulowano udział w tym procesie np. DNazy I, DNazy II i NUC-18, jednakże nie prezentowano dowodów wykazujących ich istotność dla procesu apoptotycznego [156]. W 1998 r. zidentyfikowano DNazę, która wydaje się mieć bezpośredni związek z apoptozą, gdyż jest aktywowana w wyniku działania

kaspazy 3 [40,228]. Enzym ten wyizolowany z komórek mysich nazwano CAD (*caspase-activated DNase*), jego ludzki homolog nosi nazwę CPAN (*caspase-activated nuclease*) [66]. W zdrowych, niestymulowanych do apoptozy komórkach CAD występuje w postaci nieaktywnej jako kompleks z inhibitorową podjednostką ICAD/DFP (*inhibitor of CAD / DNA fragmentation factor*) [119,174,176]. Po stymulacji komórek do apoptozy różnymi czynnikami (etopozyd, promieniowanie γ i UV) inhibitor ICAD ulega proteolizie w wyniku działania przede wszystkim kaspazy 3 [89,128,205], jak również prawdopodobnie kaspazy 7 [120,128], dzięki czemu ujawnia się nukleolityczna aktywność CAD. Na jej poziom wpływa też interakcja CAD z histonem H1 [120], jak również z jądrowymi białkami HMG2 (*high mobility group protein 2*) [207]. CAD jest bardzo ważną, chociaż z pewnością nie jedyną endonukleazą czynną w apoptozie, bowiem aktywacji pod wpływem sygnałów do apoptozy ulega na przykład także i kwaśna nukleaza (*low pH-dependent*), również degradująca DNA [43].

Sugeruje się istnienie związku pomiędzy aktywacją powyższych nukleaz a działaniem AIF (*Apoptosis Inducing Factor*), drugim, oprócz cytochromu c, apoptocycznym czynnikiem uwalnianym po zadziałaniu bodźca z przestrzeni międzłonowej mitochondriów [194]. Czynniki AIF będący flawoproteina wykazującą homologię do bakteryjnych oksydoreduktaz, wywiera bowiem bezpośredni efekt na jądra komórkowe powodując kondensację chromatyny i rozkład DNA na duże fragmenty, co być może stanowi etap poprzedzający działanie na DNA specyficznych dla apoptozy endonukleaz. Przypuszczenie to wymaga eksperymentalnego potwierdzenia.

MECHANIZMY REGULUJĄCE ODBIÓR I PRZEKAZANIE SYGNAŁU DO APOPTOZY W KOMÓRKACH PRAWIDŁOWYCH I NOWOTWOROWYCH

Układ: receptor błonowy/ligand

O efektywności transmisji sygnału proapoptotycznego generowanego w wyniku aktywacji receptorów błonowych przez cytokiny może decydować wiele czynników. Należą do nich przede wszystkim:

- A. – ilość receptorów błonowych i właściwości ich zewnątrzłonowych i cytoplazmatycznych domen,
- B. – ilość ligandu i jego zdolność do współdziałania z receptorami,
- C. – obecność kaspaz i endogennych białek hamujących ich aktywację.

A. O ilości receptorów błonowych decyduje przede wszystkim intensywność transkrypcji kodujących je genów. W regulacji indukcji receptora FAS uczestniczą między innymi czynniki transkrypcyjne – NFκB [142], p53 [141,152], FKHRL-1 [18], STAT [230], IGF-1 [28] oraz białka nie uczestniczące bezpośrednio w procesach transkrypcyjnych, np. kinaza białkowa C [220]. Prawidłowa ekspresja receptora może być zmieniona w komórkach nowotworowych, ze względu chociażby na występujące w nich zmiany aktywności protoonkogenów, mutacje genów supresorowych itp., a więc białek uczestniczących w regulacji jego transkrypcji.

Pojawia się coraz więcej doniesień wskazujących, że różne komórki nowotworowe może charakteryzować zarówno niższy, jak i wyższy poziom ekspresji, np. receptora FAS, niż komórki z otaczającej tkanki prawidłowej [116]. Obniżoną ekspresję genu receptora FAS wykazano *in vitro* np. w komórkach raka przełyku [54], gruczolaka, komórkach glejaków [222], a także w zwierzęcych nowotworach jajnika [28]. Podwyższoną ekspresją FAS charakteryzują się zaś ludzkie komórki raka piersi [98], prostaty [172], niektórych wątrobiaków [141], gruczolakoraka okrężnicy [81], a także niektórych nowotworów mózgu pochodzenia astrocytarnego [197]. Należy podkreślić, że nie zawsze wysoka ekspresja genu *Fas* świadczy o wrażliwości komórek na działanie cytokin, jak to stwierdzono na przykład w komórkach gruczolakoraka trzustki [212]. Wiąże się to z występowaniem w nich podwyższonej ekspresji genu kodującego specyficzną fosfatazę, FAP-1 (*Fas-associated phosphatase-1*), która zakłóca prawidłowe funkcjonowanie receptora FAS i uniemożliwia jego udział w przekazaniu sygnału do apoptozy. Nie jest to jednak ogólną prawidłowością, gdyż w ludzkich komórkach raka okrężnicy, znaczna ilość FAP nie wywiera wpływu na funkcjonowanie drogi sygnalizacyjnej po aktywacji FAS [80]. Sugeruje się, że do zmniejszonej wrażliwości komórek na działanie niektórych cytokin (np. FAS-L) może się też przyczyniać upośledzenie eksponowania jej receptora na powierzchni komórek [215,222].

Znaczny wzrost ekspresji FAS następuje również po zadziałaniu na komórki nowotworowe różnych cytostatyków, takich jak: doksorubicyna, bleomycyna, metotreksat, fluorouracyl, etopozyd, cisplatyna itp. [46–48,80,133,134,141,162], przy czym efekt ten występuje najczęściej w komórkach z nieuszkodzonym genem supresorowym *p53* [141]. Indukowana przez chemioterapeutyki apoptoza może także przebiegać bez udziału układu FAS/FAS-L, jak np. w ostrej białaczce limfatycznej (T-ALL) [214] czy też komórkach leukemicznych Jurkat [39].

Równie istotne jak ilość eksponowanego na powierzchni komórki receptora cytokiny, są jego właściwości – efektywność wiązania cytokiny przez część zewnątrz błonową oraz przekazanie sygnału do apoptozy białkom efektorowym przy udziale części cytoplazmatycznej. Zmiana właściwości receptora wynika najczęściej z mutacji, których jak dotąd w komórkach nowotworowych najwięcej wykryto w części cytoplazmatycznej receptora FAS. Występowanie mutacji, nonsensownych lub wynikających ze zmienionej ramki odczytu, nie ogranicza się tylko do komórek

nowotworowych pochodzenia limfoidalnego [10,203]. Udowodniono ostatnio ich obecność, i to w domenie śmierci (DD) receptora FAS, także w nowotworach niehematologicznych – w komórkach raka pęcherza (TCC) [115], jak również raka płuc, NSCLC [114], a mutacje receptora TRAIL wykryto zaś w ludzkich komórkach nowotworu głowy i szyi [154]. Mutację receptora FAS polegającą na delecji fragmentu jego części transbłonowej wykryto w komórkach ludzkiej osteosarkomy odpornej na apoptozę wywołaną przez przeciwciała antyFAS [151], jak również w komórkach niektórych nowotworów mózgu pochodzenia astrocytarnego [197]. Najdalej posuniętą modyfikacją receptora jest chyba jego występowanie jako receptora pułapkowego (*decoy receptor*), niezdolnego do przekazania odebranego sygnału ze względu na brak w nim części cytoplazmatycznej lub występowanie jej w postaci szczątkowej. Przykładami tego typu modyfikacji są: pozbawiony części cytoplazmatycznej pułapkowy receptor FAS w ludzkich komórkach chłoniaka HUT78 [21], a także w komórkach raka płuc i okrężnicy [55,157] oraz dwa receptory pułapkowe cytokiny TRAIL [57,155]. W tym ostatnim przypadku wykazano, że występują one i są zakotwiczone tylko w błonach komórek prawidłowych, czyli że wrażliwe na cytokinę TRAIL są tylko komórki nowotworowe, co jest niewątpliwie bardzo korzystne dla nosiciela nowotworu [65].

Receptory błonowe mogą także niekiedy ulegać autoaktywacji w wyniku agregacji zachodzącej nawet w nieobecności odpowiedniego liganda. Sugeruje się, że temu niepożądanemu procesowi może zapobiegać białko SODD (*silencer of death domain*), wykryte praktycznie we wszystkich narządach człowieka, przy czym także w wielu komórkach stransformowanych [90,210]. Wiąże się ono bowiem z domeną śmierci receptora TNF- α i uniemożliwia jego wiązanie z innymi białkami kompleksu DISC. Dopiero dołączenie liganda do receptora powoduje oddysocjowanie białka SODD, co stwarza warunki do właściwej transmisji sygnału apoptotycznego. Przypuszcza się, że białko SODD może zapobiegać spontanicznej aktywacji również i innych niż TNF-R1 receptorów błonowych zawierających domenę śmierci.

B. Ligandy receptorów błonowych, w tym cytokiny FAS-L, TNF- α czy TRAIL podobnie jak ich receptory, są białkami błonowymi; niektóre z nich, takie jak np. FAS-L czy TNF- α mogą też występować w postaci rozpuszczalnej [142]. Intensywność ekspresji tych cytokin zależy w znacznym stopniu od aktywacji kaskady kinaz JNK [44,75], czy kinazy C [124], od działania wielu czynników transkrypcyjnych, w tym NF κ B [93,94,142], AP-1 [93], jak też p53 [141,152], a w przypadku cytokiny TRAIL także od działania interferonów [97,181]. Większość powyższych danych na temat regulacji ekspresji cytokin uzyskano badając komórki układu odpornościowego. Nie mniej jednak wydaje się, że podobne mechanizmy regulacyjne działają także w nowotworach. Podwyższoną ekspresję genu kodującego FAS-L wykrywa się w wielu komórkach nowotworowych, np. w komórkach chłoniaków [140], komórkach czerniaka B16 [15], raka płuc [145], raka przetyku [12,54], a także komórkach różnych nowotworów mózgu [53,173]. Ten wykazywany wzrost

ekspresji cytokiny na powierzchni komórek nowotworowych może powodować niszczenie przez nowotwór, reaktywnych wobec niego, limfocytów T i tym samym przyczyniać się do powstawania w organizmie „stref immunologicznego uprzywilejowania”, które sprzyjają dalszemu rozwojowi nowotworu [146,173]. Zasygnalizowane powyżej występowanie w różnych nowotworach deregulacji ekspresji i właściwości układów sygnalizacyjnych – błonowe receptory/ligandy – może, jak się coraz powszechniej sądzi, wpływać na rozwój nowotworów, a także decydować o ich podatności na chemioterapię.

C. Otrzymane przez komórkę sygnały do apoptozy przekazywane są do jej enzymatycznych wykonawców – proteaz (zwłaszcza kaspaz) i endonukleaz. Jak już wspomniano, kaspazy występują w komórkach głównie jako nieaktywne proenzymy, a na podstawowy poziom ich ekspresji wpływa przede wszystkim obecność czynnika transkrypcyjnego STAT-1 (*signal transducers and activators of transcription*; [25,110]). Jednak wzrost ekspresji niektórych prokaspaz (prokaspaza 3 i 8), indukowany w komórkach raka okrężnicy przez cytostatyki, takie jak: cisplatyna, dokсорubicyna czy mitomycyna c, przebiega bez udziału tego czynnika transkrypcyjnego [134]. Dane na temat istotności poszczególnych kaspaz w rozwoju nowotworów, jak też i podatności komórek na spontaniczną lub indukowaną lekami apoptozę są ciągle jeszcze fragmentaryczne i niejednoznaczne. Wyższy poziom prokaspaz 2 i 3, jak również ich zaktywowanych form – kaspaz 2 i 3, charakteryzuje komórki krwi pacjentów z ostrą białaczką szpikową (AML) w porównaniu z komórkami pobranymi od osób zdrowych [41]. W związku z tym próbuje się nawet traktować poziom określonych prokaspaz jako jeden z czynników prognostycznych w tej chorobie. Podobnie, wyższą ekspresję kaspazy 3 wykazano w ludzkich komórkach białaczkowych U937 i w komórkach szpiku pacjentów z białaczką AML niż w komórkach szpiku ludzi zdrowych [38]. Brakiem natomiast ekspresji kaspazy 3 (ale także ekspresji receptorów błonowych FAS i TNF-R1) charakteryzują się komórki jednej z podlinii komórek leukemicznych Jurkat, które odznaczają się wysoką zdolnością do proliferacji i zarazem opornością na apoptozę [125].

Porównawcze badania ekspresji ośmiu prokaspaz w komórkach nowotworów płuc łatwo (SCLC) lub trudno (NSCLC) ulegających spontanicznej apoptozie nie doprowadziły do odpowiedzi czy brak ekspresji określonych prokaspaz może być jedną z przyczyn oporności komórek na apoptozę [91]. Uzyskano dane wskazujące na obecność „pełnego zestawu” badanych prokaspaz w komórkach opornych na apoptozę, natomiast na brak ekspresji prokaspaz 8, 1, 4 i 10 w komórkach podatnych. Inne badania wskazują jednak, że brak lub obniżenie ekspresji niektórych kaspaz, zwłaszcza prokaspazy 3, może być istotny dla wystąpienia oporności na apoptozę indukowaną chelatorem cynku w ludzkich komórkach raka nerek, RCC [103]. Pewne dane przemawiają też za tym, że nie endogenne poziomy określonych prokaspaz, często nawet różny w komórkach tego samego nowotworu, a zdolność komórek do zwiększania ekspresji prokaspaz pod wpływem induktorów apoptozy może sta-

nowić o wrażliwości lub oporności na apoptozę przynajmniej komórek leukemicznych HL60 i HT29 [38]. Zarówno w kontroli aktywacji prokaspaz w apoptosomie, jak i aktywności już aktywnych form tych enzymów wielce istotny jest udział białek z rodziny BCL-2/BAX i IAP. Zagadnienie to zostanie dokładnie przedstawione przy omawianiu endogennych białkowych regulatorów apoptozy.

Specyficznym, jak się wydaje, chociaż z pewnością nie jedynym modulatorem przekazywania sygnałów do aktywacji kaspaz i do apoptozy, generowanych przy udziale receptorów błonowych, jest białko FLIP (*Flice inhibitory protein*) [85], opisywane także jako białko CASPER, FLAME, CASH, CLARP, I-FLICE, USURPIN [62,164,178,209]. Jest ono inertną kaspazą ze względu na brak w cząsteczce aminokwasów występujących w centrum aktywnym typowych kaspaz. Podobnie jak w prokaspazie 8, w N-końcu cząsteczki FLIP obecne są ułożone tandemowo dwie efektorowe domeny śmierci, poprzez które wiąże się ona z prokaspazą 8 i uniemożliwia jej połączenie z białkiem adaptorowym FADD. W efekcie nie może nastąpić aktywacja prokaspazy 8 w kompleksie DISC. Zaburzone więc zostaje przekazanie sygnału z receptorów błonowych do aktywacji tych kaspaz, których proteolizę przeprowadza kaspaza 8. Białko FLIP nie wpływa natomiast na przebieg apoptozy wywoływanej w komórkach leukemicznych Jurkat przez chemioterapeutyki, promieniowanie γ czy też granzym B [95]. Wysoka ekspresja białka FLIP charakteryzuje niektóre komórki nowotworowe, zwłaszcza komórki czerniaków [85]. Wydaje się zatem, że obecność białka FLIP może być istotna dla etiologii tych nowotworów. Natomiast endogennym modulatorem aktywacji prokaspazy 9, która jak już wspomniano, zachodzi w apoptosomie, jest jej krótsza, nieaktywna enzymatycznie forma powstająca w wyniku różnicowego składania transkryptu. Współzawodniczy ona z prokaspazą 9 o wiązanie z czynnikiem Apaf-1, hamuje dzięki temu aktywację kaspazy 9 i dalszych kaspaz [187].

Układ: mitochondria/kaskada kaspaz

Wartość potencjału błonowego mitochondriów ($\Delta\Psi_{mt}$) jest, jak się obecnie sądzi, jednym, oprócz białek z rodziny BCL-2/BAX, z głównych czynników decydujących o podatności komórek, w tym nowotworowych, na apoptozę [106,107,193]. Czy mitochondria komórek prawidłowych i nowotworowych różnią się wielkością potencjału błonowego? Oznaczenia $\Delta\Psi_{mt}$ przy zastosowaniu barwnika fluorescencyjnego, rodaminy, wykazały, że mitochondria komórek z olbrzymiej większości gruczolakoraków, raka nabłonka przejściowego, raka płaskokomórkowego płuc i czerniaków cechuje znacznie wyższy $\Delta\Psi_{mt}$ niż nienowotworowe komórki epitelialne. Podwyższenia wartości $\Delta\Psi_{mt}$ nie znaleziono natomiast w komórkach białaczek, chłoniaków, nerwiaków czy kostniakomięsaków [23]. Znaczenie tych obserwacji zaczyna być doceniane w ostatnich latach, kiedy wykrywa się, że spadek wartości $\Delta\Psi_{mt}$ często poprzedza apoptozę komórek nowotworowych wywołaną różnymi czyn-

nikami stosowanymi w chemioterapii (etopozyd, doksorubicyna, AraC, kwas betuliny [31,48,132], a także zaaktywowaniem receptorów błonowych [31]. Spadek $\Delta\Psi_{mt}$ jest również jednym z pierwszych efektów apoptotycznego działania na komórki raka okrężnicy *in vitro* kwasu masłowego powstającego w procesach fermentacyjnych w jelicie [72]. Liczne antyapoptotyczne białka z rodziny BCL-2/BAX hamują wywołany lekami spadek $\Delta\Psi_{mt}$, uwalnianie z mitochondriów cytochromu c i w konsekwencji aktywację kaspaz [np. 100; rozdz. Endogenne białkowe regulatory apoptozy]. Sugeruje się nawet, że ocena wartości $\Delta\Psi_{mt}$ mogłaby być pomocna w ocenie podatności komórek na apoptozę [31].

ENDOGENNE BIAŁKOWE REGULATORY APOPTOZY

Do głównych endogennych regulatorów apoptozy należą przede wszystkim białka rodziny BCL2/BAX, białka BAG, IAP, a także białka szoku cieplnego. Są też nimi wspomniane w poprzednich rozdziałach białka FLIP, FLASH, SODD, a liczba doniesień o nowych białkach, którym można przypisywać funkcje regulatorowe w apoptozie stale wzrasta.

Rodzina białek BCL2/BAX

Najwcześniej poznaną, największą i najbardziej heterogenną grupą anty- i proapoptotycznych białek stanowią białka z rodziny BCL-2/BAX (tabela 1). W komórkach kręgowców aż 7 genów należących do tej rodziny koduje białka hamujące apoptozę, co najmniej zaś 9 wywiera działanie przeciwne. Charakteryzuje je zbliżony schemat budowy i obecność w cząsteczce kilku charakterystycznych domen, tzw. domen BH (*Bcl-2 homology*), których funkcjonalne znaczenie jest coraz lepiej poznawane [101,104,165,166]. Wykryto też kilka proapoptotycznych białek (np. białka BIK, HRK, BIM, BAD, BID [99]), których podobieństwo do białek BCL-2 ogranicza się tylko do obecności domeny BH3, niezbędnej, aby dane białko wykazywało proapoptotyczne działanie. W tabeli 1 nie wymieniono występujących jedynie w matriksie mitochondrialnej białek typu NIP, które wykazują słabą homologię z białkami zawierającymi tylko domenę BH3 [22]. Promują one jednak apoptozę komórek i dzięki interakcjom z białkami antyapoptotycznymi, wywołują zmiany potencjału błonowego mitochondriów i stymulują uwalnianie cytochromu c [84]. Białka z rodziny BCL-2/BAX działają zazwyczaj jako homo- i/lub heterodimery, chociaż nie zawsze tego typu oligomeryzacja jest konieczna do wywoływania efektu biologicznego. Informacji nt. poszczególnych białek z tej rodziny, ich struktury, występowania i przypuszczalnych mechanizmów działania jest bardzo dużo i ich omówienie przekracza zakres tego opracowania. Dane na ten temat można znaleźć w wielu opracowaniach przeglądowych [61,101,104,135,167,193].

Od dawna postuluje się, że ze względu na powiązania BCL-2 i wielu jego homologów z błonami – zewnętrzną błoną mitochondrialną, błoną jądrową, siateczką śródplazmatyczną – uczestniczą one w regulowaniu funkcjonowania mitochondriów, w przeciwdziałaniu stresowi oksydacyjnemu, w regulacji wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia itp. Sugeruje się, że niektóre proapoptotyczne białka z rodziny BCL-2 mogą też tworzyć w błonach kanały sprzyjające transportowi jonów i białek [167]. Nie negując znaczenia powyższych działań, obecnie wydaje się, że główne, istotne dla apoptozy działanie białek z rodziny BCL-2 polega na ich udziale w regulacji spadku potencjału błonowego mitochondriów i uwalniania z nich czynników apoptogennych. Sądzi się również, że obecne w zewnętrznej błonie mitochondrialnej białka o działaniu antyapoptotycznym, np. BCL-2 czy BCL-X_L, mogą wiązać cytoplazmatyczny czynnik Apaf-1 i uniemożliwiać jego oddziaływanie z prokaspazą 9 (rys. 1). Czynnik indukujący apoptozę miałby powodować interakcję anty- i proapoptotycznych białek, obecnych lub dołączających się do błony mitochondrialnej pod wpływem induktora. W efekcie dochodzić miałoby do ich zmian konformacyjnych [35], rozbicia kompleksu białka Apaf-1 z BCL-X_L i do utworzenia apoptosomu wraz z cząsteczkami prokaspazy 9 i cytochromem c uwolnionym z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów. Po wewnątrzcząsteczkowych przekształceniach w kompleksie następowałaby autoaktywacja prokaspazy 9. Kilka białek proapoptotycznych (BIK, BAK, BID, BAD) może tworzyć kompleksy z obecnymi w mitochondrialnej błonie białkami BCL-2 czy BCL-X_L i w ten sposób hamować ich działanie. Postuluje się także, że białko BAX może tworzyć w błonach mitochondrialnych kanały [2], przez które cytochrom c mógłby „wydostawać” się z mitochondriów.

Szczególnie istotne w regulacji apoptozy wydaje się działanie białka BAD, które ulega fosforylacji przez kinazę AKT/PKB. Ufosforylowane białko BAD wychwytywane jest w cytoplazmie przez wiążące fosfoserynę białka 14-3-3 i w efekcie nie może ono pełnić swoich funkcji w mitochondriach. Na unieczynnianiu BAD poprzez jego fosforylację wydaje się przede wszystkim polegać udział szlaku kinaz PI-3K i AKT/PKB w ochronie komórek przed apoptozą wywoływaną na przykład brakiem czynników wzrostowych [101,161,165]. Należy podkreślić, że o prawidłowym funkcjonowaniu tego szlaku decyduje białko supresorowe PTEN, fosfataza defosforylująca między innymi PIP₃ (trifosforan fosfatydyloinozytolu) i regulująca tym samym jego wewnątrzkomórkowy poziom [14,123]. Delecje genu PTEN, lub jego mutacje, wykrywa się w komórkach nowotworów prostaty, mózgu [67], a także w komórkach czerniaków [64,208]. W nieobecności białka PTEN zwiększa się stężenie PIP₃, co powoduje silną, a często nadmierną aktywację kinazy AKT/PKB, ciągłą fosforylację białka BAD i w efekcie brak apoptozy. Defosforylację BAD, umożliwiającą jego migrację i powiązanie z mitochondriami, przeprowadza zaś kalcyneuryna, fosfataza, o aktywności zależnej od wewnątrzkomórkowego poziomu jonów Ca⁺⁺.

TABELA 1. Przykłady białek z rodziny BCL2/BAX (z danych 2, 101, 104)

BIAŁKA ANTYAPOPTOTYCZNE		
Podrodzina BCL-2	Domeny BH	Domena TM
BCL-2	BH 1,2,3,4	TM
BCL-X _L	BH 1,2,3,4	TM (?)
BCL-N	BH 1,2,3,4	TM
MCL-1	BH 1,2,3 (4?)	TM
A1/BFL-1	BH 1,2,3	TM (?)
NR-13/Boo/Diva	BH 1,2,3	TM (?)
CED-9 (<i>C. elegans</i>)	BH 1,2,3,4	TM
BIAŁKA PROAPOPTOTYCZNE		
Podrodzina BAX		
BAX _(α,β,δ,ω)	BH 1,2,3	TM
BAK	BH 1,2,3	TM
BOK	BH 1,2,3	TM
BCL-X _S	BH 1,3	TM
Podrodzina BH 3		
BIK	BH 3	TM
HRK	BH 3	TM
BLK	BH 3	TM
BID	BH 3	–
BIM _(EL,L,S)	BH 3	TM (?)
BAD	BH 3-	–

Fosforylacja BAD, a także BCL-2 [188] znosząca ich pro- i antyapoptotyczne działanie to tylko jeden z przykładów modyfikacji, jakim mogą podlegać białka z rodziny BCL-2/BAX. Mogą być one również proteolitycznie rozkładane na mniejsze fragmenty: BCL-2 przez kaspazę 3 [102], BID przez kaspazę 8 [16,118,122], BAX przez niezidentyfikowaną jeszcze proteazę [102], być może kalpainę [227]. Podczas gdy proteolityczne fragmenty BID i BAX działają w ten sam sposób jak nietraktowane proteazami białka, to proteolityczny fragment antyapoptotycznego białka BCL-2 staje się czynnikiem promującym uwalnianie cytochromu c i apoptozę komórek.

W nowotworach często wykrywa się obecność zmutowanych białek z rodziny BCL-2/BAX, szczególnie tyczy to białka BAX. Utratę proapoptotycznego działania przypisuje się nonsensownym mutacjom *bax* w komórkach raka przewodu pokarmowego [52], ostrej białaczki limfatycznej (T-ALL) oraz chłoniaka Burkitta [131], zaś mutacjom wynikającym ze zmienionej ramki odczytu w komórkach raka okrężnicy [163], żołądka i trzonu macicy [150]. Obserwacje te są bardzo ważne ze względu na fakt, że BAX jest jednym z głównych białkowych efektorów, poprzez które białko supresorowe p53 indukuje apoptozę. Brak funkcjonalnego BAX może być więc przyczyną nieskuteczności terapii zależnej od obecności p53.

Chociaż udział białek z rodziny BCL-2/BAX w regulacji apoptozy jest w pełni doceniany [166], to bardzo trudna i ciągle niejednoznaczna jest odpowiedź na pytanie, czy ważniejsza dla rozwoju nowotworu i jego podatności na indukcję apoptozy jest obecność białek anty- czy proapoptotycznych. Wysoki poziom BCL-2 i/lub BCL-X_L charakteryzuje komórki licznych nowotworów hematologicznych [190], płaskokomórkowego raka płuc [37] i gruczolakoraków okrężnicy i odbytu [105], zwłaszcza komórki nowotworowe nie zawierające genu supresorowego p53 [68], negatywnego regulatora ekspresji *bcl-2*. Brak promującego apoptozę białka BAX [127], jak też wysoki poziom antyapoptotycznego białka np. BCL-X_L [211], zaczyna się traktować jako wyznaczniki stopnia oporności komórek na chemioterapię. W przypadku wielu nowotworów czynione są też próby prognozowania przeżycia nosicieli nowotworów na podstawie oznaczeń poziomu białek z rodziny BCL-2/BAX i białka supresorowego p53. Zwraca się też uwagę na udział białka BCL-2 w przerzutowaniu takich nowotworów jak czerniaki [198] czy nowotwory płuc [34,185].

Białka BAG

Białka BAG zidentyfikowano w 1995 r. dzięki ich zdolności do wiązania się z BCL-2 [200]. Obecnie wiadomo, że białka BAG tworzą kompleksy z bardzo różnymi białkami regulatorowymi, przy czym obecność w komórce określonych izoform BAG decyduje o składzie powstałych heterokompleksów [201,202]. Związywanie przez białka BAG na przykład receptorów błonowych czynników wzrostowych, takich jak: HGF i PDGF [8], kinazy serynowo-treoninowej Raf-1 [219], receptorów hormonów steroidowych [45,236], indukowanego przez p53 białka SIAH [149], czy też białek szoku cieplnego, np. HSP70 [191], moduluje w znacznym stopniu ich działanie. Tak więc białka BAG mogą pełnić „pomocnicze” funkcje w regulacjach tak bardzo różnych procesów komórkowych, jak: proliferacja, apoptoza czy nowotworzenie. Na poziom ekspresji BAG mają wpływ niektóre interleukiny, np. Il-2 [1], i nie są to z pewnością jedyne cytokiny, które mogą regulować poziom białek BAG. Wykazano bowiem ostatnio wzrost ekspresji genu BAG-1 w wielu komórkach nowotworowych pod wpływem zmutowanego (*gain of function*) białka p53 [234]. Nadekspresję niektórych izoform białek BAG wykrywa się w licznych nowotworach, w tym w komórkach leukemicznych, komórkach raka płuc, piersi, okrężnicy i prostaty [201,231–233]. W przypadku raka piersi sugeruje się nawet, aby obecność określonych izoform białka BAG stanowiła molekularny wyznacznik tego nowotworu [232]

Białka IAP

Antyapoptotyczne białka IAP (*inhibitory apoptosis proteins*) zidentyfikowano na początku lat dziewięćdziesiątych w wirusach owadzych, następnie zaś wykazano, że występują one powszechnie we wszystkich komórkach zwierzęcych [27,36,63].

Hamują one apoptozę wywołaną przez cytokiny FasL i TNF- α , liczne chemioterapeutyki, owadzie białkowe induktory apoptozy, nadmiar kaspaz itp. [63,136,204]. Działanie białek IAP polega przede wszystkim na ich bezpośrednich interakcjach z kaspazami lub prokaspazami, jak również na oddziaływaniach z białkami regulatorowymi nie przejawiającymi aktywności enzymatycznej, takimi jak: TRAF (*TNF- α receptor-associated factor*), czynnik transkrypcyjny NF κ B czy też owadzie induktory apoptozy [63,111]. Efekt tych oddziaływań to bardzo silne hamowanie aktywności kaspaz i zmiany zdolności sygnalizacyjnej białek. Może to nawet prowadzić do oporności komórek na działanie czynnika indukującego apoptozę, jak to stwierdzono w przypadku opornych na FAS-L komórek ludzkiego wątrobiaka HepG2 [195]. Szczególne zainteresowanie wzbudzają współzależności funkcjonowania czynnika NF κ B i białek IAP: NF κ B indukuje w komórkach ludzkich ekspresję białek IAP, natomiast białka IAP aktywują czynnik NF κ B, prawdopodobnie dzięki wpływowi na proteolityczną degradację jego inhibitora, I κ B [26,189,218].

Od 1997 r. wzrasta zainteresowanie niektórymi białkami IAP ze względu na ich przypuszczalny udział w nowotworzeniu [111]. Tyczy to zwłaszcza surwiwiny, jednego z przedstawicieli białek IAP, którą poza tkankami płodowymi [3,4], wykrywa się w komórkach większości ludzkich nowotworów, w tym w nowotworach płuc, okrężnicy, trzustki, piersi, prostaty, chłoniaka Hodgkina [5] i żołądka [121]. Eksperymentalne obniżenie ekspresji surwiwiny w komórkach HeLa prowadzi do zahamowania ich wzrostu i wywołuje w nich apoptozę [5]. Wynik ten potwierdza w układzie *in vitro* znaczenie tego białka IAP dla progresji nowotworu i sugeruje, że regulacja ekspresji surwiwiny może stać się efektywnym celem w terapii nowotworowej.

Białka szoku cieplnego

Od kilku lat zaczyna się doceniać udział białek szoku cieplnego zarówno dużych z rodziny HSP70 [19,182,202], jak i małych (sHSP), których przedstawicielem jest białko HSP27 [6], w ochronie komórek przed działaniem różnych czynników apoptogennych. W przypadku HSP70 wykazano jego antyapoptotyczne działanie przy indukowaniu apoptozy nie tylko szokiem cieplnym [71,138,177], ale także cytokiną TNF- α [87,88], doksorubicyną czy też nadekspresją kaspazy 3 [87]. Postuluje się też udział białka HSP70 w hamowaniu szlaków prowadzących do kinaz JNK/SAPK, jak również w niedopuszczeniu do aktywacji prokaspaz (np. prokaspazy 3) oraz w hamowaniu efektów wynikających z działania już aktywnych kaspaz. Wspomniane już białko BAG-1 znosi powyższe „opiekuńcze” działanie HSP70 [191]. Należy podkreślić, że nadekspresja HSP70 występuje często w nowotworach piersi, macicy, płuc, jajnika, trzustki, komórkach białaczkowych itp. [88]. W wielu przypadkach wskazuje to na możliwość wystąpienia oporności komórek na chemioterapię, promieniowanie czy hipertermię.

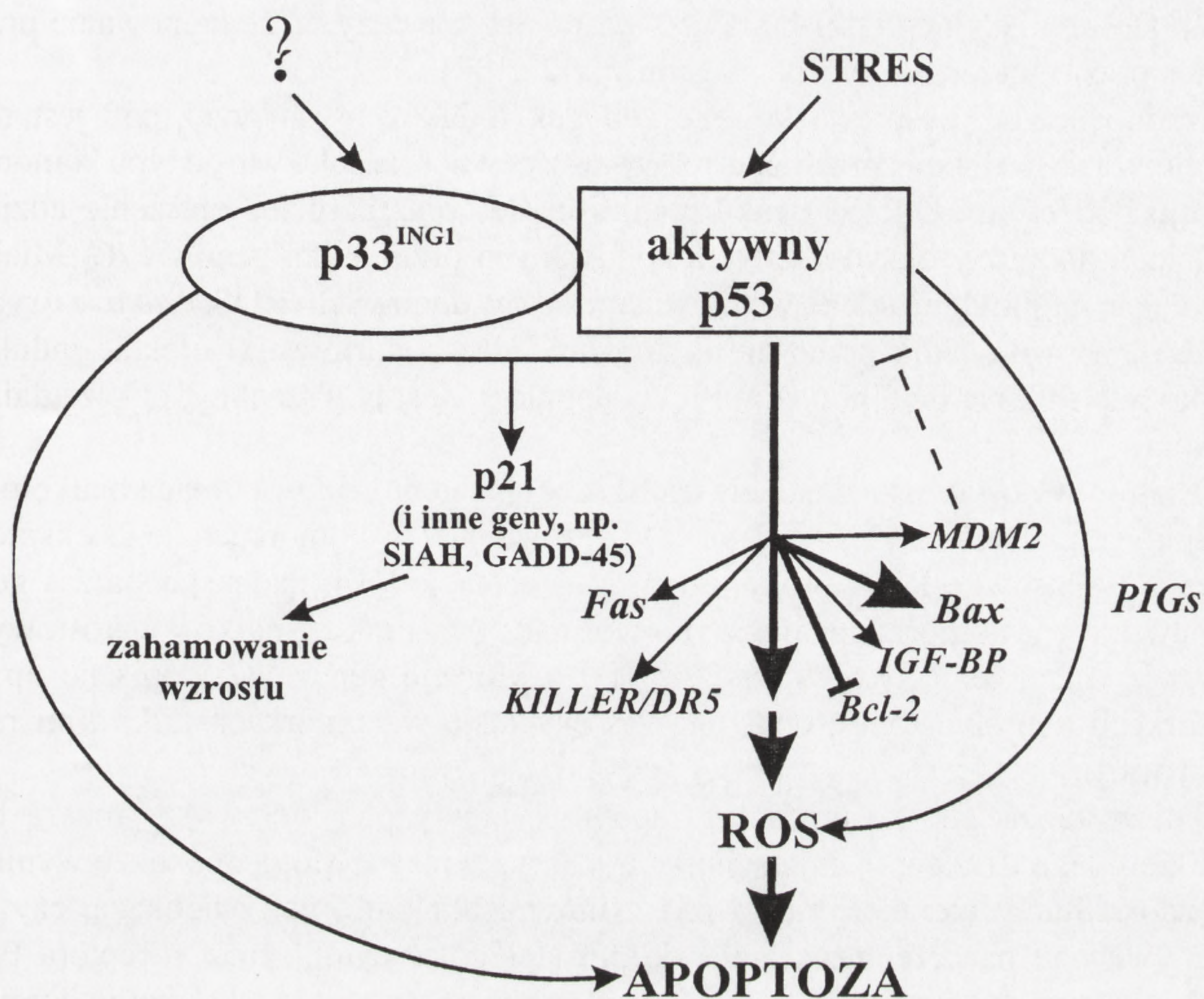
Małe białka sHSP także są zdolne do hamowania apoptozy wywoływanej przez cytokiny FAS-L i TNF- α [6]. Zapobiegają też one proapoptotycznym efektom stresu oksydacyjnego, staurosporyny i etopozydu [6,130,170]. Nadekspresję sHSP wykryto w komórkach nowotworów jajnika i kostniakomięsaka [88], a także w szczurzych nowotworach nerki [199] i ludzkich nowotworach mózgu [77]. Sugeruje się, że endogenny niski poziom sHSP w nowotworach może wskazywać na ich wrażliwość na chemioterapię i hipertermię, co obserwowano na przykład w raku jąder [169]. Mechanizmy ochronnego działania białek HSP w apoptozie nie są w pełni wyjaśnione. Można przypuszczać, że wynikają one między innymi z neutralizowania przez nie toksycznych efektów wywoływanych przez zdenaturowane białka lub wolne rodniki.

GENY SUPRESOROWE I ONKOGENY W INDUKCJI I REGULACJI APOPTOZY

Zagadnienie to zostanie przedstawione na przykładzie procesów, w których uczestniczą produkty genów *p53*, *Rb* i *c-myc*. *p53* i *Rb*, to geny supresorowe, które kodują białka o przeciwnym działaniu na proces apoptozy. A mianowicie, białko *p53* indukuje apoptozę, zaś białko *pRb* hamuje jej przebieg. Białko *c-MYC* natomiast, zależnie od typu komórek, stopnia ich zróżnicowania i rodzaju czynnika zewnętrznego promuje proliferację komórek lub ich apoptozę. W dalszej części artykułu postaram się wyjaśnić, na czym polegają współzależności działania tych białek w procesie apoptozy. Należy zaznaczyć, że również i innym białkom onkogennym, zwłaszcza *c-RAS* i *c-ABL* przypisuje się wpływ na regulację przebiegu apoptozy.

Białko *p53*

W komórkach nieuszkodzonych, niestymulowanych do apoptozy, poziom *p53* jest niski, wzrasta zaś dramatycznie po wywołaniu w nich uszkodzeń DNA. Rezultatem wzrostu poziomu *p53* jest bądź to zatrzymanie komórek w fazie G-1 cyklu komórkowego, bądź też skierowanie ich na drogę apoptozy, przy czym o wyborze drogi decyduje stopień uszkodzenia DNA. W komórkach nowotworowych gen *p53* jest prawdopodobnie, oprócz *p16*, jednym z najczęściej zmutowanych genów. Jego brak lub obecność zmutowanych form, a w konsekwencji niewystępowanie apoptozy, prowadzą do niestabilności genomu, zwiększenia liczby mutacji chromosomalnych, zwielokrotnienia różnych genów, co często zaburza przebieg cyklu komórkowego i może prowadzić do transformacji nowotworowej komórek. Powoduje to także, że w komórkach z niefunkcyjnym *p53* trudniej dochodzi do wywołania apoptozy przez różne cytostatyki. Dziś już wydaje się pewne, że apoptoza indukowana przez *p53* pełni istotną rolę w rozwoju nowotworów *in vivo* [196], a liczne sygnały mitogenne antagonizują działanie *p53* [79]. Więcej informacji na zasygnalizowane



RYSUNEK 2. Białka p53 i p33^{ING} jako regulatory transkrypcji genów niezbędnych do indukcji apoptozy lub zahamowania wzrostu komórek (wg [14], zmodyf. i uzupełniony)

powyżej problemy można znaleźć w opracowaniach przeglądowych [11,17,-117,221,223], w tym także w polskich czasopismach [58,180].

Działanie p53 powodujące zahamowanie cyklu komórkowego lub wywołanie apoptozy komórek zależy przede wszystkim od jego funkcjonowania jako czynnika transkrypcyjnego, wiążącego się z określonymi sekwencjami nukleotydów w DNA, w tzw miejscach p53RE (*p53-responsive elements*). Białko p53 aktywuje transkrypcję licznych genów, przy czym działanie kilku kodowanych przez nie białek (p21^{WAF1}, GADD45, SIAH) związane jest z hamowaniem cyklu komórkowego, działania innych indukcją i regulacją apoptozy (rys. 2). Należą do nich przede wszystkim proapoptyczne białko BAX, receptory błonowe FAS i receptor cytokiny TRAIL tzw. KILLER, białko wiążące IGF (IGF-BP) [137,149,152,183], prawdopodobnie katepsyna D i białko p85, będące podjednostką regulatorową kinazy PI-3K [11], a także kilkanaście białek kodowanych przez tzw. geny PIG (*p53-induced genes*), które uczestniczą w różnych przemianach oksydoredukcyjnych [159]. p53 indukuje też transkrypcję genu cykliny G, której udział w apoptozie wydaje się ograniczać do „uczulania” komórek na działanie różnych induktorów apoptozy, w tym TNF- α

[147]. Do regulacyjnego działania p53 w apoptozie należy także hamowanie przez nie ekspresji antyapoptotycznego genu *bcl-2* [137].

Trudno ocenić, ekspresja którego z białek indukowanych przez p53 jest najważniejsza dla indukcji i przebiegu apoptozy; z pewnością zależy to od typu komórek, rodzaju bodźca itp. Od 1997 roku podkreśla się coraz bardziej znaczenie udziału w inicjacji apoptozy oksydoreduktaz kodowanych przez kilka genów *PIG*. Miałyby one polegać na stymulacji syntezy wolnych rodników tlenowych (ROS, *reactive oxygen species*), wywoływaniu przez nie uszkodzeń mitochondriów i w efekcie indukcji apoptozy [159]. Na ile taki udział *PIG* w apoptozie jest powszechny, pokażą dalsze badania.

Ostatnio wykazano, że działanie transkrypcyjne genu *p53* wspomaga białko p33, produkt genu *ING-1* [51,149] (rys. 2). Wyłączenie w komórkach jego ekspresji przez antysensowne RNA promuje ich transformację [50], nadekspresja zaś genu *ING* uwrażliwia komórki np. mysich potworniaków na brak czynników wzrostowych i sprzyja wystąpieniu w nich apoptozy [73]. Mutacje genu *ING-1* opisano np. w komórkach neuroblastomy, obniżoną zaś ekspresję w komórkach kilku linii raka piersi [50].

Należy zaznaczyć, że promujące apoptozę efekty p53 nie zawsze muszą być wynikiem jego działania jako czynnika transkrypcyjnego. Mogą one także wynikać z bezpośrednich interakcji białka p53 z innymi białkami, np. z helikazą, czy też z wpływu p53 na przemieszczanie się powstałego w cytoplazmie receptora FAS do błony komórkowej [11]. Wiele działań, przypisywanych dotąd tylko białku p53, może też być spełnianych, jak się wydaje, przez wykryte przed kilku laty jego homologi, tj. białka p73 (α i β) oraz p51/63 [225]. W przeciwieństwie do p53 mutacje tych białek są rzadkie, a działanie tych homologów p53 często zależy od funkcjonowania szlaku kinaz tyrozynowych, zwłaszcza kinazy kodowanej przez onkogen *c-abl* [235].

O funkcjonalnym wewnątrzkomórkowym poziomie p53 decyduje jego wiązanie z wieloma białkami komórkowymi i wirusowymi, w tym ze wspomnianym już białkiem p33^{ING}, dużym antygenem T wirusa SV40, białkiem E6 wirusa brodawczaka czy też białkiem E1B adenowirusów. W kontekście apoptozy szczególnego znaczenia nabiera zdolność kompleksowania p53 z białkiem MDM2, produktem onkogenu *mdm2*. MDM2 wiąże się z transkrypcyjną domeną w cząsteczce p53 i hamuje w ten sposób jego aktywność jako regulatora transkrypcji. Ponadto stymuluje ono ubikwitynację p53 [78] i jego proteolityczną degradację [58,70,108,112]. MDM2 jest więc niezwykle istotnym regulatorem procesów, w których uczestniczy p53, tym bardziej że p53 aktywuje transkrypcję genu *mdm2* (regulacja na zasadzie sprzężenia zwrotnego). Należy wspomnieć, że MDM2 może też tworzyć kompleksy z białkiem p73, homologiem p53. Hamuje wówczas jego aktywność jako regulatora transkrypcji, nie stymuluje jednakże jego proteolitycznej degradacji [237].

Zwielokrotnienie genu *mdm2* wykryto w komórkach wielu raków [148] i różnych nowotworów mózgu [168], doniesiono też o występowaniu w nowotworach pochodzenia astrocytarnego skróconych transkryptów MDM2, niezdolnych do wiązania się z p53 [126].

Białko pRb

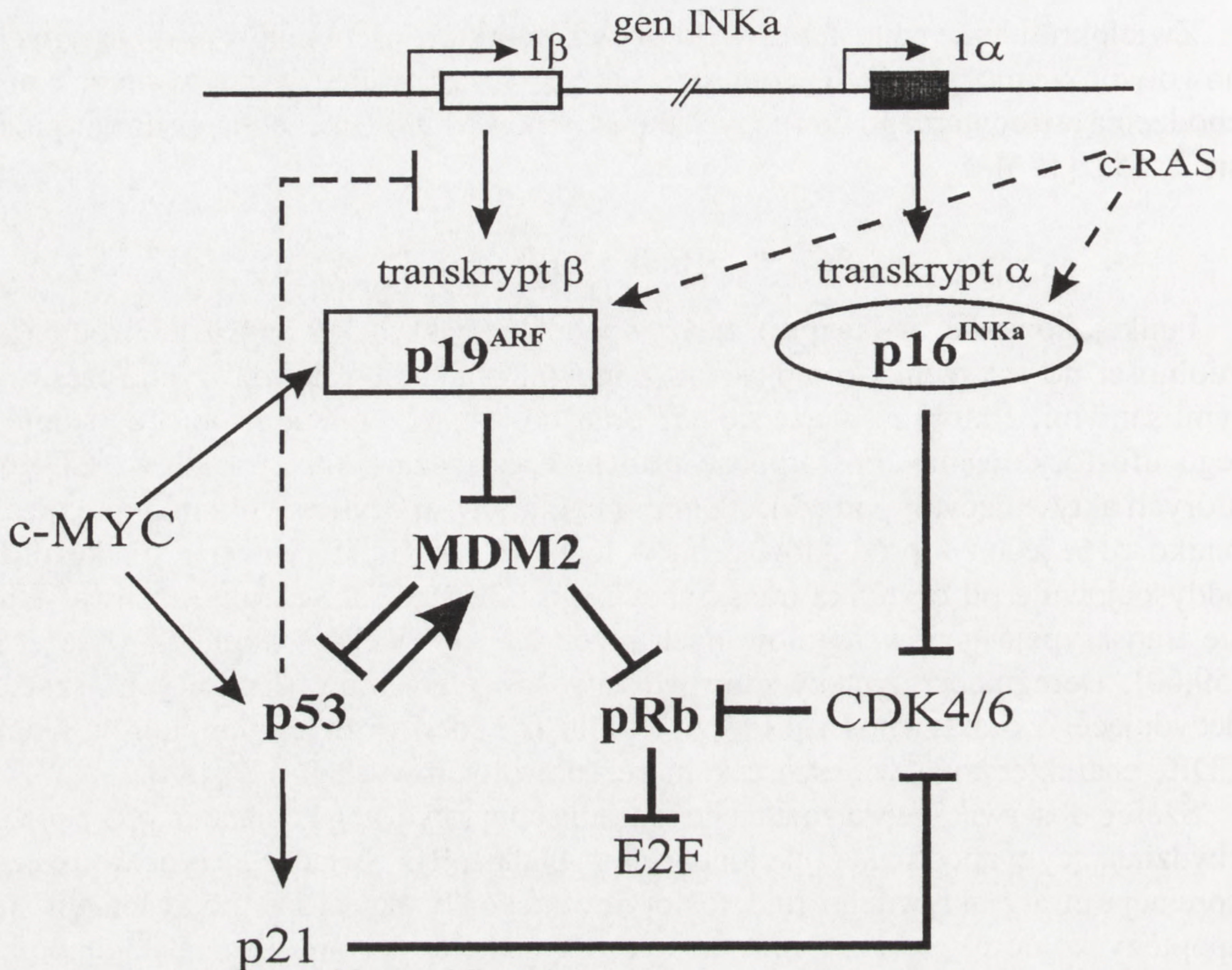
Funkcjonowanie białka pRb zależy, podobnie jak w przypadku p53, od jego zdolności do tworzenia kompleksów z innymi białkami komórkowymi, często z tymi samymi, z którymi wiąże się p53 oraz, co jest szczególnie istotne, od stopnia jego ufosforylowania. Fosforylację pRb przeprowadzają kinazy CDK4 i CDK6, których aktywującymi podjednostkami są cykliny D, specyficznym inhibitorem zaś białko p16, jeden z produktów genu w locus *INKa*. Ufosforylowane białko pRb oddysocjowuje od czynnika transkrypcyjnego E2F-1, dzięki czemu możliwa staje się transkrypcja genów regulowanych przez E2F-1 i wejście komórek w fazę S [59,60]. Deregulacja syntezy i/lub właściwości „elementów składowych” szlaku decydującego o aktywności pRb, tzn. cyklin D i specyficznych inhibitorów kinaz CDK, charakteryzuje większość komórek nowotworowych [60,74,184].

Szereg obserwacji wskazuje na powiązania apoptotycznego działania p53 z przeciwdziałającym apoptozie funkcjonowaniem białka pRB. Świadczy o tym zwłaszcza korelacja utraty aktywnego (nieufosforylowanego) białka pRb z pojawieniem się apoptozy komórek, a także brak apoptozy i niekontrolowane podziały komórek, przy „wyłączeniu” działania obydwu genów *p53* i *Rb* [76,184,214]. Co więcej, sądzi się, że apoptoza wynikająca z inaktywacji *Rb* zachodzi prawdopodobnie z udziałem p53 [223,224], chociaż jak się sugeruje ostatnio, jeszcze inne, niezidentyfikowane dotąd szlaki, mogą być odpowiedzialne za jej wystąpienie [74]. Wiadomo także, że eksperymentalnie wywołana nadekspresja pRb przeciwdziała apoptozie indukowanej przez p53 w komórkach HeLa charakteryzujących się niskim poziomem aktywności białka pRb i jego homologów [69]. Istnieją co najmniej trzy punkty styeczne szlaków p53 i pRb (rys. 3):

- białko MDM2 tworzące kompleksy zarówno z p53 jak i pRb,
- białko ARF, jeden z produktów genu *INKa*, który koduje też białko p16, inhibitor kinaz CDK4/6,
- białko p21, „uniwersalny” inhibitor praktycznie wszystkich kinaz cyklino-zależnych, w tym fosforylujących pRb, którego ekspresję indukuje p53.

Utworzenie kompleksu pRb z MDM2 [229] stanowi przykład wewnątrzkomórkowego wyłączenia działania białka supresorowego pRb, co pośrednio wpływa na wzrost poziomu wolnego p53 i może intensyfikować jego funkcje jako aktywatora transkrypcji genów, w tym genu kodującego inhibitor kinaz CDK, białko p21.

Na stan funkcjonalny białek MDM2, p53 i pośrednio Rb wywiera bardzo znaczący wpływ białko ARF (p14 w komórkach ludzkich, p19 w komórkach mysich). Jest



RYSUNEK 3. Białka p19^{ARF} i p16^{INKα}, kodowane przez gen *INKα*, regulatorami działania białek supresorowych p53 i pRb (wg [24], zmodyf. i uzupełniony)

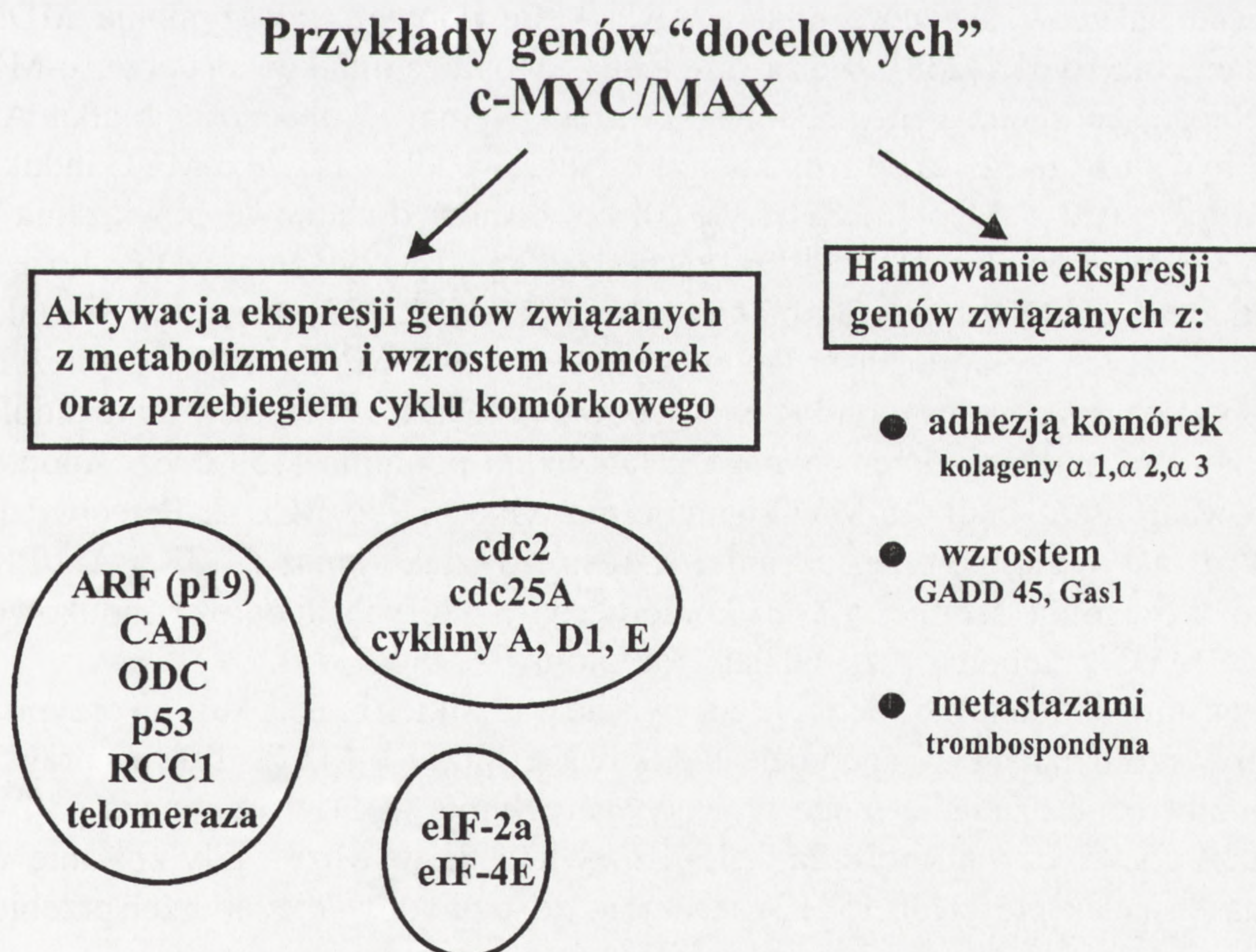
ono drugim białkiem, kodowanym przez gen *INKα*, o którym początkowo sądzono, że koduje tylko białko p16, specyficzny inhibitor kinaz CDK4/6 [24,92,113] (rys. 3). Białko ARF nie wykazuje homologii strukturalnej z p16, niemniej jednak, podobnie jak znane już inhibitory kinaz CDK, p16 i p21, jego nadekspresja może zatrzymać komórki w fazie G1 i/lub G2 cyklu komórkowego. Mechanizm działania ARF wydaje się częściowo przynajmniej wyjaśniony. Związanie ARF z MDM2 promuje degradację tego białka [238], blokuje zatem wywoływaną przez MDM2 degradację p53 [160]. Uniemożliwia bowiem działanie MDM2 jako ligazy ubikwitynowej [78], która katalizuje wyznakowanie p53 ubikwityną, etap niezbędny, aby p53 mogło ulec proteolitycznej degradacji w proteasomie. Brak funkcjonalnego ARF, wynikający z braku ekspresji ARF lub obecności jego zmutowanych form, wykrywany na przykład w komórkach ostrej białaczki limfatycznej [49], czy też w komórkach nowotworowych pochodzenia limfoidalnego (limfocyty B) [33], może przyczyniać się do spadku poziomu p53 i osłabienia w komórkach procesów apoptotycznych.

Ostatnio okazało się, że ARF nie tylko jest niezbędne do utrzymania funkcjonalnego poziomu p53 i pośrednio pRb, lecz może uczestniczyć także w apoptozie indukowanej przez protoonkogen *c-myc*.

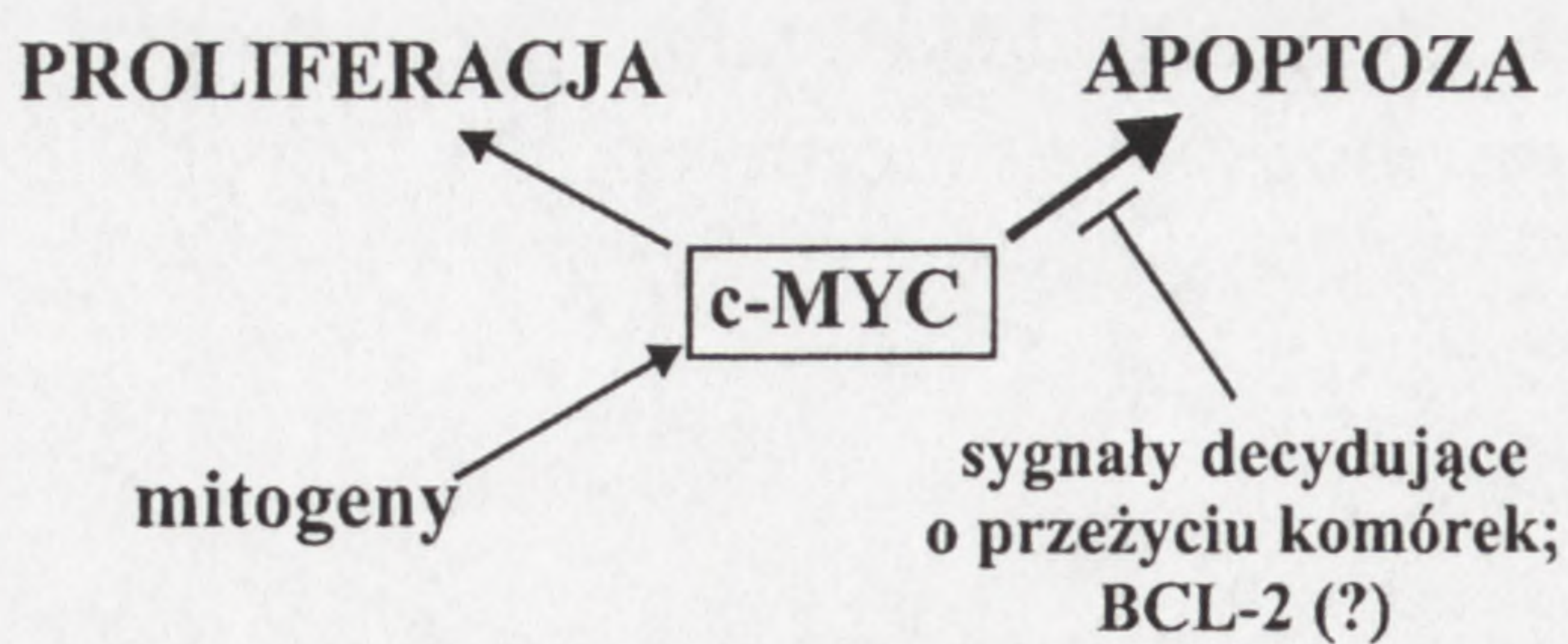
Białko c-MYC

Protoonkogen *c-myc*, koduje białko c-MYC, funkcjonujące jako czynnik transkrypcyjny w kompleksach z komórkowymi partnerami MAX i MAD (rys. 4). Poprzez wpływ na ekspresję wielu genów kontroluje ono procesy proliferacji, różnicowania i apoptozy, a zaburzona ekspresja c-MYC charakteryzuje wiele nowotworów [30,82,206]. Zarówno nadekspresja c-MYC, jak i obniżenie jego poziomu lub inaktywacja mogą wywoływać apoptozę, ewentualnie też „uczulać” komórki na działanie różnych induktorów apoptozy, w tym usunięcie czynników wzrostowych, niedotlenienie, uszkodzenie DNA, działanie toksyn i cytokin. Ma to miejsce zwłaszcza wówczas, gdy komórkom brak jest czynników wzrostowych lub zahamowany zostaje przebieg cyklu komórkowego [82,206].

Różne hipotezy starają się wyjaśnić to często przeciwstawne działanie c-MYC. Tak na przykład hipoteza dwóch sygnałów sugeruje, że proliferacja komórek zachodzi wówczas, gdy komórki otrzymują dwa niezależne sygnały: jeden dostarczany przez



RYSUNEK 4. Przykłady genów „docelowych” c-MYC/MAX (z danych [153])



RYSUNEK 5. Schemat hipotezy „dwóch sygnałów”, decydujących o promowaniu przez c-MYC

c-MYC w proliferacji komórek. O takiej kooperacji c-MYC i BCL-2 świadczy synergizm ich działania w progresji wielu nowotworów, w tym różnego typu chłoniaków [29]. Inna z hipotez zwraca uwagę na możliwość jednoczesnego wystąpienia w komórkach deregulacji c-MYC, i pogłębienie jej przez czynnik indukujący apoptozę, co miałyby prowadzić do powstania bliżej niezidentyfikowanego „wewnętrznego konfliktu” i apoptozy [153].

Jak dotąd nie wiadomo, czy c-MYC indukuje w komórkach specyficzne szlaki apoptotyczne czy też wykorzystuje już istniejące. To drugie przypuszczenie wydaje się prawdziwsze, gdyż modulacja przez c-MYC apoptozy, na przykład w mysich fibroblastach, zachodzi jedynie w obecności funkcjonalnych białek p53 [216] i co więcej także w obecności białka ARF, które poprzez unieczynianie MDM2 stabilizuje białko p53 [238]. Nie zawsze jednak apoptoza indukowana przez c-MYC i przebiegająca z udziałem p53 musi zarazem wymagać obecności białka ARF [240], być może zależy to od typu komórek. Należy podkreślić, że c-MYC indukuje transkrypcję p53 i ARF [30,82] (rys. 3), co stwarza dodatkowe powiązania regulacyjne. W apoptozie fibroblastów zachodzącej pod wpływem c-MYC może też uczestniczyć układ receptorów błonowych FAS/FAS-L [82]. Sugeruje się także, że w niektórych komórkach proapoptotyczne efekty c-MYC mogą również być wywoływane przez wolne rodniki tlenowe powstające na przykład w wyniku indukcji biosyntezy, a następnie intensywnego katabolizmu poliamin [153,206]. Apoptozę indukowaną przez białko c-MYC hamuje nie tylko białko BCL-2. Przeciwdziała jej także zaktywowanie przez czynniki wzrostowe szlaku kinaz P1-3K i Akt/PKB. Jest to szczególnie istotne w tych komórkach, w których apoptoza indukowana przez c-MYC przebiega przy udziale receptora FAS [82,171].

Przedstawione dane nie obejmują oczywiście wszystkich białek, którym przypisuje się sprawcze działanie w apoptozie indukowanej przez c-MYC. Tak na przykład proapoptotyczne działanie mogą wywoływać cykliny A, D1 i E, kinaza p34^{cdc2}, fosfataza cdc25, czynniki eIF-2a i eIF-4E, zwłaszcza wówczas, gdy zostanie wywołana ich nadekspresja [30,153]. Wskazuje to, że spowodowanie zaburzeń przebiegu cyklu komórkowego może przyczyniać się do wystąpienia apoptozy.

białko c-MYC i prowadzący do proliferacji i apoptozy oraz drugi, hamujący szlak apoptotyczny i być może generowany przez czynniki wzrostowe sprzyjające przeżywaniu komórek (rys. 5). Liczne dowody przemawiają za tym, że białko BCL-2 (lub jego homologi) mogłoby w pewnym stopniu zastępować sygnały czynników wzrostowych, hamować apoptozę i promować udział

PODSUMOWANIE

Przedstawione w artykule informacje wskazują na podobny przebieg apoptozy w komórkach prawidłowych i nowotworowych, pomimo często wyraźnych różnic w ich podatności na działanie czynników apoptogennych. Mniejsza wrażliwość komórek nowotworowych na tego typu czynniki i osłabiona w związku z tym ich podatność na apoptozę, wynika prawdopodobnie ze zmian w intensywności różnorodnych procesów regulacyjnych, w tym ze zmian ilości i działania bardzo wielu anty- i proapoptotycznych białek, z których tylko część omówiono w tym opracowaniu.

W pełni doceniając ich znaczenie, nie wspomniano w artykule o problemie udziału w apoptozie licznych kinaz i fosfataz, uruchamiających kaskady fosforylacji i defosforylacji jako odpowiedzi komórek na sygnały dochodzące z ich otoczenia. Zasygnalizowano też tylko, omawiając poszczególne białka, bardzo ważne zagadnienie ich translokacji między różnymi kompartmentami komórkowymi. Zaburzenia przemieszczania się białek mogą bowiem uniemożliwiać powstawanie właściwych kompleksów białkowych i w efekcie brak i/lub zmienione ich funkcjonowanie. Wydaje się zatem, że wewnątrzkomórkowe translokacje białek uczestniczących w apoptozie można traktować jako istotny element regulacyjny tego procesu.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ADACHI M, SEKIYA M, TORIGOE T, TAKAYAMA S, REED JC, MIYAZAKI T, MINAMI Y, TANIGUCHI T, IMAI K. Interleukin-2 (Il-2) upregulates BAG-1 gene expression through serine-rich region within Il-2 receptor beta c chain. *Blood* 1996; **88**: 4118–4123.
- [2] ADAMS JM, CORY S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; **281**: 1322–1326.
- [3] ADIDA C, BERREBI D, PEUCHMAUR M, ROYES-MUGICA M, ALTIERI DC. Anti-apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma. *Lancet* 1998; **351**: 882–883.
- [4] ADIDA C, CROTTY PL, MAGRATH J, BERREBI D, DIEBOLD J, ALTIERI DC. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene *survivin* in human and mouse differentiation. *Am J Pathol* 1998; **152**: 43–49.
- [5] AMBROSINI G, ADIDA C, SIRUGO G, ALTIERI DC. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by *survivin* gene targeting. *J Biol Chem* 1998; **273**: 11177–11182.
- [6] ARRIGO A-P. Small stress proteins: chaperones that act as regulators of intracellular redox state and programmed cell death. *Biol Chem* 1998; **379**: 19-26.
- [7] ASHKENAZI A, DIXIT VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; **281**: 1305–1308.
- [8] BARDELLI A, LONGATI P, ALBERO D, GORUPPI S, SCHNEIDER C, PONZETTO C, COMOGLIO PM. HGF-receptor associates with the anti-apoptotic protein BAG-1 and prevents cell death. *EMBO J* 1996; **15**: 6205–6215.

- [9] BECKER K, SCHNEIDER P, HOFMANN K, MATTMANN C, TSCHOPP J. Interaction of Fas (Apo-1/CD95) with proteins implicated in the ubiquitination pathway. *FEBS Lett* 1997; **412**: 102–106.
- [10] BELTINGER C, KURZ E, BOHLER T, SCHRAPPE M, LUDWIG WD, DEBATIN KM. CD95 (APO-1/Fas) mutations in childhood T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1998; **91**: 3943–3951.
- [11] BENNETT M. Mechanisms of p53-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol* 1999; **58**: 1089–1095.
- [12] BENNET MW, OCONNELL J, OSULLIVAN GC, BRADY C, ROCHE D, COLLINS JK, SHANAHAN F. The Fas counterattack *in vivo*: apoptotic depletion of tumor-infiltrating lymphocytes associated with Fas ligand expression by human esophageal carcinoma. *J Immunol* 1998; **160**: 5669–5675.
- [13] BERNARDI P, SCORRANO L, COLONNA R, PETRONILLI V, DI LISA F. Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem* 1999; 687–701.
- [14] BESSON A, ROBBINS SM, YONG VW. PTEN/MMAC1/TEP1 in signal transduction and tumorigenesis. *Eur J Biochem* 1999; **263**: 605–611.
- [15] BOHM W, THOMA S, LEITHAUSER F, MOLLER P, SCHIRMBECK R, REIMANN J. T cell-mediated, IFN-gamma-facilitated rejection of murine B16 melanomas. *J Immunol* 1998; **161**: 897–908.
- [16] BOSSY-WETZEL E, GREEN DR. Caspases induce cytochrome c release from mitochondria by activating cytosolic factors. *J Biol Chem* 1999; **274**: 17484–17490.
- [17] BROWN JM, WOUTERS BG. Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Res* 1999; **59**: 1391–1399.
- [18] BRUNET A, BONNI A, ZIGMOND MJ, LIN MZ, JUO P, HU LS, ANDERSON MJ, ARDEN KC, BIENIS J, GREENBERG ME. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. *Cell* 1999; **96**: 857–868.
- [19] BUKAU B, HORWICK AL. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 1998; **32**: 351–356.
- [20] CARAFOLI E, MOLINARI M. Calpain: a protease in search of a function? *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **247**: 193–203.
- [21] CASCINO I, PAPOFF G, DEMARIA R, TESTI R, RUBERTI G. Fas/Apo-1 (CD95) receptor lacking the intracytoplasmic signaling domain protects tumor cells from Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* 1996; **156**: 13–17.
- [22] CHEN G, CIZEAU J, VELDE CV, PARK JH, BOZEK G, BOLTON J, SHI L, DUBIK D, GREENBERG A. Nix and Nip3 form a subfamily of pro-apoptotic mitochondrial proteins. *J Biol Chem* 1999; **274**: 7–10.
- [23] CHEN LB. Mitochondrial membrane potential in living cells. *Annu Rev Cell Biol* 1988; **4**: 155–181.
- [24] CHIN L, POMERANTZ J, DE PINHO R. The INK4a/ARF tumor suppressor: on gene - two products - two pathways. *Trends Biochem Sci* 1998; **23**: 291–296.
- [25] CHIN YE, KITAGAWA M, KUIDA K, FLAVELL RA, FU X-Y. Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. *Mol Cell Biol* 1997; **17**: 56328–5337.
- [26] CHU Z-L, MCKINSEY TA, LIU L, GENTRY JL, MALIM MH, BALLARD DW. Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF- κ B control. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 10057–10062.
- [27] CLEM RJ, DUCKETT CS. The *iap* genes: unique arbitrators of cell death. *Trends Cell Biol* 1997; **7**: 337–339.
- [28] COPPOLA D, SAUNDERS B, FU L, MAO W, NICOSIA SV. The insulin-like growth factor 1 receptor induces transformation and tumorigenicity of ovarian mesothelial cells and down-regulates their Fas-receptor expression. *Cancer Res* 1999; **59**: 3264–3270.

- [29] CORY S, VAUX DL, STRASSER A, HARRIS AW, ADAMS JM. Insights from Bcl-2 and Myc: malignancy involves abrogation of apoptosis as well as sustained proliferation. *Cancer Res* 1999; **59**: 1685s–1692s.
- [30] DANG CV. C-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 1–11.
- [31] DECAUDIN D, GELEY S, HIRSCH T, CASTEDO M, MARCHETTI P, MACHO A, KOFLER R, KROEMER G. Bcl-2 and Bcl-X_L antagonize the mitochondrial dysfunction preceding nuclear apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer Res* 1997; **57**: 62–67.
- [32] DEISS LP, GALINKA H, BERISSI H, COHEND, KIMCHI A. Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha. *EMBO J* 1996; **15**: 3861–3870.
- [33] DELLA-VALLE V, DURO D, BERNARD O, LARSEN CJ. The human protein p19ARF is not detected in hemopoietic human cell lines that abundantly express the alternative beta transcript of the p16INK4a/MTS1 gene. *Oncogene* 1997; **15**: 2475–2481.
- [34] DEL BUFALO D, BIROCCIO A, LEONETTI C, ZUPI G. Bcl-2 overexpression enhances the metastatic potential of a human breast cancer line. *FASEB J* 1997; **11**: 947–953.
- [35] DESAGHER S, OSEN-SAND A, NICHOLS A, ESKES R, MONTESSUIT S, LAUPER S, MAUNDRELL K, ANTONSSON B, MARTINOU J-C. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* 1999; **144**: 891–901.
- [36] DEVERAUX QL, REED JC. IAP family proteins – suppressors of apoptosis. *Genes & Develop* 1999; **13**: 239–252.
- [37] DRENNING SD, MARCOVITCH AJ, JOHNSON DE, MELHEM MF, TWEARDY DJ, GRANDIS JR. Bcl-2 but not Bax expression is associated with apoptosis in normal and transformed squamous epithelium. *Clin Cancer Res* 1998; **4**: 2913–2921.
- [38] DROIN N, DUBREZ I, EYMIN B, RENVOIZÉ C, BRÉARD J, DIMANCHE-BOITREL MT, SOLARY E. Upregulation of CASP genes in human tumor cells undergoing etoposide-induced apoptosis. *Oncogene* 1998; **16**: 2885–2894.
- [39] EISCHEN CM, KOTTKE TJ, MARTINS LM, BASI GS, TUNG JS, EARNSHAW WC, LEIBSON PJ, KAUFMANN SH. Comparison of apoptosis in wild-type and Fas-resistant cells: chemotherapy-induced apoptosis is not dependent on Fas/Fas ligand interactions. *Blood* 1997; **90**: 935–943.
- [40] ENARI M, SAKAHIRA H, YOKOYAMA H, OKAWA K, IWAMATSU A, NAGATA S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature (Lond)* 1998; **391**: 43–50.
- [41] ESTROV Z, THALL PF, TALPAZ M, ESTEY EH, KANTARJIAN HM, ANDREEFF M, HARRIS D, VAN Q, WALTERSCHEID M, KORNBLAU SM. Caspase 2 and caspase 3 protein levels as predictors of survival in acute myelogenous leukemia. *Blood* 1998; **92**: 3090–3097.
- [42] EVAN G, LITTLEWOOD T. A matter of life and cell death. *Science* 1998; **281**: 1317–1322.
- [43] FAMULSKI KS, MACDONALD D, PATERSON MC, SIKORA E. Activation of a low pH-dependent nuclease by apoptotic agents. *Cell Death Differ* 1999; **6**: 281–289.
- [44] FARIS M, KOKOT N, LATINIS K, KASIBHATLA S, GREEN DR, KORETZKY GA, NEL A. The c-Jun N-terminal kinase cascade plays a role in stress-induced apoptosis in Jurkat cells by up-regulating Fas ligand expression. *J Immunol* 1998; **160**: 134–144.
- [45] FROESH BA, TAKAYAMA S, REED JC. BAG-1L protein enhances androgen receptor function. *J Biol Chem* 1998; **273**: 11660–11666.
- [45] FULDA S, SIEVERTS H, FRIESEN C, HERR I, DEBATIN K-M. The CD95 (APO-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Cancer Res* 1997; **57**: 3823–3829.
- [47] FULDA S, FRIESEN C, DEBATIN K-M. Molecular determinants of apoptosis induced by cytotoxic drugs. *Klin Pädiatr* 1998; **210**: 148–152.

- [48] FULDA S, SUSIN SA, KROEMER G, DEBATIN K-M. Molecular ordering of apoptosis induced by anticancer drugs in neuroblastoma cells. *Cancer Res* 1998; **58**: 4453–4460.
- [49] GARDIE B, CAYUELA JM, MARTINI S, SIGAUX F. Genomic alterations of the p19ARF encoding exons in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1998; **91**: 1016–1020.
- [50] GARKAVTSEV I, KAZAROV A, GUDKOV A, RIABOWOL K. Suppression of the novel growth inhibitor p33^{ING1} promotes neoplastic transformation. *Nat Genet* 1996; **14**: 415–420.
- [51] GARKAVTSEV I, GRIGORIAN IA, OSSOVSKAYA VS, CHERNOV MV, CHUMAKOV PM, GUDKOV AV. The candidate tumor suppressor p33^{ING1} cooperates with p53 in cell growth control. *Nature (Lond)* 1998; **391**: 295–298.
- [52] GIL J, YAMAMOTO H, ZAPATA JM, REED JC, PERUCHO M. Impairment of the proapoptotic activity of Bax by missense mutations found in gastrointestinal cancers. *Cancer Res* 1999; **59**: 2034–2037.
- [53] GRATAS C, TOHMA Y, VAN MEIR EG, KLEIN M, TENAN M, ISHII N, TACHIBANA O, KLEIHUES P, OHGAKI H. Fas ligand expression in glioblastoma cell lines and primary astrocytic brain tumors. *Brain Pathol* 1997; **7**: 863–869.
- [54] GRATAS C, TOHMA Y, BARNAS C, TANIÈRE P, HAINAUT P, OHGAKI H. Up-regulation of Fas (APO-1/CD95) ligand and down-regulation of Fas expression in human esophageal cancer. *Cancer Res* 1998; **58**: 2057–2062.
- [55] GREEN DR. Death deceiver. *Nature (Lond)* 1998; **396**: 629–630.
- [56] GREEN DR, REED JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; **281**: 1309–1312.
- [57] GRIFFITH TS, LYNCH DH. TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms. *Curr Op Immunol* 1998; **10**: 559–563.
- [58] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Geny supresorowe – molekularne mechanizmy działania i ich znaczenie w kontroli proliferacji komórek. *Kosmos* 1995; **44**: 323–352.
- [59] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Regulacja cyklu komórkowego – udział białkowych kinaz cyklino-zależnych. *Post Biochem* 1995; **41**: 80–93.
- [60] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Cykliny fazy G1 cyklu komórkowego, ich funkcje i udział w nowotworzeniu. *Post Biochem* 1996; **42**: 99–107.
- [61] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Regulacja procesu apoptozy – udział błonowych białek z rodziny BCL-2. *Kosmos* 1997; **46**: 53–64.
- [62] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Molekularne mechanizmy apoptozy indukowanej poprzez aktywację błonowych receptorów z nadrodziny TNF-R. *Post Biochem* 1998; **44**: 8–21.
- [63] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Udział wirusowych i komórkowych białek IAP w regulacji apoptozy i przeżycia komórek. *Post Biochem* 1999; **45**: 167–176.
- [64] GULDBERG P, STRATEN P, BIRCK A, AHRENKIEL V, KIRKIN AF, ZEUTHEN J. Disruption of the *MMAC1/PTEN* gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma. *Cancer Res* 1997; **57**: 3660–3663.
- [65] GURA T. How TRAIL kills cancer cells, but not normal cells. *Science* 1997; **277**: 768.
- [66] HALENBECK R, MACDONALD H, ROULSTON A, CHEN TT, CONROY L, WILLIAMS LT. CPAN, a human nuclease regulated by the caspase-sensitive inhibitor DFF45. *Curr Biol* 1998; **8**: 537–540.
- [67] HAAS-KOGAN D, SHALEV N, WONG M, MILLS G, YOUNT G, STOKOE D. Protein kinase B (PBK/Akt) activity is elevated in glioblastoma cells due to mutation of the tumor suppressor *PTEN/MMAC*. *Curr Biol* 1998; **8**: 1195–1198.
- [68] HARWOOD FG, FRAZIER MW, KRAJEWSKI S, REED JC, HOUGHTON JA. Acute and delayed apoptosis induced by thymidine deprivation correlates with expression of p53 and p53-regulated genes in colon carcinoma cells. *Oncogene* 1996; **12**: 2057–2067.
- [69] HAUPT Y, ROWAN S, OREN M. p53-mediated apoptosis in HeLa cells can be overcome by excess pRB. *Oncogene* 1995; **10**: 1563–1571.
- [70] HAUPT Y, MAYA R, KAZAZ A, OREN M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature (Lond)* 1997; **387**: 296–299.

- [71] HE L, FOX MH. Variation of heat shock protein 70 through the cell cycle in HL-60 cells and its relationship to apoptosis. *Exp Cell Res* 1997; **232**: 64–71.
- [72] HEERDT B, HOUSTON MA, ANTHONY GM, AUGENLICHT LH. Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_{mt}$) in the coordination of p53-independent proliferation and apoptosis pathways in human colonic carcinoma cells. *Cancer Res* 1998; **58**: 2869–2875.
- [73] HELBING CC, VEILLETTE, RIABOWOL K, JOHNSTON RN, GARKAVTSEV I. A novel candidate tumor suppressor, *ING1*, is involved in the regulation of apoptosis. *Cancer Res* 1997; **57**: 1255–1258.
- [74] HELLIN K, PETERS G. Tumor suppressors: from genes to function and possible therapies. *Trends Genetics* 1998; **14**: 8–9.
- [75] HERR I, WILHELM D, BÖHLER T, ANGEL P, DEBATIN K-M. Activation of CD95 (APO-1/Fas) signaling by ceramide mediates cancer therapy-induced apoptosis. *EMBO J* 1997; **16**: 6200–6208.
- [76] HERWIG S, STRAUSS M. The retinoblastoma protein: a master regulator of cell cycle, differentiation and apoptosis. *Eur J Biochem* 1997; **246**: 581–601.
- [77] HITOTSUMATSU T, IWAKI T, FUKUI M, TATEISHI J. Distinctive immunohistochemical profiles of small heat shock proteins (heat shock protein 27 and alpha b-crystallin) in human brain tumors. *Cancer Res* 1996; **77**: 352–361.
- [78] HONDA R, YASUDA H. Association of p19^{ARF} with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *EMBO J* 1999; **18**: 22–27.
- [79] HONG M, LAI M-D, LIN Y-S, LAI M-Z. Antagonism of p53-dependent apoptosis by mitogen signals. *Cancer Res* 1999; **59**: 2847–2852.
- [80] HOUGHTON JA, HARWOOD FG, TILLMAN DM. Thymineless death in colon carcinoma cells is mediated via Fas signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 8144–8149.
- [81] HOUGHTON JA, HARWOOD FG, GIBSON AA, TILLMAN DM. The Fas signaling pathway is functional in colon carcinoma cells and induces apoptosis. *Clin Cancer Res* 1997; **3**: 2205–2209.
- [82] HUEBER AO, EVAN GI. Traps to catch unwary oncogenes. *Trends Genetics* 1998; **14**: 364–367.
- [83] IMAI Y, KIMURA T, MURAKAMI A, YAJIMA N, SAKAMAKI K, YONEHARA S. The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis. *Nature (Lond)* 1999; **398**: 777–785.
- [84] IMAZU T, SHIMIZU S, TAGAMI S, MATSUSHIMA M, NAKAMURA Y, MIKI T, OKUYAMA A, TSUJIMOTO Y. Bcl-2/E1B 19 kDa-interacting protein 3-like protein (Bnip3L) interacts with Bcl-2/Bcl-x_L and induces apoptosis by altering mitochondrial membrane permeability. *Oncogene* 1999; **18**: 4523–4529.
- [85] IRMLER M, THOME M, HAHNE M, SCHNEIDER P, HOFMANN K, STEINER V, BODMER JL, SCHROTER M, BURNS K, MATTMANN C, RIMOLDI D, FRENCH LE, TSCHOPP J. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature (Lond)* 1997; **388**: 190–195.
- [86] JABS T. Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochem Pharmacol* 1999; **57**: 231–245.
- [87] JÄÄTTELÄ M, WISSING D, KOKHOLM K, KALLUNKI T, EGEHLAD M. Hsp70 exerts its anti-apoptosis function downstream of caspase-3-like proteases. *EMBO J* 1998; **17**: 6124–6134.
- [88] JÄÄTTELÄ M. Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp Cell Res* 1999; **248**: 30–43.
- [89] JÄNICKE RU, SPRENGART ML, WATI MR, PORTER AG. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem* 1998; **273**: 9357–9360.

- [90] JIANG Y, WORONICZ JD, LIU W, GOEDEL DV. Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science* 1999; **283**: 543–546.
- [91] JOSEPH B, EKEDAHL J, SIRZEN F, LEWENSOHN R, ZHIVOTOVSKY B. Differences in expression of pro-caspases in small cell and non-small cell lung carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **262**: 381–387.
- [92] KAMIJO T, WEBER JD, ZAMBETTI G, ZINDY F, ROUSSEL MF, SHERR CJ. Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 8292–8297.
- [93] KASIBHATLA S, BRUNNER T, GENESTIER L, ECCHEVERRI F, MAHBOUBI A, GREEN DR. DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1. *Mol Cell* 1998; **1**: 543–551.
- [94] KASIBHATLA S, GENESTIER L, GREEN DR. Regulation of Fas-ligand expression during activation-induced cell death in T lymphocytes via nuclear factor κ B. *J Biol Chem* 1999; **274**: 987–992.
- [95] KATAOKA T, SCHROTER M, HAHNE M, SCHNEIDER P, IRMLER M, THOME M, FROELICH CJ, TSCHOPP J. FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *J Immunol* 1998; **161**: 3936–3942.
- [96] KAWIAK J, HOSER G, SKÓRSKI T. Apoptosis and some of its medical implications. *Folia Histochem Cytobiol* 1998; **36**: 99–110.
- [97] KAYAGAKI N, YAMAGYCHI N, NAKAYAMA M, ETO H, OKUMURA K, YAGITA H. Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: a novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs. *J Exp Med* 1999; **189**: 1451–1460.
- [98] KEANE MM, ETTENBERG SA, LOWERY GA, RUSSEL EK, LIPKOWITZ S. Fas expression and function in normal and malignant breast cell lines. *Cancer Res* 1996; **56**: 4791–4798.
- [99] KELEKAR A, THOMPSON CB. Bcl-2 family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol* 1998; **8**: 324–330.
- [100] KIM CN, WANG X, HUANG Y, IBRADO AM, LIU L, FANG G, BHALLA K. Overexpression of Bcl-x_L inhibits ara-C-induced mitochondrial loss of cytochrome c and other perturbations that activate the molecular cascade of apoptosis. *Cancer Res* 1997; **57**: 3115–3120.
- [101] KINLOCH RA, TREHERNE JM, FURNESS LM, HAJIMOHAMADREZA I. The pharmacology of apoptosis. *Trends Pharmacol Sci* 1999; **20**: 35–42.
- [102] KIRSCH DG, DOSEFF A, CHAU BN, LIM D-S, DE SOUZA-PINTO NC, HANSFORD R, KASTAN MB, LAZEBNIK YA, HARDWICK JM. Caspase-3-dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome c. *J Biol Chem* 1999; **274**: 21155–21161.
- [103] KOLENKO V, UZZO RG, BUKOWSKI R, BANDER NH, NOVICK AC, HIS ED, FINKE JH. Dead or dying: necrosis versus apoptosis in caspase-deficient human renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1999; **59**: 2838–2842.
- [104] KORSMEYER SJ. Bcl-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res* 1999; **59** (7 suppl.): 1693s–1700s.
- [105] KRAJEWSKA M, MOSS SF, KRAJEWSKI S, SONG K, HOLT PR, REED JC. Elevated expression of Bcl-X and reduced Bak in primary colorectal adenocarcinomas. *Cancer Res* 1996; **56**: 2422–2427.
- [106] KROEMER G, ZAMZANI N, SUSIN SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 1997; **18**: 44–51.
- [107] KROEMER G, DALLAPORTA B, RESCHE-RIGON M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 1998; **60**: 619–642.
- [108] KUBBUTAT MHG, JONES SN, VOUSDEN KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature (Lond)* 1997; **387**: 299–303.

- [109] KUIDA K, HAYDAE TF, KUAN C-Y, GU Y, TAYA C, KARASUYAMA H, SU MS-S, RAKIC P, FLAVELI RA. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* 1998; **94**: 325–337.
- [110] KUMAR A, COMMANE M, FLICKINGER TW, HORVATH CM, STARK GR. Defective TNF- α -induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases. *Science* 1997; **278**: 1630–1632.
- [111] LaCASSE EC, BAIRD S, KORNELUK RG, MACKENZIE AE. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 1998; **17**: 3247–3259.
- [112] LANE DP, HALL PA. MDM2 – arbiter of p53's destruction. *Trends Biochem Sci* 1997; **22**: 372–374.
- [113] LARSEN C-J. p16^{INK4a}: a gene with a dual capacity to encode unrelated proteins that inhibit cell cycle progression. *Oncogene* 1996; **12**: 2041–2044.
- [114] LEE SH, SHIN MS, PARK WS, KIM SY, KIM HS, HAN JY, PARK GS, DONG SM, PI JH, KIM CS, KIM SH, LEE JY, YOO NJ. Alterations of Fas (Apo-1/CD95) gene in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 1999; **18**: 3754–3760.
- [115] LEE SH, SHIN MS, PARK WS, KIM SY, DONG SM, PI JH, LEE HK, KIM HS, JANG JJ, KIM CS, KIM SH, LEE JY, YOO NJ. Alterations of Fas (APO-1/CD95) gene in transitional cell carcinomas of urinary bladder. *Cancer Res* 1999; **59**: 3068–3072.
- [116] LEITHAUSER F, DHEIN J, MECHTERSHEIMER G, KORETZ K, BRUDERLEIN S, HENNE C, SCHMIDT A, DEBATIN KM, KRAMMER PH, MOLLER P. Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. *Lab Invest* 1993; **69**: 415–429.
- [117] LEVINE AJ. P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; **88**: 323–331.
- [118] LIU H, ZHU H, XU C, YUAN J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998; **94**: 491–501.
- [119] LIU X, ZOU H, STAUGHTER C, WANG X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 1997; **89**: 175–184.
- [120] LIU X, ZOU H, WIDLAK P, GARRARD W, WANG X. Activation of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease). *J Biol Chem* 1999; **274**: 13836–13840.
- [121] LU CD, ALTIERI DC, TANIGAWA N. Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas. *Cancer Res* 1998; **58**: 1808–1812.
- [122] LUO X, BUDIHardjo I, ZOU H, SLAUGHTER C, WANG X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998; **94**: 481–490.
- [123] MAEHAMA T, DIXON JE. PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. *Trends Cell Biol* 1999; **9**: 125–128.
- [124] MARIANI SM, KRAMMER PH. Surface expression of TRAIL/Apo-2 ligand in activated mouse T and B cells. *Eur J Immunol* 1998; **28**: 1492–1498.
- [125] MARTINEZ-LORENZO MJ, GAMEN S, ETXEBERRIA J, LASIERRA P, LARRAD L, PINEIRO A, ANEL A, NAVAL J, ALAVA MA. Resistance to apoptosis correlates with a highly proliferative phenotype and loss of Fas and CPP32 (caspase-3) expression in human leukemia cells. *Int J Cancer* 1998; **75**: 473–481.
- [126] MATSUMOTO R, TADA M, NOZAKI M, ZHANG C-L, SAWAMURA Y, ABE H. Short alternative splice transcripts of the *mdm2* oncogene correlate to malignancy in human astrocytic neoplasms. *Cancer Res* 1998; **58**: 609–613.
- [127] McCURRACH ME, CONNOR TMF, KNUDSON CM, KORSMEYER SJ. *Bax*-deficiency promotes drug resistance and oncogenic transformation by attenuating p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 2345–2349.

- [128] McILROY D, SAKAHIRA H, TALANIAN RV, NAGATA S. Involvement of caspase 3-activated DNase in internucleosomal DNA cleavage induced by diverse apoptotic stimuli. *Oncogene* 1999; **18**: 4401–4408.
- [129] MEDEMA JP. Life and death in a FLASH. *Nature* (Lond) 1999; **398**: 756–757.
- [130] MEHLEN P, SCHULZE-OSTHOFF K, ARRIGO A-P. Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. *J Biol Chem* 1996; **271**: 16510–16514.
- [131] MEIJERINK JPP, SMETSERS TFCM, SLÖETJES AW, LINDERS EHP, MENSINK EJBM. Bax mutations in cell lines derived from hematological malignancies. *Leukemia* 1995; **9**: 1828–1832.
- [132] MELENDEZ-ZAJGLA J, CRUZ E, MALDONADO V, ESPINOZA AM. Mitochondrial changes during the apoptotic process of HeLa cells exposed to cisplatin. *Biochem Mol Biol Int* 1999; **47**: 765–771.
- [133] MICHEAU O, SOLARY E, HAMMANN A, MARTIN F, DIMANCHE-BOITREL M-T. Sensitization of cancer cells treated with cytotoxic drugs to Fas-mediated cytotoxicity. *J Nat Cancer Institute* 1997; **89**: 783–789.
- [134] MICHEAU O, HAMMANN A, SOLARY E, DIMANCHE-BOITREL M-T. STAT-1 independent upregulation of FADD and procaspase-3 and -8 in cancer cells treated with cytotoxic drugs. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **250**: 603–607.
- [135] MIGNOTTE B, VAYSSIERE J-L. Mitochondria and apoptosis. *Eur J Biochem* 1998; **252**: 1–15.
- [136] MILLER LK. An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends Cell Biol* 1999; **9**: 323–328.
- [137] MIYASHITA T, KRAJEWSKI S, KRAJEWSKA M, WANG HG, LIN HK, LIEBERMAN DA, HOFFMAN B, REED JC. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene* 1994; **9**: 1799–1805.
- [138] MOSSER DD, CARON AW, BOURGET L, DENIS-LAROSE C, MASSIE B. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 1997; **17**: 5317–5327.
- [139] MOTYL T. Apoptoza – śmierć warunkująca życie. *Post Biol Kom* 1998; **25**: 315–334.
- [140] MULLAUER L, MOSBERGER I, CHOTT A. Fas ligand expression in nodal non-Hodgkin's lymphoma. *Mod Pathol* 1998; **11**: 369–375.
- [141] MÜLLER M, STRAND S, HUG H, HEINEMANN EM, WALCZAK H, HOFMAN WJ, STREMMEL W, KRAMMER PH, GALLE PR. Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (Apo-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J Clin Invest* 1997; **99**: 403–413.
- [142] NAGATA S, GOLSTEIN P. The Fas death factor. *Science* 1995; **267**: 1449–1456.
- [143] NAISMITH JH, SPRANG SR. Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem Sci* 1998; **23**: 74–79.
- [144] NICHOLSON DW, THORNBERRY NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 1997; **22**: 299–306.
- [145] NIEHANS GA, BRUNNER T, FRIZELLE SP, LISTON JC, SALERNO CT, KNAPP DJ, GREEN DR, KRATZKE RA. Human lung carcinomas express Fas ligand. *Cancer Res* 1997; **15**: 1007–1012.
- [146] O'CONNELL J, BENNETT MW, OSULLIVAN GC, COLLINS JK, SHANAHAN F. The Fas counterattack: cancer as a site of immune privilege. *Immunol Today* 1999; **20**: 46–52.
- [147] OKAMOTO K, PRIVES C. A role of cyclin G in the process of apoptosis. *Oncogene* 1999; **18**: 4606–4615.
- [148] OLINER JD, KINZLER KW, MELTZLER PS, GEORGE DL, VOGELSTEIN B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* (Lond) 1992; **358**: 80–83.
- [149] OREN M. Teaming up to restrain cancer. *Nature* (Lond) 1998; **391**: 233–234.

- [150] OUYANG H, FURUKAWA T, ABE T, KATO Y, HORII A. The *BAX* gene, the promoter of apoptosis, is mutated in genetically unstable cancers of the colorectum, stomach, and endometrium. *Clin Cancer Res* 1998; **4**: 1071–1074.
- [151] OWEN-SCHAUB LB, ANGELO LS, RADINSKY R, WARE CF, GESNER TG, BARTOS DP. Soluble Fas /APO-1 in tumor cells: a potential regulator of apoptosis? *Cancer Lett* 1995; **94**: 1–8.
- [152] OWEN-SCHAUB LB, ZHANG W, CUSACK JC, ANGELO LS, SANTEE SM, FUJIWARA T, ROTH JA, DEISSEROTH AB, ZHANG W-W, KRUZEL E, RADINSKY R. Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 3032–3040.
- [153] PACKHAM G, CLEVELAND JL. C-Myc and apoptosis. *Biochem Biophys Acta* 1995; **1242**: 11–28.
- [154] PAI SI, WU GS, ÖZÖREN N, WU L, JEN J, SIDRANSKY D, EL-DEIRY WS. Rare loss-of-function mutation of a death receptor gene in head and neck cancer. *Cancer Res* 1998; **58**: 3513–3518.
- [155] PAN G, NI J, WEI Y-F, YOU G-I, GENTZ R, DIXIT VM. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 1997; **277**: 815–818.
- [156] PEITSCH MC, MANNHERZ HG, TSCHOPP J. The apoptosis endonucleases: cleaning up after cell death? *Trends Cell Biol* 1994; **4**: 37–41.
- [157] PITTI RM, MARSTERS SA, LAWRENCE DA, ROY M, KISCHKEL FC, DOWD P, HUANG A, DONAHUE CJ, SHERWOOD SW, BALDWIN DT, GODOWSKI PJ, WOOD WI, GURNEY AL, HILLAN KJ, COHEN RL, GODDARD AD, BOTSTEIN D, ASHKENAZI A. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature (Lond)* 1998; **396**: 699–702.
- [158] PIWOCKA K, ZABŁOCKI K, WIĘCKOWSKI MR, SKIERSKI J, FEIGA I, SZOPA J, DRELA N, WOJTCZAK L, SIKORA E. A novel apoptosis-like pathway, independent of mitochondria and caspases, induced by curcumin in human lymphoblastoid T (Jurkat) cells. *Exp Cell Res* 1999; **249**: 299–307.
- [159] POLYAK K, XIA Y, ZWELER JL, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. A model for p53-induced apoptosis. *Nature (Lond)* 1997; **389**: 300–305.
- [160] POMERANTZ J, SCHREIBER-AGUS N, LIÉGEOIS NJ, SILVERMAN A, ALLAND L, CHIN L, POTES J, CHEN K, ORLOW I, LEE H-W, CORDON-CARDO C, DE PINHO R. The *Ink4a* tumor suppressor gene product, p19^{Arf}, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2s inhibition of p53. *Cell* 1998; **92**: 713–723.
- [161] PORTER AG. Protein translocation in apoptosis. *Trends Cell Biol* 1999; **9**: 394–401.
- [162] POSOVSKY C, FRIESEN C, HERRI I, DEBATIN K-M. Chemotherapeutic drugs sensitize pre-B ALL cells for CD95- and cytotoxic T-lymphocyte-mediated apoptosis. *Leukemia* 1999; **13**: 400–409.
- [163] RAMPINO N, YAMAMOTO H, IONOV Y, LI Y, SAWAI H, REED JC, PERUCHO M. Somatic frameshift mutations in the *BAX* gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 1997; **274**: 967–969.
- [164] RASPER DM, VAILLANCOURT JP, HADANO S, HOUTZAGER VM, SEIDEN I, KEEN SL, TAWA P, XANTHOUDAKIS S, NASIR J, MARTINDALE D, KOOP BF, PETERSON EP, THORNBERRY NA, HUANG J, MACPHERSON DP, BLACK SC, HORNUNG F, LENARDO MJ, HAYDEN MR, ROY S, NICHOLSON DW. Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell Death Differ* 1998; **5**: 271–288.
- [165] REED JC. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature (Lond)* 1997; **387**: 773–776.
- [166] REED JC. Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. *Curr Opin Oncol* 1995; **7**: 541–546.

- [167] REED JC, JURGENSMEIER JM, MATSUYAMA S. Bcl-2 family proteins and mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1366**: 127–137.
- [168] REIFENBERGER G, LIU L, ICHIMURA K, SCHMIDT EE, COLLINS VP. Amplification and overexpression of the *MDM2* gene in a subset of human malignant glioma without p53 mutations. *Cancer Res* 1993; **53**: 2736–2739.
- [169] RICHARDS EH, HICKEY E, WEBER L, MASTERS JR. Effect of overexpression of the small heat shock protein HSP70 on the heat and drug sensitivities of human testis tumor cells. *Cancer Res* 1996; **56**: 2446–2451.
- [170] ROGALLA T, EHRNSPERGER M, PREVILLY X, KOTLYAROV A, LUTSCH G, DUCASSE C, PAUL C, WIESKE M, ARRIGO A-P, BUCHNER J, GAESTEL M. Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor α by phosphorylation. *J Biol Chem* 1999; **274**: 18947–18956.
- [171] ROHN JL, HUEBER A-O, MCCARTHY NJ, LYOND, NAVARROP, BURGERING BMT, EVAN GI. The opposing roles of the Akt and c-Myc signalling pathways in survival from CD95-mediated apoptosis. *Oncogene* 1998; **17**: 2811–2818.
- [172] ROKHLIN OW, BISHOP GA, HOSTAER BS, WALDSCHMIDT TJ, SIDORENKO SP, PAVLOFF N, KIEFER MC, UMANSKY SR, GLOWER RA, COHEN MB. Fas-mediated apoptosis in human prostatic cell lines. *Cancer Res* 1997; **57**: 1758–1768.
- [173] SAASP, WALKER PR, HAHNE M, QUIQUER AL, SCHNURIGER V, PERRIN G, FRENCH L, VAN-MEIR EG, DE TRIBOLET N, TSCHOPP J, DIETRICH PY. Fas ligand expression by astrocytoma *in vivo*: maintaining immune privilege in the brain? *J Clin Invest* 1997; **99**: 1173–1178.
- [174] SABOL SL, LI R, LEE TY, ABDUL-KHALEK R. Inhibition of apoptosis-associated DNA fragmentation activity in nonapoptotic cells: the role of DNA fragmentation factor-45 (DFF45/ICAD). *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **253**: 151–158.
- [175] SADOUL R, FERNANDEZ PA, QUIQUEREZ AL, MARTINOU I, MAKI M, SCHROTER M, BECHERER JD, IRMLER M, TSCHOPP J, MARTINOU JC. Involvement of the proteasome in the programmed cell death of NGF-deprived sympathetic neurons. *EMBO J* 1996; **15**: 3845–3852.
- [176] SAKAHIRA H, ENARI M, NAGATA S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature (Lond)* 1998; **391**: 96–99.
- [177] SAMALI A, COTTER TG. Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. *Exp Cell Res* 1996; **223**: 162–170.
- [178] SCAFFIDI C, SCHMITZ I, KRAMMER PH, PETER ME. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1999; **274**: 1541–1548.
- [179] SCHULZE-OSTHOFF K, FERRARID, LOS M, WESSELBORG S, PETER ME. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 1998; **254**: 439–459.
- [180] SCHLICHTHOLZ B, SOUSSI T. Perspektywy praktycznego zastosowania badań nad genem p53. *Post Biochem* 1994; **40**: 211–221.
- [181] SEDGER LM, SHOWS DM, BLANTON RA, PESCHON JJ, GOODWIN RG, COSMANS D, WILEY SR. IFN-gamma mediates a novel antiviral activity through dynamic modulation of TRAIL and TRAIL receptor expression. *J Immunol* 1999; **163**: 920–926.
- [182] SHARP FR. Heat-shock protein protection. *Trends Neurosci* 1999; **22**: 97–99.
- [183] SHEIKH MS, BURNS TF, HUANG Y, WUGS, AMUNDSON S, BROOKS KS, FORNACE AJ, EL-DEIRY WS. P53-dependent and -independent regulation of the death receptor *KILLER/DR5* gene expression in response to genotoxic stress and tumor. *Cancer Res* 1998; **58**: 1593–1598.
- [184] SHERR CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996; **274**: 1672–1676.
- [185] SIERRA A, CASTELLSAGUÉ X, TÓRTOLA S, ESCOBEDO A, LLOVERAS B, PEINADO MA, MORENO A, FABRA A. Apoptosis loss and Bcl-2 expression: key determinants of lymph node metastases in T₁ breast cancer. *Clin Cancer Res* 1996; **2**: 1887–1894.

- [186] SIKORA E. Apoptoza a onkogeneza. *Kosmos* 1995; **44**: 353–363.
- [187] SRINIVASULA SM, AHMAD M, GUO Y, ZHAN Y, LAZEBNIK Y, FERNANDES-ALNEMRI T, ALNEMRI ES. Identification of an endogenous dominant-negative short isoform of caspase-9 that can regulate apoptosis. *Cancer Res* 1999; **59**: 999–1002.
- [188] SRIVASTAVA RK, QING-SHENG M, HARDWICK JM, LONGO DL. Deletion of the loop region of Bcl-2 completely blocks paclitaxel-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 3775–3780.
- [189] STEHLIK C, DE MARTIN R, BINDER BR, LIPP J. Cytokine induced expression of porcine inhibitor of apoptosis protein (iap) family member is regulated by NF- κ B. *Biochim Biophys Res Commun* 1998; **243**: 827–832.
- [190] STRASSER A, HUANG DCS, VAUX DL. The role of the *bcl-2/ced-9* gene family in cancer and general implications of defects in cell death control for tumourgenesis and resistance to chemotherapy. *Biochim Biophys Acta* 1997; **1333**: F151–F178.
- [191] STUART JK, MYSZKA DG, JOSE L, MITCHELL RS, MCDONALD S, XIE Z, TAKAYAMA S, REED JC, ELY KR. Characterization of interactions between the anti-apoptotic protein BAG-1 and Hsc70 molecular chaperones. *J Biol Chem* 1998; **273**: 22506–22514.
- [192] SUN X-M, MACFARLANE M, ZHUANG J, WOLF BB, GREEN DR, COHEN GM. Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1999; **274**: 5053–5060.
- [193] SUSIN SA, ZAMZAMI N, KROEMER G. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1366**: 151–165.
- [194] SUSIN SA, LORENZO HK, ZAMZAMI N, MARZO I, SNOW BE, BROTHERS GM, MANGION J, JACOTOT E, COSTANTINI P, LOEFFLER M, LAROCLETTE N, GOODLETT DR, AEBERSOLD R, SIDEROVSKI DP, PENNINGER JM, KROEMER G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature (Lond)* 1999; **397**: 441–446.
- [195] SUZUKIA, TSUTOMI Y, AKAHANE K, ARAKI T, MIURA M. Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21^{WAF1} and IAP gene family ILP. *Oncogene* 1998; **17**: 931–939.
- [196] SYMONDS H, KRALL L, REMINGTON L, SAENZ-ROBLES M, LOWE S, JACKS T, VANDYKE T. p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression *in vivo*. *Cell* 1994; **78**: 703–711.
- [197] TACHIBANA O, NAKAZAWA H, LAMPE J, WATANABE K, KLEIHUES P, OHGAKI H. Expression of Fas/Apo-1 during the progression of astrocytomas. *Cancer Res* 1995; **55**: 5528–5530.
- [198] TAKAOKA A, ADACHI M, OKUDA H, SATO S, YAWATA A, HINODA Y, TAKAYAMA S, REED JC, IMAI K. Anti-cell death activity promotes pulmonary metastasis of melanoma cells. *Oncogene* 1997; **14**: 2971–2977.
- [199] TAKASHI M, SAKATA T, OHMURA M, KATO K. Elevated concentrations of the small stress protein HSP27 in rat renal tumors. *Urol Res* 1997; **25**: 173–177.
- [200] TAKAYAMA S, SATO T, KRAJEWSKI S, KOCHER K, IRIE S, MILAN JA, REED JC. Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2 binding protein with anti-cell death activity. *Cell* 1995; **80**: 279–284.
- [201] TAKAYAMA S, KRAJEWSKI S, KRAJEWSKA M, KITADA S, ZAPATA JM, KOCHER K, KNEE D, SCUDIERO D, TUDOR G, MILLER GJ, MIYASHITA T, YAMADA M, REED JC. Expression and location of Hsp70/Hsc-binding anti-apoptotic protein BAG-1 and its variants in normal tissues and tumor cell lines. *Cancer Res* 1998; **58**: 3116–3131.
- [202] TAKAYAMA S, XIE Z, REED JC. An evolutionarily conserved family of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulators. *J Biol Chem* 1999; **274**: 781–786.
- [203] TAMIYA S, ETOH K, SUZUSHIMA H, TAKATSUKI K, MATSUOKA M. Mutation of CD95 (Fas/Apo-1) gene in adult T-cell leukemia cells. *Blood* 1998; **15**: 3935–3942.

- [204] TAMMI, WANG Y, SAUSVILLE E, SCUDIERO DA, VIGNA N, OLTERS DORFT, REED JC. IAP- family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* 1998; **58**: 5315–5320.
- [205] TANG D, KIDD VJ. Cleavage of DFF-45/ICAD by multiple caspases is essential for its function during apoptosis. *J Biol Chem* 1998; **273**: 28549–28552.
- [206] THOMPSON EB. The many roles of c-Myc in apoptosis. *Annu Rev Physiol* 1998; **60**: 575–600.
- [207] TOH SY, WANG X, LI P. Identification of the nuclear factor HMG2 as an activator for DFF nuclease activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **250**: 598–601.
- [208] TSAO H, ZHANG X, BENOIT E, HALUSKA FG. Identification of *PTEN/MMAC1* alterations in uncultured melanomas and melanoma cell lines. *Oncogene* 1998; **16**: 3397–3402.
- [209] TSCHOPP J, IRMLER M, THOME M. Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol* 1998; **10**: 552–558.
- [210] TSCHOPP J, MARTINON F, HOFMANN K. Apoptosis: silencing the death receptors. *Curr Biol* 1999; **9**: R381–R384.
- [211] TU Y, RENNER S, XU F-H, FLEISHMAN A, TAYLOR J, WEISZ J, VESCIO R, RETTIG M, BERENSON J, KRAJEWSKI S, REED JC, LICHTENSTEIN A. BCL-X expression in multiple myeloma: possible indicator of chemoresistance. *Cancer Res* 1998; **58**: 256–262.
- [212] UNGEFROREN H, VOSS M, JANSEN M, ROEDER C, HENNE-BRUNS D, KREMER B, KALTHOFF H. Human pancreatic adenocarcinomas express Fas and Fas ligand yet are resistant to Fas-mediated apoptosis. *Cancer Res* 1998; **58**: 1741–1749.
- [213] VILLA P, KAUFMANN SH, EARNSHAW WC. Caspases and caspase inhibitors. *Trends Biochem Sci* 1997; **22**: 388–393.
- [214] VILLUNGER A, EGLE A, KOS M, HARTMANN BL, GELEY S, KOFLER R, GREIL R. Drug-induced apoptosis is associated with enhanced Fas (Apo-1/CD95) ligand expression but occurs independently of Fas (Apo-1/CD95) signaling in human T-acute lymphatic leukemia cells. *Cancer Res* 1997; **57**: 3331–3334.
- [215] VON REYHER U, STRÄTER J, KITTSTEIN W, GSCHWENDT M, KRAMMER PH, MÖLLER P. Colon carcinoma cells use different mechanisms to escape CD95-mediated apoptosis. *Cancer Res* 1998; **58**: 526–534.
- [216] WAGNER AJ, KOKONTIS JM, HAY N. Myc-mediated apoptosis requires wild-type p53 in a manner independent of cell cycle arrest and the ability of p53 to induce p21^{waf1/cip1}. *Genes & Develop* 1994; **8**: 2817–2830.
- [217] WALLACH D, BOLDIN M, VARFOLOMEEV E, BEYAERT R, VANDENABEELE P, FIERS W. Cell death induction by receptors of the TNF family: towards a molecular understanding. *FEBS Lett* 1997; **410**: 96–106.
- [218] WANG C-Y, MAYO MW, KORNELUK RG, GOEDDEL DV, BALDWIN AS Jr. NF-κB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998; **281**: 1680–1683.
- [219] WANG H-G, TAKAYAMA S, RAPPUR, REED JC. Bcl-2 interacting protein, BAG-1, binds to and activates the kinase Raf-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 7063–7068.
- [220] WANG R, ZHANG L, YIN D, MUFSON RA, SHI Y. Protein kinase C regulates Fas (CD95/APO-1) expression. *J Immunol* 1998; **161**: 2201–2207.
- [221] WANG X, HARRIS CC. P53 tumor-suppressor gene: clues to molecular carcinogenesis. *J Cell Physiol* 1997; **173**: 247–255.
- [222] WELLER M, MALIPIERO U, RENSING-EHL A, BARR PJ, FONTANA A. Fas/APO-1 gene transfer for human malignant glioma. *Cancer Res* 1995; **55**: 2936–2944.
- [223] WHITE E. p53, guardian of Rb. *Nature (Lond)* 1996; **371**: 21–22.
- [224] WHITE E. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes & Develop* 1996; **10**: 1–15.
- [225] WHITE E, PRIVES C. DNA damage enables p73. *Nature (Lond)* 1999; **399**: 734–737.

- [226] WOLF BB, GREEN DR. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* 1999; **274**: 20049–20052.
- [227] WOOD DE, THOMAS A, DEVI LA, BERMAN Y, BEAVIS RC, REED JC, NEWCOMB EW. Bax cleavage is mediated by calpain during-induced apoptosis. *Oncogene* 1998; **17**: 1069–1078.
- [228] WYLLIE A. An endonuclease at least. *Nature (Lond)* 1998; **391**: 20–21.
- [229] XIAO Z-X, CHEN J, LEVINE AJ, MODJTAHEDL N, XING J, SELLERS WR, LIVINGSTON DM. Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2. *Nature (Lond)* 1995; **375**: 694–698.
- [230] XU X, FU X-Y, PLATE J, CHONG A S-F. IFN- γ induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression. *Cancer Res* 1998; **58**: 2832–2837.
- [231] YANG X, CHERNENKO G, HAO Y, DING Z, PATER MM, PATER A, PATER A, TANG S-C. Human BAG-1/RAP46 protein is generated as four isoforms by alternative translation initiation and overexpressed in cancer cells. *Oncogene* 1998; **17**: 981–989.
- [232] YANG X, HAO Y, DING Z, PATER A, TANG S-C. Differential expression of antiapoptotic gene BAG-1 in human breast normal and cancer cell lines and tissues. *Clin Cancer Res* 1999; **5**: 1816–1822.
- [233] YANG X, HAO Y, FERENCZY A, TANG S-C, PATER A. Overexpression of anti-apoptotic gene BAG-1 in human cervical cancer. *Exp Cell Res* 1999; **247**: 200–207.
- [234] YANG X, PATER A, TANG S-C. Cloning and characterization of the human BAG-1 gene promoter: upregulation by tumor-derived p53 mutants. *Oncogene* 1999; **18**: 4546–4553.
- [235] YUAN Z-M, SHIOYA H, ISHIKO T, SUN X, GU J, HUANG YY, LU H, KHARBANDA S, WEICHSELBAUM R, KUFEL D. p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature (Lond)* 1999; **399**: 814–817.
- [236] ZEINER M, GEHRING H. A protein that interacts with members of the nuclear hormone receptor family: identification and cDNA cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 11465–11469.
- [237] ZENG X, CHEN L, JOST CA, MAYA R, KELLER D, WANG X, KAELIN WG, OREN M, CHEN J, LU H. MDM2 suppresses p73 function without promoting p73 degradation. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 3257–3266.
- [238] ZHANG Y, XIONG Y, YARBROUGH WG. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* 1998; **92**: 725–734.
- [239] ZHIVOTOWSKY B, BURGESS DH, VANAGS DM, ORRENIUS S. Involvement of cellular proteolytic machinery in apoptosis. *Biochim Biophys Res Commun* 1997; **230**: 481–488.
- [240] ZINDY F, EISCHEN CM, RANDLE DH, KAMIJO T, CLEVELAND JL, SHERR CJ, ROUSSEL MF. Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes & Develop* 1998; **12**: 2424–2433.

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

NOWOTWORY A STARZENIE*

CANCER AND AGING

Małgorzata BALIŃSKA, Agnieszka BRZEZIŃSKA, PATRYCJA WIŃSKA

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

Streszczenie: W starzejącej się populacji gwałtownie wzrasta zachorowalność na nowotwory. Przyczynami tego zjawiska są: spadek odpowiedzi immunologicznej spowodowany pęknięciami podwójnej spirali DNA, dłuższa ekspozycja na karcinogeny, zmniejszenie zdolności reperacyjnej DNA komórek starzejących się i defekty genów supresorowych. Omówiono głównie defekty DNA komórek starzejących się i nowotworowych, polegające między innymi na unieczynnieniu genów poprzez hipermetylację fragmentów GpC. Ukazano podobieństwo zmian macierzy zewnątrzkomórkowej w przypadku komórek starzejących się i nowotworowych.

(*Postępy Biologii Komórki 2000; Supl. 15: 45–55*)

Słowa kluczowe: nowotwory, starzenie się, metylacja DNA, macierz zewnątrzkomórkowa.

Summary: In aging population growing up rapidly causes of cancers are observed. Lost of immunological answer caused by DNA double-strand breakes, longer exposition to carcinogens, decreasing activity of DNA-repair system in aging cells, defects of supressor genes are caused carcinogenesis. DNA-defects of aging and cancer cells by hipermethylation GpC island of gene promoters are observed. Changes in extracellular matrix of aging and transformed cells are responsible for cell migration causing metastasis.

(*Advances in Cell Biology 2000; Suppl. 15: 45–55*)

Key words: cancer, aging, senescence, DNA-methylation, extracellular matrix.

WSTĘP

Ostatnie stulecie oprócz rewolucji naukowo-technicznej w krajach uprzemysłowionych, przyniosło wybitne przedłużenie długości życia ludzkiego. I tak gdy w roku 1900 średnia długość życia w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej

*Praca finansowana z grantu KBN nr 6P04B00719.

wynosiła 47 lat, w Japonii 44, a w Meksyku 33, to pod koniec XX wieku (w 1998 roku) wzrosła odpowiednio do 76, 80, 74 lat, a odsetek ludności powyżej 65 roku zwiększył się kilkakrotnie (w USA 4-krotnie – z 4% w 1900 roku do 16% w roku 1998 – dane ze Stanów Zjednoczonych są bardziej miarodajne, ponieważ przez ten kontynent nie przetoczyły się wyniszczające wojny światowe, jak przez kontynent europejski). Jednocześnie wybitnie zwiększył się w populacji po 65 roku odsetek zachorowań na choroby nowotworowe i w roku 1998 wyniósł on 45%, podczas gdy w całej populacji odsetek zgonów z powodu chorób nowotworowych wynosi około 25% [19]. Te proste dane wskazują, że ludzie w starszym wieku chorują na nowotwory znacznie częściej niż ludzie młodzi. Co może być tego przyczyną zjawiska?

Jak wiadomo, proces nowotworzenia jest procesem powolnym, zachodzące zmiany są nieodwracalne, a zachodzą one w pewnej, określonej dla danego nowotworu liczbie genów. Jeżeli przyjmiemy za jedną z przyczyn powstawania nowotworu ewolucję klonalną [5,7], kolejne nagromadzenie mutacji w komórce przekształcającą ją w komórkę o cechach nowotworowych tzn. komórkę, której kształt jest zmieniony w porównaniu z komórką wyjściową, która nie reaguje na sygnały hamujące podział i ma zdolność do przerzutowania (klasycznym przykładem jest tu rak okrężnicy – 4 kolejne mutacje) [45], to wówczas możemy w pewnym stopniu tłumaczyć, że wraz ze starzeniem organizmu mutacje prowadzące do powstania komórki nowotworowej mogą się nagromadzać. Jednakże gdy przyjmiemy inną hipotezę, że w starzejącym organizmie zachodzą zmiany przypominające niektóre wczesne stadia charakteryzujące komórki nowotworowe, jeżeli do tego dodamy teorię niestabilności genomu [24], która odnosi się w pewien sposób zarówno do procesów starzenia się, jak i nowotworzenia, to zagadką pozostanie, dlaczego jedna starzejąca się komórka podlega wyłącznie procesowi starzenia, a druga transformacji nowotworowej. Odpowiedzi na ten temat można szukać porównując niektóre zmiany w obu typach komórek, a przede wszystkim w odpowiedzi immunologicznej organizmu. Ponadto należy odróżnić procesy zachodzące w komórce podczas starzenia (*aging*) i procesy zachodzące w starej komórce (*senescence*). Uważa się ostatnio, że komórki stare (*senescent cells*) nie ulegają podziałom, nie wchodzą w fazy cyklu komórkowego pod wpływem mitogenów, nie umierają poprzez proces apoptozy, a zmiany w DNA, nie wiadomo dotąd dokładnie jakie, choć sugeruje się, że są prawdopodobnie związane ze skracaniem specyficznym telomerów, powodują takie zmiany, że w komórkach tych hamowana jest transformacja nowotworowa. Być może poprzez uwalnianie czynników regulujących transkrypcję, choć w innych komórkach takie zmiany nie zachodzą i komórki podlegają transformacji nowotworowej; jest to, jak się w tej chwili wydaje, proces przypadkowy. Sugeruje się, jednak, że w procesach tych może odgrywać rolę heterochromatyna, której rozpleciona forma może hamować pewne geny prowadząc do starzenia się komórki, a nie do transformacji. Komórki tego typu gromadzą się wraz z wiekiem w organizmie i wpływają na starzenie

się całego organizmu [4, 14]. Sugeruje się nawet ekspresję przez komórki ludzkie fenotypu „starczo-podobnego” (*senescent-like*). Być może polega to na deekspresji protoonkogenu *c-as-HA* [4, 40]. Dlatego przedstawione dane będą dotyczyć głównie procesów starzenia się (*aging*), a nie komórek starych, które z różnych powodów pozostają odporne na procesy transformacji nowotworowej. Za przyczyny powstawania nowotworów w starzejącej się populacji uważa się:

- spadek odpowiedzi immunologicznej, związany ze zmianami w strukturze DNA powodujące zahamowanie różnicowania się limfocytów B i T,
- dłuższą ekspozycję na karcynogeny,
- łatwiejsza podatność na karcynogeny,
- zmniejszenie zdolności reperacji DNA,
- amplifikacja i aktywacja onkogenów,
- defekty w genach supresorowych.

Z kolei zmiany w genomie prowadzące do powstawania nowotworów są utrwalane wolniej ze względu na wolniejsze dzielenie się komórek starych [6]. Dlatego należy zawsze pamiętać, że w innym aspekcie należy rozpatrywać starzejącą się pojedynczą komórkę, a w innym starzejący się organizm.

ZMIANY W DNA KOMÓREK STARZEJĄCYCH SIĘ I KOMÓREK PODLEGAJĄCYCH TRANSFORMACJI NOWOTWOROWEJ

Hipermetylacja specyficznych regionów promotorów

Promotorowe obszary większości genów tzw. *housekeeping* mają regiony bogate w nukleotydy CpG, których metylacja powodować może inaktywację transkrypcyjną genu. Nadmierna metylacja regionów CpG niezależnie od statusu danego genu prowadzi do inaktywacji transkrypcyjnej, co w sumie powoduje wiele transformacji nowotworowych. Dotyczy to takich genów supresorowych, jak: *VHL*, *RB*, *p16* [1]. Ponadto hipermetylacja dotyczy wielu genów związanych z transformacją nowotworową, a intensywne badania dotyczą metylacji genów towarzyszących rakowi okrężnicy, takich jak: receptor estrogenów (*ER*), insulino-podobny czynnik wzrostu (*IGF*), transkrypt *N33* zlokalizowany na 8 chromosomie, mięśniowo specyficzny czynnik transkrypcyjny *MYOD*. Podobne zjawisko towarzyszy również i innym nowotworom, czego przykładem jest hipermetylacja genu kodującego kalcytoninę *CALCA* znajdowaną w przypadku nowotworów płuc. Co dziwniejsze taka nadmierna metylacja regionów CpG spotykana jest w komórkach starych i to zarówno w regionach promotorowych tych samych genów, jak również *cMYC* i *cFOS*. Nasuwa się tu zasadnicze pytanie, czy hipermetylacja CpG związana ze starzeniem się ko-

mórek, czy z procesem nowotworowym. Znalezione, że hipermetylacja większości badanych genów między innymi *ER*, *N33*, *MYOD* znajdowana jest zawsze w tkankach prawidłowych pobranych od ludzi w wieku powyżej lat 60 (czego nie spotyka się u zdrowych osobników przed 30. rokiem życia), jak również w tkankach nowotworowych niezależnie od wieku chorego. Stwierdzono również, że hipermetylacja supresorowego genu, takiego jak np. *p16/CDKN2*, powoduje zahamowanie jego ekspresji z jednoczesną kondensacją chromatyny. Zjawisko to stwierdzono zarówno w komórkach nowotworowych (glioma), jak i w komórkach starych (mózg) [8]. Wniosek, jaki się nasuwa z tego rodzaju obserwacji, sugeruje, że starzenie się komórek może być skorelowane z czynnikami stymulującymi procesy nowotworowe. Z kolei jądrowe białko p33 IMG1, jeżeli ulegnie nadekspresji, hamuje podziały komórek starych, hamuje również w niektórych wypadkach wzrost „nieśmiertelnych” komórek nowotworowych, czyli jest to dalszy dowód na powiązanie metabolizmu komórek starych i komórek nowotworowych [15]. Wydaje się, że białko p33 IMG1 jest częścią drogi sygnałowej związanej z białkiem p53, co powoduje negatywną regulację wzrostu komórek przez modulację p53-zależnej transkrypcji.

ZMIANY W IMMUNOLOGICZNEJ ODPOWIEDZI, PROCESY ZWIĄZANE Z PEKNIĘCIAMI PODWÓJNEJ SPIRALI DNA

Jednym z najważniejszych zjawisk, jak się wydaje odpowiedzialnych za korelację w organizmie procesów starzenia się i transformacji nowotworowej, są procesy związane z immunologiczną odpowiedzią, za którą odpowiedzialny jest poziom zarówno cytokin prozapalnych, jak i komórek NK. Wiele szczegółowych informacji można znaleźć w artykule J. Myśliwskiej [30]. Na poziomie komórkowym, jak się wydaje, za zmiany prowadzące do omawianych procesów mogą być odpowiedzialne pęknięcia podwójnej nici w DNA (spowodowane różnymi czynnikami, takimi jak: promieniowanie radiacyjne, wpływ wolnych rodników tlenowych) spotykane często w dojrzałych limfocytach B oraz we wczesnych etapach dojrzewania limfocytów T, powodujące deregulację funkcji limfocytów T, a co za tym idzie defekty innych komórek, takich jak: komórki prezentujące antygen i upośledzenie aktywacji komórek sytemu immunologicznego [34]. Takie zmiany spotyka się w limfocytach różnych typów białaczek. Jak się sugeruje, defekty pęknięcia podwójnych nici DNA w komórkach limfoidalnych powodują zaburzenia w integralności i zawartości DNA, reperacja tych ubytków powoduje bowiem trwałe uszkodzenie DNA. Pęknięcia podwójnej spirali DNA powodują fizjologiczne zmiany w czasie dyferencjacji komórek limfoidalnych. Dotyczy to rekombinacji w regionie *V(D)J* podczas rozwoju komórek B i T, a także dojrzewania limfocytów T. Pęknięcia podwójnej nici powodują translokacje chromosomalne, utratę informacji genetycznej w miejscu

pęknięcia, co jest główną, zdaniem wielu badaczy, przyczyną defektów immunologicznych powstałych wraz z wiekiem i w procesach nowotworzenia [25]. Ponadto stwierdzono, że obserwowane unieczynnienie w wyniku hipermetylacji chromosomu X u kobiet w wieku powyżej 75 lat skorelowane są ze zmianami DNA limfocytów T, defektami immunologicznymi i zapadalnością na białaczki [43, 36]. Z kolei obniżenie ekspresji czynnika transkrypcyjnego NFkappa B (odpowiedzialnego za regulację różnego rodzaju cytokin, np. IL-1, IL-2, IL-6 oraz czynnika martwicy nowotworu α) wraz z wiekiem zmniejsza aktywację limfocytów T, co prowadzi do różnego typu zmian między innymi syntezy nieprawidłowych białek, które nie usuwane z organizmu w związku ze zmniejszoną aktywnością proteaz prowadzić mogą do procesu nowotworowego [35], jak np. w przypadku syntezy D-aminokwasów [13]. Zauważono również, że zmiany ekspresji czynników zaangażowanych w naprawę głównie pęknięć podwójnej spirali DNA, takich czynników, jak: Ku86, Ku70, DNA-PK, Xrcc4 i DNA ligazy IV, mogą być odpowiedzialne za progresję procesów nowotworową związaną z procesami starzenia się. I tak myszy pozbawione czynnika ku86 (-/-) wykazują szybsze starzenie się i większą zapadalność na nowotwory [44]. Podobne efekty powoduje unieczynnienie czynnika ku80 [26]. Jak więc widać, zmiany prowadzące do zmienionej odpowiedzi immunologicznej w procesach starzenia i powstawania nowotworów związane są, jak się wydaje, na poziomie pojedynczej komórki ze specyficznymi zmianami w DNA i związanymi z tym procesami naprawczymi.

ZMIANY DNA POD WPŁYWEM REAKCJI WOLNORODNIKOWYCH

Oprócz tych zmian opisanych powyżej powodujących pęknięcie podwójnej nici również uszkodzenie pojedynczej nici DNA jak zastąpienie w jednej nici DNA guaniny poprzez utworzenie 7-hydro-8-oksodezoksyguanidyny na skutek zmian wolnorodnikowych. Takie podstawienie sprzyja mutagenezie, której wystąpienie wzrasta w tym przypadku wraz z wiekiem [27, 31]. Zmiany te akumulują się wraz z wiekiem i dotyczą nie tylko DNA jądrowego, ale także mitochondrialnego. Ponadto aktywność enzymów wychwytyjących wolne rodniki, takie jak: dysmutaza nadtlenkowa (zarówno zależna od Mn, jak i Zn i Cu), jak i katalaza i peroksydaza glutationu, wraz z wiekiem wyraźnie spada. Spada również stosunek peroksydazy zależnej od Mn i do katalazy i peroksydazy, co jest przyczyną niezrównoważonego wzrostu wolnych rodników i powodującego mutacje mitochondrialnego (mtDNA) i jądrowego DNA przyczyniając się do szybszego starzenia i zwiększenia możliwości transformacji nowotworowej [28]. Wolne rodniki wydają się wpływać na zmiany mtDNA, powodując delecje. I tak najbardziej znana delecja 4977 par zasad w mtDNA spotykana u ludzi w wieku powyżej 40 lat. Ta delecja i inne delecje

mtDNA wydają się być zależne od wieku. Wycięty kawałek mtDNA może opuścić mitochondria i przemieścić się do jądra, być włączony do jądrowego DNA, w wyniku czego dochodzi do zmiany informacji w DNA jądrowym powodującej, zmiany, które promują często jednocześnie procesy starzenia się i nowotworzenia [46]. Ponadto, jak się wydaje, wpływ wolnych rodników na zmiany DNA jądrowego uszkadza regulację genów, czego przykładem mogą być mutacje genów kodujących p53 i PGK1, co jest stwierdzane zarówno w starzejących się komórkach, jak i nowotworach (np. raku piersi) [38, 9]. Dlatego próbuje się stosować antyoksydanty w terapii nowotworowej, jak i w zmniejszeniu efektów starzenia się [23].

HELIKAZY: ROLA W STARZENIU SIĘ I TRANSFORMACJI

Niezwykle istotną, jak się okazało, w procesie starzenia jest ekspresja helikazy DNA. Rodzina helikaz liczy w chwili obecnej 5 genów, które ulegają ekspresji w większości ludzkich szybko dzielących się komórkach, głównie nowotworowych. Jedną ze zmutowanych helikaz występuje w chorobie Wernera, który to syndrom charakteryzuje się przedwczesnym starzeniem i podatnością na choroby nowotworowe [41]. Wiele nowotworowych komórek wykazuje wysoką ekspresję zmutowanego białka helikazy, powodując deregulację przejścia fazy G2/M cyklu komórkowego, ponadto zmiany w ekspresji helikaz wykryto w fibroblastach pobranych od osób powyżej 60 roku życia, czyli w obu opisywanych procesach ma swój udział zmutowana helikaza [17, 42, 22].

SERPINY - ZMIANY EKSPRESJI W PROCESACH STARZENIA I NOWOTWORACH

Z kolei badania ekspresją serpin (PEDF/EPC-1) (naturalnych inhibitorów proteazy serynowej), które to białko jest znajdowane wyłącznie w młodych komórkach, natomiast w komórkach starych i nowotworowych nie znajdowano ani białka serpiny, ani jej m-RNA [33]. Jest to kolejny dowód na wzrost procesów nowotworowych w komórkach starych, których zmieniony metabolizm sprzyja zmianom nowotworowym.

MIANY W STRUKTURZE MACIERZY KOMÓRKOWEJ W CZASIE STARZENIA SIĘ I PROCESU PRZERZUTOWANIA NOWOTWORU

Jedną z ważniejszych cech komórek nowotworowych jest zdolność do przerzutowania. Proces ten związany jest ze zmianami w komórce, jak i w macierzy zewnątrzkomórkowej, które powodują, że komórki mogą migrować. Podobne zmiany obserwuje się w starzejącym się organizmie. Zmiany w układzie białek kurczliwych komórki i zmiany w macierzy zewnątrzkomórkowej umożliwiają migrację komórek, w przypadku nowotworów dochodzi do tworzenia pseudopodiów inwazyjnych (invadopodia), w przypadku komórek starzejących się do takich zmian składników macierzy komórkowej, które ułatwiają ruch komórek zdolnych do migracji [3]. I tak stwierdzono, że w fibroblastach starzejących się następuje nadekspresja składników zewnątrzkomórkowej macierzy, takich jak: α 1-prokolagen, osteonektyny, fibronektyny i lamininy (zmieniają one między innymi kinetykę formowania, np. zwijania, elementów włóknistych macierzy zewnątrzkomórkowej, powodując jej „rozluźnienie” i możliwość migracji różnych komórek zdolnych do przemieszczania się). Podobnie zjawisko ma to miejsce w fibroblastach stransformowanych zmutowanym onkogenem *ras*. Transformacja ta wpływa na wzrost migracji komórek [16]. Jednocześnie w tych komórkach ekspresja genu osteonektyny jest hamowana przez zmutowany czynnik transkrypcyjny *c-jun*. W innych komórkach starzejącej się linii fibroblastycznej stwierdzono dodatkowo ekspresję aktywatora plazminogenu typu urokinazy (czynniki powodujące degradację macierzy zewnątrzkomórkowej) [32] i metaloproteaz, jak również pewnych białek macierzy zewnątrzkomórkowej. Takie same zmiany obserwowano w komórkach stransformowanych [18, 10]. W limfocytach pobranych od osób po 65. roku życia, stwierdzono podobnego typu zależności – zwiększał się poziom receptora elastyna-laminina [37]. Zarówno elastyna, jak i laminina wzrastały 10-krotnie w zewnątrzkomórkowej macierzy w przypadku inwazji komórek nowotworowych [2]. Ogromną rolę jak się wydaje w obu procesach – starzeniu i nowotworzeniu – odgrywa zawartość zarówno w komórce, jak i w zewnątrzkomórkowej macierzy soli kwasu hialuronowego, wytwarzanego w komórce (w wyniku działania syntazy), a degradowanego przez lizosomalne hialuronidazy [29], który w komórkach młodych i prawidłowych nie ulega degradacji i gromadzi się w cytoplazmie, podczas gdy w komórkach starych i nowotworowych spotykany jest głównie jako składnik macierzy zewnątrzkomórkowej, ułatwiając jak się wydaje migrację komórek [11]. Tak więc wydaje się, że komórki nowotworowe i starzejące się zmieniają w podobny sposób skład zewnątrzkomórkowej macierzy. Stąd, jak się wydaje w starzejącym się organizmie w pewnych wypadkach mogą zaistnieć warunki sprzyjające przerzutowaniu komórek nowotworowych.

ROLA TELOMERAZY W PROCESACH STRZENIA I NOWOTWORZENIA

Jak wiadomo, skracanie telomerów w komórkach dzielących się [20] zwiększa się wraz z wiekiem, czemu towarzyszy niestabilność genomu związana ze skracaniem się czasu przeżycia i występowania nowotworów. W przypadku gdy komórki charakteryzują się wysoką aktywnością enzymu zapobiegającemu skracaniu telomerów – telomerazy wydają się być w niektórych hodowlach „nieśmiertelne” i dzielić jak się wydaje w nieskończoność (osiągnięto 165 podziałów), a wszczepione do organizmu nie dawać przerzutów nowotworowych [12]. Z kolei myszy, pozbawiane genu telomerazy, żyją nie tylko krócej o jedną czwartą, szybciej się starzeją, lecz również charakteryzuje je dziesięciokrotne zwiększenie zapadalności na nowotwory złośliwe [39], jak więc widać, niezwykle istotną rolę w obu omawianych procesach odgrywa aktywność telomerazy. Wpływając na niestabilność genomu [24] powoduje nie tylko dyfunkcję telomerów, ale również fuzję końców telomerów. W procesie starzenia odgrywa kluczową rolę nie tylko aktywność telomerazy, lecz także jednocześnie inaktywacja drogi $p16^{INK4a}/p53$. Aktywacja tej drogi powodowana jest przez wiele fizjologicznych reakcji stresowych [47] i nieinaktywowanie drogi $p16^{INK4a}/p53$ prowadzi do aberacji chromosomalnych związanych często z transformacją nowotworową, a czasem ze śmiercią komórki. Tak więc według badaczy telomerazy istnieje cienka linia między nieśmiertelnością, starzeniem się komórek a transformacją nowotworową.

ZAKOŃCZENIE

Jak więc widać z przedstawionych prac, prawdopodobieństwo wystąpienia nowotworu zwiększa się wraz z wiekiem. Taka korelacja rodzi oczywiście pytanie o możliwości powiązania przyczynowego obu procesów. W ciągu ostatnich lat postęp wiedzy na temat genetycznych podstaw mechanizmów powstawania nowotworów oraz mechanizmów starzenia może doprowadzić do wniosku, że uszkodzenia regulacji genów, powodują destabilizację elementów procesów regulacyjnych zarówno na poziomie komórkowym, jak i w całym organizmie [21]. Tylko prawidłowa regulacja genów w różnicującym się organizmie może zabezpieczyć komórkę przed transformacją nowotworową [9]. Tak więc genetyczna regulacja stoi u podstaw obu procesów i ich wzajemnego powiązania. Stąd też nie każda starzejąca się komórka ulega transformacji nowotworowej. Są to z pewnością dwa różne procesy, mające jednak pewne powiązania genetyczne, stąd ta pozytywna korelacja.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AHUJA N, QUING LI, AVINASH L, MOHAN, STEPHEN B BAYLIN, JEAN-PIERRE J ISSA. Aging and DNA Methylation in Colorectal Mucosa and Cancer. *Cancer Research* 1998; **58**: 5489–5494.
- [2] BRENNER E, GROSS, STEINBACH F, HORN S, HOHENFELLNER R, THUROFF J W. Differential inhibition of renal cancer cell invasion mediated by fibronectin, collagen IV and laminin. *Cancer Lett* 2000; **155**: 199–205.
- [3] BUTTON E, SHAPLAND C, LAWSON D. Actin, its associated proteins and metastasis *Cell Motility and the cytoskeleton and metastasis* 1995, **30**: 247–251.
- [4] CAMPISI J. Cancer, aging and cellular senescence. *In vivo* 2000; **14**: 83–188
- [5] CAVENEE WK, WHITE RL. Genetyczne podstawy raka. *Świat Nauki* 1995; **45**: 46–54..
- [6] CHOW M, KONG M, RUBIN H. Unmasking large and persistent reductions in proliferation rate of aging cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1997; **33**: 809–818.
- [7] CHOW M, RUBIN H. The cellular ecology of progressive neoplastic transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 2093–2098.
- [8] COSTELLO JF, BERGER MS, HUANGH-JS, CAVENE EWK. Silencing *p16/CDKN2* expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation. *Cancer Res* 1996; **56**: 2405–2410.
- [9] CUTLER RG, SEMSEI I. Development, cancer and aging: possible common mechanisms of action and regulation. *J Gerontol* 1989; **44**: 25–34.
- [10] EATOCK MM, SCHATZLEIN A, KAYE SB. Tumour vasculature as a target for anticancer therapy *Cancer Treat. Rev* 2000; **26**: 191–204.
- [11] EVANKO SP, WIGHT TN. Intracellular localization of hyaluronan in proliferating cells. *J Histochem Cytochem* 1999; **47**: 1331–42.
- [12] FERBER D. Immortalized cells seem cancer-free so far. *Science*. 1999; **283**: 154–155.
- [13] FISHER GH. Appearance of D-amino acids during aging: D-amino acids in tumor proteins. *EXS* 1998; **85**: 109–118.
- [14] FOSSEL M. Cell senescence in human aging: a review of the theory. *In Vivo* 2000; **14**: 29–34.
- [15] GARKAVTSEV I, GRIGORIAN IA, OSSOVSKAYA VS, CHERNOV MV, CHUMAKOV PM, GUDKOV AV. The candidate tumour suppressor p33ING1 cooperates with p53 in cell growth control. *Nature* 1998; **391**: 295–298.
- [16] GONOS ES, DERVENTZI A, KVEIBORGM, AGIOSTRATIDOU G, KASSEM M, CLARK BF, JAT PS, RATTAN SI. Cloning and identification of genes that associate with mammalian replicative senescence. *Exp Cell Res* 1998; **240**: 66–74.
- [17] GOTO M., YAMABE Y, SHIRATORI M, OKADA M, KAWABE T, MATSUMOTO T, SUGIMOTO M, FURUICHI Y. Immunological diagnosis of Werner syndrome by down-regulated and truncated gene products. *Hum Genet* 1999; **105**: 301–307.
- [18] GRILLARI J, HOHENWARTER O, GRABHERR RM, KATINGER H. Subtractive hybridization of mRNA from early passage and senescent endothelial cells. *Exp Gerontol* 2000; **35**: 187–197.
- [19] ISAACSON W. Our Century and the next one. *Time Magazine* 1998; **15**: 70–206.
- [20] JARUGA E. Udział telomerów w regulacji podziałów komórkowych i starzeniu się. *Kosmos* 1999; **48**: 225–264.
- [21] KAISER HE. Aging and neoplastic progression. *In vivo* 1998; **12**: 691–693.
- [22] KITAO S, OHSUGI I, ICHIKAWA K, GOTO M, FURUICHI Y, SHIMAMOTO A. Cloning of two new human helicase genes of the RecQ family: biological significance of multiple species in higher eukaryotes. *Genomics* 1998; **54**: 443–452.
- [23] KONG Q, LILLEHEI KO. Antioxidant inhibitors for cancer therapy. *Med Hypotheses* 1998; **51**: 405–409.

- [24] LENGAUER C, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998; **396**: 643–649.
- [25] LIEBER MR. Pathological and physiological double-strand breaks- roles in cancer, aging and the immune system. *Amer J Pathol* 1998; **153**: 1323–1332.
- [26] LIM DS, VOGEL H, WILLERFORD DM, SANDS AT, PLATT KA, HASTY P. Analysis of ku80-mutant mice and cells with deficient levels of p53. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 3772–3780.
- [27] LOFT S, POULSEN HE. Estimation of oxidative DNA damage in man from urinary excretion of repair products. *Acta Biochim Pol* 1998; **45**: 133–144.
- [28] LUCY, LEE HC, FAHN HJ, WEI YH. Oxidative damage elicited by imbalance of free radical scavenging enzymes is associated with large-scale mtDNA deletions in aging human skin. *Mutat Res* 1999; **423**: 11–21.
- [29] MCCOURT PA. How does the hyaluronan scrap-yard operate? *Matrix Biol.* 1999; **18**: 427–432.
- [30] MYŚLIWSKA J. Odpowiedź immunologiczna w procesie starzenia. *Kosmos* 1999; **48**: 169–180.
- [31] NINABER A, GOODFELLOW JM. The biological implication of damage to DNA incorporating an 8-oxodeoxyguanine: cytosine base pair. *J Biomolecul Struct Dynamics* 1998; **16**: 651–661.
- [32] OKUSA Y, ICHIKURA T, MOCHIZUKI H. Prognostic impact of stromal cell-derived urokinase-type plasminogen activator in gastric carcinoma. *Cancer* 1999; **85**: 1033–1038.
- [33] PALMIERI D, WATSON JM, RINEHART CA. Age-related expression of PEDF/EPC-1 in human endometrial stromal fibroblasts: implications for interactive senescence. *Exp Cell Res* 1999; **247**: 142–1477.
- [34] PAWELEC G, EFFROS RB, CARUSO C, REMARQUE E, BARNETT Y, SOLANA RT. Cells and aging. *Front Biosci* 1999; **4**: 216–269.
- [35] PONNAPPAN U. Regulation of transcription factor NFkappa B in immune senescence. *Front Biosci* 1998; **3**: 152–168.
- [36] RICHARDSON B, YUNG R. Role of DNA methylation in the regulation of cell function. *J Lab Clin Med* 1999; **134**: 333–340.
- [37] ROBERT L, PETERSZEGI G. Aging and matrix biology. *Pathol Biol* 1998; **46**: 491–495.
- [38] RODRIGUEZ H, AKMAN SA. Mapping oxidative DNA damage at nucleotide level. *Free Radic Res* 1998; **29**: 499–510.
- [39] RUDOLPH KL, CHANG S, LEE HW, BLASCO M, GOTTLIEB GJ, GREIDER C, DEPINHO RA. Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell* 1999; **96**: 70.
- [40] SERRANO M. Tumor suppressor protein p16INK4a. *Exp Cell Res* 1997; **237**: 7–13.
- [41] SHEN JC, GRAY MD, OSHIMA J, LOEB LA. Characterization of Werner syndrome protein DNA helicase activity: directionality, substrate dependence and stimulation by replication protein A. *Nucleic Acids Res* 1998; **26**: 2879–2885.
- [42] SHIRATORI M, SAKAMOTO S, SUZUKI N, TOKUTAKE Y, KAWABE Y, ENOMOTO T, SUGIMOTO M, GOTO M, MATSUMOTO T, FURUICHI Y. Detection by epitope-defined monoclonal antibodies of Werner DNA helicases in the nucleoplasm and their upregulation by cell transformation and immortalization. *J Cell Biol* 1999; **144**: 1–9.
- [43] TONON L, BERGAMASCHIG, DELLAVECCHIA C, ROSTI V, LUCOTTIC, MALABARBA L, NOVELLA A, VERCESI E, FRASSONI F, CAZZOLA M. Unbalanced X-chromosome inactivation in haemopoietic cells from normal women. *Br J Haematol* 1998; **102**: 996–1003.
- [44] VOGEL H, LIM DS, KARSENTY G, FINEGOLD M, HASTY P. Deletion of Ku86 causes early onset of senescence in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 10770–10775.
- [45] VOGELSTEIN B, FEARON ER, KERN SE, HAMILTON SR, PREISINGER AC, NAKAMURA Y, WHITE R. Allelotype of colorectal cancers. *Science* 1989; **244**: 207–211.

- [46] WEI YH. Mitochondrial DNA alterations as ageing-associated molecular events. *Mutat Res* 1992; **275**: 45–55.
- [47] WEINBERG RA. Bumps on the road to immortality. *Nature* 1998; **396**: 23–24.

Adres autora: ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa
email:mlb@nencki.gov.pl

LIPIDY KOMÓRKI NOWOTWOROWEJ – WYBRANE ZAGADNIENIA

LIPIDS OF CANCER CELL – SELECTED TOPICS

Sławomir PIKUŁA

Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego, Warszawa

Streszczenie: Metabolizm lipidów odgrywa podstawową rolę w biogenezie błon biologicznych, w wytwarzaniu lipidowych przekaźników informacji, a także w naprawie uszkodzeń błon wywołanych przez czynniki stresogenne. Niedawno zaobserwowano, że zmiany równowagi pomiędzy syntezą a degradacją lipidów towarzyszą wczesnym etapom rozwoju nowotworów. W niniejszym artykule omówiono związek pomiędzy uszkodzeniami błon biologicznych a kancerogenezą, scharakteryzowano zmiany struktury błon i metabolizmu lipidów w komórkach nowotworowych, przedyskutowano znaczenie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych i mikrodomen lipidowych w oporności wielolekowej komórek oraz opisano oddziaływanie niektórych leków przeciwnowotworowych z lipidami błon biologicznych. Z zebranych informacji wynika, że na wczesnych etapach kancerogenezy na poziomie komórkowym dochodzi do rewolucyjnych zmian metabolizmu lipidów, które w konsekwencji prowadzą do zmiany składu chemicznego błon komórek nowotworowych, zaburzeń procesów przekazywania informacji oraz zmian właściwości elektrycznych i strukturalnych błon.

(*Postępy Biologii Komórki* 2000; *Supl. 15*: 57–77)

Słowa kluczowe: kancerogeneza, struktura błon, stres oksydacyjny, metabolizm fosfolipidów, wielonienasycone kwasy tłuszczowe, mikrodomeny lipidowe, oporność wielolekowa.

Summary: Lipid metabolism plays a pivotal role in membrane biogenesis, synthesis of lipid second messengers and membrane repair processes. Recently, disturbances in a balance between synthesis and degradation of lipids have been ascribed to participate at early stages of cancer development. Therefore, in this article the following topics are discussed: relationship between membrane damage and cancerogenesis, characteristics of changes of membrane structure and lipid metabolism in cancer cells, a role of polyunsaturated fatty acids and lipid microdomains in multidrug resistance, and interactions of some anti-cancer drugs with membrane lipids. Taken together, these observations suggest that at early stages of cancer development crucial changes in lipid metabolism occur, that lead to remodelling of membrane chemical composition, disturbances of signal transduction, and changes of electric and structural properties of cell membranes.

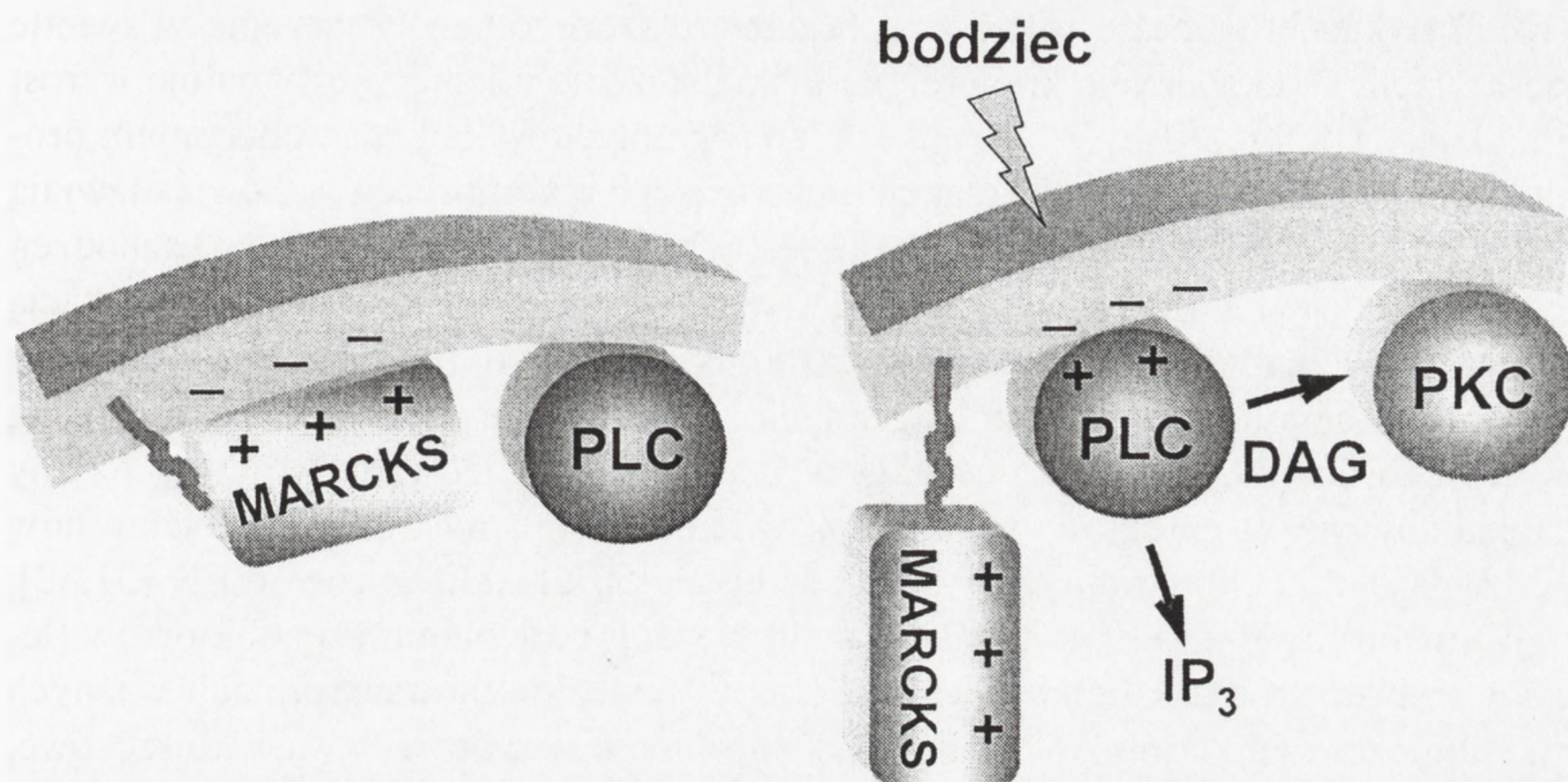
(*Advances in Cell Biology* 2000; *Suppl. 15*: 57–77)

Key words: cancerogenesis, membrane structure, oxidative stress, phospholipid metabolism, polyunsaturated fatty acids, lipid microdomains, multidrug resistance

WSTĘP

Obecny stan wiedzy nie pozwala na sformułowanie jednego uniwersalnego mechanizmu tłumaczącego przekształcenie fenotypu komórki z normalnego w nowotworowy. Zarówno wady genetyczne, toksyczne związki chemiczne, onkowirusy, infekcje bakteryjne, stres oksydacyjny, jak i niezrównoważona dieta mogą przyczyniać się do zaburzenia delikatnej równowagi ustroju, co prowadzi do rozwoju nowotworów. Jednak coraz częściej badacze zwracają uwagę na istnienie związku przyczynowo-skutkowego pomiędzy zmianami składu lipidowego, struktury i funkcji błon biologicznych a wczesnymi etapami rozwoju nowotworu [1–3]. Dodatkowo, za jedną z pierwotnych przyczyn powstawania nowotworów uważane są również stesy: chemiczny i oksydacyjny, podczas których ulegają uszkodzeniom lipidy błonowe [4–6]. Komórki nowotworowe charakteryzują się również zaburzeniami metabolizmu lipidowego [7–10] oraz procesów przekazywania informacji za pośrednictwem cząsteczek pochodzących z przemian lipidów [11–14]. Niniejszy artykuł jest poświęcony omówieniu roli lipidów w procesach kancerogenezy.

Wczesnym etapom rozwoju nowotworu towarzyszą uszkodzenia błony plazmatycznej komórek: zaburzenia jej właściwości elektrycznych (zmiany równowagi elektrycznej) i zmiany potencjału błonowego. W efekcie dochodzi do zmian wewnątrzkomórkowego pH (alkalizacja cytoplazmy), do utraty zdolności komórek do komunikowania się z innymi komórkami, do zmiany kształtu komórek w wyniku uszkodzenia struktury cytoszkieletu oraz do zaburzeń transportu jonów i metabolitów przez błony [3]. Zmiany tempa transportu różnych substancji przez błony prowadzą w konsekwencji do utraty wewnątrzkomórkowej homeostazy jonów i do rozregulowania metabolizmu komórki. Zmiany właściwości błon pociągają za sobą utratę równowagi pomiędzy procesami syntezy i naprawy uszkodzeń DNA (akumulacja uszkodzeń), upośledzoną transkrypcję informacji genetycznej, zaburzenia cyklu komórkowego i metabolizmu lipidów. Zmieniony metabolizm lipidów jest bezpośrednią przyczyną zaburzeń wytwarzania lipidowych przekaźników informacji [11–14] i zmian składu chemicznego błon biologicznych [7–10]. Za zmiany składu lipidowego błon odpowiadają także zmiany lokalizacji enzymów uczestniczących w syntezie i degradacji lipidów, zmiany ekspresji genów kodujących te enzymy (np. syntazy kwasów tłuszczowych, fosfolipaz, kinaz fosfolipidów inozytolowych [15–17]). Równolegle dochodzi do zmian ekspresji genów białek transportujących lipidy [18], białek wiążących lipidy: aneksyn [19,20] i białek C2 [21,22], oraz białek biorących udział w przekazywaniu sygnałów, np. MARCKS (ang. *myri-*



RYSUNEK 1. Udział białek MARCKS w regulacji wytwarzania wtórnych przekaźników informacji (DAG i IP₃). Fosfolipidy inzytolowe w błonie plazmatycznej, odarzone wypadkowym ładunkiem ujemnym, oznaczono na rysunku symbolem (-)

styoylated alanine-rich C kinase substrates) [23] i SREBP (ang. *sterol regulatory element-binding protein*) [11].

Przytoczone powyżej fakty wskazują, że lipidy są nieodłącznymi partnerami przemian zachodzących w komórce nowotworowej. Na rysunku 1 przedstawiono, w jaki sposób białka wiążące specyficzne klasy lipidów, np. fosfolipidy inozytolowe, mogą regulować wytwarzanie lipidowych przekaźników informacji: diacyloglicerolu (DAG), który jest aktywatorem kinazy białkowej C (PKC) [23] i inozytolotrisfosforanu (IP₃), który jest kluczowym związkiem regulującym homeostazę jonów wapnia w komórkach, wiążąc się ze swoim receptorem – kanałem uwalniającym Ca²⁺ z endoplazmatycznego retikulum (ER) [24].

Lipidy odgrywają również istotną rolę w mechanizmach programowanej śmierci komórek. Utrata asymetrycznego rozmieszczenia lipidów w błonie, w wyniku zahamowania aktywności translokazy aminofosfolipidów, jest sygnałem dla białka osocza krwi (glikoproteiny I beta2), które wiążąc się z błoną tych komórek sprawia, że są one rozpoznawane przez makrofagi i niszczone [2]. Wzrost stężenia lipidów eterowych i ceramidów w błonach prowadzi do indukcji apoptozy [25,26], zaś przedłużona ekspozycja komórek na przeciwutleniacze wzmacnia ekspresję białka bcl2, czego wynikiem jest zahamowanie apoptozy [27,28].

STRES OKSYDACYJNY A KANCEROGENEZA

Jak już wspomniano, jedną z teorii na temat przyczyn powstawania nowotworów, która zdobyła wielu zwolenników, jest teoria o udziale reaktywnych form tlenu

(RFT) w kancerogenezie [6]. Teoria ta nabiera szczególnego znaczenia w świetle obserwacji, że ekspozycja komórek na niskie stężenie utleniaczy stymuluje wzrost i podziały komórek [6]. W warunkach stresogennych RFT, będąc ubocznymi produktami wielu fizjologicznych reakcji zachodzących w komórkach ssaków, pojawiają się w takim nadmiarze, że organizm nie jest w stanie nadążyć z naprawą uszkodzeń białek, lipidów i kwasów nukleinowych, wywołanych nieodwracalną modyfikacją struktury tych makrocząsteczek przez rodniki [6]. Modyfikacje te prowadzą do uszkodzeń genotoksycznych, mutagennych i kancerogennych, stając się przyczyną wielu chorób [29,30]. RFT powstają w reakcjach katalizowanych przez enzymy zlokalizowane w peroksosomach, a także białka łańcucha transportu elektronów w błonach mitochondrialnych i cytochromy P-450 zlokalizowane w ER [31,32].

Cytochromy P-450 biorą udział w hydroksylacji i utlenianiu ksenobiotyków (leków, trucizn, środków ochrony roślin) oraz w syntezie i biotransformacji ważnych fizjologicznie endobiotyków, takich jak: hormony sterydowe, kwasy tłuszczowe, kwasy żółciowe, pochodne witaminy D₃, prostaglandyny, leukotrieny i aminy biogenne [33]. Cytochromy P-450 do prawidłowego funkcjonowania wymagają obecności określonych rodzajów molekularnych fosfatydyloetanolaminy (PE) i fosfatydyloseryny (PS), szczególnie tych rodzajów molekularnych wymienionych fosfolipidów, które zawierają reszty wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w pozycji *sn*-2 (PUFA; ang. *polyunsaturated fatty acids*) [34]. Odpowiedni poziom tych rodzajów molekularnych fosfolipidów zapewnia ich synteza w zależności od stężenia jonów wapnia reakcji wymiany zasad fosfolipidów [35–37]. Z drugiej strony należy zwrócić uwagę na fakt, że reszty acylowe fosfolipidów są najbardziej narażone na utlenianie w obecności RFT. W odróżnieniu od stechiometrycznej reakcji RFT z białkami i kwasami nukleinowymi, utlenienie pojedynczych cząsteczek fosfolipidów zapoczątkowuje reakcję łańcuchową powielania wolnych rodników [38]. Produkty tej reakcji, tj. nadtlenki lipidów, prowadzą do destabilizacji błon i zmiany ich właściwości fizykochemicznych. Natomiast aldehydy (np. 4-hydroksynonenal) oddziałują z grupami aminowymi fosfolipidów i białek bądź z grupami tiolowymi białek, np. z sekwencją redukującą -Cys-Gly-Pro-Cys-, powodując inaktywację tych makrocząsteczek [39].

Jednym z wielu mechanizmów zabezpieczających błony przed skutkami działania RFT jest wzmożona resynteza fosfolipidów i zmiany wzajemnego stosunku ich rodzajów molekularnych [34]. Kluczową reakcją, obok mechanizmu acylacji i deacylacji lipidów, biorącą udział w postawianiu nowych rodzajów molekularnych tych związków, jest reakcja wymiany zasad fosfolipidów, związana ze stanem metabolicznym komórki (w tym homeostazą jonów wapnia), potencjałem oksydo-redukcyjnym błon i poziomem naturalnych przeciwutleniaczy [34,36,37]. Przypuszcza się, że poznanie mechanizmów regulujących syntezę fosfolipidów w reakcji wymiany zasad przyczyni się do określenia związków pomiędzy rozwojem nowotworów a zmianami składu lipidowego błon.

Wyniki badań nad wpływem utleniania lipidów i zmian stanu oksydo-redukcyjnego błon na wydajność syntezy PE w reakcji katalizowanej przez enzym wymieniający etanoloaminę w cząsteczkach PS i PC wskazują, że aktywność tego białka jest stymulowana w obecności przeciwutleniaczy (butylowanego hydroksytoluenu) i nienasyconych kwasów tłuszczowych (kwasu oleinowego i linolenowego). Podczas gdy utleniacze (np. Fe^{2+} , askorbinian, NADPH), generując nadtlenki lipidów, znacznie obniżają wydajność syntezy PE w badanej reakcji [34]. Jak wykazano, również związki reagujące z grupami tiolowymi hamują powstawanie PE drogą wymiany zasad [36]. Na podstawie tych wyników można zaproponować, że zarówno proporcja grup -SH/-S-S- w białkach, jak i poziom lipidowych hydroksynadtlenków (generowanych nieenzymatycznie lub w reakcjach zależnych od cytochromu P-450) są w równym stopniu odpowiedzialne za inaktywację enzymu wymieniającego etanoloaminę w ER. Wobec powyższego, resynteza uszkodzonych rodzajów molekularnych PE może być jednym z mechanizmów obrony komórki przed działaniem RFT [34,37,40,41].

Hipoteza ta znalazła częściowe potwierdzenie w wynikach badań dotyczących udziału peroksysomalnych enzymów w ochronie cząsteczek fosfolipidów wątroby przed RFT. Stymulację proliferacji peroksysomów, a więc i produkcji RFT, powodują leki hypolipidemiczne, np. kwas klofibrowy [37,40,41]. W wątrobie gryzoni związek ten indukuje zmiany metabolizmu fosfolipidów i kwasów tłuszczowych, m.in. przez stymulację aktywności enzymów uczestniczących w syntezie fosfatydylocholiny (PC) drogą *de novo* oraz za hamowanie aktywności metylotransferazy PE [37]. Kwas klofibrowy jest stosowany w leczeniu hiperlipoproteinemii typu IV, polegającej m.in. na zwiększeniu stężenia VLDL (ang. *very low density lipoproteins*) w surowicy [42–44], co predysponuje do powstania i rozwoju miażdżycy oraz jej skutków w postaci choroby niedokrwiennej serca i zawału [45]. Oprócz obniżenia poziomu VLDL, triacylogliceroli i cholesterolu w osoczu (efekt hypolipidemiczny) kwas klofibrowy wywołuje wzrost masy wątroby (bez zwiększenia liczby komórek), wzrost liczby peroksysomów i mitochondriów, zmiany aktywności wielu enzymów, w tym również enzymów zaangażowanych w metabolizmie lipidów [37].

Na poziomie molekularnym, kwas klofibrowy oddziałuje z receptorami zlokalizowanymi w otoczce jądrowej, tzw. receptorami PPAR (ang. *peroxisome proliferator activated receptors*). Receptory te należą do tej samej rodziny białek receptorowych, co receptory glikokortykoidów, mineralokortykoidów, estrogenów, androgenów, witaminy D_3 i hormonów tarczycy [44]. U zwierząt, którym podano kwas klofibrowy albo w diecie, albo dootrzewnowo, zaobserwowano zwiększenie poziomu fosfolipidów (w tym dwukrotny wzrost zawartości PE), DNA i zredukowanej formy glutationu (GSH) [37,46]. Na podstawie badań metabolizmu lipidów można przypuszczać, że kwas klofibrowy indukuje ekspresję genu kodującego enzym wymieniający etanoloaminę lub wywołuje jego modyfikacje posttranslacyjne zachodzące w peroksysomach [37,46]. Możliwy też jest inny mechanizm działania

leku, polegający na zmianie składu kwasów tłuszczowych w fosfolipidach, substratach błonowych reakcji wymiany etanoloaminy, jak również na zmianie potencjału oksydo-redukcyjnego błon regulującego aktywność enzymu w wyniku specyficznej indukcji cytochromu P-450 [37,40,41].

Na podkreślenie zasługuje fakt, że zarówno zmiany morfologiczne, jak i biochemiczne mają przy krótkotrwałym podawaniu kwasu klofibrowego, charakter odwracalny. Długotrwałe podawanie leku powoduje u zwierząt zwiększenie częstotliwości powstawania nowotworów wątroby, prawdopodobnie ze względu na stymulację tworzenia w komórkach RFT lub aktywację niekontrolowanej proliferacji komórek [47].

PRZEBUDOWA BŁON KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

Komórki nowotworowe charakteryzują się zmianami morfologicznymi, polegającymi na spadku zawartości błon, powstawaniu anormalnych połączeń błon mitochondrialnych z ER oraz zmianach składu chemicznego błon [48–51]. Szczególnym celem tych zmian jest PE, stanowiąca 30–40% fosfolipidów błon komórek zwierzęcych. PE, w odróżnieniu od PC, stanowiącej ponad 50% fosfolipidów, charakteryzuje się zdolnością do tworzenia struktur heksagonalnych w dwuwarstwach lipidowych [36]. Cecha ta ma znaczenie w regulacji aktywności integralnych białek błonowych, co zostało doświadczalnie potwierdzone dla niektórych enzymów i białek transportujących [36,52]. PE jest syntetyzowana w różnych przedziałach komórkowych, gdzie tworzy odrębne, wzajemnie wymieniające się pule. Dwie z nich powstają z etanoloaminy w ER. Największa pula tworzy się w trakcie przekształceń etanoloaminy do fosfoetanoloaminy, CDP-etanoloaminy i, w obecności DAG, ostatecznie do PE (tzw. synteza *de novo*). Mniejsza pula fosfolipidu (<10%), różniąca się od poprzedniej składem kwasów tłuszczowych, powstaje w wyniku reakcji wymiany seryny lub choliny na etanoloaminę w polarnej części fosfolipidów ER. Trzecia pula PE jest syntetyzowana w błonach mitochondriów, w reakcji dekarboksylacji PS. PS jest syntetyzowana w ER wyłącznie w reakcji wymiany zasad, skąd jest transportowana z powrotem do błon mitochondrialnych. Pule PE powstające w ER, stanowią m.in. substrat do resyntezy cząsteczek PS, natomiast pula mitochondrialna jest transportowana do ER, gdzie ulega metylacji do PC [35,46,53].

Ulegające wzajemnym przekształceniom klasy i rodzaje molekularne fosfolipidów są materiałem budulcowym w procesie biogenezy różnych systemów błon w komórce, w tym otoczki jądrowej i błony plazmatycznej, które są pozbawione większości enzymów syntezy lipidów. Niektóre fosfolipidy i kwasy tłuszczowe wywierają istotny wpływ na regulację procesów replikacji i transkrypcji DNA, mających kluczowe znaczenie w kancerogenezie [54].

W prawidłowych tkankach szybko rosnących (wątroba stymulowana do wzrostu przez częściową hepatektomię lub podanie kwasu klofibrowego), które są dobrymi modelami do badania procesów biogenezy błon, zwiększenie zawartości PE w porównaniu z tkankami wolno rosnącymi, może być spowodowane aktywacją enzymu wymieniającego etanoloaminę w cząsteczkach określonych rodzajów molekularnych fosfolipidów ER [37]. Aktywację tej reakcji zaobserwowano również w ER izolowanym z wątrób szczurów głodzonych [34], które wykorzystują zamiast glukozy endogenne kwasy tłuszczowe jako główny substrat energetyczny. Fakt ten może świadczyć o istnieniu zależności pomiędzy syntezą PE a stanem metabolicznym komórek [34].

Badano również, czy biosynteza PE zachodzi w tkankach nowotworowych podobnie jak w tkankach prawidłowych. Tkanekę modelową stanowił wątrobiak Morrisa 7777 (HM7777), guz, który indukowany jest u szczurów przez podanie zwierzętom kwasu N-2-fluorenyloftalowego [46]. Komórki wątrobiaka, morfologicznie zbliżone do hepatocytów, różnią się jednak od nich oprócz tempa wzrostu, stopniem zróżnicowania wewnątrzkomórkowego, metabolizmem kwasów tłuszczowych oraz selektywnością włączania nasyconych i nienasyconych reszt acylowych w pozycje *sn-1* i *sn-2* szkieletu glicerolowego fosfolipidów [46]. Charakterystyczna jest w tych komórkach zwiększona ilość wolnych kwasów tłuszczowych, plazmalogenów i estrów steroli, podwyższona aktywność enzymów glikolitycznych i znacznie obniżona aktywność enzymów glukoneogenezy (np. glukozy-6-fosfatazy) [46].

Komórki HM7777, transplątowane w mięsień udowy szczurów rasy Buffalo, hodowano 4–5 tygodni. We frakcjach subkomórkowych pochodzących z komórek HM7777 (mitochondria, ER, frakcja cytozolowa) zaobserwowano istotne różnice w zawartości i rozmieszczeniu PE oraz w aktywnościach enzymów różnych szlaków biosyntezy tego fosfolipidu, w porównaniu z normalnymi hepatocytami [46]. Aktywność enzymu wymieniającego etanoloaminę była około 20-krotnie wyższa w mitochondriach HM7777 i 2.5-krotnie niższa w ER niż aktywności oznaczone we frakcjach subkomórkowych hepatocytów. Wyniki tych badań wskazują, że zwiększenie zawartości PE w tkankach szybko rosnących może być związane z aktywacją enzymu wymieniającego etanoloaminę w cząsteczkach określonych rodzajów molekularnych fosfolipidów ER. Wskazują one również na zmianę organizacji błon wewnątrzkomórkowych i zaburzenie segregacji białek enzymatycznych pomiędzy odpowiednimi przedziałami w komórkach HM7777 (tab. 1). Szczególnie wysoka aktywność enzymu wymieniającego etanoloaminę w mitochondriach komórek HM7777 może być związana z integracją ER z zewnętrzną błoną mitochondriów lub zaburzeniami mechanizmów kierujących białka do błon określonych przedziałów komórkowych [46]. Podobny mechanizm może mieć znaczenie także w przypadku innych typów nowotworów.

TABELA 1. Zmiany wewnątrzkomórkowego rozmieszczenia niektórych enzymów syntetyzujących fosfolipidy w komórkach wątrobiaka Morrisa (HM7777) w porównaniu z normalnymi hepatocytami

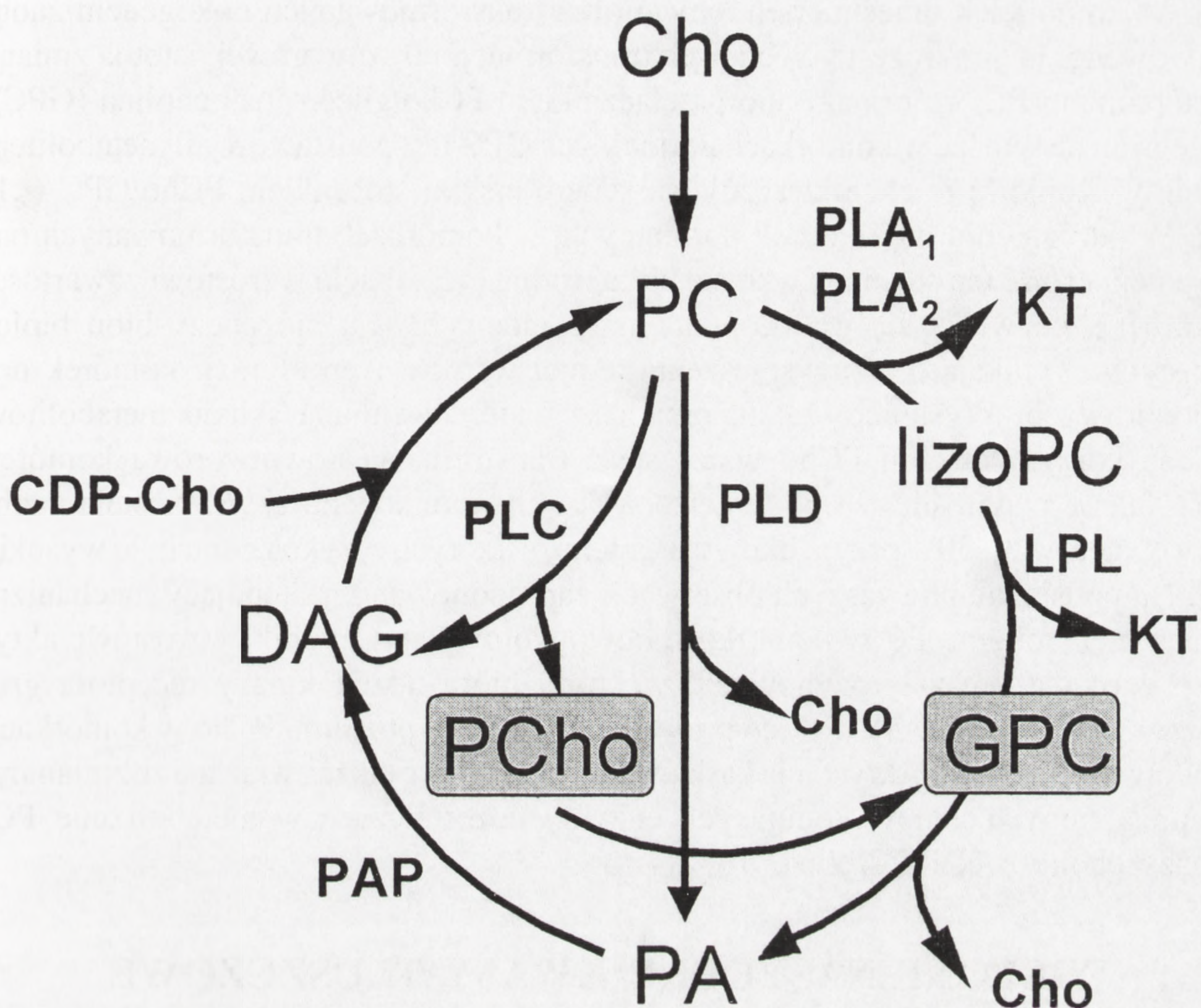
Fracje subkomórkowe		Aktywność [pmol/mg białka/min]		
enzymy	komórki	cytozol	mitochondria	ER
Cytydylilotransferaza CTP:PEth	hepatocyty	1863	0	63
	HM7777	1264	0	298
Dekarboksylaza PS (PSD)	hepatocyty	0	950	42
	HM7777	0	1330	36
Enzym wymieniający zasady fosfolipidów	hepatocyty	0	6	76
	HM7777	0	96	24

Cytydylilotransferaza CTP:fosfoetanolamina (PEth) enzym szlaku syntezy *de novo* PE, zlokalizowany jest w komórkach normalnych przede wszystkim w cytozolu; tylko niewielka frakcja enzymu wiąże się odwracalnie z błonami [35]. PSD katalizująca reakcję dekarboksylacji PS do PE, jest typowym enzymem błon mitochondrialnych [35]. Aktywność PSD zmierzona we frakcji ER może wynikać z zanieczyszczenia tej frakcji błonami mitochondrialnymi w trakcie preparatyki. Enzym wymieniający zasady w cząsteczkach fosfolipidów (PS i PC) na etanolaminę, w wyniku czego powstaje PE, zmienia swoją wewnątrzkomórkową lokalizację w komórkach nowotworowych, z typowej dla hepatocytów (ER) na nietypową (błony mitochondrialne) [46].

PRZEŁĄCZNIK FOSFOCHOLINA/GLICEROFOSFOCHOLINA

W poprzednim rozdziale zwrócono uwagę na znaczenie metabolizmu fosfolipidów, szczególnie PE, w procesach transformacji nowotworowej i w zmianach struktury błon komórek nowotworowych. Najpowszechniej występujący w błonach biologicznych fosfolipid, PC, wraz z PE i lipidami neutralnymi odgrywa podstawową rolę w utrzymywaniu struktury błony jako dwuwarstwy lipidowej i zachowaniu jej integralności [53]. Dodatkowo wykazano, że procesy biosyntezy i hydrolizy PC mają kluczowe znaczenie w przekazywaniu sygnału mitogenicznego w komórkach, a produkty i substraty metabolizmu PC: fosfocholina (PCho), DAG i kwas arachidonowy oraz jego metabolity, odgrywają rolę przekaźników informacji (rys. 2).

Czynnik martwicy nowotworów, TNF α (ang. *tumor necrosis factor α*), jest cytokiną, która niszczy określone typy komórek nowotworowych poprzez indukcję apoptozy lub nekrozy. W komórkach nowotworu piersi MCF-7 TNF α wywołuje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G₀ + G₁/S, indukując następnie apoptozę tych komórek [8,55]. W wyniku zadziałania cytokiny w komórkach MCF-7 zaobserwowano spadek transportu choliny, a po 15 godzinach dwukrotny wzrost aktywności cytydylilotransferazy PCho:CTP, enzymu szlaku syntezy PC *de novo*, który katalizuje powstawanie CDP-choliny [8,55]. Aktywacji enzymu i zaburzeniom trans-



RYSUNEK 2. Przelącznik fosfocholiny/glicerofosfocholiny. Na rysunku przedstawiono drogi metaboliczne prowadzące do wzajemnych przekształceń fosfolipidów i wytwarzania prekursorów syntezy fosfolipidów oraz lipidowych przekazników informacji: CDP-Cho – CDP-cholina; Cho – cholina; DAG – diacyloglicerol; GPC – glicerofosfocholina; KT – kwas tłuszczowy; lizoPC – lizofosfatydylocholina; LPL – lizofosfolipaza; PA – kwas fosfatydowy; PAP – fosfataza kwasu fosfatydowego; PC – fosfatydylocholina; PCho – fosfochoina; PLA₁, PLA₂ – fosfolipazy A₁ i A₂; PLC – fosfolipaza C; PLD – fosfolipaza D

portu choliny towarzyszył spadek stężenia PCho w tych komórkach, potwierdzający ważną rolę metabolizmu PC w procesie programowanej śmierci komórek i w powstawaniu nowotworów [8,55]. Ponadto, hydroliza PC do kwasu fosfatydowego (PA), katalizowana przez fosfolipazę D (PLD), jest często obserwowaną odpowiedzią komórek na bodźce (np. estry forbolu) we wczesnym stadium rozwoju nowotworu [56–58].

Szczególnie dobrze udokumentowane obserwacje, świadczące o udziale metabolitów PC w transformacji nowotworowej, zebrano dla linii komórek nabłonkowych gruczołów piersiowych człowieka, HMEC (ang. *human mammary epithelial cells*). Materiał badawczy stanowiły linie 184A1 i 184B5, powstałe w wyniku potraktowania komórek HMEC benzo(α)pyrenem, oraz komórki transformowane onkogenem *erbB2*

[9]. W komórkach unieśmiertelnionych oraz transformowanych onkogenem zaobserwowano, już na wczesnych etapach transformacji nowotworowej, istotną zmianę metabolizmu PC, którą nazwano przełącznikiem PCho/glicerofosfocholina (GPC). Polega on na tym, że w komórkach normalnych GPC jest podstawowym metabolitem choliny. Komórki te charakteryzują się zatem niskim stosunkiem PCho/GPC (<1) [9]. W odróżnieniu od komórek normalnych, w komórkach transformowanych onkogenem *erbB2* ten stosunek wzrasta kilkukrotnie (>5), dzięki wzrostowi zawartości PCho [9], co wiąże się prawdopodobnie z intensyfikacją biogenezy błon biologicznych, wynikającą z przyspieszenia tempa wzrostu i proliferacji komórek nowotworowych. Wysłunięto zatem przypuszczenie, że zmiana składu metabolitów PC na korzyść udziału PCho wiąże się z transformacją nowotworową komórek [9]. Należy podkreślić, że podwyższona ekspresja onkogenu *erbB2* została zaobserwowana w 20–30% przypadków raka piersi, w których ryzyko zgonu było wysokie [9]. Na podstawie powyższych obserwacji zaproponowano następujący mechanizm zmian metabolizmu PC w komórkach nowotworowych. Czynniki wzrostowe aktywują kaskadę kinaz tyrozynowych, w której biorą udział kinazy receptora *grb*, *2-sos-ras-raf-1-MEK-MAPK*, co prowadzi do wzrostu poziomu PCho w komórkach nowotworowych [9]. Aktywacja kaskady kinaz może być także związana ze zmianami ekspresji innych genów kodujących enzymy uczestniczące w metabolizmie PC: kinazy cholinowej i fosfolipaz [9].

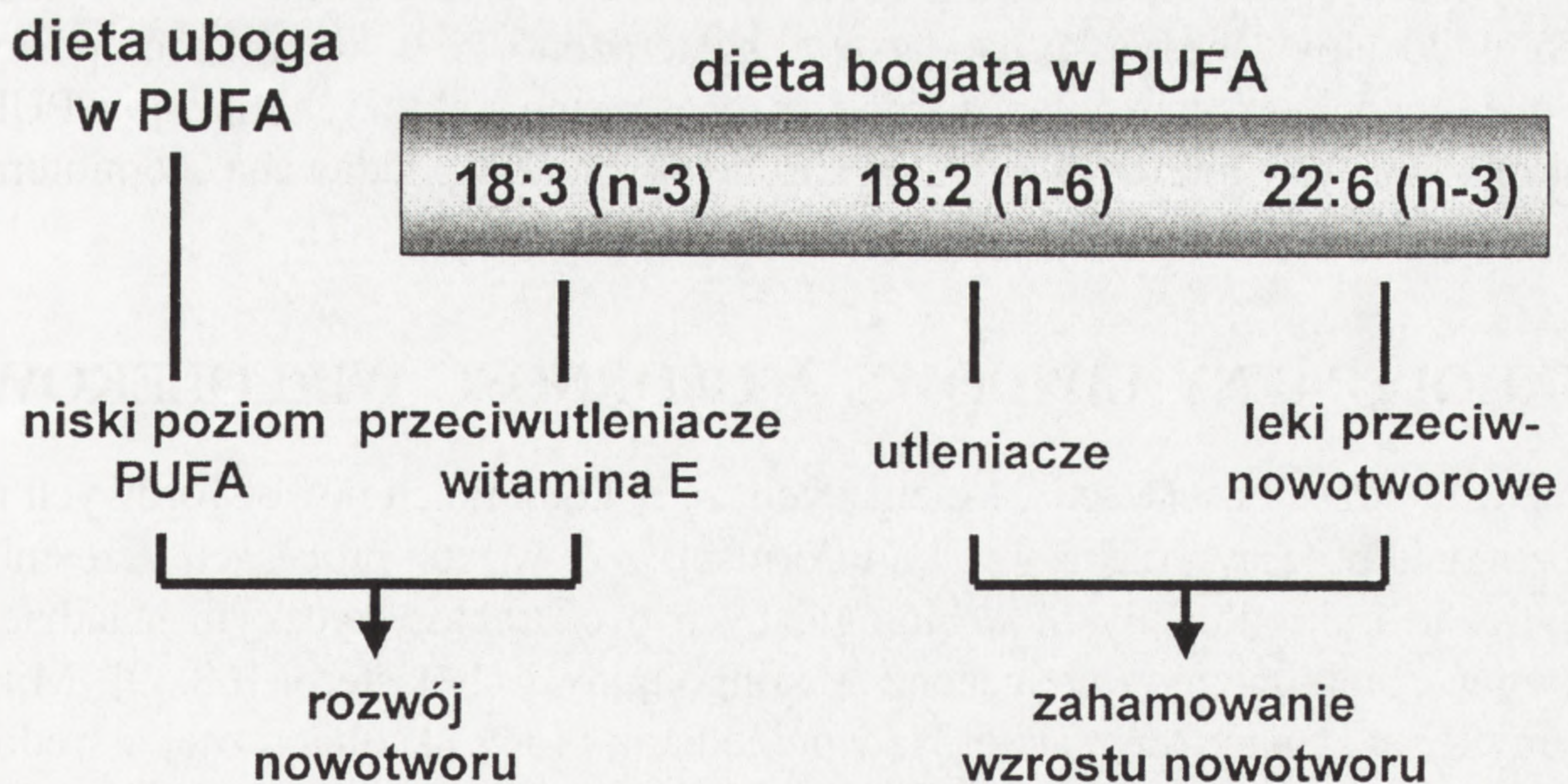
WIELONIENASYCONE KWASY TŁUSZCZOWE

Kwasy tłuszczowe pełnią rozliczne funkcje w komórce, które są niezbędne dla właściwego funkcjonowania i zdrowia organizmu [59–61]. Nasycone kwasy tłuszczowe są związkami magazynującymi energię metaboliczną, są również zaangażowane w procesy transportu lipidów, syntezę fosfolipidów i sfingolipidów, niezbędnych w biogenezie błon biologicznych i do kowalencyjnej modyfikacji białek. Nienasycone kwasy tłuszczowe odgrywają podobną rolę co kwasy nasycone, dodatkowo mając ogromny wpływ na zachowanie optymalnej płynności dwuwarsztwy lipidowej błony, co ma znaczenie w regulacji aktywności wielu białek błonowych [59]. Wśród nienasyconych kwasów tłuszczowych szczególne znaczenie mają PUFA. PUFA są niezbędne w regulacji struktury i fizycznych właściwości mikrodomen lipidowych w błonach, w produkcji prostaglandyn i leukotrienów, w procesach przekazywania sygnałów oraz w aktywacji jądrowych czynników transkrypcyjnych. Niektóre z klas PUFA (oznaczone jako n-6 i n-3) nie mogą być w pełni syntetyzowane w organizmach ssaków, wobec tego muszą być dostarczane w diecie [61]. Szczególne znaczenie ma kwas arachidonowy (20:4, n-6), który oprócz wymienionych funkcji jest również dostarczycielem wolnych rodników lipidowych oraz bierze udział w regulacji ekspresji genów (np. kodujących enzymy glikolityczne, cytochromy P-450, oksydazę acyloCoA, metaloproteinazy, syntazę prostaglandyn H, desaturazę kwasów

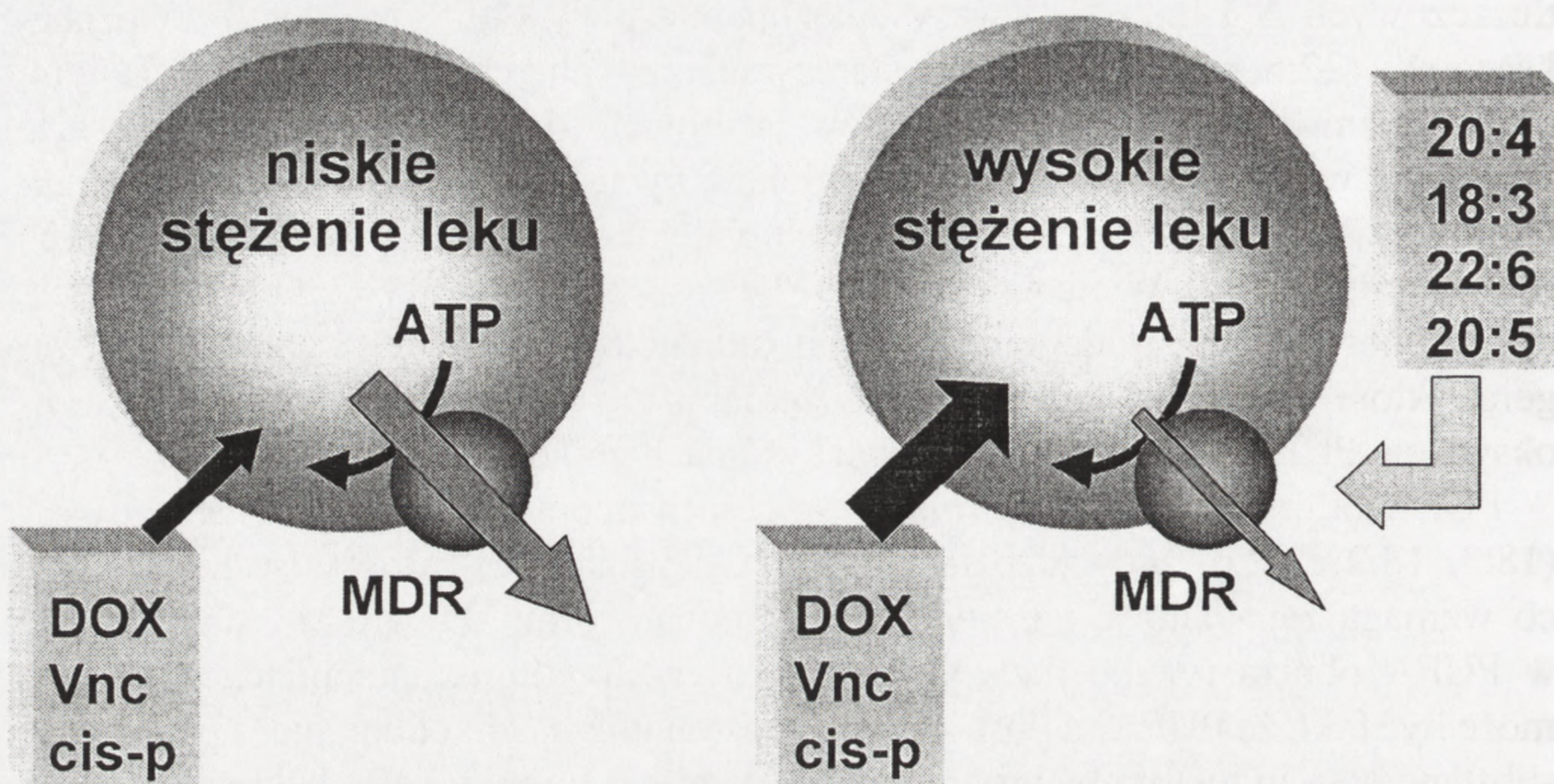
tłuszczowych Δ^9) [59,61]. Kwasy eikozopentaenowy (20:5, n-3) oraz dokozaheksaenowy (22:6, n-3) są również dostarczycielami wolnych rodników oraz ważnymi prekursorami lipidowych przekaźników informacji [59,61]. Dodatkowo kwasy te występują w określonych rodzajach molekularnych PS i PE, pełniących rolę regulatorową w stosunku do wielu błonowych białek enzymatycznych, transportowych i strukturalnych [62]. Wiele wskazuje, że PUFA są zaangażowane w wielu chorobach, np. w chorobach neurodegeneracyjnych (adrenoleukodystrofia, syndrom Zellwegera), które charakteryzują się uszkodzeniami enzymów, biorących udział w β -oksydacji PUFA zachodzącej w peroksosomach [60,61].

PUFA odgrywają również rolę w procesach apoptozy. Dieta uboga w PUFA (18:3, 18:2 i 22:6) prowadzi do obniżenia stężenia tych kwasów w komórkach, co wzmacnia zapadalność na niektóre typy nowotworów. Odwrotnie, dieta bogata w PUFA obniża ryzyko rozwoju nowotworów. Wy tłumaczeniem tego zjawiska może być fakt, że PUFA są doskonałymi substratami reakcji utleniania, a powstające substancje są induktorami programowanej śmierci komórek. Dodatkowo, poziom utleniania PUFA może być regulowany poziomem naturalnych bądź syntetycznych przeciwutleniaczy i utleniaczy oraz odgrywa rolę w chemioterapii [63,64]. Zależności pomiędzy poziomem PUFA a zapadalnością na nowotwory pokazano na rysunku 3.

Wielonienasycone kwasy tłuszczowe mogą również wpływać na powstawanie fenotypu oporności wielolekowej (MDR; ang. *multidrug resistance*) [63,65]. Wiadomo, że PUFA i ich metabolity są cytotoksyczne w stosunku do wielu typów komórek nowotworowych, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Fenotyp MDR charakteryzuje się obniżonym napływem leków przeciwnowotworowych do komórek docelowych i wzrostem wypływu leków z tych komórek. Wzrost ten wynika z



RYSUNEK 3. Wpływ wielonienasyconych kwasów tłuszczowych na ryzyko występowania nowotworów



RYSUNEK 4. Hipotetyczny udział wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) w cytotoksyczności leków przeciwnowotworowych: DOX – adriamycyna; Vnc – winkrystyna; cis-P – *cis*-platinum(II)

aktywacji syntezy zależnych od ATP transporterów leków, produktów genów MDR, MRP (ang. *multidrug resistance associated proteins*) i innych [48–50,66]. Dzięki tym białkom, stężenie leków w komórkach nowotworowych utrzymuje się na niskim poziomie. PUFA wykazują cytotoksyczność w stosunku do komórek o fenotypie MDR, wzmagając działanie leków przeciwnowotworowych, takich jak: winkrystyna (Vnc), adriamycyna (DOX) i *cis*-platinum (cis-P) [63]. Mechanizm działania tych kwasów polega prawdopodobnie na zahamowaniu przez PUFA aktywności białek MDR (MRP), dzięki czemu leki przeciwnowotworowe akumulują się w cytozolu komórek docelowych (rys. 4). Dodatkowo stwierdzono, że w komórkach opornych na Vnc i inne leki przeciwnowotworowe spada stężenie niektórych rodzajów PUFA. Opublikowano również dane, że PUFA chronią organizmy poddawane chemioterapii przed ubocznymi efektami leków przeciwnowotworowych [67].

MIKRODOMENY LIPIDOWE A OPORNOŚĆ WIELOLEKOWA

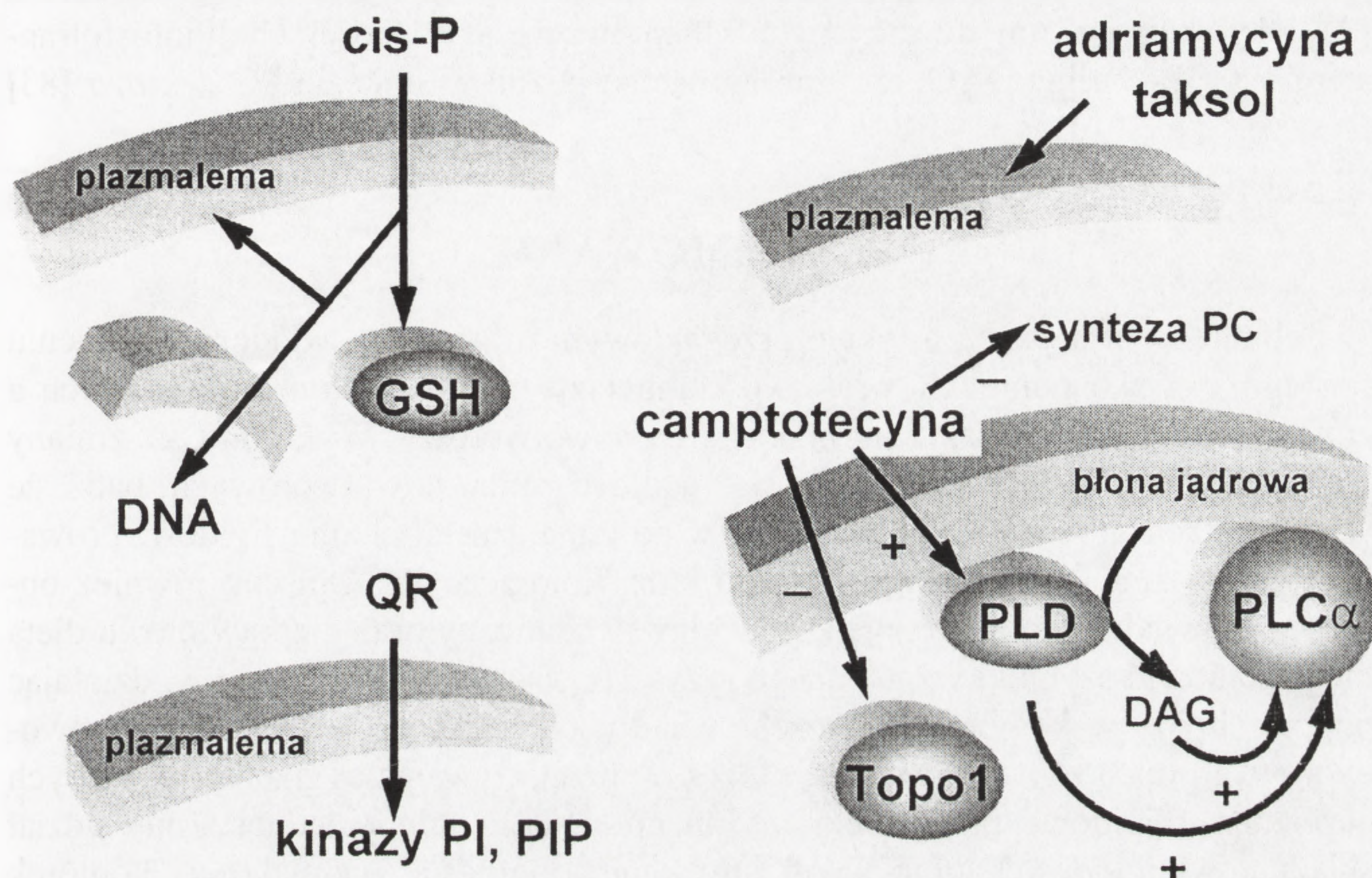
Wzrasta liczba obserwacji wskazujących, że w komórkach nowotworowych ulegają zmianie procesy przekazywania informacji, i że w tych procesach uczestniczą specyficzne mikrodomeny błon biologicznych o charakterystycznym składzie lipidowym i białkowym, wzbogacone w sfingolipidy i cholesterol [68,69]. Mikrodomeny te, nazywane kaweolami, są wpukleniami błony plazmatycznej o średnicy 50–100 nm, nieopłaszczonymi klatryną. Można je oczyścić z zawiesin różnych typów komórek nabłonkowych w postaci frakcji błon, nierozpuszczalnej w nie-

cholesterolu na zewnątrz komórek, dzięki czemu spada wewnątrzkomórkowe stężenie tego lipidu. Zaś ekspresja genu kodującego kaweolinę 1 znajduje się pod kontrolą wolnego cholesterolu, który działa poprzez białko regulatorowe SREBP [73]. Molekularny mechanizm transportu cholesterolu nie jest dotąd poznany, ale przypuszcza się, że kaweole biorą również udział w transporcie leków lipofilowych, co może być związane ze zmianą składu lipidowego błon i wzmożoną ekspresją kaweoliny 1 w komórkach nowotworowych, białka biorącego udział w regulacji wzrostu komórek [69].

ODDZIAŁYWANIE LEKÓW PRZECIWNOWOTWOROWYCH Z LIPIDAMI

Niektóre leki stosowane w chemioterapii są zdolne do akumulacji w błonach biologicznych, wpływając w ten sposób na enzymy uczestniczące w metabolizmie lipidów. Dlatego ważnym elementem, który należy brać pod uwagę w badaniach mechanizmów rozwoju nowotworów i ich terapii jest oddziaływanie leków przeciwnowotworowych z fosfolipidami błon biologicznych. Często bowiem stwierdza się efekty uboczne działania różnych leków, polegające na wystąpieniu nie dających się przewidzieć oddziaływań tych leków z lipidami [74]. Na przykład PC, zawierająca w pozycji *sn*-2 wielonienasycony kwas tłuszczowy 22:6, zwiększa cytotoksyczność niektórych leków, ułatwiając ich oddziaływanie z błonami komórek docelowych [65]. Sfingozyna, metabolit sfingilipidów, hamuje aktywność PKC i rozwój pewnych form nowotworów [75]. Sztuczne lipidy kationowe, takie jak: transfektan i lipofektyna, używane są w terapii nowotworów. Przewiduje się również zastosowanie N-acylo-PE (lipidu stymulującego fuzję błon biologicznych) w dostarczaniu leków do wnętrza komórek nowotworowych [76,77]. Dlatego badania nad oddziaływaniami leków przeciwnowotworowych z błonami biologicznymi mają ogromne znaczenie w zwalczaniu nowotworów. Prześledźmy te mechanizmy na kilku przykładach.

Lek przeciwnowotworowy, *cis*-diaminodichloroplatyna(II) (*cis*-platinum, *cis*-P), stosowany w leczeniu nowotworów jąder, jajników, pęcherza moczowego i płuc, tworzy *in vitro* stabilne kompleksy z PS [78]. *In vivo*, *cis*-P wnika do komórek na zasadzie prostej dyfuzji lub transportu katalizowanego przez białka, gdzie oddziałuje z DNA. W komórkach nowotworowych *cis*-P wiąże się przede wszystkim z GSH, zaś kompleksy *cis*-P/PS powstają tylko przejściowo, nie przyczyniając się do cytotoksyczności związku. Zatem w tym przypadku, cytotoksyczność *cis*-P opiera się przede wszystkim na oddziaływaniach produktów wewnątrzkomórkowej hydrolizy tego związku z kwasami nukleinowymi i enzymami [78] (rys. 6). Inny mechanizm działania leku opisano dla antybiotyku przeciwnowotworowego, adriamycyny. Mechanizm ten polega na nierównomiernej akumulacji związku w dwuwarstwie lipidowej błony, czego rezultatem są zmiany struktury błony i zaburzenia



RYSUNEK 6. Oddziaływanie leków przeciwnowotworowych z lipidami błon biologicznych lub enzymami biorącymi udział w syntezie lipidów: cis-P – cis-platinum(II); DAG – diacyloglicerol; GSH – zredukowana forma glutationu; PC – fosfatydylocholina; PI – fosfatydyloinozytol; PIP – fosfatydyloinozytolofosforan; PKC α – izoforma kinazy białkowej C; PLD – fosfolipaza D; QR – kwercetyna; Topo1 – topoizomeraza 1

kształtu komórki [79] (rys. 6). Podobny mechanizm cytotoksyczności zaobserwowano w przypadku taksolu, stosowanego w leczeniu raków jajowodów i piersi. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że w zależności od składu lipidowego błon, taksol wywoływał upłynnianie lub usztywnianie dwuwarstwy lipidowej, wpływając w ten sposób na strukturę błony [80]. Kwercetyna (QR) i jej pochodne, należące do grupy glikozydów flawonowych wyizolowanych z ekstraktów roślinnych, są związkami, które m.in. indukują syntezę białka MRP2 w komórkach Caco-2, odpowiedzialnego za zjawisko oporności wielolekowej komórek nowotworowych [81]. Związki te wpływają także na indukcję apoptozy, poprzez aktywację kaspaz 9 i 3 [82]. W komórkach nowotworowych piersi i jajników QR hamuje proliferację komórek nowotworowych, regulując aktywność kinaz fosfolipidów inozytolowych [81] (rys. 6). Jeszcze inny mechanizm działania opisano dla kamptotecyny, związku wywołującego apoptozę i będącego inhibitorem topoizomerazy 1 (Topo1) [83]. W komórkach HL-60, hodowanych w obecności kamptotecyny, zaobserwowano aktywację PKC α obecnej na terenie jądra komórkowego, w wyniku lokalnego wzrostu stężenia DAG. Było to związane ze stymulacją przez kamptotecynę aktywności

PLD, a także dodatkową aktywacją PLD w wyniku fosforylacji enzymu przez PKC α [83]. Tym zjawiskom towarzyszyło zahamowanie aktywności cholinofosfotransferazy CDP-cholina:DAG, enzymu biorącego udział w syntezie PC *de novo* [83] (rys. 6).

PODSUMOWANIE

Zebrane w niniejszym artykule przeglądowym informacje świadczą o istnieniu ścisłego związku pomiędzy właściwościami fazy lipidowej błon biologicznych a zmianą fenotypu komórek z normalnego na nowotworowy. Wykazano, że zmiany struktury i funkcji błon mogą stanowić podłoże zmian nowotworowych, bądź, że w komórkach nowotworowych dochodzi do zmian metabolizmu lipidów, prowadzących do zmiany morfologii i składu błon biologicznych. Opisano również obserwacje świadczące, że stesy oksydacyjny i chemiczny oraz nieprawidłowa dieta mogą stanowić czynniki wzmożonego ryzyka powstawania nowotworów, działając poprzez lipidy w komórce. Zaprezentowane także dane, że w komórkach nowotworowych dochodzi do zaburzeń procesów przekazywania sygnałów, w których uczestniczą lipidowe przekaźniki informacji. Uwzględniono jednocześnie udział składników lipidowych błon w utrzymywaniu oporności wielolekowej komórek nowotworowych. W związku ze stosowaniem w chemioterapii szerokiego spektrum leków przeciwnowotworowych, zaprezentowano również przykładowe mechanizmy oddziaływania tych leków z komponentą lipidową błon. Poznanie tych mechanizmów jest szczególnie istotne w przewidywaniu efektów ubocznych stosowanych leków i w projektowaniu nowych związków. Wydaje się również, że badania zmian metabolizmu lipidów na wczesnych etapach rozwoju nowotworów pozwalają na określenie nowych strategii oceny ryzyka tworzenia nowotworów, nowych sposobów odżywiania i opracowaniu nowych metod terapii. Zatem odpowiedź na zadane przez K. Simonsa pytanie "Quo vadis, Lipidologist?" [84], w którym badacz ten wyraża niepokój o przyszłość badań nad lipidami, jawi się obecnie jako wzmożenie wysiłków zmierzających do poznania mechanizmów molekularnych utrzymujących delikatną równowagę pomiędzy syntezą i degradacją lipidów oraz naprawą uszkodzeń lipidów wywołanych przez szkodliwe czynniki środowiska.

LITERATURA

- [1] ALBRIGHT CD, LIU R, MAR MH, SHIN OH, VRABLIC AS, SALGANIK RI, ZEISEL SH. Diet, apoptosis, and carcinogenesis. *Adv Exp Med Biol* 1997; **422**: 97–107.
- [2] LEEVERS SJ, van HAESEBROECK B, WATERFIELD MD. Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. *Curr Opin Cell Biol* 1999; **11**: 219–225.
- [3] STERN RG, MILESTONE BN, GATENBY RA. Carcinogenesis and the plasma membrane. *Med Hypotheses* 1999; **52**: 367–372.

- [4] MATTSON MP. Modification of ion homeostasis by lipid peroxidation: roles in neuronal degeneration and adaptive plasticity. *Trends Neurosci* 1998; **21**: 53–57.
- [5] KLAUNIG JE, XU Y, ISEBERG JS, BACHOWSKI S, KOLAJA KL, JIANG J, STEVENSON DE, WALBORG EF Jr. The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 1998; **106 (Suppl 1)**: 289–295. *Cancer Res* 1999; **59**: 2433–2437.
- [6] DAVIES KJA. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life* 1999; **48**: 41–47.
- [7] BOUCROT P, AUBRY J, MEZAZIGH A. Severe modifications of ether-ester- or diester-linked glycerolipid and non glycerolipid synthesis in human neuroblastoma LAN-1 cells cultured with octadecylmethylglycero-phosphocholine. *Arch Physiol Biochem* 1995; **103**: 165–174.
- [8] BOGIN L, PAPA MZ, POLAK-CHARCON S, DEGANI H. TNF-induced modulations of phospholipid metabolism in human breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1392**: 217–232.
- [9] ABOAGYE EO, BHUJWALLA ZM. Malignant transformation alters membrane choline phospholipid metabolism of human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 1999; **59**: 80–84.
- [10] ANTHONY ML, ZHAO M, BRINDLE KM. Inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis following induction of apoptosis in HL-60 cells. *J Biol Chem* 1999; **274**: 19686–19692.
- [11] SWINNEN JV, VERHOEVEN G. Androgens and the control of lipid metabolism in human prostate cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998; **65**: 191–198.
- [12] BALSINDE J, BALBOA MA, INSEL PA, DENNIS EA. Regulation and inhibition of phospholipase A₂. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; **39**: 175–189.
- [13] DANIEL LW, SCIORRA VA, GHOSH S. Phospholipase D, tumor promoters, proliferation and prostaglandins. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1439**: 265–276.
- [14] WAGGONER DW, XU J, SINGH I, JASIŃSKA R, ZCHANG Q-X, BRINDLEY DN. Structural organization of mammalian lipid phosphate phosphatases: implications for signal transduction. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1439**: 299–316.
- [15] CLIBY WA, ROBERTS CJ, CIMPRICH KA, STRINGER CM, LAMB JR, SCHREIBER SL, FRIEND SH. Overexpression of a kinase-inactive ATR protein causes sensitivity to DNA-damaging agents and defects in cell cycle checkpoints. *EMBO J* 1998; **17**: 159–169.
- [16] VISCA P, ALO PL, DEL NONNO F, BOTTIC, TROMBETTA G, MARANDINO F, FILIPPI S, DI TONDO U, DONNORSO RP. Immunohistochemical expression of fatty acid synthase, apoptotic-regulating genes, proliferating factors, and ras protein product in colorectal adenomas, carcinomas, and adjacent nonneoplastic mucosa. *Clin Cancer Res* 1999; **5**: 4111–4118.
- [17] XIA P, WANG L, GAMBLE JR, VADAS MA. Activation of sphingosine kinase by tumor necrosis factor- α inhibits apoptosis in human endothelial cells. *J Biol Chem* 1999; **274**: 34499–34505.
- [18] VAN MEER G, SILLENCE D, SPRONG H, KALIN N, RAGGERS R. Transport of (glyco)sphingolipids in and between cellular membranes; multidrug transporters and lateral domains. *Biosci Rep* 1999; **19**: 327–333.
- [19] BASTIAN BC. Annexins in cancer and autoimmune diseases. *Cell Mol Life Sci* 1997; **53**: 554–556.
- [20] TRAVERSO V, MORRIS JF, FLOWER RJ, BUCKINGHAM J. Lipocortin 1 (annexin 1) in patches associated with the membrane of a lung adenocarcinoma cell line and in the cell cytoplasm. *J Cell Sci* 1998; **111**: 1405–1418.
- [21] PRATT KP, SHEN BW, TAKESHIMA K, DAVIE EW, FUJIKAWA K, STODDARD BL. Structure of the C2 domain of human factor VIII at 1.5 Å resolution. *Nature* 1999; **402**: 439–442.
- [22] SAVINO M, D'APOLITO M, CENTRA M, VAN BEERENDONK HM, CLETON-JANSEN AM, WHITMORE SA, CRAWFORD J, CALLEN DF, ZELANTE L, SAVOIA A. Characterization of copine VII, a new member of the copine family, and its exclusion as a candidate in sporadic breast cancers with loss of heterozygosity at 16q24.3. *Genomics* 1999; **61**: 219–226.

- [23] GLASER M, WANASKIS, BUSER CA, BOGUSLAVSKY V, RASHIDZADA W, MORRIS A, REBECCHI M, SCARLATA SF, RUNNELS LW, PRESTWICH GD, CHEN J, ADEREM A, AHN J, MCLAUGHLIN S. Myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) produces reversible inhibition of phospholipase C by sequestering phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in lateral domains. *J Biol Chem* 1996; **271**: 26187–26193.
- [24] ISSHIKIM, ANDERSON RG. Calcium signal transduction from caveolae. *Cell Calcium* 1999; **26**: 201–208.
- [25] KOMORI H, ICHIKAWA S, HIRABAYASHI Y, ITO M. Regulation of intracellular ceramide content in B16 melanoma cells. Biological implications of ceramide glycosylation. *J Biol Chem* 1999; **274**: 8981–8987.
- [26] LIU G, KLEINE L, HEBERT RL. Advances in the signal transduction of ceramide and related sphingolipids. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1999; **36**: 511–573.
- [27] CHIAO C, CAROTHERS AM, GRUNBERGER D, SOLOMON G, PRESTON GA, BARRETT JC. Apoptosis and altered redox state induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in transformed rat fibroblast cells. *Cancer Res* 1995; **55**: 3576–3583.
- [28] LIN JH, WEIGEL H, COTRINA ML, LIU S, BUENO E, HANSEN AJ, HANSEN TW, GOLDMAN S, NEDERGAARD M. Gap-junction-mediated propagation and amplification of cell injury. *Nat Neurosci* 1998; **1**: 494–500.
- [29] FLOYD RA. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; **222**: 236–245.
- [30] MATES JM, PEREZ-GOMEZ C, NUNEZ DE CASTRO I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999; **32**: 595–603.
- [31] AHMAD S [red.] Oxidative stress and antioxidant defences in biology. New York: Chapman and Hall 1995.
- [32] BERGENDI L, BENES L, DURACKOVA Z, FERENCIK M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 1999; **65**: 1865–1874.
- [33] WHITLOCK JP, DENISON MS. Induction of cytochrome P450 enzymes that metabolize xenobiotics. [w] ORTIZ DE MONTELLANO PR [red.] Cytochrome P450: structure, mechanism and biochemistry. New York: Plenum Press 1995: 367–390.
- [34] JASIŃSKA R, RAKOWSKA M, LENART J, KOMAŃSKA I, PIKUŁA S. Nonenzymatically evoked and cytochrome P450-dependent lipid peroxidation inhibits synthesis of phosphatidylethanolamine via the ethanolamine base reaction in rat liver microsomes. *FEBS Lett* 1996; **386**: 33–38.
- [35] KENT C. Eukaryotic phospholipid biosynthesis. *Annu Rev Biochem* 1995; **64**: 315–343.
- [36] RAKOWSKA M, JASINSKA R, LENART J, KOMANSKA I, MAKOWSKI P, DYGAS A, PIKULA S. Membrane integrity and phospholipid movement influence the base exchange reaction in rat liver microsomes. *Mol Cell Biochem* 1997; **168**: 163–176.
- [37] LENART J, KOMAŃSKA I, PIKUŁA S, JASIŃSKA R. Positive feedback between ethanolamine-specific phospholipid base exchange and cytochrome P450 activities in rat liver microsomes. The effect of clofibrilic acid. *FEBS Lett* 1998; **434**: 101–107.
- [38] BARTOSZ G. Druga twarz tlenu. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN 1995.
- [39] MIRANDA-VIZUETE A, GUSTAFSSON JA, SPYROU G. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding a human thioredoxin-like protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **243**: 284–288.
- [40] LENART J, KOMAŃSKA I, JASIŃSKA R, PIKUŁA S. The induction of cytochrome P450 isoform, CYP4A1, by clofibrate coincides with activation of ethanolamine-specific phospholipid base exchange reaction in rat liver microsomes. *Acta Biochim Polon* 1998; **45**: 119–126.
- [41] LENART J, PIKUŁA S. 10-Undecynoic acid, an inhibitor of cytochrome P450 4A1, inhibits ethanolamine-specific phospholipid base exchange reaction in rat liver microsomes. *Acta Biochim Polon* 1999; **46**: 203–210.
- [42] KNOPP RH. Drug treatment of lipid disorders. *N Engl J Med* 1999; **341**: 498–511.

- [43] MOONEY A. Treating patients with hypertriglyceridaemia saves lives: triglyceride revisited. *Curr Med Res Opin* 1999; 15: 65–77.
- [44] WAXMAN DJ. P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch Biochem Biophys* 1999; 369: 11–23.
- [45] MURAKAMI T, URATA T, YAMADA N, KAWAKUBO K, YOSHIDA T, KAWAMURA H, KASHIWA T, IINO S Lipoprotein abnormalities in type 2 diabetic patients. Increased distribution of triglycerides (TG) in very low density lipoprotein (VLDL) and decreased apolipoprotein E/VLDL-TG ratio are risk for ischemic heart disease. *Artery* 1997; 22: 309–27.
- [46] LENART J, Stres oksydacyjny i metaboliczny a synteza fosfolipidów w endoplazmatycznym retikulum komórek wątroby. *Praca doktorska* 1999; Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN w Warszawie.
- [47] EAGON PK, TEEPE AG, ELM MS, TADIC SD, EPLEY MJ, BEILER BE, SHINOZUKA H, RAO KN. Hepatic hyperplasia and cancer in rats: alterations in copper metabolism. *Carcinogenesis* 1999; 20: 1091–1096.
- [48] AMBUDKAR SV, DEY S, HRYCYNA CA, RAMACHANDRA M, PASTAN I, GOTTESMAN MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39: 361–398.
- [49] BORST P, EVERS R, KOOL M, WIJNHOLDS J. The multidrug resistance protein family. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1461: 347–357.
- [50] HIPFNER DR, DEELEY RG, COLE SP. Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1461: 359–376.
- [51] ILANGUMARAN S, BORISCH B, HOESSLI DC. Signal transduction via CD44: role of plasma membrane microdomains. *Leuk Lymphoma* 1999; 35: 455–469.
- [52] PIKULA S, EPSTEIN L, MARTONOSI A. The relationship between phospholipid content and Ca²⁺-ATPase activity in the sarcoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1196: 1–13.
- [53] CULLIS PR, HOPE MJ. Physical properties and functional roles of lipids in membranes. [w] VANCE DE, VANCE J [red.] *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers 1991: 1–41.
- [54] ISHIHARA H, TAMIYA-KOIZUMI K, KURIKI H, YOSHIDA S, KOJIMA K. Growth-associated changes in fatty acid compositions of nuclear phospholipids of liver cells. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1084: 53–59.
- [55] SCHOR NF, TYURINA YY, TYURIN VA, KAGAN VE. Differential membrane antioxidant effects of immediate and long-term estradiol treatment of MCF-7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 260: 410–415.
- [56] MIN DS, SHIN KS, KIM EG, KIM SR, YOON SH, KIM MS, JO YH. Down-regulation of phospholipase D during differentiation of mouse F9 teratocarcinoma cells. *FEBS Lett* 1999; 454: 197–200.
- [57] OHGUCHI K, NAKASHIMA S, NOZAWA Y. Phospholipase D development during differentiation of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1439: 215–227.
- [58] UCHIDA N, OKAMURA S, KUWANO H. Phospholipase D activity in human gastric carcinoma. *Anticancer Res* 1999; 19: 671–675.
- [59] POULOS A. Very long chain fatty acids in higher animals - a review. *Lipids* 1995; 30: 1–14.
- [60] BARTSCH H, NAIR J, OWEN RW. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis* 1999; 20: 2209–2218.
- [61] SPECTOR AA. Essentiality of fatty acids. *Lipids* 1999; 34 (Suppl): S1–3.
- [62] ELLINGSON JS, SEENAI AH B. The selective use of stearyl-polyunsaturated molecular species of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine for the synthesis of phosphatidylserine. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1213: 113–117.

- [63] DAS UN. Reversal of tumor cell drug resistance by essential fatty acids. *Lipids* 1999; **34** (Suppl): S103.
- [64] FINSTAD HS, HEIMLI H, KOLSET SO, DREVON CA. Proliferation and types of killing of leukemia cell lines by very long chain polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 1999; **34** (Suppl): S107.
- [65] KAFRAWY O, ZEROUGA M, STILLWELL W, JENSKI LJ. Docosahexaenoic acid in phosphatidylcholine mediates cytotoxicity more effectively than other omega-3 and omega-6 fatty acids. *Cancer Lett* 1998; **132**: 23–29.
- [66] ZIMNIAK P, PIKUŁA S, BANDOROWICZ-PIKUŁA J, AWASTHI YC. Mechanisms for xenobiotic transport in biological membranes. *Toxicol Lett* 1999; **106**: 107–118.
- [67] TAKAHATA K, TADA M, YAZAWA K, TAMAKI T. Protection from chemotherapy-induced alopecia by docosahexaenoic acid. *Lipids* 1999; **34** (Suppl): S105.
- [68] KURZCHALIA TV, PARTON RG. Membrane microdomains and caveolae. *Curr Opin Cell Biol* 1999; **11**: 424–431.
- [69] LAVIE Y, FIUCCI G, CZARNY M, LISCOVITCH M. Changes in membrane microdomains and caveolae constituents in multidrug-resistant cancer cells. *Lipids* 1999; **34** (Suppl): S57–S63.
- [70] ILANGUMARAN S, ARNI S, VAN ECHTEN-DECKERT G, BORISCH B, HOESSLI DC. Microdomain-dependent regulation of Lck and Fyn protein-tyrosine kinases in T lymphocyte plasma membrane. *Mol Biol Cell* 1999; **10**: 891–905.
- [71] IKEZU T, TRAPP BD, SONG KS, SCHLEGEL A, LISANTI MP, OKAMOTO T. Caveolae, plasma membrane microdomains for alpha-secretase-mediated processing of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 1998; **273**: 10485–10495.
- [72] GARVER WS, HOSSAIN GS, WINSCOTT MM, HEIDENREICH RA. The Npc1 mutation causes an altered expression of caveolin-1, annexin II and protein kinases and phosphorylation of caveolin-1 and annexin II in murine livers. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1453**: 193–206.
- [73] CZARNY M, LAVIE Y, FIUCCI G, LISCOVITCH M. Localization of phospholipase D in detergent-insoluble, caveolin-rich membrane domains. Modulation by caveolin-1 expression and caveolin-1⁸²⁻¹⁰¹. *J Biol Chem* 1999; **274**: 2717–2724.
- [74] SZEWCZYK A, PIKUŁA S. Lipid metabolism as a target for potassium channel effectors. *Biochem Pharmacol* 2000; **59**: in press.
- [75] JARVIS WD, GRANT S. Protein kinase C targeting in antineoplastic treatment strategies. *Invest New Drugs* 1999; **17**: 227–240.
- [76] HOPE MJ, MUI B, ASELL S, AHKONG QF. Cationic lipids, phosphatidylethanolamine and the intracellular delivery of polymeric, nucleic acid-based drugs. *Mol Membr Biol* 1998; **15**: 1–14.
- [77] LANGNER M, KUBICA K. The electrostatics of lipids surface. *Chem Phys Lipids* 1999; **101**: 3–35.
- [78] BURGER KNJ, STAFFHORST RWHM, DE KRUIJFF B. Interaction of the anti-cancer drug cisplatin with phosphatidylserine in intact and semi-intact cells. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1419**: 43–54.
- [79] SUWALSKY M, HERNANDEZ P, VILLENA F, AGUILAR F, SOTOMAYOR CP. The anticancer drug adriamycin interacts with the human erythrocyte membrane. *Z Naturforsch [C]* 1999; **54**: 271–277.
- [80] BERNSDORFF C, RESZKA R, WINTER R. Interaction of the anticancer agent Taxol (paclitaxel) with phospholipid bilayers. *J Biomed Mater Res* 1999; **46**: 141–149.
- [81] BOCK KW, ECKLE T, OUZZINE M, FOURNEL-GIGLEUX S. Coordinate induction by antioxidants of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6 and the apical conjugate export pump MRP2 (multidrug resistance protein 2) in Caco-2 cells. *Biochem Pharmacol* 2000; **59**: 467–470.

- [82] WANG IK, LIN-SHIAU SY, LIN JK. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *Eur J Cancer* 1999; **35**: 1517–1525.
- [83] MARTELLI AM, BORTUL R, BAREGGI R, TABELLINI G, GRILL V, BALDINI G, NARDUCCI P. The pro-apoptotic drug camptothecin stimulates phospholipase D activity and diacylglycerol production in the nucleus of HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Cancer Res* 1999; **59**: 3961–3967.
- [84] SIMONS K. Quo Vadis Lipidologist? [w] HOEKSTRA D [red.] Current Topics in Membranes, Vol. 40, Cell Lipids. San Diego: Academic Press 1994: 619–623.

Adres autora: ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa
e-mail:slawek@nencki.gov.pl

ZASTOSOWANIE DIAGNOSTYKI GENETYCZNEJ W CHOROBAH NOWOTWOROWYCH*

GENETIC DIAGNOSTICS OF CANCER

Janusz Aleksander SIEDLECKI

Zakład Biologii Molekularnej, Centrum Onkologii-Instytut, Warszawa

Streszczenie: W przedstawionym poniżej artykule omówiono różne aspekty wykorzystania zdobyczy biologii molekularnej nowotworów do celów diagnostycznych. Przedstawiono pokrótce opis najczęściej stosowanych metod, ich wady i zalety. Szerzej omówiono zagadnienia związane z diagnostyką opartą na wykrywaniu zmian (mutacje, translokacje) w materiale genetycznym, wykrywaniu rozrostów klonalnych. Omówiono też techniki pozwalające na wykrycie komórek nowotworowych w otoczeniu innych komórek. Wskazano też na inne możliwości wykorzystania charakterystyki molekularnej nowotworu, w szczególności do prognozowania przebiegu choroby i wyboru właściwej terapii.

(*Postępy Biologii Komórki 2000 Supl. 15 79–89*)

Kluczowe słowa: diagnostyka molekularna, markery nowotworowe, prognozowanie

Summary: The article shows possibilities of improvement of cancer diagnosis based on general biological features of cancer. A short description of commonly used methods and their advantages and disadvantages are discussed. Diagnostic methods based on detection of changes in genetic material (mutations and translocations) as well as clonal growth of cancer cells are described in greater detail. Techniques of detection of cancer cells in the context of healthy cells/tissues are presented. The article also discusses other uses of the tumor's molecular properties in prognosis and choice of therapy in particular.

(*Advances in Cell Biology 2000 Supl. 15 79–89*)

Key words: molecular diagnostics, tumor markers, prognosis

Mechanizm nowotworzenia związany jest przede wszystkim z powstawaniem zmian w materiale genetycznym komórki [1]. Przyczyniło się to do powstania serii obiecujących testów umożliwiających zarówno wykrycie nowotworów we wczesnych postaciach, w których zabieg chirurgiczny jest wystarczająco efektywny, jak

*Praca była finansowana z grantu KBN 4 P05B 109 13

i ocenę ryzyka zachorowania. Podejmowane są też próby opracowania testów pozwalających na wybór najlepszych dla danego pacjenta form chemioterapii, czy ustalenie prawdopodobieństwa wznowy nowotworu po zabiegu chirurgicznym [1]. Techniki molekularne, stosowane w miejsce środków inwazyjnych, stwarzają ponadto możliwość wykonania badania np. w próbce moczu czy kropli krwi.

Metody molekularne można podzielić na dwie zasadnicze grupy. Do pierwszej grupy zaliczamy te, które są oparte na badaniach tzw. markerów biochemicznych. Markerem biochemicznym jest dowolna substancja wielkocząsteczkowa umożliwiająca odróżnienie komórki normalnej od nowotworowej. Markery biochemiczne odzwierciedlają zwiększoną proliferację komórek nowotworowych, ich różnicowanie i obumieranie. W praktyce markerem jest najczęściej białko (glikolipid, glikoproteid, aktywność enzymatyczna). Białka te występują w komórce nowotworowej albo w zmienionej postaci, albo w zmienionych ilościach w stosunku do komórek normalnych. Ich obecność lub zmiany w poziomie ujawnia się za pomocą przeciwciał mono- i poliklonalnych. Przeciwciała umożliwiają wykazanie obecności poszukiwanych białek we wnętrzu bądź na powierzchni komórki, ale również i wówczas, gdy białka te przedostaną się do płynów ustrojowych, takich jak: krew czy mocz. Przykładem wykorzystania przeciwciał może być badanie na wykazanie obecności białka TP53. Prawidłowe białko TP53 nie akumuluje się w komórce, gdyż jego półokres trwania jest bardzo krótki. Natomiast półokres trwania produktu zmutowanego genu ulega wydłużeniu nawet do kilkunastu godzin [2]. Obecność prawidłowego TP53 można obserwować jedynie w przypadku, gdy białko to nie ulega prawidłowej degradacji w systemie ubikwityny. Przeważnie więc przeciwciała wykrywają obecność zmutowanego TP53. Innym przykładem wykorzystania przeciwciał monoklonalnych jest ustalenie, czy komórka nowotworowa posiada zmutowaną molekułę CD44 na swojej powierzchni. Wiemy bowiem, że obecność pewnych wariantów tej cząsteczki (w szczególności wariantu 5 i 6) związana jest z nabywaniem przez komórkę zdolności do przerzutowania [3].

Markery biochemiczne stosowane są powszechnie w praktyce diagnostycznej. Właściwie trudno sobie dzisiaj nawet wyobrazić proces diagnostyczny, jak i terapię bez wykorzystania wyników pochodzących z tych badań. Wykorzystuje się nie tylko przeciwciała mono- i poliklonalne, ale również testy badające między innymi aktywności enzymatyczne [4].

Do drugiej grupy zaliczamy te metody, które oparte są o analizę tzw. markerów genetycznych. Markery genetyczne można podzielić na trzy zasadnicze podgrupy. Do pierwszej zalicza się markery, które można by nazwać nowotworowymi. Ich badanie umożliwia rozpoznanie zmian w genach tworzących tory mutacyjne. Markerami są w tych przypadkach powszechnie używane sondy dla onkogenów, genów supresorowych i genów mutatorowych, fragmenty amplifikowanych genów czy wreszcie bezpośrednio sekwencje badanych fragmentów DNA. Druga podgrupa to markery klonalności. Jak wiadomo, jednym z atrybutów chorób nowotworowych jest

rozrost klonalny. Nie znaczy to oczywiście, jak sądzono do niedawna, że mamy w nowotworze zawsze do czynienia z rozrostem monoklonalnym. Najczęściej mamy do czynienia z rozrostem oligoklonalnym. Markery klonalności wykorzystywane są najczęściej w diagnostyce pomocniczej nowotworów układu chłonnego. Dotyczą w pierwszym rzędzie genów immunoglobulinowych i receptorów limfocytów T [5,6]. Rolę markerów klonalności mogą również odgrywać sekwencje mikrosatelitarne [7,8]. I wreszcie trzecia podgrupa, do której zaliczamy markery pozwalające rozpoznać geny ulegające specyficznej ekspresji jedynie w określonym typie komórek. Umożliwiają one rozpoznanie tego typu komórek w otoczeniu nawet kilku milionów komórek innego typu – np. rozpoznanie komórek nowotworowych krążących w krwi obwodowej albo znalezienie ich w węzle chłonnym [9–11].

Markery genetyczne znajdują zastosowanie w badaniach predyspozycji rodzinnych do zapadania na choroby nowotworowe, w diagnozowaniu chorób nowotworowych, prognozowaniu przebiegu choroby, jak wykazano niedawno, mogą mieć wpływ na wybór terapii [1].

IDENTYFIKACJA MUTACJI

Analiza materiału genetycznego komórki umożliwia identyfikację zmian (mutacji) charakterystycznych dla ztransformowanej komórki. Podstawowym problemem jest to, że w komórce nowotworowej nie mamy pojedynczej zmiany w genomie. W większości typów komórek nowotworowych zmian w genomie jest więcej (od 3 do nawet kilkunastu). Przykładowo uważa się, że średnia liczba zmian w genomie w nowotworach np. jelita grubego wynosi około dziesięciu. Nie znaczy to wcale, że pojedyncza zmiana nie może służyć jako molekularny marker nowotworowy. Trzeba jednak zdawać sobie sprawę, że obecność takiej zmiany nie zawsze musi oznaczać, że mamy do czynienia z tkanką nowotworową. Pewne zmiany występują bowiem we wczesnych stadiach karcinogenezy, kiedy mamy do czynienia jeszcze z tkanką dysplastyczną. Przykładem może być występowanie mutacji w genie *APC* w przednowotworowych zmianach w jelicie grubym [12]. Nasza wiedza o torach mutacyjnych ciągle jeszcze jest bardzo fragmentaryczna. Dlatego nie jesteśmy w stanie odpowiedzieć sobie na jedno z podstawowych pytań o znaczenie kolejności mutacji w torze mutacyjnym prowadzącym do rozwoju nowotworu.

Znalezienie związku pomiędzy mutacjami w określonym genie (a czasem nawet w określonej pozycji danego genu) a jednostką chorobową oraz agresywnością przebiegu choroby należy do rzadkości. Jak dotychczas można rozpoznać jedynie kilka takich przypadków. Są to związki pomiędzy:

- a) mutacją w kodonie 12 genu *Ki-RAS* a gruczolakorakiem trzustki,
- b) określonym typem rearanżacji łańcucha δ w limfocytach T γ/δ a niektórymi białaczkami (ostra białaczka limfoidalna, ALL i ostra białaczka mieloblastyczna, AML) i

c) mutacjami w genie *RET* a nowotworami tarczycy.

Większość dotychczasowych doświadczeń wskazuje, że podobne mutacje występują w torach mutacyjnych prowadzących do bardzo różnych nowotworów. Przykładem znowu mogą być mutacje we wspomnianym powyżej genie *Ki-RAS*, które są charakterystyczne dla wielu chorób nowotworowych. Zmiany w tym genie obserwuje się w około 50% przypadków raka jelita grubego [13] i około 30% przypadków raka płuc [14]. Podobne dane nagromadzono o genie *TP53*. Zmiany w tym genie obserwuje się w ponad 50% wszystkich nowotworów [1,13,15].

Pomimo wspomnianych powyżej trudności już obecnie istnieje kilka dobrych przykładów potwierdzających przydatność technik molekularnych w diagnozowaniu chorób nowotworowych [16]. Chyba najbardziej powszechnie wykorzystywane są badania rearanżacji genów immunoglobulinowych i receptora powierzchniowego limfocytu T w różnicowaniu chłoniaków trudnych do zdiagnozowania przy pomocy klasycznych technik histopatologicznych i immunochemicznych. W wielu białaczkach i chłoniakach obserwuje się translokacje chromosomowe. Miejsca złącza translokowanych chromosomów są dobrymi markerami diagnostycznymi. Przykładem wykorzystania tej techniki może być badanie złącz powstających w wyniku translokacji t(9:22). W wyniku tej translokacji powstaje tzw. chromosom Philadelphia. Obserwuje się go w 95% białaczek mieloblastycznych. Efektem translokacji jest gen hybrydowy *BCR-ABL*. Inna znana translokacja chromosomowa t(8:14) obserwowana jest w chłoniakach Burkitta [17]. Ta aberracja występuje w 90% przypadków tego nowotworu i polega na przeniesieniu fragmentu chromosomu 8 zawierającego *locus* onkogenu *c-MYC* na chromosom 14 w miejsce, gdzie znajduje się *locus* ciężkiego łańcucha immunoglobuliny [17]. Analiza obecności złącza może być wykorzystywana również w przypadkach badania tzw. choroby resztkowej [18].

Analizę złącz translokowanych chromosomów wykorzystuje się również w diagnostyce mięsaków tkanek miękkich i kości. Klasycznym przykładem jest tu mięsak Ewinga, gdzie mamy do czynienia w 85% z translokacją t(11;22) (q24;q12) [19].

Przykładem wykorzystania bezpośredniej zmiany w określonym genie do celów diagnostycznych jest mutacja w kodonie 12 proto-onkogenu *Ki-RAS*. Badania wykazują, że zmiana ta jest charakterystyczna dla 70–95% pierwotnych gruczolakoraków trzustki. Mutacji praktycznie nie obserwuje się w nienowotworowej tkance i zmianach nienowotworowych, np. w przewlekłym zapaleniu trzustki [20]. Innym przykładem są mutacje w proto-onkogenie *RET*. Są one jednoznacznie związane z rdzeniastym rakiem tarczycy (zespołem licznych nowotworów układu dokrewnego typ 2A, MEN-2A). Mutacja w kodonie 380 genu *RET* powodująca zamianę cysteiny na inny aminokwas w 95% przypadków prowadzi do MEN-2A. Nie obserwuje się takiej mutacji w MEN-2B – w zespole podobnym do MEN-2A [21,22].

Obecny stan wiedzy na temat molekularnych mechanizmów karcinogenezy nie wydaje się stwarzać nadziei na znalezienie wielu jednoznacznych korelacji pomiędzy określoną zmianą a typem nowotworu. Dlatego większość opracowywanych obecnie

testów diagnostycznych nastawione jest raczej na jak najwcześniejsze odróżnienie komórki nowotworowej od normalnej. W warunkach początkowych, gdy masa nowotworu jest niewielka, analizy morfologiczne oraz cytologiczne – dla przykładu badanie pod mikroskopem komórek z rozmazu cytologicznego – są często niewystarczające do zidentyfikowania małej grupy zmienionych komórek jedynie na podstawie ich kształtu i wielkości. Podobnie zawodne w przypadku mikrorozrostów lub nawet pojedynczych komórek mogą okazać się techniki immunocytochemiczne. W przeciwieństwie do nich, biologia molekularna oferuje narzędzia pozwalające na wykrycie zmian w DNA, RNA i białkach nawet w pojedynczej komórce.

Dzięki technice PCR możliwe jest otrzymanie nawet ponad miliarda kopii danego fragmentu DNA. Tak duże wzmocnienie pozwala na wykrycie zmian w materiale genetycznym pojedynczej komórki. Stwarza to szanse na znalezienie np. komórek, które złuszczyły się z nowotworu we wczesnej fazie jego rozwoju do płynów ustrojowych, takich jak: mocz, płwocina, czy nawet wydzielina z sutka [9,11,14,23,24].

Technika PCR umożliwia w stosunkowo prosty sposób wykazanie obecności mutacji charakterystycznych dla danego typu nowotworu – np. w płwocinie chorego na raka płuc, w moczu chorego na raka pęcherza czy w kale chorego na raka jelita. Dzięki tej technice wykazano po raz pierwszy obecność mutacji w proto-onkogenie *RAS* badając kał pacjentów z polipami. Obserwacje tego typu legły u podstaw prowadzonych na szeroką skalę badań, których celem jest określenie, czy identyfikacja mutacji w proto-onkogenie *RAS* w kale może być podstawą strategii badań przesiewowych [25]. Test taki pozwalałby na wykrycie polipa, zanim uwidoczni go kolonoskopia. Proste usunięcie polipa znacznie zmniejsza szanse pacjenta na rozwój nowotworu. Opisano również inny przykład wczesnego wykrycia obecności komórek nowotworowych. W cytologicznie negatywnych próbkach płwociny, na 10 przebadanych przypadków w 8 stwierdzono obecność komórek niosących mutację w genach *Ki-RAS* lub *TP53*. We wszystkich tych przypadkach rak płuc został klinicznie potwierdzony w 1–4 miesiące później, a w przypadku jednego z pacjentów aż 13 miesięcy później [23].

Jeszcze jedna funkcja wczesnego ostrzegania wydaje się istotna. Chodzi mianowicie o wykazanie obecności mikronacieków w obszarze otaczającym usuniętą wraz z odpowiednim marginesem zmianę pierwotną. Znalezienie takich mikronacieków klasycznymi metodami jest dosyć trudne. Natomiast techniki PCR mogą stosunkowo łatwo ujawnić obecność mikroognisk. Pozwalają one również na ujawnienie mikroprzerzutów w węzłach chłonnych [26].

Jak już wspomniano, jedną z najpoważniejszych przyczyn zgonów z powodu nowotworu są przerzuty. Technika PCR oparta na badaniu tkankowo-specyficznych markerów pozwala na znalezienie nawet kilkuset komórek nowotworowych krążących we krwi obwodowej. Dobrym przykładem wykorzystania tej techniki jest poszukiwanie komórek czerniaka krążących we krwi obwodowej u chorych po radykalnym zabiegu chirurgicznym i/lub z czynnym procesem nowotworowym.

W tym celu wykorzystuje się fakt, że komórki czerniaka są jedynymi krążącymi we krwi komórkami wykazującymi ekspresję genu tyrozynazy – enzymu uczestniczącego w syntezie melaniny, barwnika produkowanego przez melanocyty [11,27]. Podobne eksperymenty prowadzone są dla raka prostaty i raka sutka [9,10,23,25].

Wysoce obiecujące jest wykorzystanie do identyfikacji komórek nowotworowych analizy sekwencji mikrosatelitarnych. Równomiernie rozproszone wzdłuż DNA każdego chromosomu, sekwencje te stały się użytecznym narzędziem w diagnostyce nowotworowej. Wykazano, że zmiany w ilościach powtórzeń, wstawki lub delecje motywów powtórzeń, a czasami delecje razem z regionem chromosomu są dobrym świadectwem niestabilności genomu wywołanej na przykład mutacją w genie mutatorowym. Prostota analizy powtórzeń mikrosatelitarnych oraz możliwość pełnego jej zautomatyzowania stanowi o przewadze tej techniki w porównaniu z techniką wykrywania specyficznych mutacji [7,8,28,29].

Metody wykorzystujące techniki PCR stwarzają ogromne możliwości dla wczesnej diagnostyki. Wykorzystując je należy jednak pamiętać, że są one technikami nadczułymi. Z faktu, że wykryje się pojedynczą komórkę o zmienionym genomie, nie wynika, że stanie się ona zaledwie zmianą nowotworowej. Wykrycie takiej komórki nie musi też oznaczać czynnej choroby nowotworowej. Konieczne jest zatem wypracowanie pewnych standardów postępowania. W wysokorozwiniętych krajach zachodnich, w których techniki molekularne są już przynajmniej w niektórych ośrodkach medycznych stosowane rutynowo, nadczułość technik PCR stała się powodem kondensacji badań molekularnych w wyspecjalizowanych jednostkach. Tylko takie jednostki są bowiem w stanie zapewnić pełną standaryzację oznaczeń.

Niezwykle obiecujące z punktu widzenia wykrywania i monitorowania przebiegu choroby nowotworowej wydaje się badanie aktywności telomerazy. W większości normalnych komórek somatycznych telomeraza jest nieobecna. Jednak w komórkach nowotworowych staje się aktywna i przeciwdziała skracaniu telomerów. Obecnie wiele firm prowadzi intensywne badania nad opracowaniem odpowiednich testów. Dysponujemy już dziś możliwością opracowania zarówno testu enzymatycznego wykrywającego aktywność telomerazy, jak i testu molekularnego opartego na możliwości pomiaru ekspresji genów, których produkty składają się na aktywność tego enzymu (podjednostka katalityczna – hTERT lub TP1 [30–32]).

PROGNOZOWANIE PRZEBIEGU CHOROBY NOWOTWOROWEJ

Markery molekularne wykorzystywane są dziś dość powszechnie jako narzędzia prognostyczne. W ciągu lat badań nagromadziło się wiele informacji o związkach

pomiędzy przebiegiem choroby a obecnością pewnych zmian w materiale genetycznym [33–35].

W komórkach nowotworowych często obserwowanym zjawiskiem jest amplifikacja określonych onkogenów. Często, choć nie zawsze, amplifikacja onkogenu wiąże się z agresywnością nowotworu, a co za tym idzie jest wskaźnikiem złej prognozy. Zmiany wywołane amplifikacją genu są możliwe do wykrycia metodami immunochemicznymi przy pomocy przeciwciał monoklonalnych albo molekularnymi z wykorzystaniem odpowiednich sond lub przy wykorzystaniu techniki PCR. Większość tego typu badań koncentruje się obecnie na zastosowaniu analizy molekularnej.

Najbardziej znanymi przykładami związku pomiędzy amplifikacją genu a procesem nowotworowym są nerwiaki (neuroblastoma) i rak piersi. W nerwiakach w stopniu 3 i 4 następuje amplifikacja genu *N-MYC*; czasami taka amplifikacja jest widoczna już w stopniu 1 i 2. W stopniu 4S amplifikację *N-MYC* stwierdza się jedynie w 10–20% przypadków. Stwierdzono ponad wszelką wątpliwość ścisły związek pomiędzy ilością kopii genu *N-MYC* a prognozą przebiegu choroby. W praktyce uważa się, że jeżeli liczba kopii genu *N-MYC* przekracza 10, rokowanie dla pacjenta jest złe i należy stosować radykalne sposoby leczenia [36]. W rakach sutka takim wskaźnikiem niekorzystnej prognozy jest zwielokrotnienie liczby kopii proto-onkogenu *ERB-B2* zwanego też *NEU* lub *HER-2*. Produkt tego genu, białko P185, wykazuje strukturalne i funkcjonalne podobieństwo do receptorów dla czynników wzrostowych, szczególnie EGF-u. Zwielokrotnienie liczby kopii genu *ERB-B2* obserwowano w 25–30% raków sutka i raków jajnika. Ponad wszelką wątpliwość wydaje się obecnie udowodnione, że zwiększona liczba kopii i zwiększona ekspresja *ERB-B2* są złymi czynnikami rokowniczymi. Jeżeli do tego w rakach sutka dochodzi do tego zajęcia pachowych węzłów chłonnych, to rokowanie jest bardzo złe [37].

Równie dobrym przykładem zastosowania markera molekularnego do celów prognostycznych wydają się być delecje w chromosomie 18q w rakach jelita grubego. Okazuje się, że w grupie pacjentów z drugim stopniem zaawansowania klinicznego, którzy przeżyli pięć lat, brak delecji w regionie 18q obserwowano aż w 93% przypadków. Natomiast w grupie pacjentów z trzecim stopniem choroby, którzy przeżyli podobny okres, brak delecji 18q obserwowano natomiast jedynie u 53% przypadków [38].

WYBÓR TERAPII

Ostatnio pojawiły się też informacje o możliwości wykorzystania informacji o zmianach w genomie dla wyboru metod terapii. Dobrym przykładem wykorzystania tego typu informacji jest ocena reakcji pacjentów na różne formy chemioterapii w przypadku obserwowanej mutacji w genie *TP53*. Normalną funkcją produktu tego genu jest wykrywanie uszkodzeń genetycznych i uruchomienie procesów na-

prawczych. Gdy uszkodzenia są zbyt poważne, produkt genu *TP53* otwiera komórce drogę do śmierci samobójczej. Wiele typów chemioterapii wywołując poważne uszkodzenia w materiale genetycznym komórki, indukuje *TP53* zależną apoptozę uśmiercając tą drogą komórki nowotworowe. Jednak nowotwór, w którym gen *TP53* uległ delecji lub zmutowany produkt genu jest nieaktywny, może nie odpowiedzieć na taką formę konwencjonalnej chemioterapii. W takim przypadku należy rozważyć inną jej formę. Jako przykład może tu służyć rozważana obecnie w raku piersi alternatywna chemioterapia z zastosowaniem taksolu, która nie jest oparta na indukowanej przez *TP53* apoptozie. Taksol hamuje skutecznie tworzenie wrzeciona podziałowego, czyli hamuje proliferację komórki na granicy faz G2/S, a nie jak większość stosowanych obecnie chemioterapeutyków na granicy faz G1/S [39].

Innym przykładem może być wykorzystanie informacji o mutacji w genie *RAS*. Mutacja ta powoduje stałą aktywację produktu genowego, a ponieważ produkt genu *RAS* włączony jest w kaskadę przekazywania informacji aktywującej do jądra, komórki z takim uszkodzeniem w genomie ulegają ciągłej proliferacji. Z drugiej strony wiadomo, że białko *RAS* produkowane jest w postaci nieaktywnego prekursora. Proces aktywacji białka polega na dodaniu w określone miejsce reszty farnezylowej (15-węglowy łańcuch), umożliwiającej umocowanie białka w błonie komórkowej. Otóż proces dojrzewania białka *RAS* może być całkowicie zahamowany przez inhibicję enzymu zdolnego przenosić reszty farnezylowe zwanego transferazą farnezyli. Badania nad wykorzystaniem odpowiedniego inhibitora transferazy farnezyli jako leku znajdują się już w ostatniej fazie klinicznej i należy oczekiwać, że związek ten w najbliższej przyszłości rozszerzy grupę leków przeciwnowotworowych [40].

* * *

Aby wykorzystać w pełni informacje otrzymane dzięki analizie kwasów nukleinowych, konieczne jest jeszcze wskazanie lokalizacji małej kolonii komórek nowotworowych tak, aby mogły być one wycięte. Postęp w technikach obrazowania za pomocą rezonansu magnetycznego czy komputerowej tomografii powinien pomóc w wykryciu zmian patologicznych. Te badania mogą być wzmacniane przez „biologiczne obrazowanie” – wykorzystujące niskoznakowane związki radioaktywne, lub techniki fluorescencyjne, w których sygnały radiacyjne dokładnie lokalizują położenie komórek nowotworowych.

Jeszcze przez długie lata poszukiwane będą odpowiednie markery, które w sposób precyzyjny wiązałyby określoną jednostkę chorobową (określony typ nowotworu) z badaną zmianą, ułatwiałyby prognozę, jak i zastosowanie najskuteczniejszej terapii. Zapewne nie będzie też pojedynczego testu zdolnego do wykrycia wszystkich typów nowotworów. Każdy bowiem rodzaj nowotworu ma swój własny „podpis molekularny”, a więc wymaga odrębnego opracowania.

Pomimo korzyści płynących z zastosowania diagnostyki molekularnej, większość badań znajduje się w stadium początkowym i oczekuje na końcową weryfikację w dużych eksperymentach klinicznych. Wydaje się jednak, że na przełomie wieku, właśnie diagnostyka molekularna w chorobach nowotworowych będzie częścią rutynowego badania lekarskiego.

LITERATURA

- [1] LIMON J, SIEDLECKI JA. Choroby nowotworowe., [w] J.Bal [red] Badania molekularne i cytogenetyczne. Elementy genetyki klinicznej. Warszawa; Springer PWN; 1998; 141–185.
- [2] BARTEK J, BARTKOVA J, VOJTESEK B, STASKOVA Z, LUKAS J, REITHAR A, KOVARIK J, MIDGLEY CA, GANNON JV, LANE DP. Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. *Oncogene* 1991; 6: 1699–1703.
- [3] HIRATA T, FUKUSE T, NAIKI H, HITOMI S AND WADA H. Expression of the CD44 variant exon 6 in stage I non-small cell lung carcinoma as a prognostic factor. *Cancer Res* 1998; 58: 1108–1110.
- [4] SZYMENDERA JJ, GÓŹDŹ SS. Rola krążących markerów nowotworowych w diagnostyce i monitorowaniu leczenia chorych na nowotwory. *Nowotwory* 1995; 45: 365–383.
- [5] RAMASAMY J, BRISCO M, MORLEY A. Improved PCR method for detecting monoclonal immunoglobulin heavy chain rearrangement in B-cell neoplasms. *J Clin Pathol* 1992; 45: 770–775.
- [6] SIDRANSKY D. Nucleic acid-based methods for the detection of cancer. *Science* 1997; 278: 1054–1058.
- [7] BOCKER T, DIERMANN J, FRIEDL W, GEBERT J, HOLINSKI-FENER E, KARNER-HANUSCH J, von KNEBEL-DOEBERITZ M, KOEBLE K, MOESLEIN G, SCHACKERT H-K, WIRTZ H-C, FISHEL R, ANDRUSCHOFF J. Microsatellite instability analysis: A multicenter study for reliability and Quality control. *Cancer Res* 1997; 57: 4739–4743.
- [8] NAWROZ H, KOCH W, ANKER P, STROUN M and SIDRANSKY D. Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nature Med* 1996; 2: 1035–1037.
- [9] ELTAHIR EM, MALLINSON DS., BIRNIE GD, HAGAN C, GEORGE WD, PURUSHOTHAM AD. Putative markers for the detection of breast carcinoma cells in blood. *Br J Cancer* 1998; 77: 1203–1207.
- [10] GHOSSEIN RA, SCHER HI, GERALD WL, KELLY WK, CURLEY T, AMSTERDAM A, ZHANG Z-F, ROSAI J. Detection of circulating tumor cells in patients with localized and metastatic prostatic carcinoma: Clinical implications. *J Clin Oncol* 1995; 13: 1195–1120.
- [11] KULIK J, NOWECKI Z, RUKA W, SIEDLECKI JA. Wykrywanie komórek czerniaka krążących we krwi obwodowej za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy. *Nowotwory* 1996; 46: 707–715.
- [12] POWELL SM, ZILZ N, BEAZER-BARELAY Y, BRYAN TM, HAMILTON RS, THIBODEAU SV, VOGELTEIN B, KINZLER KW. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992; 359: 235–237.
- [13] FEARON ER. Human cancer syndromes; Clues to the origin and nature of cancer. *Science* 1997; 278: 1043–1050.
- [14] YAKUBOWSKAYA MS, SPIEGELMAN V, LUO FC, MALEV S, SALNEV A, ZBOROWSKAYA I, GASPARYAN A, POLOTSKY B, MACHALADZE Z, TRACHTENBERG AC,

- BELITZKY GA, AND RONAI Z. High frequency of K-RAS mutations in normal appearing lung tissue and sputum of patients with lung cancer. *Int J Cancer* 1995; **63**: 810–814.
- [15] GOTTLIEB TM and OREN M. p53 in growth control and neoplasia. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1996; **1287**: 77–102.
- [16] PONDER B. Genetic testing for cancer risk. *Science* 1997; **278**: 1050–1054.
- [17] HEIM S, MITELMAN, F. [w] Cancer Cytogenetics. New York; Wiley-Liss: 1995
- [18] HOSLER GA, BASH RO, BAI X, JAIN V, SCHEUERMANN RH. Development and validation of a quantitative polymerase chain reaction Assay to evaluate minimal residual disease for T-cel acute lymphoblastic leukemia and follicular lymphoma. *Am J Pathol* 1999; **154**: 1023–1035.
- [19] ZOUBEK A, LADENSTEIN R, WINDHAGER R, AMANN G, FISCHMEISTER G, KAGER L, JUGOVIC D, AMBROS PF, GADNER H and KOVAR H. Predictive potential of testing for bone marrow involvement in Ewing tumor patients by RT-PCR; a preliminary evaluation. *Int J Cancer* 1998; **79**: 56–60.
- [20] URBAN T, RICCI S, GRANGE J-D. Detection of K-RAS mutation by PCR/RFLP analysis and diagnosis of pancreatic adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1993; **85**: 2008–2012.
- [21] van HEURN LW, SCHAAP C, SIE G, HAAGEN AA, GERVER WJ, FRELING G, van AMSTEL HK, HEINEMAN E. Predictive DNA testing for multiple endocrine neoplasia 2: a therapeutic challenge of prophylactic thyroidectomy in very young children. *J Pediatr Surg* 1999; **34**: 568–571.
- [22] INOUE K, SHIMOTAKE T, INOUE K, TOKIWA K, IWAI N. Mutational analysis of the RET proto-oncogene in kindred with multiple endocrine neoplasia type 2A and Hirschsprungs disease. *J Pediatric Surg* 1999; **34**: 1552–1554.
- [23] MAO L, HRUBAN RH, BOYLE JO, TOCKMAN H, SIDRANSKY D. Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer. *Cancer Res* 1994; **54**: 1634–1637.
- [24] LEITZEL K, LIEU B, CURLEY E, SMITH J, CHINCHILLI V, RYCHLIK W AND LIPTON A. Detection of cancer cells in peripheral blood of breast cancer patients using RT-PCR for epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 1998; **4**: 3037–3043.
- [25] SIDRANSKY D, TOKINO T, HAMILTON RS. Identification of ras mutation in stool of patients with curable colorectal cancer. *Science* 1992; **256**: 102–105.
- [26] RAJ GV, MORENO JG, GOMELLA LG. Utilization of polymerase chain reaction technology in the detection of solid tumors. *Cancer* 1998; **82**: 1419–1442.
- [27] KULIK J, NOWECKI ZI, RUTKOWSKI P, RUKA W, ROCHOWSKA M, SKURZAK H, SIEDLECKI JA. Detection of circulating melanoma cells in peripheral blood by a two-marker RT-PCR assay. *Melanoma Res* 2000; in press.
- [28] CHEN XQ, STROUN M, MAGNENAT J-L, NICOD LP, KURT A-M, LYAUTEY J, LEDERREY C and ANKER P. Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung carcinoma. *Nature Med* 1996; **2**: 1033–1035.
- [29] DIETMAIER W, WALLINGER S, BOCKER T, KULLMANN F, FISHEL R, AND J RUSCHOFF J. Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res* 1997; **57**: 4749–4756.
- [30] COUNTER CM, HIRTE HW, BACCHETTI S and HARLEY CB. Telomerase activity in human ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 2900–2904.
- [31] SHAY JW., BACCHETTI S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997; **33**: 787–791.
- [32] CONG Y-S, WEN J, BACCHETTI S. The human telomerase catalytic subunits hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum Molec Gen* 1999; **8**: 137–142.
- [33] FEARON ER. K-RAS gene mutation as a pathogenic and diagnostic marker in human cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; **85**: 1978–1980.

- [34] HORIO Y, TAKAHASHI T, KUROISHI T, HIBI K, SUYARNA M, NIIMI T, SHIMOKATA K, YAMAKAWA K, NAKAMURA Y, UEDA R. Prognostic significance of P53 mutations and 3p. deletions in primary resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1993; **53**: 1–4.
- [35] MITSUDOMI T, OYAMA T, KUSANO T, OSAKI T, NAKANISHI R, SHIRAKUSA T. Mutations of the *P53* gene as a predictor of poor prognosis with non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; **85**: 2018–2023.
- [36] INOUE A, HASAN Z, HEMMI H, KANDA N, HAYOSH Y, IZHIZAWA T, TSUCHIDA Y, SHIMATAKE H. Competitive PCR for the quantification of N-myc gene copy number in neuroblastoma. *Tumor Biology* 1996; **17**: 262–270.
- [37] SAHIU AA. Biological and clinical significance of HER-2/NEU (c ERB-2) in breast cancer. *Adv Anat Pathol* 2000; **7**: 158–166.
- [38] JEN J, KIM H, PIANTADOSI S, LIU ZF, LEVIT RC, SISTONEN D, KINZLER KW, VOGELSTEIN B, HAMILTON RS. Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1994; **331**: 213–221.
- [39] CROWN J, O'LEARY M. The taxanes: an update. *Lancet*. 2000;355:1176-8.
- [40] BARINGA M. From bench top to bedside. *Science* 1997; **278**: 1036–1039.

Adres autora: ul. Roentgena 5, 02-781 Warszawa
e-mail: jas@coi.waw.pl

**NIEKTÓRE MECHANIZMY IMMUNOLOGICZNE
W NOWOTWORACH.
IMMUNOTERAPIA NOWOTWORÓW
W MODELACH ZWIERZĘCYCH ORAZ W KLINICE***

**IMMUNOLOGICAL MECHANISMS IN CANCER.
CANCER IMMUNOTHERAPY IN ANIMAL MODELS
AND IN THE CLINIC**

Jerzy KAWIAK, Grażyna HOSER

Zakład Cytologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

*Artykuł poświęcamy pamięci
doktora Macieja Kawalca*

Streszczenie: Immunoterapia nowotworów nie jest ogólnie przyjętym postępowaniem w klinicznym leczeniu, mimo że pierwsze próby w tym kierunku czyniono wiele lat temu. Teoretycznie w leczeniu można wykorzystać fakt pojawienia się w trakcie kancerogenezy antygenów swoistych dla nowotworu, TSA (*Tumor Specific Antigens*), np. Bcr/abl, bądź antygenów związanych z nowotworem, TAA (*Tumor Associated Antigens*). W trakcie procesu transformacji nowotworowej komórki gromadzą produkty onkogenów i/lub tracą funkcjonalne produkty genów supresorowych nowotworów. Te genetyczne zmiany w komórce przyczyniają się, między innymi, do zmienionej sygnalizacji wewnątrzkomórkowej na drogach regulujących proliferację, jak i apoptozę. Zmiany takie w komórce zachodzą kolejno w różnych genach i proces ten nazywamy progresją nowotworu. Rozwój nowotworu jest jednak warunkowany nie tylko pojawieniem się w komórkach transformowanych nowotworowo zmian genetycznych, ale również zmienioną odpowiedzią układu odpornościowego na nowotwór. Pojawia się tolerancja immunologiczna, w której komórki nowotworowe i cytotoksyczne limfocyty koegzystują, a atak limfocytów przeciw komórkom nowotworowym jest zahamowany. Zwykle komórki predendrytyczne docierają do guza nowotworowego i mogą przejmować antygeny komórek nowotworowych, a potem po osiedleniu się w obwodowych węzłach chłonnych prezentować je dziewiczemu limfocytom T CD4⁺ i CD8⁺ w reakcji krzyżowej. Są obserwacje, iż antygeny komórek nowotworowych pochodzące z komórek w apoptozie mogą być prezentowane krzyżowo, w czym uczestniczą białka opiekuńcze. Zjawiska te

*Praca finansowana z grantu KBN 4PO5A 002 18 oraz 501-1-1-03-12/00.

wykorzystano w immunoterapii nowotworów dla przerywania tolerancji immunologicznej. W leczeniu nowotworów immunoterapia jest metodą pomocniczą i można z nią wkroczyć po wstępnym zmniejszeniu masy nowotworu zabiegiem chirurgicznym. Guz nowotworowy, usunięty podczas zabiegu chirurgicznego i podzielony na porcje, jest przechowywany w ciekłym azocie. Po miesiącu od usunięcia guza bankowane fragmenty guza są wyjmowane z azotu, komórki guza rozizolowuje się i *ex vivo* napromieniowuje albo traktuje Mafosfamidem używając dawki blokujące proliferację, ale nie zabijające komórek. Komórki guza odpowiednio przygotowane służą do kilkakrotnego uodpornienia chorego podaniem podskórnym (sc). Aktywacja układu immunologicznego powoduje usunięcie pozostałych po zabiegu chirurgicznym komórek nowotworowych. Kliniczne wyniki immunoterapii raka jelita grubego są podobne jak w chemioterapii stosowanej po zabiegu chirurgicznym. Dla chorego jest ważne, że immunoterapia nie jest tak obciążającym zabiegiem jak chemioterapia, a ponadto nie naraża chorego na dodatkowe zakażenia bakteryjne, wirusowe i grzybicze oraz nie indukuje wtórnych nowotworów. (*Postępy Biologii Komórki 2000; Supl. 15: 91–118*)

Słowa kluczowe: komórki dendrytyczne, TSA, TAA, immunoterapia nowotworów.

Summary: Cancer immunotherapy is not a standard in clinical treatment of tumors, while first attempts were made several years ago. The appearance of tumor specific antigens (TSA) e.g. Bcr/abl, or tumor associated antigens (TAA) in cancer cells may be used theoretically in cancer therapy. Tumor cells in transformation process accumulate products of oncogenes and/or loss the functional products of tumor suppressor genes. This processes change intracellular signaling roads regulating cell proliferation and/or apoptosis of cancer cells and effect the tumor growth progression. Tumor progression is, however, not only due to genetic transformation of cancer cells but as well to changes in response to the tumor of immunological system of the organism. The immunological tolerance of the organism develop in cancer, the situation when cancer cells and cytotoxic T cells (CTLs) coexist. The attack of CTL against tumor cells is blocked. Predendritic cells (pDC) are present in tissues, and they endocytose virally infected or pre-cancer cells. Than the pDC translocate to peripheral lymphatic tissue e.g. lymph nodes where they mature to dendritic cells (DC) and cross-present the antigens of infected cells or cancer cells to naive T cells CD8⁺ and CD4⁺. The antigens of apoptotic cells may be cross-presented by DC to T lymphocytes as well, and probably chaperone proteins (hsp) are involved in this process. The above observations were used to stop the immunological tolerance in cancer as part of immunotherapy. The scheduled procedure is, first surgical removal of the tumor. The tumor tissue is divided on portions and banked in liquid nitrogen. Then, about one months after surgery, the tumor tissue is recovered from the bank, tumor cells are isolated and *ex vivo* irradiated or treated with Mafosfamide (Maf) with a dose sufficient to block cell divisions, but not to kill the cells. The cell suspension is than injected s.c. to the patient four times in one week intervals. The activation of immunological system should induce removal of cancer cells remaining after surgery. The clinical results in colon cancer immunotherapy are similar as in chemotherapy after surgery. It is important, that immunotherapy does not expose the patient to bacterial, viral or fungal infections and does not induces secondary cancers as compared to chemotherapy. (*Advances in Cell Biology 2000; Supl. 15: 91–118*)

Key words: dendritic cells, TSA, TAA, cancer immunotherapy

Objaśnienia skrótów: **APC** (*antigen presenting cell*) – komórka prezentująca antygen; **BCG** (franc. *bacille Calmette Guérin*) – szczepionka przygotowana z żywych atenuowanych prątków *Mycobacterium tuberculosis*; **CD** (*cluster of differentiation*) – kompleks różnicowania; tym symbolem i odpowiednią cyfrą oznaczone są epitopy komórek, głównie leukocytów; **Chemokiny** – cząsteczki oddziałujące chemotaktycznie na różne populacje leukocytów; **CTL** (*cytotoxic T lymphocyte*) – limfocyt T cytotoxyczny; **Cytokiny** – cząsteczki regulujące proliferację i różnicowanie komórek, są one mediatorami reakcji zapalnych i immunologicznych; **DC** (*dendritic cell*) – komórka dendrytyczna; **Determinanty antygenowe (epitopy)** – fragmenty antygeny, które wiązane są przez przeciwciała lub receptory limfocytów T wiążące antygen; **GM-CSF** (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów; **HLA** (*human leukocyte antigens*) –

antygeny ludzkich leukocytów; **HSP** (*heat-shock proteins*) – białka opiekuńcze, białka szoku cieplnego; **IFN** – interferon; **Interleukiny** (IL) – cząsteczki służące komunikowaniu się i wzajemnemu oddziaływaniu między komórkami układu odpornościowego; **Komórka docelowa** – w tym artykule to komórka nosząca odpowiedni antygen, która jest obiektem ataku komórek cytotoksycznych; **Komórka efektorowa** – komórka wykazująca właściwości pomocnicze, supresorowe lub cytotoksyczne; **Komórki immunologicznie kompetentne** – limfocyty, które są zdolne do rozpoznania antygeny i odpowiedzi immunologicznej na ten antygen; komórka **NK** (*natural killer*) - naturalna komórka cytotoksyczna NK; **LC** (*Langerhans cell*) – komórka Langerhansa; limfocyt **Tc** – limfocyt T cytotoksyczny; limfocyt **Th** (*helper*) – limfocyt T pomocniczy; **LPS** – lipopolisacharyd (składnik ścian drobnoustrojów gramujemnych); **MHC** (*major histocompatibility complex*) – główny układ zgodności tkankowej; cząsteczki głównego układu zgodności tkankowej są związane z komórkami i biorą udział w prezentacji antygenów limfocytom T; **TAA** (*tumor associated antigens*) – antygeny związane z nowotworem; **TAP** (*transporter associated with antigen processing*) – białko transportujące związane z obróbką antygeny; **TCR** (*T-cell receptor*) – receptor limfocytów T; **TGF** (*transforming growth factor*) – transformujący czynnik wzrostu; **TSA** (*tumor specific antigens*) – swoiste antygeny nowotworowe

1. WSTĘP

Leczenie nowotworów – zabieg chirurgiczny i napromienianie – jest naogół skuteczne tylko wtedy, gdy guz został wcześniej rozpoznany [32]. Trwałe remisje bądź wyleczenia po chemioterapii obserwuje się w białaczkach dzieci oraz w raku jądra. Chemioterapia jest również skuteczna w leczeniu chorych z kosmówczakiem oraz u około 15% chorych na raka drobnokomórkowego płuca. Jednak u dzieci po chemioterapii białaczek obserwowano genetyczną niestabilność komórek nienowotworowych, liczne mutacje limfocytów T [29]. Przypuszcza się, że podczas chemioterapii są indukowane wtórne nowotwory oraz oporność na leki. Tymi niepożądanymi skutkami dla chorego nie jest obciążone wykorzystanie procesów naturalnej odporności w leczeniu nowotworów, czyli immunoterapia. W wielu przypadkach immunoterapia może być również stosowana jako leczenie paliatywne podobnie jak chemioterapia, ale bez obciążających chorego „kursów” chemioterapii obniżających dodatkowo ogólną odporność [11]. W pewnych przypadkach postępowanie immunoterapeutyczne nie wyklucza kojarzenia z chemioterapią. Aby lepiej zrozumieć problemy związane z immunoterapią nowotworów, dobrze jest porównać tę metodę postępowania ze szczepieniem przeciw chorobom zakaźnym. Szczepienie osoby przeciw chorobie zakaźnej jest najczęściej postępowaniem prewencyjnym skierowanym przeciw antygenom określonego mikroorganizmu. Takie szczepienia przez określony czas (okres) chronią organizm przeciw infekcji wirusem, bakterią bądź innym patogenem. Szczepienie w celu leczenia stosuje się dla zwalczania wścieklizny. Postępowanie w schorzeniach nowotworowych z reguły jest leczeniem chorego. Można spodziewać się, narazie tylko wyjątkowo, stosowania immunoprewencji w stanach przedrakowych [42]. Miałyby to szczególne znaczenie w nowotworach zależnych od zakażenia wirusem, np. wirusem papiloma [27] u kobiet, co wiąże się z narażeniem tych osób na pojawienie się raka szyjki macicy. Trzeba

pamiętać, że komórki nowotworowe tworzące guz stanowią niejednorodną populację oraz są takimi właśnie, którym udało się przewyciężyć obronę immunologiczną gospodarza i wywołać tolerancję immunologiczną.

Leczenie immunologiczne nowotworu zwykle nie jest samodzielny postępowaniem, ale wspomagającym, skojarzonym z innymi sposobami leczenia np. chirurgią. Jest to spowodowane stosunkowo późnym rozpoznawaniem nowotworów u chorych, a to z kolei wynika z wolno i niepostrzeżenie rozpoczynającej się choroby. Zabieg chirurgiczny czy miejscowe napromienianie ma więc zmniejszyć masę guza. Pewne nadzieje budzą nowe metody wczesnej diagnozy nowotworów z wykorzystaniem metody fotodynamicznej [59], którą można wcześniej rozpoznać drobne guzy o średnicy zaledwie 1–3 mm. Niestety są to guzy położone w skórze, a tylko wyjątkowo w głębi ciała. Do tego również zmierzają próby wczesnego określenia genetycznych zmian komórek nowotworowych technologią DNA-chips (brak terminu polskiego) [22]. Określenie zmian genetycznych w komórkach nowotworowych można wykorzystać również do prognozowania przebiegu choroby nowotworowej np. raka płuca [63], w celu zastosowania odpowiedniego leczenia. Wydaje się natomiast, że próby sporządzenia przeciwnowotworowej szczepionki uniwersalnej, przeciw różnym nowotworom, mają znikomą szansę powodzenia.

Proces kancerogenezy jest złożony, przebiega w wielu etapach, początkowo wolno i niepostrzeżenie. Transformacja nowotworowa komórek nie jest zdarzeniem jednorazowym, ale jest skutkiem nagromadzenia, często w ciągu wielu lat, zmian zachodzących w genomie. DNA komórek nowotworowych koduje niektóre nieprawidłowe białka. W trakcie procesu transformacji nowotworowej dochodzi do zmian genetycznych: mutacji punktowych, translokacji, delecji fragmentów DNA w komórce. Szacuje się, że przeciętnie jest to 5–6 mutacji w komórce, zanim stanie się złośliwą komórką nowotworową dającą przerzuty. Wyrazem tych zmian genetycznych są pojawiające się zmienione białka, np. białka fuzyjne, mające nowe determinanty antygenowe odróżniające komórki nowotworowe od prawidłowych. Cząsteczki te są określane jako antygeny nowotworowe swoiste (TSA=*Tumor Specific Antigens*), albo gdy nie są swoiste – jako antygeny związane z nowotworem (TAA = *Tumor Associated Antigens*). Bardzo często komórki tak zmienione są usuwane przez układ immunologiczny. Zdarza się jednak, że zmieniona komórka pozostaje żywa i dzieli się, a jej potomstwo ma okazję do dalszych zmian w swoim genomie. Zmiany w genomie komórki nowotworowej mogą prowadzić do niezależnienia się jej od sygnałów pozostałych komórek organizmu, a także unikania ataku immunologicznego. Zmiany zachodzą różnie w poszczególnych komórkach wczesnego nowotworu, stąd początkowo guz stanowi niejednorodną populację składającą się z wielu subpopulacji komórek, często różnych antygenowo i zachowujących różną zależność od pozostałych komórek organizmu. Zdarza się jednak, że komórki jednej subpopulacji zyskują szczególnie sprzyjające właściwości do

rozwoju i wtedy przeważa w guzie jeden bądź niewiele klonów komórek nowotworowych.

Podstawowym zaburzeniem pojawiającym się w nowotworze jest: nieregulowana proliferacja komórek nowotworowych oraz/albo większa ich odporność na czynniki powodujące śmierć komórki. Jest to wynikiem nagromadzenia się w transformowanej komórce zmian w genach kodujących białka na szlakach przekazywania sygnałów do układów regulujących podziały i tych, które regulują śmierć komórki. Proces uniezależniania się komórek nowotworowych odbywa się stopniowo, jest procesem „chronicznym”, również stopniowo przekraczającym bariery obrony organizmu z udziałem układu immunologicznego. W pewnym okresie rozwoju choroby dochodzi do załamania się podstawowych funkcji organizmu, który ginie.

2. ZMIENIONA ODPOWIEDŹ UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO W NOWOTWORACH. TOLERANCJA IMMUNOLOGICZNA

W walce z nowotworem należy brać pod uwagę nie tylko zmienioną reaktywność i antygenowość komórek nowotworowych spowodowaną pojawieniem się w nich nowych białek, ale również zmieniony sposób reagowania układu immunologicznego w schorzeniach nowotworowych [3]. Brak odrzucania nowotworu przez układ immunologiczny może częściowo być spowodowany ekspansją komórek guza. Swoiście odpowiadające na komórki nowotworowe limfocyty T bądź nieswoiście odpowiadające inne komórki układu obronnego są w zbyt małej proporcji do komórek nowotworu, by go zwalczyć. Wielokrotnie obserwowano, że zabiegi prewencyjne bądź szczepienie przeciwnowotworowe we wczesnym okresie po wszczepieniu zwierzęciu nowotworu są skuteczne, natomiast immunoterapia w późniejszym stadium wzrostu nowotworu nie prowadzi do wyzdrowienia. Przyczyn tego stanu może być kilka.

- (1) Nowotwór, jak i otaczające go tkanki mogą zyskać zdolność do produkcji czynników immunosupresyjnych np. TGF β hamującego efektywną stymulację, szczególnie komórek T dziewiczych [97]. Udowodniono również, że komórki białaczki produkują substancje hamujące dojrzewanie tymocytów w grasicy [57].
- (2) Inną istotną przyczyną może być szybki przyrost łącznej masy komórek nowotworowych, podobnie jak bakterii podczas posocznicy, a liczba prekursorowych swoistych komórek T zbyt wolno przyrasta dla skutecznego usunięcia guza.
- (3) Komórki nowotworu mogą mieć niewydolny układ przygotowania antygeny w proteasomach [80] oraz mogą utracić zdolność prezentacji antygeny z powodu upośledzenia ekspresji MHC klasy I [67, 75].

Oczywiście antygeny nowotworowe dopiero w połączeniu z autologicznymi cząsteczkami MHC mogą być rozpoznane przez limfocyty T. Upośledzenie ekspresji cząsteczek MHC klasy I nie jest łatwe do interpretacji, bo niektóre prawidłowe

TABELA 1. Mechanizmy tolerancji immunologicznej na obwodzie (wg [31] zmienione)

Mechanizm	Literatura – modele zwierzęce
Ignorancja	Wick et al. 1997 [102]
Anergia	Mizaguchi et al. 1992 [66], Speiser et al. 1997 [88], Staveley-O'Carroll et al. 1998 [89]
Delecja limfocytów T	Hahne et al. [40], Zeytun et al. [109]

komórki jak mięśniowe, tłuszczowe, rozrodcze – konstytutywnie nie mają determinant HLA-ABC, ale zachodzi ich ekspresja w guzach nowotworowych wywodzących się z tych komórek. W wielu nowotworach np. w raku gardła, pęcherza moczowego, drobnokomórkowego i niedrobnokomórkowego raku płuca, piersi, szyjki macicy obserwuje się niską ekspresję bądź brak ekspresji HLA klasy I. W raku jelita grubego 10–15% guzów zupełnie nie ma ekspresji HLA-ABC wykrywanej immunocytochemicznie, ale pozostałe mają [67].

Wyżej opisane zjawiska przyczyniają się do **tolerancji immunologicznej**, gdy układ immunologiczny nie odpowiada, bądź odpowiedź jest niewystarczająca na pojawiające się komórki nieprawidłowe, nowotworowe.

W tabeli 1 zebrano wybraną literaturę o mechanizmach indukcji tolerancji na obwodzie, poza centralnymi narządami immunologicznymi [31].

Mimo obserwacji, głównie prowadzonych *in vitro*, że wiele komórek układu immunologicznego może zabijać komórki nowotworowe, tylko wyjątkowo *in vivo* obserwuje się efektywną odpowiedź immunologiczną przeciw nowym antygenom pojawiającym się podczas kancerogenezy na powierzchni komórek nowotworowych. Antygeny związane z nowotworem zwykle pojawiają się wewnątrz komórek i nie dają sygnału zagrożenia. Jedną z przyczyn tolerancji jest zjawisko **ignorancji**, co dobrze ilustruje następująca obserwacja. Badano zachowanie się przeszczepów do myszy transgenicznej, u której praktycznie wszystkie limfocyty T CD8⁺ były swoiście skierowane przeciw jednej grupie własnych peptydów naturalnych, pochodzących z enzymu dehydrogenazy α -ketoglutaranu, występującego powszechnie w komórkach prawidłowych i komórkach nowotworowych. Peptydy były prezentowane w związku z MHC klasy I (H-2L^d). U myszy tej przeszczepy skóry L^d-pozytywne były odrzucane, ale nowotwory L^d-pozytywne dobrze rosły [102]. W opisanym modelu można było to precyzyjnie wykazać, bo: 1) w myszy transgenicznej występowała praktycznie olbrzymia liczba limfocytów T CD8⁺ swoistych dla guza (anty-nowotworowe limfocyty T CD8), 2) transgeniczne limfocyty T CD8⁺ rozpoznawały ten sam epitop zarówno na L^d(+) komórkach guza, jak i na L^d(+) komórkach prawidłowych. Gospodarz z rosnącym, ustabilizowanym nowotworem nie wykazywał objawów wyczerpania się limfocytów T, układowej anergii ani uogólnionej immunosupresji, mimo że w trakcie wzrostu guz nie tracił ekspresji L^d.

Guz nie miał też ekspresji FasL, co powodowałoby zabijanie limfocytów atakujących nowotwór (patrz dalej). Przeszczepy skóry były odrzucane po 12–13 dniach, również w przypadku rosnącego u gospodarza guza nowotworowego, a więc nie obserwowano wyczerpania się swoistych L^d limfocytów T CD8. Traktowanie myszy przeciwciałem anti-CD8, ale nie anti-CD4, zapobiegało odrzuceniu przeszczepu skóry, co potwierdza konieczny udział w tym procesie limfocytów T CD8. Komórki nowotworowe w teście *in vitro* były lizowane przez swoiste $L^d(+)$ komórki T, ale *in vivo* proces ten nie zachodził. Mimo obecności swoistych antygenowo limfocytów T, komórki nowotworowe rosły i nie były atakowane, podczas gdy przeszczep normalnej skóry był odrzucany. Do tego, aby nastąpiło odrzucenie przeszczepu nowotworu, była konieczna ekspresja kostymulujących cząsteczek na nowotworowych komórkach oraz pre-immunizacja myszy przeszczepem skóry. Tak więc również tutaj zaobserwowano, że w przypadku ustalonego, rosnącego nowotworu brak aktywacji swoistych dla nowotworu limfocytów T w miejscu guza, może być przeszkodą w leczeniu bądź zapobieganiu wzrostowi nowotworu noszącego rozpoznawalne antygeny. Bez dodatkowego bodźca układ działa tak, jakby ignorował obecność antygeny prezentowanego w związku z MHC-klasy I – $L^d(+)$ na komórkach nowotworowych. Podobna wczesna tolerancja limfocytów T w stosunku do nowotworu pojawia się po przejściowej aktywacji antygenowo-swoistych komórek T [89]. Limfocyty T swoiste antygenowo dla nowotworu podlegają istotnym zmianom fenotypowym i funkcjonalnym już wkrótce po zetknięciu się z antygenami nowotworowymi, co prowadzi do progresji nowotworu i wyprzedza ogólną, systemową immunosupresję u myszy.

Anergię przypisuje się głównie brakowi sygnałów kostymulujących. Do aktywacji limfocytów T mających receptor CD28 jest niezbędny ligand CD80 (B7-1) na komórkach docelowych [1, 103]. Komórki nowotworowe mogą nie mieć cząsteczek kostymulujących (B7) oddziałujących z CD28 limfocytów T cytotoksycznych i warunkujących ich cytotoksyczny efekt. Nowotwory immunogenne np. myszy chłoniak RMA, EL4, mastocytoma P815, nie mają ekspresji liganda B7 i są tumorogenne po wszczepieniu do myszy syngenicznej, ale tracą tę właściwość (tumorogenność) po transfekcji B7 [20]. Natomiast nowotwory nieimmunogenne, takie jak mysie mięsaki MCA101, Ag104 czy melanoma B16, po transfekcji genem B7 pozostają tumorogenne. Tak więc kostymulacja jest konieczna na etapie oddziaływania limfocyt T-komórka docelowa, ale warunkiem skuteczności jest immunogenność nowotworu.

Delecja swoistych limfocytów T może być spowodowana ekspresją Fas-Liganda (FasL) na komórkach nowotworowych [40, 56, 71]. Jak zaobserwowano, swoiste, aktywowane **cytotoksyczne limfocyty T (CTL)**, które wykazują ekspresję Fas zbliżając się do komórek melanoma z FasL na powierzchni otrzymują sygnał do apoptozy i są eliminowane. Obserwowano też inny mechanizm eliminacji swoistych CTL. Polega on na pobieraniu przez limfocyty T kompleksów peptyd-MHC z APC na

drodze endocytozy zależnej od receptorów. W tym procesie limfocyty T mogłyby prezentować pobrane antygeny nowotworowe w związku z MHC klasy I i stawać się komórkami wrażliwymi na swoistą lizę przez sąsiednie limfocyty T (*fratricide*) [43]. Zjawisko to może zachodzić, gdy do limfocytów T jest przenoszonych wiele kompleksów peptyd-MHC i może ono dobrze tłumaczyć „wyczerpanie” odpowiedzi limfocytów T wywołane znacznym „ładunkiem” antygenów dostarczanych przez nowotwór dużych rozmiarów.

3. ROZPOZNAWANIE PRZEZ LIMFOCYTY T I LIMFOCYTY NK KOMÓREK NOWOTWOROWYCH JAKO KOMÓREK W STRESIE

Ekspresja MHC klasy I jest często upośledzona w komórkach zakażonych wirusem i w komórkach nowotworowych, jak o tym już wspomniano. Powoduje to brak aktywacji limfocytów $T\alpha\beta$ przy udziale MHC klasy I, limfocytów skierowanych przeciw zakażonym i nowotworowym komórkom, co chroni je przed atakiem komórek układu odpornościowego. Natomiast sygnałem stresu komórki niezależnym od MHC, wywołującym odpowiedź immunologiczną jest obecność na jej powierzchni białka MICA i podobnego do niego białka MICB. Te cząsteczki białkowe funkcjonują jak antygeny wywołane stresem i są rozpoznawane przez limfocyty $T\gamma\delta$ [92] ze zmiennym regionem $V\delta 1$ [37]. Limfocyty te stanowią około 37% limfocytów T w nabłonku jelita grubego człowieka [22a]. Limfocyty $T\gamma\delta$ rozpoznają antygeny MICA/B bez konieczności prezentacji ich w związku z MHC klasy I albo klasy II i ligandami peptydowymi. Oddziaływania te nie są warunkowane cięciem antygenów na peptydy, jak ma to miejsce w rozpoznawaniu antygenów prezentowanych w związku z MHC. Komórki prawidłowe nie wykazują na powierzchni ekspresji białka MICA.

U człowieka białka oznaczane jako **MICA** i **MICB**, zachowane w rozwoju prawie wszystkich ssaków, są kodowane w pobliżu genu MHC klasy I, HLA-B. Transkrypcja genu MICA jest regulowana przez promotor białek opiekuńczych [36]. Białka MICA/B mają tylko 27% sekwencji aminokwasów identycznych z MHC klasy I w zewnątrzkomórkowych domenach $\alpha 1\alpha 2\alpha 3$ oraz wiele miejsc glikozylacji, ale nie mają domen wiążących CD8 i $\beta 2m$.

Obserwowano, że komórki nowotworów pochodzenia nabłonkowego, np. raka płuca, sutka, nerki, jajnika, prostaty, jelita grubego, mają ekspresję białek MICA i MICB, stąd powinny być rozpoznawane jako komórki w stresie. Prawdopodobnie tak jest, gdyż w guzach z ekspresją MICA/B częstość występowania limfocytów $T\gamma\delta V\delta 1$ była znacznie większa niż w guzach MICA/B negatywnych [38]. Do rozpoznania liganda MICA służy komórkom NK, jak i limfocytom T receptor oznaczany jako NKG2D [7]. Receptor NKG2D jest izoformą immunoglobino-po-

dobnych receptorów oddziałujących z HLA-A, -B, -C [21, 107]. Receptor ten po rozpoznaniu MICA tworzy kompleks z innym białkiem błonowym komórek NK i limfocytów T, białkiem DAP10, aktywując te komórki przeciw komórkom docelowym [106]. Białko DAP10 ma domenę SH2, którą oddziałując z podjednostką p85 kinazy-3-fosfatydyloinozytolowej (PI-3-kinaza) [87] przekazuje w cytoplazmie sygnał do uruchomienia reakcji cytotoksycznej komórek NK i limfocytów T. Sygnał ten trafia więc na drogę wewnątrzkomórkową, prowadząc przez PI-3 kinazę, jak w procesie kostymulacji przez CD28 [73]. Można również domyślać się, chociaż tego w tym układzie bezpośrednio nie udowodniono, że drogą PI-3-kinazową atakujące cytotoksyczne komórki NK i cytotoksyczne limfocyty T są chronione przed apoptozą [56]. Transkrypty (mRNA) DAP10 wykryto w komórkach śledziony i grasicy, komórkach NK, limfocytach $T\alpha\beta$ oraz limfocytach $T\gamma\delta$, także w komórkach mieloidalnych U937, monocytach, granulocytach, komórkach dendrytycznych, ale nie było tych mRNA w limfocytach B, komórkach nabłonkowych i fibroblastach. Obecnie nie wiadomo, jak skutecznie działa układ MICA *in vivo* w nowotworach, oraz jak można układ ten aktywować, jeżeli jest zahamowany.

4. UDZIAŁ KOMÓREK DENDRYTYCZNYCH W PRZEKAZYWANIU INFORMACJI O ANTYGENACH ZWIĄZANYCH Z NOWOTWOREM, PREZENTACJA KRZYŻOWA

Główną rolę w aktywacji limfocytów $T\alpha\beta$ $CD4^+$ i $CD8^+$ pełnią pochodzące ze szpiku kostnego komórki prezentujące antygen (APC), obecne w węzłach chłonnych, nazywane **komórkami dendrytycznymi (DC)**. Antygeny związane z nowotworem melanoma B16 u myszy nie są prezentowane *in vivo* na powierzchni tych komórek z MHC klasy I, jest to więc nowotwór nieimmunogeny [45]. Antygeny komórek melanoma B16 są natomiast prezentowane przez pochodzące ze szpiku kostnego komórki dendrytyczne. Czyli efektywna prezentacja antygenów komórek nowotworowych *in vivo* zachodzi przez przeniesienie tych antygenów do DC, które prezentują je dziewiczemu limfocytom T.

Cytotoksyczne limfocyty T $CD8^+$ (CTL) stanowią obronę przeciw czynnikom zakaźnym i nowotworom. Klasycznie uważa się, że CTL rozpoznają fragmenty białek komórkowych jako antygeny, które zostają w komórkach docelowych (atakowanych przez CTL) przygotowane w proteasomie [104]. Fragmenty te, peptydy 8–11-merowe, są przekazywane układem transportującym (**TAP** = *Transporter Associated with antigen Processing*) do siateczki śródplazmatycznej [24]. Stąd wspomniane peptydy w kompleksie z MHC klasy I są przenoszone poprzez układ Golgiego na powierzchnię komórki i tam prezentowane limfocytom T $CD8^+$ wywołując ich odpowiedź.

Inna sytuacja jest w przypadku aktywacji dziewiczych limfocytów T, do czego konieczne są komórki dendrytyczne, które pośredniczą w rozpoznawaniu antygenów. Dziewicze limfocyty T nie są częstymi gośćmi w narządach, gdzie spotyka się komórki zakażone wirusami albo komórki nowotworowe, a raczej krążą między wtórnymi narządami limfatycznymi: węzłami chłonnymi, śledzioną, migdałkami – z krwią i limfą. Proces aktywacji dziewiczych limfocytów T zachodzi w narządach limfatycznych drenujących te narządy, w których komórki podlegają zakażeniu czy transformacji nowotworowej. W prezentacji nowotworowych i wirusowych antygenów pośredniczą DC osiadłe w narządach limfatycznych. Tę drogę prezentacji antygenów nazywa się w j. angielskim *cross-presentation*, co można by tłumaczyć „prezentację krzyżową” [12, 16].

Komórki dendrytyczne pochodzą ze szpiku kostnego i prezentują „zawodowo” antygeny [51]. W ich rozwoju można wyróżnić następujące okresy [18]:

- 1) ze szpiku kostnego są przenoszone wraz z krwią do tkanek i narządów nielimfoidalnych, gdzie rozwijają się do stadium określanego jako niedojrzałe, **prekursorowe komórki dendrytyczne** (pDC). W tym procesie rozwoju wymagane są pewne cytokiny np. czynnik stymulujący kolonie neutrofilowo-makrofagowe, **GM-CSF** [17]. Są opisywane w naskórku jako komórki Langerhansa, w skórze właściwej jako skórne prekursorowe DC. Te komórki aktywnie pobierają rozpuszczalne (pinocytoza) i nierozpuszczalne (fagocytoza) antygeny i przerabiają je, ale mają małą zdolność do aktywacji limfocytów T.
- 2) Pojawienie się czynników zapalnych, takich jak $\text{TNF}\alpha$, IL-1 albo bakteryjnych lipoprotein (LPS) w narządzie (tkance) sprzyja dalszemu dojrzewaniu DC, które migrują wtedy z krwią [48] albo limfą do obwodowych narządów limfatycznych: – węzłów chłonnych, śledziony, gdzie osiadają w strefie T-komórkowej. W tym etapie rozwoju, komórki określane jako dojrzałe DC, tracą zdolność do endocytozy, ale zyskują dużą zdolność aktywacji dziewiczych limfocytów T. **Dojrzałe DC** prezentują dziewiczym limfocytom T antygeny pobrane w tkankach i narządach.

Wyróżnia się komórki dendrytyczne typu 1 i 2 (*Dendritic Cells*, **DC1 i DC2**). DC1 pochodzą z monocytów (pDC1, myeloidalne DC) [72] i uważa się, że indukują różnicowanie limfocytów T_H typu 1 oraz CTL. Natomiast DC2 prawdopodobnie pochodzą z oddzielnej linii komórek hemopoetycznych (pDC2, plazmocytoidalne) i różnicują się pod wpływem IL3 i liganda CD40 (CD40L=CD154) [39]. Patolodzy od dawna obserwowali w strefie limfocytów T ludzkich węzłów chłonnych komórki plazmatyczne o ekspresji markera CD4, ale bez markera CD3 i cytoplazmatycznych immunoglobulin, komórki o właściwościach DC2. Te DC indukują różnicowanie limfocytów T_H typu 2 [81]. DC1, jak i DC2 mogą indukować CTL. Warto dodać, że prekursorzy DC2 (pDC2) są również producentami interferonu α (IFN- α) wydzielanego pod wpływem pobudzenia przez zetknięcie się z wirusami, bakteriami czy komórkami nowotworowymi, stąd są też nazywane komórkami **IPN** (*Interferon-Producing Cells*) [85]. Wydzielanie przez pDC2 bardzo dużych ilości IFN- α

zachodzi już w 6 godzin po pobudzeniu, stąd komórki te zalicza się do składników wrodzonej, naturalnej, pierwotnej odporności.

Jak wspomniano, komórki pre-dendrytyczne (pDC) pobierają rozpuszczalne białka w drodze endocytozy, często podczas wędrówki z krwią i limfą ze szpiku kostnego do węzłów. Z limfą do węzłów dopływa około 10^4 komórek DC/godz. [26]. Te DC są poza cyklem komórkowym i ocenia się, że ostatni podział przeszedł one 5 i pół dnia wcześniej [64]. W węzłach DC lokalizują się w strefie komórek T, gdzie są optymalnie rozmieszczone dla selekcji i aktywacji klonów limfocytów T mogących odpowiadać na prezentowane antygeny (nie omawiamy tutaj DC grudkowych w węzle). DC w węzłach prawdopodobnie giną po jakimś czasie, bo brak ich w naczyniach limfatycznych wyprowadzających. W hodowli frakcja monocytoz (pDC1) różnicuje się w okresie około 7 dni w DC1, gdy w środowisku jest obecna IL4 i GM-CSF [83]. We wspólnej hodowli komórek śródbłonna z pDC1 różnicują się one już po 2 dniach, co świadczy o prawdopodobnych dodatkowych interakcjach międzykomórkowych sprzyjających temu procesowi [78].

5. PREZENTACJA KRZYŻOWA ANTYGENÓW NOWOTWOROWYCH POCHODZĄCYCH Z KOMÓREK W APOPTOZIE

Wykazano, że *in vitro* komórki dendrytyczne mogą endocytować i wydajnie prezentować antygeny pochodzące z komórek w apoptozie [2, 47, 82]. Aktywowane komórki DC stymulują CTL $CD8^+$ zależne od MHC-klasy I.

Funkcje DC lepiej można zrozumieć prowadząc doświadczenia modelowe. W tym celu wykorzystano zjawiska zachodzące w przebiegu zakażenia wirusem A grypy u ludzi, które przede wszystkim prowadzi do obumierania komórek urzęsionych nabłonka oskrzeli. Pośród leukocytów, tylko monocyty i makrofagi są bardzo wrażliwe na zakażenie, natomiast nie jest ono toksyczne dla DC. Te ostatnie komórki są zdolne do indukcji swoistych wirusowo CTL. Pojawiające się CTL są zależne od MHC klasy I i zabijają zakażone wirusem monocyty, które podlegają apoptozie [10,28,41]. Z kolei monocyty w apoptozie są pobierane przez DC [2] prezentujące peptydy wirusa A grypy (GILGFVFT) i indukujące dalsze CTL [13]. W ten sposób układ ten skutecznie eliminuje zakażenie wirusem.

Tak więc zakażenie wirusem A grypy nie jest toksyczne dla DC, a takie DC są zdolne do indukcji swoistych, antywirusowych CTL. Towarzyszy temu: 1) proliferacja limfocytów T $CD8^+$ oraz ich aktywność cytotoksyczna, jak też 2) rozpoznawanie i zabijanie zakażonych, zgodnych MHC klasy I monocytów przez komórki zabijające (CTL). W procesie tym nie są potrzebne limfocyty T $CD4^+$ ani egzogenne cytokiny. Cytokiny zapalne ($TNF\alpha$, IL1, IL6, $IFN\alpha/\beta$) będące sygnałem dojrzewania DC, jak obserwowano, były natomiast w dużej ilości uwalniane

przez monocyty i makrofagi, zanim włączyły one proces apoptozy. Wystarczyło 5×10^3 zakażonych monocytów dla „naładowania” DC i dla indukcji CTL. Tutaj więc funkcjonował mechanizm prezentacji krzyżowej związany z pojawieniem się komórek w apoptozie.

Odpowiedź CTL nie była powodowana wolnymi peptydami uwalnianymi z obumierających monocytów, CTL swoiste wirusowo pojawiały się *in vitro* dopiero po 7 dniach. Aktywność CTL była związana tylko z frakcją limfocytów T CD8⁺. Była ona zahamowana, gdy środowisko z obumierającymi monocytami sączono przez filtr 0,45 μm przed dodaniem do hodowli limfocytów T i komórek DC, co można wytłumaczyć pamiętając, że filtr 0,45 μm zatrzymuje komórki w apoptozie, przepuszczając wirusy i peptydy. Materiał antygenowy pochodził więc z komórek w apoptozie. Zakażone wirusem monocyty, w których apoptozę zahamowano inkubacją w obecności Z-VAD-CHO, inhibitora kaspaz, nie były materiałem, z którego antygeny mogły być przeniesione do DC. Komórki w apoptozie, a nie nekrotyczne były zdolne do „ładowania” DC antygenem. Optymalna prezentacja krzyżowa antygenów z komórek nowotworowych badana w innym układzie [83a] wymagała jednak fagocytozy komórek w apoptozie przez niedojrzałe DC oraz sygnału dojrzewania DC uwalnianego przez komórki nowotworowe w nekrozie.

Dla opisanego w DC wewnątrzkomórkowej drogi antygenów pobranych użyto mysich linii komórek DC [84]. Użyte klon komórek DC prezentował w związku z MHC klasy I albo klasy II peptydy ovalbuminy (OVA) szczególnie wydajnie, gdy antygen ten był związany z kulkami tlenku żelaza. Komórki wstępnie były traktowane inhibitorami wewnątrzkomórkowych dróg przemieszczania antygenów i dopiero potem użyte do indukcji swoistych CTL. Chlorek amonu blokujący drogę endosomową hamował prezentację antygenów w związku z MHC klasy II, ale nie MHC klasy I. Brefeldyna A blokująca drogę z siateczki śródplazmatycznej przez kompleks Golgiego do błony komórkowej [107a], jak i inhibitory enzymów proteasomu, całkowicie hamowały zdolność prezentacji antygenów w związku z MHC klasy I.

Sprawdzono też, czy prezentacja antygenów przez DC zależy od proteasomu używając komórek szpiku kostnego myszy inkubowanego z GM-CSF, od zwierząt z homozygotyczną delecją podjednostki TAP1 (TAP1 -/-). Antygenem była ovalbumina (OVA), a aktywowane były komórki T linii hybrydoma odpowiadające na peptyd OVA o sekwencji SIINFEKL w kontekście H-2K^b. Prezentacja OVA była zablokowana, podczas gdy w kontrolnych komórkach DC szpiku myszy prawidłowej droga ta funkcjonowała. Pinocytoza komórek TAP -/- była prawidłowa oraz obecność MHC klasy I nie była zmieniona. W komórkach DC TAP1 +/- prezentacja OVA była również blokowana inhibitorem aktywności proteasomu. W ten sposób wykazano udział drogi prowadzącej przez proteasom w prezentacji endocytowanych przez DC antygenów w kontekście MHC. Sugeruje to, że klasyczna droga transportu antygenów wraz z MHC klasy I jest wykorzystywana do prezentacji

antygeny egzogenne w DC. Ostatnio donoszono, że DC asocjują z komórkami w apoptozie przy udziale $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ receptora witronektyny, ale nie asocjują z komórkami nekrotycznymi [82]. Takie zjawisko prezentacji przez DC egzogennych antygenów wraz z MHC klasy I i II, prowadzące do indukcji CTL, opisano już wcześniej w innych doświadczeniach u myszy [74].

Limfocyty T CD4^+ biorą udział we wrodzonej oraz nabytej odporności przeciwnowotworowej [46, 52]. Ważną cechą tolerancji immunologicznej nowotworów jest brak współdziałania limfocytów T CD4^+ z komórkami dendrytycznymi [90]. Oddziaływanie to odbywa się w organizmie przy udziale CD40 na komórkach dendrytycznych i liganda CD40 (CD40L) na limfocytach T CD4^+ . Takie oddziaływanie antygeny CD40 na DC z ligandem CD154 (CD40L) na limfocytach CD4^+ powoduje aktywację DC. Przyłączenie liganda do CD40 powoduje wzrost ekspresji cząsteczek kostymulujących B7 na DC oraz wydzielanie cytokin prozapalnych, co jest istotne dla rozpoczęcia odpowiedzi komórkowej. Dojrzewające DC mogą produkować chemokiny przyciągające aktywowane limfocyty T [94]. Jest to wynikiem większego wydzielania przez dojrzewające DC chemokin „pochodzących z makrofagów” (MDC). W tym przypadku MDC nie są wydzielane przez makrofagi, ale przez DC.

Przedstawione tutaj opisy pozwalają przypuszczać, że komórki nowotworowe w apoptozie mogą dostarczać materiał antygenowy komórkom dendrytycznym, które prezentują krzyżowo te antygeny limfocytom, aktywując limfocyty T dziewicze do akcji przeciwnowotworowej. Można też wysunąć hipotezę, że w tej sytuacji proteazowa aktywność kaspaz i serynowych proteaz podczas apoptozy częściowo zastępuje funkcję proteasomu w przygotowaniu peptydów komórek nowotworowych. Powstałe w apoptozie peptydy komórek nowotworowych po endocytozie przez DC, mogą służyć przygotowaniu do ich prezentacji przez DC w drodze zbliżonej do klasycznej: prowadzącej przez TAP, siateczkę śródplazmatyczną, MHC klasy I, układ Golgiego do błony komórkowej. Może też być wykorzystana wewnątrzkomórkowa droga nieklasyczna.

6. UDZIAŁ BIAŁEK OPIEKUŃCZYCH (HSP) W PREZENTACJI KRZYŻOWEJ ANTYGENÓW NOWOTWOROWYCH

Stwierdzono, że białka opiekuńcze (*chaperones*, **HSP**=*heat shock proteins*) izolowane z komórek nowotworowych albo zakażonych wirusem wraz ze związanymi antygenami wywołują odporność ochronną oraz indukują odpowiedź CTL przeciw nowotworom i antygenom wirusowym [91]. Na przykład, mysie otrzewnowe makrofagi, wśród których najprawdopodobniej są makrofagowe prekursorzy komórek dendrytycznych, mogą ze środowiska endocytować kompleksy peptydów i HSP

np. gp96-peptydy i kierować te peptydy do wiązania z MHC klasy I oraz prezentowania tego kompleksu na powierzchni komórki. Same HSP nie są immunogenne, natomiast w kompleksie z immunogennymi antygenami wirusowymi bądź nowotworowymi stają się immunogenne. Po endocytozie, w komórce są kierowane na endogenną drogę prezentacji w związku z MHC klasy I. Tym sposobem wewnątrzkomórkowe antygeny wirusowe oraz antygeny komórek nowotworowych mogą być prezentowane na powierzchni innych komórek, np. komórek dendrytycznych, komórek nie zakażonych i nienowotworowych. Tą drogą antygeny wirusowe, np. peptyd VSV (*Vesicular Stomatitis Virus protein*=VSV, białko nukleokapsydu) w kompleksie z HSP (gp96) stymuluje 200–400 razy wydajniej CTL niż sam peptyd VSV. W makrofagach obniżenie puli ATP dodaniem azydku albo 2-deoxyglukozy hamuje prezentację peptydu VSV, nie hamuje natomiast dodanie chlorochinonu blokującego obróbkę endocytowanych peptydów w kwaśnym środowisku endosomów. Brefeldyna A również blokuje prezentację peptydu. Widocznie kompleks gp96-peptyd jest pobierany do nie-lizosomowego przedziału komórkowego i kierowany jest dalej do ER mechanizmem zależnym ew. niezależnym od białek transportujących peptyd (TAP), a potem peptyd antygenowy drogą przez aparat Golgiego jest przenoszony na powierzchnię komórki, gdzie jest prezentowany wraz z MHC klasy I. Uważa się, że zwykle gp96 funkcjonuje w komórce transportując antygeny wewnątrz komórki do cząsteczek MHC klasy I, może jednak również, jak wynika z opisanego doświadczenia *in vivo*, efektywnie przenosić peptydy antygenowe od innych komórek.

Również inne białko opiekuńcze siateczki śródplazmatycznej, kalretikulina (CRT), po oczyszczeniu z guzów nowotworowych (fibrosarcoma MethA i CMS5 u myszy) wywołuje swoistą odporność na nowotwór, z którego pochodzi CRT, ale nie na inne guzy [6]. Sama cząsteczka CRT również nie jest immunogenna, a jedynie jej kompleksy z peptydami. Interesujące jest, że CRT nie ma strukturalnej homologii ze znanymi białkami opiekuńczymi, np. gp96, hsp90, hsp70.

Linie komórek nowotworowych CMT93 i melanoma B16, mają różną immunogenność u myszy syngenicznych, co koreluje z ekspresją HSP w tych komórkach nowotworowych [65]. Stabilna transfekcja tych linii nowotworowych cDNA hsp70 powoduje wzrost ich immunogenności mierzonej przeżywaniami zwierząt po wycięciu guza pierwotnego i ponownym wszczepieniu tego samego nowotworu. Stwierdzono, że ekspresja hsp70 w nowotworze indukuje naciekanie guza przez limfocyty T, makrofagi i DC oraz że zachodzi odpowiedź Th1 wydzielania cytokin: IFN γ , TNF α , IL12 [95]. Obserwowano skuteczną immunoterapię ustabilizowanego, nieimmunogennego raka płuca Lewisa (3LL – *Lewis lung carcinoma*) u syngenicznej myszy po podaniu preparatów kompleksów HSP-peptydy z tego rodzaju guza [93]. Wzrost guza był zatrzymany, zmniejszona liczba przerzutów i przedłużony okres życia zwierząt. Odporność była swoista dla badanego rodzaju guza. Postępowanie takie

nie wymaga identyfikacji swoistego antygenowego epitopu nowotworowego, co znacznie upraszcza sporządzenie szczepionki przeciwnowotworowej.

Zbadano bliżej, jakie epitopy mysiej białaczki RLo1 są rozpoznawane przez klon CTL, Y-15 [50]. Epitop pRL1a jest produktem zmutowanego genu *act*, którego ekspresja w tej białaczce stanowi antygen powodujący jej odrzucenie. Okazało się, że oktapeptyd pRL1a (IPGLPLSL) albo jego dłuższe prekursory, były asocjowane z hsp70, hsp90 i gp96. Wykazano, że większe peptydy asocjowane z HSP stają się immunogenne dopiero po inkubacji w środowisku hodowlanym zawierającym surowicę, w której – jak wiadomo – są obecne proteazy. Jest to jednak układ nie występujący *in vivo*, gdzie w osoczu nie ma aktywnych proteaz. Wykazano również, że wiązanie 8-merowego peptydu pRL1a z hsp70 nie zachodzi poza komórką po jej lizie. Opisano jednak w *Escherichia coli* proteazową aktywność kompleksu ClpP-ClpX, gdzie ClpX jest HSP, a ClpP jest proteazą serynową [101]. W komórce bakterii HSP ClpX umożliwia proteazie ClpP degradację białka bakteriofaga. Podobne kompleksy HSP-proteaza mogłyby prowadzić wewnątrz komórki do powstania peptydów 8–10-merowych, a więc peptydów podobnych wielkością do endogennych, z przeniesionych wraz z HSP do komórki większych peptydów. Ponieważ aktywność proteazowa HSP zależy od ATP, hydroliza peptydów transportowanych z HSP możliwa byłaby dopiero po przeniesieniu kompleksu HSP-peptyd do komórki. Trudno jednak w tej chwili powiedzieć, czy takie przełożenie informacji z aktywnych u Prokaryota białek opiekuńczych, białek konserwatywnych w ewolucji [61], dotyczy również komórek Eukaryota. Powyższe rozumowanie należy więc traktować jako hipotezę roboczą.

7. PRZYKŁADY WYKORZYSTANIA AUTOLOGICZNYCH/SYNGENICZNYCH KOMÓREK NOWOTWOROWYCH W DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ IMMUNOTERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ

Wyżej przedstawione wyniki badań dobrze tłumaczą wcześniejsze obserwacje sposobów wywołania aktywnej immunoterapii przeciw nowotworom u zwierząt [53, 76]. Stwierdzono w nich, że zatrzymanie wzrostu nowotworu, a w określonych warunkach wyleczenie zwierzęcia z nowotworu, zależy od spełnienia następujących warunków:

- 1) układ immunologiczny gospodarza musi być sprawny, chociaż może być w stanie tolerancji immunologicznej,
- 2) masa nowotworu w chwili rozpoczęcia leczenia nie może być duża,
- 3) trzeba wywołać aktywację komórek, które potrafią zwalczać nowotwór złośliwy: dziewiczych limfocytów T, CTL oraz cytotoksycznych makrofagów.

TABELA 2. Wyniki chemioimmunoterapii białaczki L1210* rosnącej w syngenicznej myszy (wg [54] zmienione)

Grupa myszy	CY**	Komórki L1210-Maf***	Modyfikatory odpowiedzi ^{##}	MST (zakres) [żywe/całość] [#]
1	-	-	-	12,5 (12,2–12,8) [0/54]
2	-	10 ⁶ i.p.	-	13,5 (12,3–14,8) [0/10]
3	+	-	-	19,0 (18,5–19,5) ^a [3/56]
4	+	10 ⁶ i.p.	-	27,0 (22,6–32,3) ^b [6/20]
5	+	10 ⁷ i.p.	-	25,0 (23,5–26,6) ^b [17/60]
6	+	10 ⁷ i.p. + s.c.	-	>100 [16/30] ^{d,e}
7	+	10 ⁷ i.p. + s.c	BCG	>100 [6/10] ^b
8	+	10 ⁷ i.p. + s.c	Bestatyna	>100 [7/10] ^b

*W dniu 0 wszczepiono i.p. każdej myszy 10 komórek L 1210

**CY – podano i.p. cyklofosfamid w dawce 100 mg/kg wagi ciała w dniu 8 od zaszczepienia białaczki L1210

***Komórki L 1210-Maf otrzymano inkubując zawiesinę komórek L 1210 dwukrotnie po 30 minut *in vitro* wraz z 100 µg/ml Mafosfamidu; następnie komórki płukano 3-krotnie PBS, sprawdzano % komórek żywych testem z błękitem trypanu (>95% żywych), liczone i podawano myszy w dniach 0, +3, +6, +9, +12

[#]MST to mediana czasu przeżycia (Median Survival Time) w dniach i zakres od–do; w nawiasach [–] podano stosunek liczby myszy, które przeżyły ponad 100 dni do wszystkich myszy badanych w grupie

^{##}Niektóre grupy myszy otrzymały modyfikatory odpowiedzi immunologicznej i.p. w dniach: 0, +3, +6, +9, +12. Dawki: BCG 3x10⁶ żywych bakterii na mysz, Bestatyna 2,5 mg/kg.

Różnice statystycznie istotne: a – p<0,05 w porównaniu z grupą 1, b – p<0,05 oraz c – p<0,01 oraz d – p<0,001 w porównaniu z grupą 3, e – p<0,05 w porównaniu z grupą 5.

Pierwsze dwa warunki są oczywiste. Natomiast aktywację CTL można było uzyskać podając zwierzęciu podskórnie albo dootrzewnowo komórki nowotworowe syngeniczne, *ex vivo* napromieniowane albo traktowane Mafosfamidem (Maf) (tab. 2). Dawka Maf bądź napromienienia musiała być tak dobrana, aby komórki nowotworowe traktowane *in vitro* pozostały żywe, ale nie mogły się dzielić. Sprawdzono, że komórki białaczki L1210 traktowane dawką Maf 100 µg/ml dwa razy po 30 min były żywe w teście z błękitem Trypanu w 95%. Jednak podane dootrzewnowo przeżywały tylko 1–3 dni, a potem prawdopodobnie włączały proces apoptozy [55]. Dla uzyskania skutecznej terapii [54] trzeba było 4-krotnie, w od-

stępach trzydniowych podawać dootrzewnowo i podskórnio 10^7 komórek traktowanych Maf. Wielokrotne podawanie komórek L1210-Maf miało na celu zwiększenie populacji komórek dendrytycznych prezentujących antygeny nowotworowe limfocytom T dziewiczym oraz znaczne powiększenie cytotoksycznych klonów limfocytów T rozpoznających antygeny nowotworowe. Opisano też niedawno [30], że gdy stosunek liczby komórek w apoptozie do DC jest wysoki, oraz gdy wobec dużej liczby komórek w apoptozie nie wszystkie są fagocytowane i część podlega nekrozie, to wtedy DC są skutecznie aktywowane. Takie warunki były spełnione w tym doświadczeniu. W opisywanym doświadczeniu myszy ponadto otrzymały w 8 dniu po wszczepieniu białaczki jednorazowo cyklofosfamid w dawce 100 mg/kg masy ciała w celu zmniejszenia masy nowotworu. Powstała u zwierzęcia odporność przeciw białaczce L1210 była swoista, bo nie chroniła zwierząt przed innymi nowotworami. Odporność można było przenieść z limfocytami T do innego zwierzęcia. Dodatkowe podawanie BCG albo bestatyny zwiększało liczbę wyleczonych zwierząt w porównaniu z grupą (3), tj. takich, które przeżyły dłużej niż 100 dni od wszczepienia białaczki. Podanie 10^3 komórek L1210 po 1–2 miesiącach, a nawet po roku nie powodowało białaczki u zwierząt, co świadczy o utrzymującej się odporności przeciw temu nowotworowi. Inni autorzy opisywali, że u zwierzęcia uodpornionego, limfocyty T $CD8^+$ pamięci dzielą się od czasu do czasu bez konieczności pobudzenia z zewnątrz [58]. Czynnikiem podtrzymującym podziały jest IL15 [8]. Komórki T $CD8^+$ pamięci mają wysoki poziom CD44 oraz receptora IL2-R β wspólnego dla IL2 i IL15.

Komórki białaczki L1210 bankowane z użyciem DMSO po wyjęciu z banku, podobnie jak też inne komórki nowotworowe [77], nadawały się do uodpornienia po uprzednim traktowaniu Maf albo napromienieniu. Obserwacje te są ważne dla praktycznego wykorzystania własnych komórek nowotworowych chorego do przerwania tolerancji immunologicznej i w leczeniu.

Procedurę tutaj opisaną i testowaną też przez innych autorów w nieco zmienionych układach, wykorzystano w leczeniu klinicznym chorych na raka jelita grubego w stadium II i III u 254 osób [100]. Guz nowotworowy był usuwany operacyjnie dla zmniejszenia jego masy i dużą jego część w porcjach zabankowano. Po upływie miesiąca od zabiegu chirurgicznego jedną z porcji nowotworu odmrożono i napromieniono taką dawką (200 Gy), aby komórki nie były zdolne do podziałów, ale by pozostawały żywe. Komórki autologiczne, ok. $1,3 \times 10^7$ na porcję (86% żywych), podawano 2-krotnie w tygodniowych odstępach, śródskórnio na przedramieniu wraz z 10^7 komórek BCG. Dalsze dwie dawki komórek napromienionych już bez BCG podawano po 3 tygodniach oraz dawkę przypominającą po 6 miesiącach. Chorzy byli obserwowani od 8 miesięcy do prawie 9 lat (mediana 5,3 lat). Optymalne wyniki obserwowano u chorych w stadium II choroby. U tych chorych okres bez nawrotów wydłużył się, a ryzyko nawrotu zmniejszyło się o 61% w porównaniu z grupą chorych nie szczepionych. W grupie kontrolnej było łącznie 40 nawrotów,

natomiast w grupie leczonej 25 i obserwowano trend dłuższego przeżycia chorych. Chorzy w miejscu podania napromienionych komórek nowotworowych mieli skórne odczyny zapalne o średnicy 5 do 18 mm, silniejsze przy ostatnich dawkach szczepionki. Zaczerwienienie i obrzęk znikają do 2 dni. Podanie BCG czasem wywoływało gorączkę i dreszcze w pierwszej dobie, a miejsce podania BCG bywało bolesne, często wrzodzące. Owrzodzenia po BCG goiły się do 3 miesięcy. Można przypuszczać, że opisane postępowanie przełamuje tolerancję immunologiczną u chorego z nowotworem podobnie, jak sprawdzono to u zwierząt. Prawdopodobnie dodatkowy, pożądany efekt terapeutyczny uzyskany podawaniem BCG można wiązać z aktywacją limfocytów $T\alpha\beta$ $CD4^-CD8^-$ oraz limfocytów $T\gamma\delta$ [52a,92]. Dolegliwości takiego leczenia w porównaniu z leczeniem pooperacyjnym dużymi dawkami cytostatyków [49, 70] są znikome, a efekty nie różnią się.

Z wielu publikacji na temat immunologii i immunoterapii nowotworów wybrano kilka przykładów, aby przedyskutować wyniki oraz lepiej zrozumieć i próbować tłumaczyć powodzenia i niepowodzenia. Leczenie nie naciekającego raka pęcherza moczowego podawaniem do pęcherza BCG jest jedną z najbardziej efektywnych immunoterapii nowotworów u ludzi [69]. Może to jednak prowadzić do zakaźnych powikłań np. u osób chorych na gruźlicę. Jeszcze większe działanie przeciwnowotworowe niż BCG ma *Mycobacterium smegmatis* transfekowane ludzkim genem $TNF\alpha$, a przy tym mikroorganizm ten nie jest patogenny [4].

Peptydy nowotworowe uwalniane z dużej masy guza wywołują tolerancję immunologiczną i większy wzrost nowotworu [96], ale zjawisko to nie zachodzi, gdy peptydy są prezentowane na komórkach dendrytycznych. Jak wspomniano, ta prezentacja jest indukowana oddziaływaniem CD40 na komórkach dendrytycznych i CD40L na limfocytach T $CD4^+$. Oddziaływanie takie, które można wywołać również przeciwciałem monoklonalnym anti-CD40 (klon FGK-45), powoduje intensywne wydzielanie IL-12 przez komórki dendrytyczne i zwiększa ich oddziaływanie z limfocytami T [19, 23]. Obserwowano, że aktywacją oddziaływań między komórkami dendrytycznymi i limfocytami T $CD4^+$ i CTL można przerwać tolerancję immunologiczną nowotworu, indukować miejscową produkcję IL12 w węzłach chłonnych i zwiększyć efektywność szczepienia. Sprawdzone, że guz melanoma B16 myszy, napromieniony i podany syngenicznej myszy nie stymuluje znacznej odpowiedzi przeciwnowotworowej, jest słabo immunogenny. Jednak komórki melanoma transfekowane genem GM-CSF, napromieniane i podane wywołują u zwierzęcia silną, długotrwałą odporność przeciw B16, zależną od limfocytów T $CD4^+$ i limfocytów T $CD8^+$ [25]. Tak więc nieimmunogenny nowotwór zyskuje immunogenność dzięki ekspresji GM-CSF, prawdopodobnie przez to, że przepływające przez guz pDC endocytują komórki nowotworowe w apoptozie wraz z ich antygenami, a wydzielany GM-CSF sprzyja tym procesom. Potem pDC przenoszą antygeny komórek nowotworowych do drenujących guz węzłów chłonnych. Tam DC dojrzewają i przez długi okres prezentują antygeny dziewiczym limfocytom T $CD8^+$

i limfocytom T CD4⁺. W innych doświadczeniach do guza melanoma MmB16 wszczepionego w łapę myszy syngenicznej podawano IL12 i GM-CSF przez 7 kolejnych dni zaczynając od 7 dnia po wszczepieniu 10⁶ komórek nowotworu [34]. Myszy otrzymujące GM-CSF i IL12 żyły 70±3 dni, podczas gdy kontrolne, nie leczone 35±16 dni, a różnica była istotna statystycznie. Obserwowano też wzrost we krwi obwodowej limfocytów T CD4⁺ oraz spadek limfocytów CD8⁺, które prawdopodobnie gromadziły się i były aktywne jako CTL miejscowo, w guzie. Wyniki te można interpretować jako wpływ podawanych cytokin na pobieranie przez pDC antygenów nowotworowych w guzie i dojrzewanie DC oraz ich zwiększone oddziaływanie z limfocytami T w narządach limfatycznych spowodowane odczynem na IL12 w wysokim miejscowym stężeniu. Aktywność przeciwnowotworową IL12 opisano w różnych modelach zwierzęcych, jak i w próbach klinicznych [35]. Wykazano ponadto, że podanie *in vivo* napromieniowanych komórek melanoma wraz z mikrokulkami uwalniającymi lokalnie GM-CSF daje systemową odpowiedź przeciwnowotworową [33]. Napromieniowane komórki melanoma włączają w ciągu kilku dni apoptozę i stają się źródłem antygenów nowotworowych dla przepływających pDC. W badanym guzie melanoma u myszy obserwowano gromadzenie się monocytów i makrofagów, wśród których jest subpopulacja monocytowych pDC. Te dojrzewające potem w węzłach chłonnych drenujących guz komórki DC prezentują krzyżowo antygeny nowotworowe limfocytom T dziewiczym, które prawdopodobnie przemieszczają się do guza i tam atakują komórki melanoma [60]. Wyniki tego doświadczenia zostały wsparte badaniami transfekowanych genami GM-CSF komórek mysiego czerniaka B16-F10, gdzie zauważono silną, swoistą i długotrwałą odporność anty-nowotworową [25] oraz komórek innego mysiego czerniaka D5 słabo immunogennego transfekowanego genami białek GM-CSF i IL-12 [5]. Komórki węzłów chłonnych drenujących guz melanoma D5 z transfekowanymi komórkami melanoma, które wydzielały GM-CSF i IL-12 były cytotoksyczne dla pierwotnych komórek melanoma. Przeniesione do myszy z ustalonym pierwotnym guzem melanoma, powodowały jego regresję. Wobec tych argumentów, rozpoczęto również kliniczne próby fazy I i II z podawaniem GM-CSF chorym z nowotworami [105], a także leczenie chorych komórkami transfekowanymi genem białka GM-CSF [86]. Chorym z przerzutami raka nerki podawano autologiczne, napromieniowane komórki nowotworowe. Część chorych otrzymywała podobne komórki, ale dodatkowo transfekowane ludzkim genem GM-CSF. Wykazano wydzielanie cytokin oraz brak objawów niepożądanych u chorych z transfekowanymi GM-CSF komórkami.

Chłoniaki mają ekspresję TSA, między innymi spowodowaną translokacją t(14;18) tam, gdzie taka translokacja zachodzi. Zastosowano szczepionkę z idiotypowego białka dla usunięcia resztkowych komórek chłoniaka t(14;18)+ u 20 chorych po pierwszej całkowitej remisji uzyskanej chemioterapią [9]. Wszyscy chorzy z translokacją chromosomową wykrywalną metodą PCR w nowotworze pierwotnym, mieli

po chemioterapii w dalszym ciągu klon złośliwych komórek t(14;18)+ mimo całkowitej remisji. Po szczepieniu i podaniu GM-CSF, 8/11 chorych utraciło komórki z translokacją i miało długotrwały okres remisji bez objawów chorobowych.

W innych obserwacjach badano ekspresję MHC klasy II na monocytach krwi u chorych z rakiem żołądka i jelita grubego [98]. W zaawansowanym nowotworze stwierdzono zwiększony odsetek monocytów z ekspresją determinant Ia.7. W 6 miesiącu po wycięciu guza obserwowano spadek monocytów tej subpopulacji. W naciekach komórek otaczających guz znajdowano makrofagi Ia.7 dodatnie w zwiększonej liczbie w porównaniu z normalną błoną śluzową. Autorzy sądzą, że subpopulacja makrofagów może uczestniczyć w miejscowej odpowiedzi przeciwnowotworowej gospodarza. Czy subpopulacja ta odpowiada frakcji prekursorowych monocytarnych komórek dendrytycznych nie wiadomo, ale obecnie można by sugerować taką interpretację opisanej obserwacji.

Czerniaki (melanoma) u ludzi mają złą sławę opornych na napromienianie i chemioterapię. Natomiast są jednymi z nielicznych nowotworów, w których powtarzalnie można obserwować immunologiczną odpowiedź gospodarza przeciw nowotworowi, co sugeruje, że są immunogenne. Komórki czerniaka u ludzi noszą rozpoznawane przez autologiczne cytotoksyczne limfocyty T antygeny: gp100, MART-1, tyrozynazę, MAGE-1 i MAGE-3 [14]. Niektóre z tych antygenów są kodowane przez geny rodziny MAGE [99]. Wiele guzów różnego pochodzenia ma ekspresję genów MAGE, ale nie mają tej ekspresji komórki prawidłowe z wyjątkiem komórek jądra (testis). Geny MAGE-3 kodują antygenowy nonapeptyd rozpoznawany w kompleksie z HLA-A1 przez autologiczne CTL. Ekspresję MAGE-3 obserwuje się w 59% czerniaków, a w czerniakach przerzutowych aż w 76% [15]. Opublikowano wstępne wyniki leczenia chorych (6 osób) HLA-A1 mających guzy MAGE-3 dodatnie z progresywnie rosnącym guzem stadium III albo IV AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) [62]. Leczenie polegało na 3-krotnym, podskórnym podaniu syntetycznego peptydu MAGE-3.A1 (EVDPIGHLY) w odstępach miesięcznych. Podawano też śródskórną bardzo małą dawkę peptydu celem sprawdzenia odpowiedzi nadwrażliwości typu późnego. Dodatkowego leczenia nie prowadzono. U 3 osób obserwowano regresję guzów skórnych, ale jedna z tych osób zmarła po miesiącu z powodu przerzutów do mózgu. Podsumowując, u 2/6 (0,33) chorych po chirurgicznym usunięciu guza pierwotnego nie traktowanych cytostatykami, po 3–11 miesiącach od trzeciej dawki peptydu nie obserwowano progresji ani nowych wysiewów guza. Spontaniczna regresja podobnych guzów zachodzi z częstością 0,005, a więc nie może być brana pod uwagę w obserwowanych przypadkach. Leczeni chorzy mieli bardzo zaawansowany w rozwoju nowotwór, a mimo to zaobserwowano korzystny efekt leczenia. Wyniki te autorzy pracy traktują jako wstępne.

Uczyniono próbę użycia poliwalentnej szczepionki będącej mieszaniną antygenów 3 linii komórek melanoma napromienionych 150 Gy [44]. Użyte linie melanoma

mają ekspresję co najmniej 15 znanych antygenów nowotworowych. Komórki napromieniane przechowywano w ciekłym azocie. Chorzy byli w III i IV stadium AJCC choroby. Niektórzy otrzymali cyklofosfamid w dawce 75 mg/m^2 , 150 mg/m^2 albo 300 mg/m^2 przez 3 dni, tuż przed podawaniem szczepionki, którą stanowiły komórki nowotworu napromienione i zawiesina komórek BCG. Ocena wyników klinicznych polegała na pomiarze powierzchni skórnych zmian nowotworowych przez co najmniej 100 dni: całkowite zniknięcie zmiany oceniano jako CR (*complete remission*), a zmniejszenie się rozległości zmian jako PR (*partial remission*) obserwowano w 50% zmian. U 7/54 chorych obserwowano CR trwające 22 miesiące, a w jednym przypadku (1/54) ponad 9 lat. Szczepionka nie była toksyczna, a jedynie BCG dawało owrzodzenia gojące się po 3–4 miesiącach.

Przedstawiona dyskusja klinicznych i doświadczalnych wyników immunoterapii nowotworów jest niepełna. Wymagałaby dużo obszerniejszych ram. Przedstawione jednak przykłady tłumaczą wystarczająco dobrze wyniki obserwacji immunologicznych odnoszące się do przełamania tolerancji immunologicznej w chorobach nowotworowych oraz prób empirycznego leczenia nowotworów metodami immunologicznymi.

8. PODSUMOWANIE

Rozwijający się nowotwór powoduje zmianę odpowiedzi układu odpornościowego, mimo iż komórki nowotworowe mają na swojej powierzchni cząsteczki sygnalizujące stres komórkowy (MICA/B). Zwykle limfocyty NK i limfocyty T oraz inne komórki układu odpornościowego rozpoznają te sygnały stresu, jednak guz nowotworowy wywołuje przeciwną odpowiedź – tolerancję immunologiczną, brak odpowiedzi na sygnały stresu.

Celem immunologicznego leczenia nowotworów jest przerwanie tolerancji immunologicznej. Do swoistej, empirycznie sprawdzonej, przeciwnowotworowej obrony wykorzystuje się układ sygnalizacji za pośrednictwem komórek dendrytycznych (DC) w tzw. reakcji krzyżowej. Dostarczenie choremu dużej masy autologicznych/syngenicznych komórek nowotworowych, w których indukowano apoptozę napromieniowaniem albo traktowaniem Mafosfamidem powoduje „ładowanie” antygenami nowotworowymi komórek predendrytycznych (pDC). Te komórki po osiedleniu się w obwodowych narządach limfatycznych chorego, np. w miejscowych węzłach chłonnych, aktywują dziewicze limfocyty T CD8^+ . Kilkakrotne podawanie własnych komórek nowotworowych przygotowanych do włączenia apoptozy wywołuje przerwanie tolerancji immunologicznej i odpowiedź przeciw pozostałym, złośliwym komórkom nowotworowym w organizmie. Odpowiedź jest swoista, skierowana przeciw własnemu nowotworowi, ma cechy pamięci immunologicznej i prowadzi do ograniczenia choroby nowotworowej albo do trwałego wyleczenia. Leczenie wywołuje niewielkie objawy niepożądane i nie

naraża chorych na długotrwały brak odporności na zakażenia bakteryjne i wirusowe, jakie powodują wysokie dawki cytostatyków podczas kursów chemioterapii. Nie naraża chorego na indukcję nowych nowotworów. Ważne jest również, że wyniki leczenia immunologicznego nie są gorsze od wyników chemioterapii w niektórych nowotworach o podobnym zaawansowaniu, co sprawdzono klinicznie.

PODZIĘKOWANIE

Bardzo dziękujemy osobom, które zechciały przeczytać manuskrypt tej pracy i przekazać swoje uwagi: prof. M. Jakóbisiakowi, prof. J. Myśliwskiej, prof. Z. Osuchowskiej, prof. B. Płytycz, dr M. Żuławskiemu. Ich uwagi przyczyniły się do jaśniejszego przedstawienia myśli autorów.

LITERATURA

- [1] ABBAS AK, SHARPE AH. T-Cell stimulation: an abundance of B7s. *Nature Med* 1999; **5**: 1345–1346.
- [2] ALBERT ML, SAUTER B, BHARDWAJ N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 1998; **392**: 86–89.
- [3] ALEXANDER JP, KUDOH S, MELSOP KA, HAMILTON TA, EDINGER MG, TUBBS RR, SICA D, TUASON L, KLEIN E, BUKOWSKI RM, FINKE JH. T-Cells infiltrating renal cell carcinoma display a poor proliferative response even though they can produce interleukin 2 and express interleukin 2 receptors. *Cancer Res* 1993; **53**: 1380–1387.
- [4] ALEXANDROFF AB, ROBINS RA, MURRAY A, JAMES K. Tumor immunology: false hopes – new horizons? *Immunology Today* 1998; **19**: 247–250.
- [5] ARUGA A, TANIGAWA K, ARUGA E, YU H, CHANG AE. Enhanced adjuvant effect of GM-CSF plus IL-12 compared with either alone in vaccine-induced tumor immunity. *Cancer Gene Therapy* 1999; **6**: 89–95.
- [6] BASU S, SRIVASTAVA PK. Calreticulin, a peptide-binding chaperone of the endoplasmic reticulum, elicits tumor- and peptide specific immunity. *J Exp Med* 1999; **189**: 797–802.
- [7] BAUER S, GROH V, WU J, STEINLE A, PHILLIPS JH, LANIER LL, SPIES T. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999; **285**: 727–729.
- [8] BAŁKOWIEC-ISKRA EZ, GOŁĄB J. Interleukina 15 (IL-15). *Post Biol Kom* 1999; **26**: 863–875.
- [9] BENDANDI M, GOCKE CD, KOBRIN CB, BENKO FA, STERNAS LA, PENNINGTON R, WATSON TM, REYNOLDS CW, GAUSE BL, DUFFEY PL, JAFFE ES, CREEKMORE SP, LONGO DL, KWAK LW. Complete molecular remissions induced by patient-specific vaccination plus granulocyte-monocyte colony-stimulating factor against lymphoma. *Nature Med* 1999; **5**: 1171–1177.
- [10] BENDER A, BUI LK, FELDMAN MAV, LARSSON M, BHARDWAJ N. Inactivated influenza virus, when presented on dendritic cells, elicits human CD8+ cytolytic T cell responses. *J Exp Med* 1995; **182**: 1663–1671.
- [11] BERDD, MAGUIRE HC, Jr, MASTRANGELO MJ. Impairment of concanavalin A-inducible suppressor activity following administration of cyclophosphamide to patients with advanced cancer. *Cancer Res* 1984; **44**: 1275.
- [12] BEVAN MJ. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med* 1976; **143**: 1282–1288.

- [13] BHARDWAJ N, BENDER A, GONZALEZ N, BUI LK, GARRETT MC, STEINMAN RM. Influenza virus-infected dendritic cells stimulate strong proliferative and cytolytic responses from human CD8+ T cells. *J Clin Invest* 1994; **94**: 797–807.
- [14] BOON T, CEROTTINI JC, van den EYNDE B, van der BRUGGEN, van PEL A. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Ann Rev Immunol* 1994; **12**: 337–365.
- [15] BRASSEUR F i 29 współautorów. Expression of MAGE genes in primary and metastatic cutaneous melanoma. *Int J Cancer* 1995; **63**: 375–380.
- [16] CARBONE FR, KURTS C, BENNETT SRM, MILLER JFA, HEATH WR. Cross-presentation: a general mechanism for CTL immunity and tolerance. *Immunology Today* 1998; **19**: 368–373.
- [17] CAUX C, DEZUTTER-DAMBUYANT C, SCHMITT D, BANCHEREAU J. GM-CSF and TNF α cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 1992; **360**: 258–261.
- [18] CELLA M, SALLUSTO F, LANZAVECCHIA A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Current Opinion in Immunol* 1997; **9**: 10–18.
- [18a] CELLA M, JARROSSAY D, FACCHETTI F, ALEBARDI O, NAKAJIMA H, LANZAVECCHIA A, COLONNA M. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nature Med* 1999; **5**: 919–923.
- [19] CELLA M, SCHEIDEGGER D, PALMER-LEHMANN K, LANE P, LANZAVECCHIA A, ALBER G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of IL-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 1996; **184**: 747–752.
- [20] CHEN L, MCGOWAN P, ASHE S, JOHNSTON J, LI Y, HELLSTROM I, HELLSTROM KE. Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity. *J Exper Med* 1994; **179**: 523–532.
- [21] COLONNA M, SAMARIDIS J. Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B. Recognition by human natural killer cells. *Science* 1995; **268**: 405–408.
- [22] DELPECH M. DNA chips (j.francuski). *Annales de Biologie Clinique* 2000; **58**: 29–38
- [22a] DEUSCH K, LULING F, REICH K, CLASSEN M, WAGNER H, PFEFFER K. A major fraction of human intraepithelial lymphocytes simultaneously express the γ/δ T cell receptor the CD8 accessory molecule and preferentially uses the V δ 1 gene segment. *Eur J Immunol* 1991; **21**: 1053–1059.
- [23] DIEHL L, den BOER AT, SCHOENBERGER SP, VAN DER VOORT EIH, SCHUMACHER TNM, MELIEF CJM, OFFRINGA R, TOES REM. CD40 activation in vivo overcomes peptide-induced peripheral cytotoxic T-lymphocyte tolerance and augments anti-tumor vaccine efficacy. *Nature Medicine* 1999; **5**: 774–779.
- [24] DON MASON A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunol Today* 1998; **19**: 395–404
- [25] DRANOFF G, JAFFEE E, LAZENBY A, GOLUMBEEK P, LEVITSKY H, BROSE K, JACKSON V, HAMADA H, PARDOLL D, MULLIGAN RC. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 3539–3543.
- [26] DREXHAGE HA, MULLINK H, DEGROOT J, CLARKE J, BALFOUR BM, A study of cells present in peripheral lymph of pigs with special reference to a type of cell resembling the Langerhans cell. *Cell Tissue Res* 1979; **202**: 407–430.
- [27] EVANS EM, MAN S, EVANS AS, BORYSIEWICZ LK. Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res* 1997; **57**: 2943–2950.
- [28] FESQ H, BACHER M, NAIN M, GEMSA D. Programmed cell death (apoptosis) in human monocytes infected by influenza A virus. *Immunobiology* 1994; **190**: 175–182.

- [29] FINETTE BA, HOMANS AC, ALBERTINI RJ. Emergence of genetic instability in children treated for leukemia. *Science* 2000; **288**: 514–517.
- [30] GALLUCI S, LOLKEMA M, MATZINGER P. Natural adjuvants: Endogenous activators of dendritic cells. *Nature Medicine* 1999; **5**: 1249–1255.
- [31] GANSS R, LIMMER A, SACHER T, ARNOLD B, HAMMERLING GJ. Autoaggression and tumor rejection: it takes more than self-specific T-cell activation. *Immunolog Reviews* 1999; **169**: 263–272.
- [32] GIBBS JB. Mechanism-based target identification and drug discovery in cancer resolved. *Science* 2000; **287**: 1969–1973.
- [33] GOLUMBEK PT, AZHAR R, JAFFE M, LEVITZKY HI, LAZEBNY A, LEONG K, PARDOLL DM. Controlled release biodegradable cytokine depots: A new approach in cancer vaccine design. *Cancer Res* 1993; **53**: 5841–5844.
- [34] GOŁĄB J, STOKŁOSA T, ZAGROŹDŹON R, KACA A, KULCHITSKA LA, FELESZKO W, KAWIAK J, HOSER G, GŁOWACKA E, DĄBROWSKA A, GIERMASZ A, LASEK W, JAKÓBISIAK M. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor potentiates antitumor activity of interleukin-12 in melanoma model in mice. *Tumor Biol* 1998; **19**: 77–87.
- [35] GOŁĄB J, ZAGROŹDŹON R. Antitumor effects of interleukin-12 in pre-clinical and early clinical studies (Review). *Internat J Molec Med* 1999; **3**: 537–544.
- [36] GROH V, BAHRAM S, BAUER S, HERMAN A, BEAUCHAMP M, SPIES T. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 12445–12450.
- [37] GROH V, STEINLE A, BAUER S, SPIES T. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial $\gamma\delta$ T cells. *Science* 1998; **279**: 1737–1740.
- [38] GROH V, RHINEHART R, SECRIST H, BAUER S, GRABSTEIN KH, SPIES T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived $\gamma\delta$ T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 6879–6884.
- [39] GROURAD G, RISSOAN MC, FILGUEIRA L, DURAND I, BANCHEREAU J, LIU YJ. The enigmatic plasmacytoid T cells with interleukin-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 1997; **185**: 1101–1111.
- [40] HAHNE MD, RIMOLDI D, SCHRÓTER M, ROMERO P, SCHREIER M, FRENCH LE, SCHREIER P, BORNAND T, FONTANA A, LIENARD D, CEROTTINI JC, TSCHOPP J. Melanoma cell expression of Fas (Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 1996; **274**: 1363–1366.
- [41] HOFMANN P, SPRENGER H, KAUFMANN A, BENDER A, HASSE C, NAIN C, GEMSA D. Susceptibility of mononuclear phagocytes to influenza A virus infection and possible role in the antiviral response. *J Leuk Biol* 1997; **61**: 408–414.
- [42] HONG WK, CARBONE PP. Cancer chemoprevention: Present status, future expectations. *Hospital Practice* 1999; **34**: 101–106.
- [43] HOUANG JF, YANG Y, SEPULVEDA H, SHI W, HWANG L, PETERSON PA, JACKSON MR, SPRENT J, CAI Z. TCR-Mediated internalization of peptide-MHC complexes acquired by T cells. *Science* 1999; **286**: 952–954.
- [44] HSUEH EC, NATHANSON L, FOSHAG LJ, ESSNER R, NIZZE JA, STERN SL, MORTON DL. Active specific immunotherapy with polyvalent melanoma cell vaccine for patients with in-transit melanoma metastases. *Cancer* 1999; **85**: 2160–2169.
- [45] HUANG AYC, GOLUMBEK P, AHMADZADEH M, JAFFE E, PARDOLL D, LEVITSKY H. Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science* 1994; **264**: 961–965.
- [46] HUNG K, HAYASHI R, LAFOND-WALKER A, LOWENSTEIN C, PARDOLL D, LEVITSKY H. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med* 1998; **188**: 2357–2368.

- [47] INABA K, TURLEY S, YAMAIDE F, IYODA T, MAHNKE K, INABA M, PACK M, SUBKLEWE M, SAUTER B, SHEFF D, ALBERT M, BHARDWAJ N, MELLMAN I, STEINMAN RM. Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *J Exp Med* 1998; **188**: 2163–2173.
- [48] INABA K, STEINMAN RM, PECK MW, AYA H, INABA M, SUDO T, WOLPE S, SCHULER G. Identification of proliferating dendritic cell precursors in mouse blood. *J Exp Med* 1992; **175**: 1157–1167.
- [49] International Multicenter Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) Investigators. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. *Lancet* 1995; **345**: 939–944.
- [50] ISHII T, UDONO H, YAMANO T, OHTA H, UENAKA A, ONO T, HIZUTA A, TANAKA N, SRIVASTAVA PK, NAKAYAMA E. Isolation of MHC class I-restricted tumor antigen peptide and its precursors associated with heat shock proteins hsp70, hsp90, and gp96. *J Immunology* 1999; **162**: 1303–1309.
- [51] JAKÓBISIAK M, ROMANIUK A. Prezentacja antygenów limfocytom T, w *Immunologia*, red. M. Jakóbisiak, PWN, Warszawa 1998: 223–240.
- [52] KALAMS JA, WALKER BD. The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* 1998; **188**: 2199–2204.
- [52a] KAUFMAN SHE. γ/δ and other unconventional T lymphocytes: what do they see and what do they do? *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 2272–2279.
- [53] KAWALEC M, JAKÓBISIAK M, SKÓRSKI T, KAWIAK J. Immunogenicity of cyclophosphamide-treated leukemia cells. *Folia Biol (Praha)* 1982; **28**: 334–343.
- [54] KAWALEC M, SKÓRSKI T, KAWIAK J. Successful chemoimmunotherapy of murine L1210 lymphatic leukemia with cyclofosfamide and mafosfamide-treated leukemia cells. *Investig New Drugs* 1988; **6**: 169–172.
- [55] KAWIAK J, GŁOWACKA E, KAWALEC M. Apoptosis of WEHI-3B cells after Mafosfamide treatment. *Folia Histochem Cytobiol* 1996; **34** supl 1: 39–40.
- [56] KAWIAK J, HOSER G, SKÓRSKI T. Apoptosis and some of its medical implications. *Folia Histochem Cytobiol* 1998; **36**: 99–110.
- [57] KAWIAK J., KAWALEC M, HOSER G, MIKS B, SKÓRSKI T, POJDA Z, SKURZAK H. Changes of thymocyte subpopulations induced by activities diffusing from leukemia L1210 cells. *Thymus* 1991; **18**: 185–192.
- [58] KU CC, MURAKAMI M, SAKAMOTO A, KAPPLER J, MARRAC P. Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines. *Science* 2000; **288**: 675–678.
- [59] KWAŚNY M, MIERCZYK Z, FIEDOR P, ROWIŃSKI W, SOCHA K, GRACZYK A, DOMANIECKI J, MAZUREK AP. Protoporphyrin derivatives - the use in localization of neoplasms by titanium laser-induced fluorescence technique. *Acta Poloniae Pharmaceutica* 1997; **54**: 123–128.
- [60] LABEUR MS, ROTERS B, PERS B, MEHLING A, LUGER TA, SCHWARZ T, GRABBE S. Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation. *J Immunol* 1999; **162**: 168–175.
- [61] LINQUIST S, CRAIG EA. The heat shock proteins. *Ann Rev Genet* 1988; **22**: 631–677.
- [62] MARCHAND M, WEYNANTS P + 19 współautorów. Tumor regression responses in melanoma patients treated with peptide encoded by gene MAGE-3. *Int J Cancer* 1995; **65**: 883–885.
- [63] MASHINA T, DOSAKA-AKITA H, HOMMURA F, NISHI M, KOJIMA T, OGURA S, SHIMIZU M, KATOH H, KAWAKAMI Y. Cyclin E expression, a potential prognostic marker for non-small cell lung cancers. *Clinical Canc Res* 2000; **6**: 11–16.
- [64] MATSUNO K, EZAKI T, KUDO S, UEHARA Y. A life stage of particle-laden rat dendritic cells *in vivo*: Their terminal division, active phagocytosis, and translocation from the liver to the draining lymph. *J Exper Med* 1996; **183**: 1865–1878.

- [65] MELCHER A, TODRYK S, HARDWICK N, FORD M, JACOBSON M, VILE RG. Tumor immunogenicity is determined by the mechanism of cell death via induction of heat shock protein expression. *Nature Med* 1998; **4**: 581–587.
- [66] MITZOGUCHI H, O'SHEA JJ, LONGO DL, LOEFFLER CM, MCVICAR DW, OCHOA AC. Alterations in signal transduction molecules in T lymphocytes from tumor-bearing mice. *Science* 1992; **258**: 1795–1798.
- [67] MOLLER P, HAMMERLING GJ. The role of surface HLA-A,B,C molecules in tumor immunity. *Cancer Surveys* 1992; **13**: 101–127.
- [68] NORBURY CC, CHAMBERS BJ, PRESCOTT AR, LJUNGGREN HG, WATTS C. Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 1997; **27**: 280–288.
- [69] NSEYO UO, LAMM DL. Therapy of superficial bladder cancer. *Seminars Oncol* 1996; **23**: 598–604.
- [70] O'CONNEL MJ, MAILLIARD JA, KAHN MJ, et al. Controlled trial of fluorouracil and low-dose leucovorin given for 6 months as postoperative adjuvant therapy for colon cancer. *J Clin Oncol* 1997; **15**: 246–250.
- [71] O'CONNELL J, O'SULLIVAN GC, COLLINS JK, SHANAHAN The Fas caunterattack: Fas mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J Exp Med* 1996; **184**: 1075–1082.
- [72] OLWEUS J, BITMASOUR A, WARNKE R, THOMPSON PA, CARBALLIDO J, PICKER LJ, LUND-JOHANSEN F. Dendritic cell ontogeny: A human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 12551–12556.
- [73] PAGES F, RAGUENEAU M, ROTTAPPEL R, TRUNEH A, NUNES J, IMBERT J, OLIVE D. Binding of phosphatidyl-inositol-3-OH kinase to CD28 is required for T-cell signalling. *Nature* 1994; **369**: 327–329.
- [74] PAGLIA P, CHIODONI C, RUDOLFO M, COLOMBO MP. Murine dendritic cells loaded *in vitro* with soluble protein prime CTL against tumor antigen *in vivo*. *J Exp Med* 1996; **183**: 317–322.
- [75] PARDOLL DM Cancer Vaccines. *Nature Med* 1998; **4**: 525–531.
- [76] PETERS LC, BRANDHORST JS, HANNA MG, Jr. Preparation of immunotherapeutic autologous tumor cell vaccines from solid tumors. *Cancer Res* 1979; **39**: 1353–1360.
- [77] PETERS LC, HANNA MG, Jr. Active specific immunotherapy of destablished micrometastasis: Effect of cryopreservation procedures on tumor cell immunogenicity in guinea pigs. *J Natl Canc Inst* 1980; **64**: 1521–1525.
- [78] RANDOLPH GJ, BEAULIEU S, LEBECQUE S, STEINMAN RM, MULLER WA. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 1998; **282**: 480–483.
- [79] RESCIGNO M, WINZLER C, DELIA D, MUTINIC, LUTZM, RICCIARDI-CASTAGNOLI P. Dendritic cell maturation is required for initiation of the immune response. *J Leukocyte Biol* 1997; **61**: 415–421.
- [80] RESTIFO NP, ESQUIVEL F, ASHER AL, STOTTER H, BARTH RJ, BENNINK JR, MULE JJ, YEWDELL JW, ROSENBERG SA. Defective presentation of endogenous antigens by a murine sarcoma. *J Immunol* 1991; **147**: 1453–1459.
- [81] RISSOAN MC, SOUMELIS V, KADOWAKI N, GRONARD G, BRIERE F, de WAAL MALEFYT R, LIU YJ. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999; **283**: 1183–1186.
- [82] RUBARTELLI A, POGGI A, ZOCCHI MR. The selective engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells is mediated by the $\alpha v \beta 3$ integrin and requires intracellular and extracellular calcium. *Eur J Immunol* 1997; **27**: 1893–1900.

- [83] SALLUSTO F, LANZAVECCHIA A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by puls IL4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *Exp Med* 1994; **179**: 1109–1118.
- [83a] SAUTER B, ALBERT ML, FRANCISCO L, LARSSON M, SOMERSAN S, BHARDWAJ N. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immuno-stimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 2000; **191**: 423–433.
- [84] SHEN Z, REZNIKOFF G, DRANOFF G, ROCK KL. Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J Immunol* 1997; **158**: 2723–2730.
- [85] SIEGAL FP, KADOWAKI N, SHODELL M, FITZGERALD-BOCARSLY PA, SHAH K, HO S, ANTONENKO S, LIU YJ. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999; **284**: 1835–1837.
- [86] SIMONS JW, JAFFE EM, WEBER CE, LEVITSKY HI, NELSON WG, CARDUCCI MA, LAZENBY AJ, COHEN LK, FINN CC, CLIFT SM, HAUDA KM, BACK LA, LEIFERMAN KM, OWENS AH, PIANTADOSI S, DRANOFF G, MULLIGAN RC, PARDOLL DM, MARSHALL FF. Bioactivity of autologous irradiated renal cell carcinoma vaccines generated by *ex vivo* GM-CSF gene transfer. *Cancer Res* 1997; **57**: 1537–1546.
- [87] SONGYANG Z. SH2 Domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 1996; **72**: 767–778.
- [88] SPEISER DE, MIRANDA R, ZAKARIAN A, BACHMANN MF, MCKALL-FAIENZA K, ODRMATT B, HANAHAN D, ZINKERNAGEL RM, OHASHI PS. Self antigens expressed by solid tumors do not efficiently stimulate naive or activated T cells: implications for immunotherapy. *J Exp Med* 1997; **186**: 645–653.
- [89] STAVELEY-O'CARROL K, SOTOMAYOR E, MONTGOMERY J, BORRELLO I, HWANGL, FEIN S, PARDOLL D, LEVITSKY H. Induction of antigen-specific T cell anergy: an early event in the course of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 1178–1183.
- [90] STOMAYOR EM, BORRELLO I, TUBB E, RATTIS FM, BIEN H, LU Z, FEIN S, SCHOENBERGER S, LEVITSKY H. Conversion of tumor-specific CD4⁺ T-cell tolerance to T-cell priming through *in vivo* ligation of CD40. *Nature Med* 1999; **5**: 780–787.
- [91] SUTO R, SRIVASTAVA PK. A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science* 1995; **269**: 1585–1588.
- [92] SZCZEPANIK M, PLYTYCZ B. Limfocyty o receptorach gamma/delta ($\gamma\delta$ T). *Post Biol Kom* 1998; **25**: 155–170.
- [93] TAMURA Y, PENG P, LIU K, DAOU M, SRIVASTAVA PK. Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations. *Science* 1997; **278**: 117–120.
- [94] TANG HL, CYSTER JG. Chemokine up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells. *Science* 1999; **284**: 819–822.
- [95] TODRYK S, MELCHER AA, HARDWICK N, LINARDAKIS E, BATMAN A, COLOMBO MP, STOPPACCIARO A, VILE RG. Heat shock protein 70 induced during tumor cell killing induces Th1 cytokines and targets immature dendritic cell precursors to enhance antigen uptake. *J Immunology* 1999; **163**: 1398–1408.
- [96] TOES REM, OFFRINGA R, BLOM RJJ, MELIEF CJM, KAST WM. Peptide vaccination can lead to enhanced tumor growth through specific T cell tolerance induction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 7855–7860.
- [97] TORRE-AMIONE G, BAUCHAMP RD, KOEPPEN H, PARK BH, SCHREIBER H, MOSES HL, ROWLEY DA. A highly immunogenic tumor transfected with a murine TGF β cDNA escapes immune surveillance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 1486–1490.
- [98] URACZ W, STACHURA J, PITUCH-NOWOROLSKA A, POPIELA T, CZUPRYNA A, ZEMBALA M. The altered expression of MHC-class II determinants on monocytes of cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 1988; **27**: 171–176.

- [99] Van der BRUGGEN P, TRAVERSARI C, CHOMEZ P, LURQUIN C, De PLAEN E, Van den EYNDE B, KNUTH A, BOON T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991; **254**: 1643–1647.
- [100] VERMORKEN JB, CLAESSEN AME, VANTINTEREN H, GALL H, EZINGA R, MEIJER S, SCHEPER RJ, MEIJER CJLM, BLOEMENA E, RANSOM JH, HANNA Jr MG, PINEDO HM. Active specific immunotherapy for stage II and stage III human colon cancer: A randomised trial. *Lancet* 1999; **353**: 345–350.
- [101] WAWRZYNÓW A, WOJTKOWIAK D, MARSZAŁEK J, BANECKI B, JONSEN M, GRAVES B, GEORGOPOULOS C, ŻYLICZ M. The ClpX heat shock protein of *Escherichia coli*, the ATP-dependent substrate specificity component of the ClpP/ClpX protease, is novel molecular chaperone. *EMBO J* 1995; **14**: 1867–1877.
- [102] WICK M, DUBEY P, KEOPPEN H, SIEGEL CT, FIELDS PE, CHEN L, BLUESTONE JA, SCHREIBER H. Antigenic cancer cells grow progressively in immune hosts without evidence for T cell exhaustion or systemic anergy. *J Exp Med* 1997; **186**: 229–238.
- [103] WITAS HW, MŁYNARSKA A, MŁYNARSKI W, BODALSKI J. CD28/CTLA-4: Dodatkowy sygnał w procesie aktywacji limfocytów T. *Post Biol Kom* 1998; **25**: 111–123.
- [104] WÓJCIK C. Znaczenie proteasomów w prezentacji antygenów. *Post Biol Kom* 1998; **25**: 171–192.
- [105] WOSE E, OLNECKI T, TUASON L, BUDD GT, PEEREBOOM D, SANDSTROM K, MC LAIN D, FINKE J, BIKOWSKI RM. Phase II trial of subcutaneously administered recombinant GM-CSF in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer* 1996; **77**: 1149–1153.
- [106] WU J, SONG Y, BAKKER ABH, BAUER S, SPIES T, LANIER LL, PHILLIPS JH. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 1999; **285**: 730–732.
- [107] YOKOYAMA WM. Natural killer cell receptors. *Current Opinion in Immunol* 1998; **10**: 298–305.
- [107a] YEWDELL JW, BENNINK JR. Brefeldin A specifically inhibits presentation of protein antigens to cytotoxic T lymphocytes. *Science* 1989; **244**: 1072–1075.
- [108] ZALOUDIJK J, LAUEROVA L, JANAKOVA L, TALACR, SIMICKOVA M, NEKULOVA M, MIKULIKOVA I, KOVARIK J, SHEARD M. Significance of pre-treatment immunological promoters in colorectal cancer patients with unresectable metastases to the liver. *Hepato-Gastroenterology* 1999; **46**: 220–227.
- [109] ZEYTUN A, HASSUNEH M, NAGARKATTI M, NAGARKATTI PS. Fas-FasLigand-based interactions between tumor cells and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes: a lethal two-way street. *Blood* 1997; **90**: 1952–1959.

Adres autorów: ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa

RÓŻNICOWANIE KOMÓREK *EUKARIOTA*

DIFFERENTIATION OF EUKARYOTIC CELLS

Redaktorzy:

Zofia Osuchowska

Jerzy Kawiak

WPROWADZENIE

INTRODUCTION

Rozwój każdego organizmu zwierzęcego rozpoczyna się od jednej komórki - zygoty (zapłodnionego jaja). Zwiększenie się liczby komórek i ich różnicowanie się jest podstawą rozwoju zarodka w dorosły organizm. Proces różnicowania się komórek jest wysoce złożony, opiera się bowiem na wielu różnych mechanizmach, takich jak: aktywacja i hamowanie ekspresji genów, interakcja komórek przejawiająca się między innymi w indukcji embriologicznej, przemieszczanie się komórek i inne. Proces rozwoju zarodka i różnicowanie się komórek jest zaprogramowany i postępuje według tego programu. Program jest już częściowo tworzony w czasie oogenezy, kiedy w cytoplazmie oocyty zostaje nagromadzona informacja matczyzna kierująca wczesnym okresem rozwoju zarodka. Dalszy program rozwoju jest kierowany genami samego zarodka.

Chcąc przybliżyć Czytelnikowi problemy związane z różnicowaniem się komórek w okresie rozwoju zarodkowego przedstawiamy kilka wybranych tematów, a to:

- niektóre mechanizmy molekularne związane z różnicowaniem się komórek,
- gromadzenie się informacji matczynej w cytoplazmie oocytów płazów,
- wczesne zróżnicowanie komórek w rozwoju zarodków ssaków,
- różnicowanie się wyspecjalizowanej tkanki, jakimi są mięśnie oraz
- różnicowanie się narządu o złożonym składzie komórek – grasicy.

Zofia Osuchowska i Jerzy Kawiak

LOKALIZACJA MORFOGENÓW W OOCYTACH KRĘGOWCÓW

LOCALIZATION OF MATERNAL DETERMINANTS IN THE OOCYTES OF VERTEBRATES

Małgorzata KLOC¹, Szczepan BILIŃSKI²

¹ M.D. Anderson Cancer Center, Department of Molecular Genetics, Houston, TX, USA; ² Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie: Rozwój zarodkowy zwierząt zależy od prawidłowego, często asymetrycznego rozmieszczenia tzw. morfogenów (matczynek czynników rozwojowych, matczynek mRNA) w cytoplazmie komórki jajowej, czyli ooplazmie. Wśród kręgowców rozmieszczenie morfogenów i ich stopniową lokalizację w czasie kolejnych etapów oogenezy najdokładniej przebadano u żaby szponiastej, *Xenopus laevis*. W oocytach tego gatunku cząsteczki mRNA, zlokalizowane na biegunie wegetatywnym, uczestniczą w determinacji komórek linii płciowej, a także w powstawaniu prawidłowych struktur osiowych zarodka. U *Xenopus* opisano 2 szlaki przemieszczania się RNA do bieguna wegetatywnego. Szlak wczesny (METRO, ang. *message transport organizer*) odpowiada za lokalizację mRNA Xcat2, Xwnt11, Xpat, Xdazl, Xotx1 oraz RNA Xsirts. W początkowych stadiach oogenezy cząsteczki wymienionych rodzajów mRNA zlokalizowane są na terenie tzw. chmury mitochondrialnej, później wraz z jej fragmentami przemieszczają się do cytoplazmy korowej bieguna wegetatywnego oocytu. Po zapłodnieniu fragmenty chmury mitochondrialnej (z zawartymi w niej zlokalizowanymi cząsteczkami RNA) wchodzi w skład plazmy płciowej, która determinuje linię płciową. Drugi szlak lokalizacji RNA to tzw. szlak późny. Odpowiada on za asymetryczne rozmieszczenie takich mRNA, jak: Vg1 czy VgT. Szlak ten jest zależny od mikrotubul i cystern siateczki śródplazmatycznej i nie jest związany z chmurą mitochondrialną. Po zapłodnieniu, białka kodowane przez cząsteczki mRNA szlaku późnego uczestniczą w specyfikacji endodermy i mezodermy oraz w rozwoju struktur osiowych zarodka.

(*Postępy Biologii Komórki* 2000; Supl. 15: 121–132)

Słowa kluczowe: oogeneza, embriogeneza, lokalizacja RNA

Summary: In many vertebrates and invertebrates the development of the embryo depends on the proper, often asymmetrical, localization of maternal determinants throughout the egg cytoplasm (ooplasm). One of the best known examples of such asymmetrical localization is the localization of maternal RNAs in *Xenopus* oocytes. Here, different RNAs localized to the vegetal cortex of the oocyte participate in germ cell determination and in axial patterning of the embryo. There are two different pathways of RNA

localization during *Xenopus* oogenesis. Such mRNAs as *Xcat2*, *Xwnt11*, *Xdazl*, *Xpat*, *Xotx1* and *Xlsirts* utilize the Early (METRO, *message transport organizer*) pathway. All these RNAs are localized in the mitochondrial cloud and are transported within its fragments to the vegetal cortex of the oocyte. After fertilization the fragments of mitochondrial cloud containing localized RNAs become a part of the germ plasm. It is believed that the components of germ plasm are responsible for the specification of germ cell fate in developing embryo. Such mRNAs as *Vg1* and *VgT* utilize the Late (*Vg1-like*) pathway. This pathway does not involve mitochondrial cloud and it is microtubule and endoplasmic reticulum dependent. The Late pathway localizing RNAs play a role in endoderm and mesoderm specification and axial patterning during the development of the *Xenopus* embryo.

(*Advances in Cell Biology 2000; Suppl. 15: 121–132*)

Key words: oogenesis, embryogenesis, RNA localization

WSTĘP

Jednym z najbardziej fascynujących procesów zachodzących podczas embriogenezy jest determinacja (specyfikacja) losów komórek w rozwijającym się zarodku. Już ponad sto lat temu poznano dwa podstawowe typy rozwoju zwierząt: regulacyjny i mozaikowy.

W zarodkach regulacyjnych, których klasycznym przykładem są zarodki ssaków, cytoplazma jaja nie zawiera asymetrycznie zlokalizowanych determinantów. W związku z tym, każdy blastomer wyizolowany z wczesnego zarodka może rozwinąć się w mniejszy, lecz prawidłowo zbudowany organizm. W zarodkach mozaikowych rozwój zależy od specyficznego, asymetrycznego rozmieszczenia matczynych determinantów (tzw. morfogenów) w cytoplazmie komórki jajowej (ooplazmie). Podczas bruzdkowania różne regiony ooplazmy (zawierające odmienne determinanty) ulegają segregacji do rozmaitych blastomerów, które po dalszych podziałach tworzą odmienne linie komórkowe. Tego typu rozwój charakterystyczny jest dla nicieni, owadów, osłonic i płazów. Analiza mozaikowego typu rozwoju pozwoliła stwierdzić, że determinanty cytoplazmatyczne mają pochodzenie matczyne i odpowiedzialne są za specyfikację losów komórek w rozwijającym się zarodku [7, 8, 29]. Przez wiele lat natura morfogenów pozostawała nieznana, dopiero współczesne badania molekularne wykazały, że rolę determinantów w rozwoju zarodkowym zwierząt pełnią asymetrycznie (np. biegunowo) zlokalizowane cząsteczki RNA. Ostatnio, podobne asymetryczne rozmieszczenie cząsteczek RNA stwierdzono też w rozmaitych komórkach somatycznych, a także w zarodkach roślin [28, 32, 34]. Ponieważ nierównomierne rozmieszczenie RNA opisano w komórkach organizmów filogenetycznie tak odległych jak drożdże i kręgowce, można przypuszczać, że lokalizacja RNA stanowi ewolucyjnie konserwatywną strategię pozwalającą na lokalne zagęszczenie białek w obrębie pozornie „jednolitej” cytoplazmy.

LOKALIZACJA RNA W OOCYTACH *XENOPUS*

Biorąc pod uwagę wielkość oocytów oraz ilość zgromadzonego w nich żółtka i pigmentu, w oogenezie *Xenopus laevis* wyróżniono 6 kolejnych stadiów [6, 10]. Młode oocyty prewitelogeniczne (stadium 1) nie zawierają ani materiałów zapasowych, ani ziaren pigmentu i są całkowicie przejrzyste (rys. 1, 2). Jądro oocytu (pęcherzyk zarodkowy) w tym stadium rozwoju jest proporcjonalnie duże i leży w centrum komórki. W sąsiedztwie jądra zlokalizowana jest chmura mitochondrialna (ciało Balbianiego, rys. 1). Badania ultrastrukturalne wykazały, że chmura ta poza licznymi mitochondriami zawiera cysterny siateczki śródplazmatycznej, centriole, diktiosomy (cysterny aparatu Golgiego) oraz elektronowo-gęste, w przybliżeniu kuliste struktury tzw. ziarna płciowe (rys. 7) [2, 10, 22, 24]. Warto w tym miejscu dodać, że podobne nagromadzenia mitochondriów opisano w oocytach wielu gatunków kręgowców i bezkręgowców; funkcja takich struktur w oogenezie pozostaje wciąż niejasna [5, 9]. W kolejnych stadiach oogenezy *Xenopus* (od 2 do 6) oocyt akumuluje materiały zapasowe i stopniowo staje się nieprzejrzysty (rys. 3, 6). Ponadto, w warstwie korowej półkuli animalnej gromadzone są ziarna pigmentu, co powoduje, że ta półkula staje się ciemna, „pigmentowana”. Równocześnie pęcherzyk zarodkowy przesuwa się w kierunku bieguna animalnego, a chmura mitochondrialna rozpada się na mniejsze fragmenty. Te ostatnie wędrują ku powierzchni oocytu i docierają do bieguna wegetatywnego. W późno-witelogenicznym oocycie (stadium 6) niewielkie fragmenty chmury zostają przyłączone do warstwy korowej bieguna wegetatywnego. Fragmenty te noszą nazwę plazmy płciowej. Po aktywacji komórki jajowej przez plemnik wysepki plazmy płciowej zlewają się w większe kompleksy. Agregacja ta odbywa się przy udziale białka motorycznego z rodziny kinezyn, Xklp1 [31]. Podczas pierwszych podziałów bruzdkowania plazma płciowa ulega segregacji i zostaje przydzielona do makromerów – blastomerów powstających na biegunie wegetatywnym (rys. 8). Komórki pochodzące z tych blastomerów i zawierające wysepki plazmy płciowej dają następnie początek linii płciowej w rozwijającym się zarodku [7, 8, 10, 11, 22]. Badania w mikroskopie elektronowym wykazały, że plazma płciowa zarodka zawiera te same organelle, które występowały w chmurze mitochondrialnej, tj. mitochondria, cysterny siateczki śródplazmatycznej, diktiosomy oraz liczne ziarna płciowe [7, 11, 12]. Ziarna te są siateczkowate, często „rozgałęzione” (rys. 9) i około 10 razy większe niż ziarna obserwowane w rozwijających się oocytach (Kloc, dane niepublikowane). Rola plazmy płciowej w determinacji komórek płciowych pozostaje wciąż niejasna, jednakże doświadczenia polegające na jej mechanicznym usuwaniu i naświetlaniu promieniami UV, wskazują, iż jest ona niezbędna do powstania komórek prapłciowych i funkcjonalnych gamet [7, 8, 29].

W rozwijających się oocytach *Xenopus* opisano dwa podstawowe szlaki lokalizacji RNA do warstwy korowej bieguna wegetatywnego: szlak wczesny (METRO, ang. *messenger transport organizer*) oraz późny.

Szlak wczesny odpowiada za lokalizację następujących mRNA: Xcat2, Xdazl, Xpat, Xotx1, Xwnt11 oraz RNA Xlsirts [1, 12–14, 16, 18–20, 23, 25, 30, 34]. Sekwencje mRNA Xcat2, Xdazl i Xwnt11 zostały poznane. I tak, produkt Xcat2 zawiera palce cynkowe; wg aktualnych poglądów białko to odgrywa rolę w represji translacji [16, 17]. Produkt Xdazl wykazuje zdolność do łączenia się z RNA; doświadczenia polegające na usunięciu mRNA Xdazl z ooplazmy (za pomocą antysensownych oligonukleotydów) sugerują, że białko Xdazl bierze udział w migracji komórek prapłciowych z endodermy do zawiązków gonad [13]. Białko Xwnt11 jest czynnikiem wzrostu z grupy WNT i uczestniczy w determinacji struktur osiowych zarodka. RNA Xlsirts to RNA repetytywne i niekodujące; analiza efektów eksperymentalnego usunięcia Xlsirts z ooplazmy wskazuje, że ten rodzaj RNA pełni rolę strukturalną i bierze udział w zaczepieniu mRNA Vg1 (patrz dalej) w cytoplazmie korowej półkuli wegetatywnej [18, 19]. Rola dwóch pozostałych mRNA szlaku wczesnego: Xpat i Xotx1 nie została wyjaśniona.

Wyniki dotychczas przeprowadzonych eksperymentów sugerują, że przynajmniej niektóre lokalizowane za pomocą szlaku wczesnego rodzaje RNA, biorą udział w determinacji linii płciowej *Xenopus*. Z drugiej jednak strony, fakt że białko Xwnt11 uczestniczy w specyfikacji struktur osiowych zarodka dowodzi, iż nie wszystkie RNA szlaku wczesnego odgrywają rolę w rozwoju linii płciowej.

W młodych oocytach prewitellogenicznym (stadium I) wszystkie cząsteczki RNA szlaku wczesnego zlokalizowane są na terenie chmury mitochondrialnej (rys. 1, 2). W stadium drugim i trzecim oogenezy cząsteczki te, wraz z fragmentami chmury, wędrują w kierunku bieguna wegetatywnego i w końcu lokują się w jego cytoplazmie korowej. W tej fazie oogenezy ooplazma zawierająca RNA szlaku wczesnego przybiera postać niewielkiego dysku usytuowanego na szczycie półkuli wegetatywnej (rys. 3, 4). Po zapłodnieniu i w czasie rozwoju zarodkowego omawiane klasy RNA znajdują się na terenie plazmy płciowej. Szczegółowa analiza w mikroskopie elektronowym wykazała, że cząsteczki mRNA Xcat2 zlokalizowane są w ziarnach płciowych i/lub na ich powierzchni zarówno w czasie oogenezy, jak i trakcie rozwoju zarodkowego (rys. 7, 9) [22, 24]. Cząsteczki mRNA Xpat i Xdazl rozmieszczone są w pobliżu powierzchni ziaren (Kloc, dane niepublikowane), natomiast cząsteczki RNA Xlsirts i Xwnt11 występują w cytoplazmie pomiędzy ziarnami płciowymi i w sąsiedztwie mitochondriów [22, 24]. Mechanizm wędrówki chmury mitochondrialnej do bieguna wegetatywnego nie został dotychczas wyjaśniony. Wiadomo jedynie, że transport cząsteczek RNA szlaku wczesnego nie zależy ani od mikrotubul, ani od mikrofilamentów [1, 17, 20, 21, 23, 34]. Wykazano też, że zakotwiczenie RNA w warstwie korowej oocytu jest związane z cytoszkieletem aktynowym [1, 17, 20, 21,].

Szlak późny odpowiada za lokalizację takich mRNA jak Vg1 i VgT. Białko Vg1 jest czynnikiem wzrostu typu TGF β , natomiast VgT to czynnik transkrypcyjny [1,17,20,21,23,34]. Badania eksperymentalne pozwoliły stwierdzić, że białka te uczestniczą w specyfikacji mezodermy i endodermy oraz odpowiadają za determinację osi zarodka [1, 12, 17, 34]. W oocytach prewitellogenicznych (stadium 1 i 2) cząsteczki mRNA Vg1 i VgT są rozmieszczone równomiernie w całej ooplazmie, nigdy natomiast nie występują na terenie chmury mitochondrialnej. W kolejnych fazach oogenezy RNA szlaku późnego gromadzą się w ooplazmie zawartej między pęcherzykiem zarodkowym a biegunem wegetatywnym – w stożkowatym rejonie, przez który wcześniej przemieszczała się chmura mitochondrialna (rys. 5). Analiza tego obszaru ooplazmy wykazała, że zawiera on liczne cysterny siateczki śródplazmatycznej i mikrotubule. Na tej podstawie przypuszcza się obecnie, że wędrująca chmura mitochondrialna „organizuje” (polaryzuje) elementy cytoskieletu i siateczki, które służą następnie do transportu cząsteczek RNA szlaku późnego [1, 4, 17, 23, 34]. Udział mikrotubul w tym transporcie został potwierdzony eksperymentalnie [35], jednakże dotychczas nie wiadomo, jakie białka motoryczne w nim uczestniczą. W oocytach witellogenicznych (stadium 6) mRNA Vg1 i VgT lokują się w warstwie korowej całej półkuli wegetatywnej (rys. 6). Za tę lokalizację odpowiadają mikrofilamenty oraz cząsteczki Xlirts (patrz wyżej). Po zapłodnieniu, RNA szlaku późnego uwalniane są z warstwy korowej i ulegają rozproszeniu w cytoplazmie blastomerów wegetatywnych. Dalsze losy tych RNA pozostają nieznane.

Szlak pośredni. Ostatnio, w oocytach *Xenopus* opisano nowy „pośredni” szlak transportu RNA. W ten nietypowy sposób lokalizowane są mRNA fatvg i XRMC/Hermes. Produkt fatvg jest homologiczny do białka ADRP (ang. *adipose differentiation related protein*), natomiast produkt XRMC/Hermes to białko wykazujące zdolność do łączenia się z RNA [3, Zarfoss i wsp., dane niepublikowane). W młodych oocytach prewitellogenicznych mRNA fatvg i XMRC są rozmieszczone równomiernie w całej ooplazmie, nie występują natomiast na terenie chmury mitochondrialnej – co przypomina zachowanie cząsteczek RNA szlaku późnego. W oocytach nieco starszych (stadium 2) omawiane rodzaje RNA przemieszczają się do chmury mitochondrialnej. Analiza ultrastrukturalna wykazała, że mRNA fatvg zlokalizowany jest w cytoplazmie, pomiędzy ziarnami płciowymi (Kloc, dane niepublikowane).

Należy pamiętać, iż wszystkie hipotezy dotyczące funkcji zlokalizowanych RNA w oogenezie i rozwoju zarodkowym oparte są wyłącznie na wynikach eksperymentów, polegających albo na iniekcji analizowanych RNA do oocyta (względnie zarodka), albo na usuwaniu ich puli (z ooplazmy) przy pomocy antysensownych oligonukleotydów. Niestety, dotychczas prawie nic nie wiadomo o rozmieszczeniu białek kodowanych przez zlokalizowane mRNA. Jedyne dane dotyczą białka Xcat2. Ostatnio wykazano, że mRNA Xcat2 nie podlega translacji ani podczas oogenezy, ani w czasie bruzdkowania. Białko to pojawia się w komórkach prapłciowych dopiero w stadium późnej blastuli, a jego rola pozostaje niewyjaśniona [26].

ROLA SEKWENCJI *cis* I CZYNNIKÓW *trans* W LOKALIZACJI mRNA W OOCYTACH *XENOPUS*

Informacje dotyczące roli sekwencji *cis* (tj. sekwencji występujących w częściach mRNA) odpowiedzialnych za transport i lokalizację mRNA opierają się na doświadczeniach, polegających na iniekcji zmodyfikowanych (pozbawionych ściśle określonych fragmentów) cząsteczek RNA do ooplazmy i analizie zdolności tych cząsteczek do gromadzenia się w obrębie chmury mitochondrialnej i/lub warstwie korowej półkuli wegetatywnej. Dotychczas scharakteryzowano takie sekwencje w mRNA Vg1, fatvg, Xcat2 i RNA Xlsirts. W mRNA Vg1, fatvg i Xcat2 sekwencje te usytuowane są w niepodlegającym translacji końcu 3' (3' UTR, ang. *3' untranslated region*). Sekwencja niezbędna do lokalizacji mRNA Vg1 – tzw. VGLE (ang. *Vg1 localization element*) złożona jest z 340 nukleotydów [27]. Analogiczna sekwencja w mRNA fatvg (FVLE, ang. *fatvg localization element*) zbudowana jest z 25 nukleotydów [3]. Cząsteczka mRNA Xcat2 zawiera natomiast aż dwie sekwencje: MCLE (ang. *mitochondrial cloud localization element*) i GGLE (ang. *germinal granule localization element*) niezbędne do lokalizacji mRNA Xcat2 w chmurze mitochondrialnej (MCLE) i ziarnach płciowych (GGLE) (rys. 11) [24]. Sekwencja MCLE składa się z 227, zaś sekwencja GGLE ze 164 nukleotydów. RNA Xlsirts nie posiada 3'UTR-u. Stwierdzono, że transport tego rodzaju RNA zależy od obecności 2 tandemowo ułożonych sekwencji o długości 79–85 nukleotydów [18]. Dokładne porównanie elementów odpowiedzialnych za lokalizację rozmaitych cząsteczek RNA pozwoliło stwierdzić, że mają one odmienne sekwencje nukleotydów. Fakt ten sugeruje, że „sygnał lokalizujący” związany jest najprawdopodobniej z drugorzędową strukturą 3'UTR-u, a nie z „uszeregowaniem” nukleotydów w tym fragmencie cząsteczki RNA.

Poszukiwania czynników działających w konfiguracji *trans* (tj. białek zdolnych do łączenia się z opisanymi wyżej sekwencjami *cis*) doprowadziły do scharakteryzowania tylko jednego białka – Vera (Vg1RBP) [ang. *Vg1 ER associated protein, Vg1 RNA binding protein*], które współdziała z elementem VGLE. Fakt, iż białko to wyizolowano z frakcji wzbogaconej w siateczkę śródplazmatyczną, dowodzi, że elementy retikulum biorą udział w transporcie mRNA Vg1 do warstwy korowej półkuli wegetatywnej. Ostatnio wykazano, że białko Vera jest homologiczne do białka ZBP (ang. *zipcode binding protein*) wyizolowanego z fibroblastów kurcząt [32, 33]. Ponieważ białko ZBP wykazuje zdolność do łączenia się ze specyficzną sekwencją w obrębie 3'UTR-u mRNA β -aktyny, sądzi się obecnie, że elementy „maszyny” odpowiedzialnej za lokalizację mRNA w oocytach i komórkach somatycznych są homologiczne.

ZLOKALIZOWANE RNA W OOCYTACH DANIO, *BRACHYDANIO RERIO*

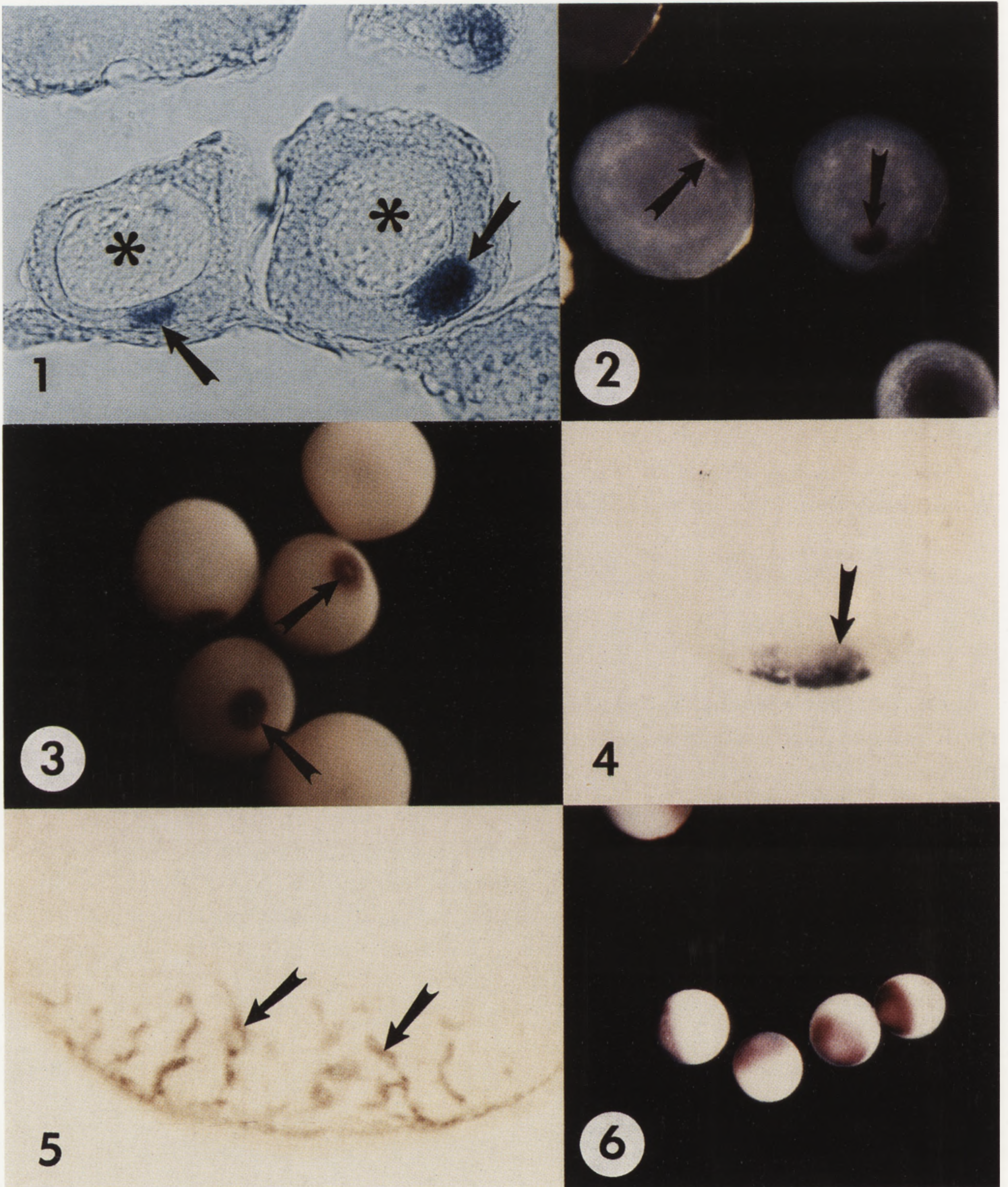
Dotychczas opisano trzy klasy zlokalizowanych RNA w oocytach danio pręgowanego [15]:

- 1) mRNA zlokalizowane w warstwie korowej bieguna animalnego oocyty, które po aktywacji pozostają w tym samym rejonie zarodka, np. Zorba, Notch1a, Vgl, PABP, Taram-a, Cth, Pou, mRNA cykliny B;
- 2) mRNA zlokalizowane w warstwie korowej bieguna wegetatywnego: mRNA Dazl,
- 3) mRNA zlokalizowane w całej warstwie korowej oocyty, które po aktywacji przemieszcza się do półkuli animalnej: mRNA Vasa.

Niestety mechanizmy lokalizacji wymienionych mRNA nie zostały wyjaśnione. Wiadomo jedynie, że mRNA Vasa ulega segregacji do komórek prapłciowych.

MORFOGENY W OOCYTACH SSAKÓW

Oocyty ssaków uważane były zawsze za klasyczny przykład komórek niespolaryzowanych, pozbawionych asymetrycznie rozmieszczonych determinantów cytoplazmatycznych. Uważna analiza literatury dotyczącej oogenezy tej grupy zwierząt wykazuje jednak, że u wszystkich torbaczy i wielu ssaków łożyskowych (np. świnka morska, chomik, szczur, królik, koza, niektóre naczelne) oocyty są asymetryczne i zawierają biegunowo zlokalizowane ciało Balbianiego (chmurę mitochondrialną, rys. 10) [5, 9]. Funkcja tego ciała w oogenezie i embriogenezie ssaków nie została poznana; jego obecność sugeruje jednakże, że determinanty cytoplazmatyczne odgrywają również rolę w rozwoju regulacyjnym.



RYSUNEK 1. *X. laevis*; oocyty, stadium 1 (wczesne). Hybrydyzacja z antysensownym Xcat2, mRNA Xcat2 występuje w ciałach Balbianiego (strzałki), jądra oocytów (gwiazdki). X 200;

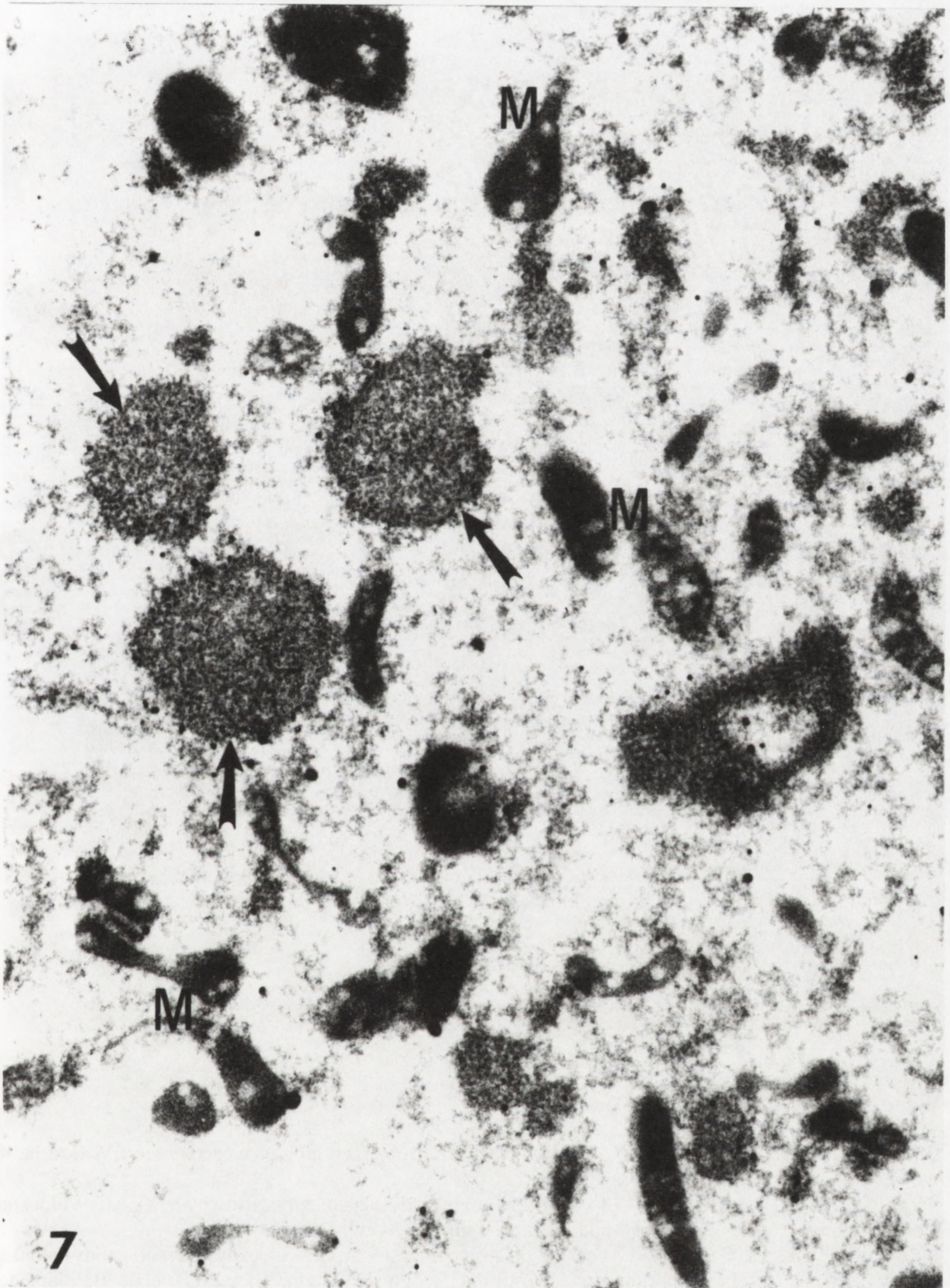
RYSUNEK 2. *X. laevis*; oocyty, stadium 1. Hybrydyzacja z antysensownym Xlsirts. RNA Xlsirts występuje w ciałach Balbianiego (strzałki). X 100;

RYSUNEK 3. *X. laevis*; oocyty, stadium 3. Hybrydyzacja z antysensownym Xcat2. Na biegunie wegetatywnym widoczna cytoplazma (dysk) zawierająca mRNA Xcat2 (strzałki). X 60;

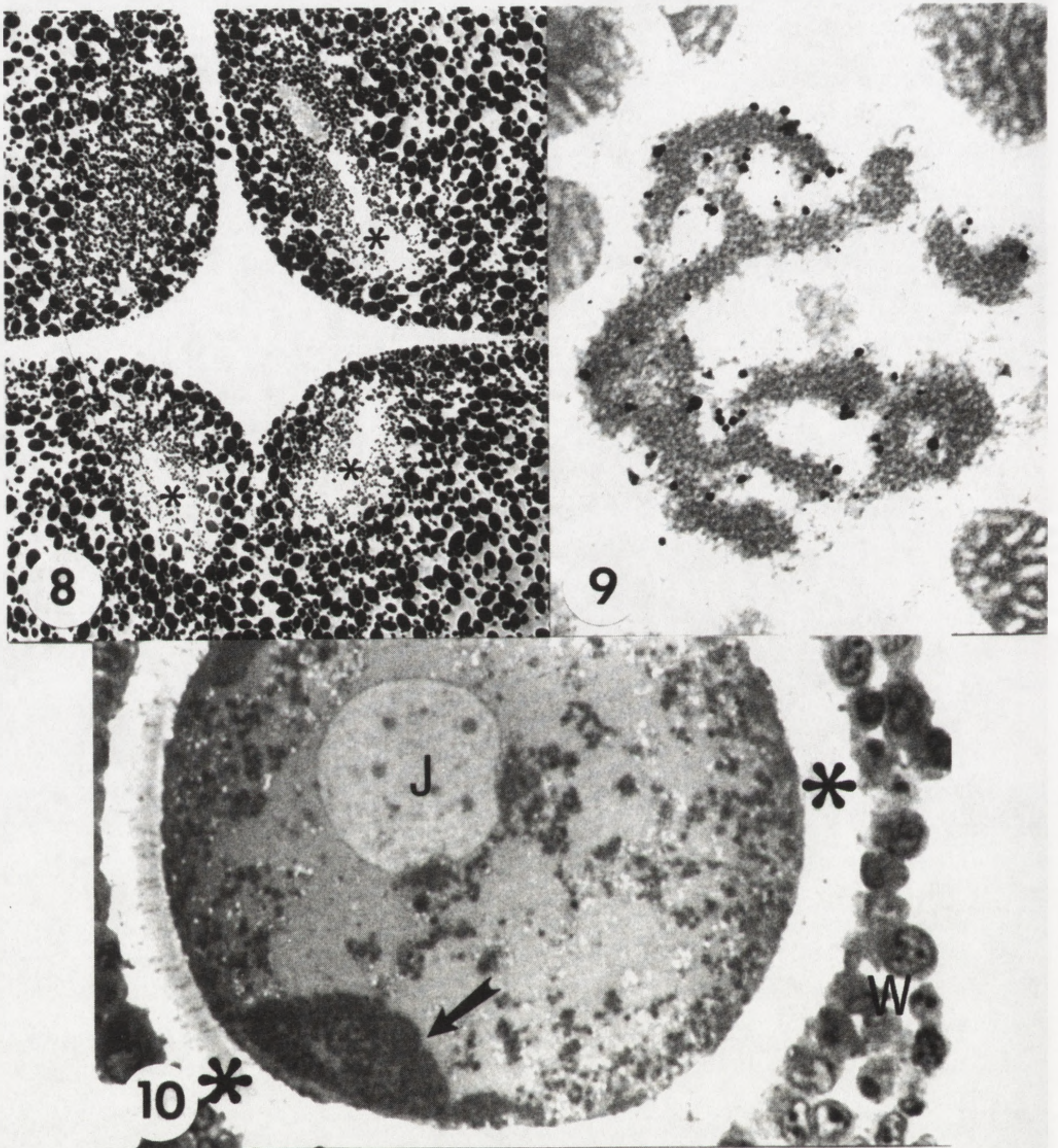
RYSUNEK 4. *X. laevis*; oocyt, stadium 2. Hybrydyzacja z antysensownym Xwnt11 (strzałka). Na biegunie wegetatywnym widoczna cytoplazma zawierająca mRNA Xwnt11. X 180;

RYSUNEK 5. *X. laevis*; oocyt, stadium 5. Hybrydyzacja z antysensownym Vg1. Widoczne pasma cytoplazmy zawierające mRNA Vg1 (strzałki) podczas wędrówki w kierunku bieguna wegetatywnego. X 200;

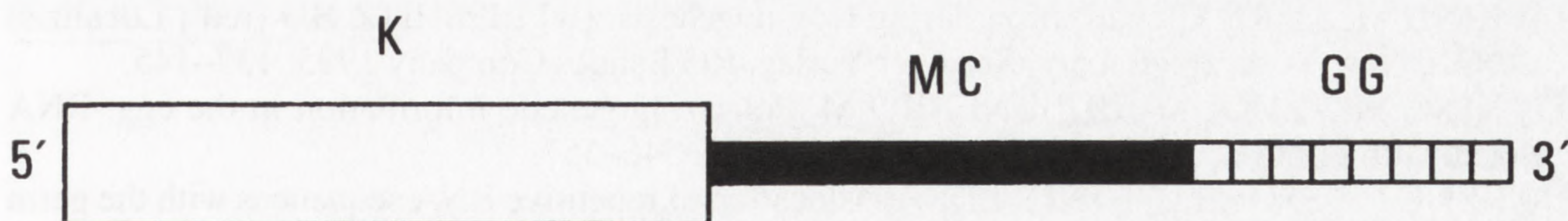
RYSUNEK 6. *X. laevis*; oocyty, stadium 6. Hybrydyzacja z antysensownym Vg1. mRNA Vg1 występuje w warstwie korowej bieguna wegetatywnego. X 10



RYSUNEK 7. *X. laevis*; oocyt, stadium 1 (wczesne). Hybrydyzacja z antysensownym Xcat2. Przekrój przez ciało Balbianiego, widoczne ziarna płciowe (strzałki) i mitochondria (M.); znakowanie odpowiada lokalizacji mRNA Xcat2. X 30 000



- RYSUNEK 8. *X. laevis*; zarodek 8-komórkowy. Przekrój przez biegun wegetatywny. Widoczne 4 makromery i wysepki plazmy płciowej (gwiazdki). X 250;
- RYSUNEK 9. *X. laevis*; zarodek 8-komórkowy. Hybrydyzacja z antysensownym Xcat2. Widoczne ziarno płciowe, znakowanie odpowiada lokalizacji mRNA Xcat2. X 50 000;
- RYSUNEK 10. Koza, *Capra hircus*; pęcherzyk jajnikowy, stadium C. Widoczny oocyt otoczony osłonką przejrzystą (gwiazdki) i komórkami wieńca promienistego (W). Jądro oocytu (J), ciało Balbianiego (strzałka). X 900



RYSUNEK 11. Budowa cząsteczki mRNA Xcat2. Część kodująca (K), sekwencja MCLE (MC), sekwencja GGLE (GG), wg [24]

LITERATURA

- [1] BASHIRULLAH A, COOPERSTOCK RL, LIPSHITZ HD. RNA localization in development. *Annu Rev Biochem* 1998; **67**: 335–394.
- [2] BILLET FS, ADAM E. The structure of the mitochondrial cloud of *Xenopus laevis* oocytes. *J Embryol Exp Morphol* 1976; **36**: 697–710.
- [3] CHAN AP, KLOC M., ETKIN LD. Fatvg encodes a new localized RNA that uses a 25-nucleotide element (FLVE1) to localize to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes. *Development* 1999; **126**: 4943–4953.
- [4] DESHLER JO, HIGHETT MI, SCHNAPP BJ. Localization of *Xenopus* Vg1 mRNA by Vera protein and the endoplasmic reticulum. *Science* 1997; **276**: 1128–1131.
- [5] DE SMEDT V, SZOLLOSI D, KLOC M. The Balbiani body: Asymmetry in the mammalian oocyte. *Genesis* 2000 **26**: 208–212.
- [6] DUMONT JN. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory animals. *J Morphol* 1972; **136**: 153–179.
- [7] EDDY EM. Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. *Int Rev Cytol* 1975; **43**: 229–280.
- [8] GERHART J, DANILCHIK M., ROBERTS J, ROWNING B, VINCENT JP. Gametogenesis and the early embryo. London, Alan R. Liss Press 1986.
- [9] GURAYA SS. Recent advances in the morphology, cytochemistry, and function of Balbiani viteline body in animal oocytes. *Int Rev Cytol* 1979; **59**: 249–321.
- [10] HAUSEN P, RIEBESELL M. The Early Development of *Xenopus laevis*. An Atlas of the Histology. Heidelberg, New York, Springer Verlag 1991.
- [11] HEASMAN J, QUARMBY J, WYLIE CC. The mitochondrial cloud of *Xenopus* oocytes: the source of germinal granule material. *Dev Biol* 1984; **105**: 458–469.
- [12] HORB ME, THOMESSEN GH. A vegetally localized T-box transcription factor in *Xenopus* eggs specifies mesoderm and endoderm and is essential for embryonic axes formation. *Development* 1997; **124**: 1689–1698.
- [13] HOUSTON DW, KING ML. A critical role for Xdazl a germ-plasm localized RNA in the differentiation of primordial germ cells in *Xenopus*. *Development* 2000; **127**: 447–456.
- [14] HUDSON C, WOODLAND HR. Xpat, a gene expressed specifically in germ plasm and primordial germ cells of *Xenopus laevis*. *Mech Dev* 1998; **73**: 159–168.
- [15] HOWLEY C, HO RK. mRNA localization patterns in zebrafish oocytes. *Mech Dev* 2000; **92**: 305–309.

- [16] KING ML. mRNA localization during frog oogenesis. [w] LIPSHITZ HD [red.] Localized RNAs. New York, Heidelberg, Springer Verlag, RG Landes Company 1995: 137–145.
- [17] KING ML, ZHOU Y, BUBUNENKO M. Polarizing genetic information in the egg: RNA localization in the frog oocyte. *BioEssays* 1999; **21**: 546–557.
- [18] KLOC M., SPOHR G, ETKIN LD. Translocation of repetitive RNA sequences with the germ plasm in *Xenopus* oocytes. *Science* 1993; **262**:1712–1714.
- [19] KLOC M., ETKIN LD. Delocalization of Vg1 mRNA from the vegetal cortex in *Xenopus* oocytes after destruction of Xlsirt RNA. *Science* 1994; **265**:1101–1103.
- [20] KLOC M., ETKIN LD. Two distinct pathways for the localization of RNAs at the vegetal cortex in *Xenopus* oocytes. *Development* 1995; **121**: 287–297.
- [21] KLOC M., LARABELL C, ETKIN LD. Elaboration of the messenger transport organizer pathway for localization of RNA to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes. *Dev Biol* 1996; **180**: 119–130.
- [22] KLOC M., LARABELL C, CHAN AP, ETKIN LD. Contribution of METRO pathway localized molecules to the organization of the germ cell lineage. *Mech Dev* 1998; **75**: 81–93.
- [23] KLOC M., ETKIN LD. Apparent continuity between the messenger transport organizer and late RNA localization pathways during oogenesis in *Xenopus*. *Mech Dev* 1998; **73**: 95–106.
- [24] KLOC M., BILIŃSKI S, CHAN AP, ETKIN LD. The targeting of Xcat2 mRNA to the germinal granules depends on a cis-acting germinal granule localization element within the 3UTR. *Dev Biol* 2000; **217**: 221–229.
- [25] KU M., MELTON DA. Xwnt-11: a maternally expressed *Xenopus* wnt gene. *Development* 1993; **119**: 1161–1173.
- [26] MACARTHUR H, BUBUNENKO M., HOUSTON DW, KING ML. Xcat2 RNA is a transcriptionally sequestered germ plasm component in *Xenopus*. *Mech Dev* 1999; **84**: 75–88.
- [27] MOWRY KL, MELTON DA. Vegetal messenger RNA localization directed by a 340-nt RNA sequence element in *Xenopus* oocytes. *Science* 1992; **255**: 991–994.
- [28] MOWRY KL, COTE CA. RNA sorting in *Xenopus* oocytes and embryos. *FASEB J* 1999; **13**: 435–445.
- [29] NIEWKOOP PD, SUTASURYA LA. Primordial Germ Cells in the Chordates. Cambridge University Press 1979.
- [30] PANNESE M., CAGLIANI R, PARDINI CL, BONCINELLI E. Xotx1 maternal transcripts are vegetally localized in *Xenopus laevis* oocytes. *Mech Dev* 2000; **90**: 111–114.
- [31] ROBB DL, HEASMAN J, RAATS J, WYLIE C. A kinesin-like protein is required for germ plasm aggregation in *Xenopus*. *Cell* 1996; **87**: 823–831.
- [32] ROSS AF, OLEYNIKOV Y, KISLAUSKIS EH, TANEJA KL, SINGER RH. Characterization of a γ -actin mRNA zipcode-binding protein. *Mol Biol Cell* 1997; **17**: 2158–2165.
- [33] SCHWARTZ SP, AISENTHAL L, ELISHA Z, OBERMAN F, YISRAELI JK. A 69-kDa RNA binding protein from *Xenopus* oocytes recognizes a common motif in two vegetally localized maternal mRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 11895–11899.
- [34] ST JOHNSTON D. The intracellular localization of messenger RNAs. *Cell* 1995; **81**: 161–170.
- [35] YISRAELI JK, SOKOL S, MELTON DA. A two-step model for the localization of maternal mRNA in *Xenopus* oocytes: involvement of microtubules and microfilaments in the translocation and anchoring of Vg1 mRNA. *Development* 1990; **108**: 289–298.

Adres autora: Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński,
30-060 Kraków, Ingardena 6

RÓŻNICOWANIE SIĘ KOMÓREK WE WCZESNYCH STADIACH ROZWOJU MYSZY

CELLULAR DIFFERENTIATION IN EARLY DEVELOPMENT OF THE MOUSE

Marek MALESZEWSKI

Zakład Embriologii, Instytut Zoologii, Uniwersytet Warszawski

Streszczenie: W czasie rozwoju przedimplantacyjnego zarodka ssaka zachodzą dwa zjawiska morfogenetyczne: kompaktacja i kawitacja. W ich wyniku w blastocyste (blastuli ssaka) wyróżniają się węzeł zarodkowy i trofektoderma, czyli dwie pierwsze linie komórkowe, które różnią się zarówno budową, jak i losami rozwojowymi. W poniższym artykule przedstawione zostały informacje na temat mechanizmów komórkowych i molekularnych, które są zaangażowane w tym procesie różnicowania.

(*Postępy Biologii Komórki 2000; Supl. 15: 133–144*)

Słowa kluczowe: zarodek, bruzdkowanie, blastocysta, kompaktacja, kawitacja, trofektoderma, węzeł zarodkowy.

Summary: During the preimplantation period of mammalian development two morphogenetic events take place: compaction and cavitation. In consequence, mammalian blastocyst is composed of two cell lineages: trophoctoderm and inner cell mass. These cell lineages differ in morphology as well as in their developmental fate. This review summarizes the current knowledge of the cellular and molecular mechanisms, that participate in early differentiation events during mammalian development.

(*Advances in Cell Biology 2000; Supl. 15: 133–144*)

Key words: embryo, cleavage, blastocyst, compaction, cavitation, trophoctoderm, inner cell mass.

BRUZDKOWANIE – JEDNOKOMÓRKOWA ZYGOTA PRZEKSZTAŁCA SIĘ W ZARODEK WIELOKOMÓRKOWY

Wkrótce po zapłodnieniu w życiu zarodka rozpoczyna się okres, który nosi nazwę bruzdkowania. W tym czasie zarodek przechodzi serię podziałów mitotycznych,

w wyniku których cytoplazma zygoty (zarodka 1-komórkowego) dzieli się na coraz mniejsze komórki – blastomery. W zarodkach większości badanych organizmów podziały bruzdkowania odznaczają się szeregiem charakterystycznych cech, które odróżniają je od typowych podziałów mitotycznych. Pierwszą typową cechą bruzdkowania jest to, że podziały komórek zarodka są bardzo szybkie, a pomiędzy podziałami nie ma fazy wzrostu. Cykle komórkowe blastomerów są często zredukowane do naprzemiennie występujących faz S i M. Szybkie tempo bruzdkowania zarodków niektórych zwierząt jest możliwe dzięki przyspieszeniu tempa replikacji DNA. Stwierdzono na przykład, że w bruzdkującym zarodku *Drosophila melanogaster* faza S trwa tylko 3–4 minuty, podczas gdy w dzielących się komórkach somatycznych tego organizmu faza S trwa 10 godzin. U wielu gatunków podziały bruzdkowania zachodzą synchronicznie we wszystkich blastomerach, zaś metabolizm zarodka pozostaje w tym czasie pod kontrolą mRNA i białek pochodzenia matczynego, które zostały nagromadzone w oocyocie podczas oogenezy.

Ponieważ w czasie bruzdkowania zarodek nie rośnie, to w rezultacie postępującego bruzdkowania coraz mniej cytoplazmy zygoty przypada na poszczególne komórki zarodka. Oznacza to, że w czasie bruzdkowania zachodzi zwiększenie stosunku objętości jądra do objętości cytoplazmy. W zygotie ten stosunek jest niski, ale pod koniec bruzdkowania staje się bardzo wysokim. Po zakończeniu bruzdkowania, gdy zarodek osiąga stadium blastuli, stosunek jądro-cytoplazmatyczny ma zwykle wartość typową dla komórek somatycznych. Stwarza to sytuację wyjściową do rozpoczęcia w zarodku procesów różnicowania komórkowego. Jednak już w trakcie bruzdkowania zwykle obserwujemy specjalizację określonych grup komórek zarodka.

Bruzdowanie zarodków ssaków jest pod wieloma względami odmienne od bruzdkowania zarodków innych grup zwierząt. Co prawda u ssaków w tym okresie również nie obserwujemy wzrostu zarodka, jednak cykle komórkowe trwają bardzo długo: we wczesnej fazie bruzdkowania nawet około 24 godzin. Podziały blastomerów u ssaków są niesynchroniczne, stąd w bruzdkujących zarodkach obserwować możemy nieparzystą liczbę komórek. Odmienne niż u innych zwierząt, aktywacja genomu zarodkowego zachodzi u ssaków wcześniej w czasie bruzdkowania. U myszy masowa aktywacja genów zarodkowych zachodzi w stadium 2-komórkowym, a transkrypcja genów zarodka niezbędna jest do rozwoju poza to stadium [3, 7]. Przy zastosowaniu bardzo czułych metod aktywność transkrypcyjną wykrywa się jednak już w 1-komórkowym zarodku myszy [5].

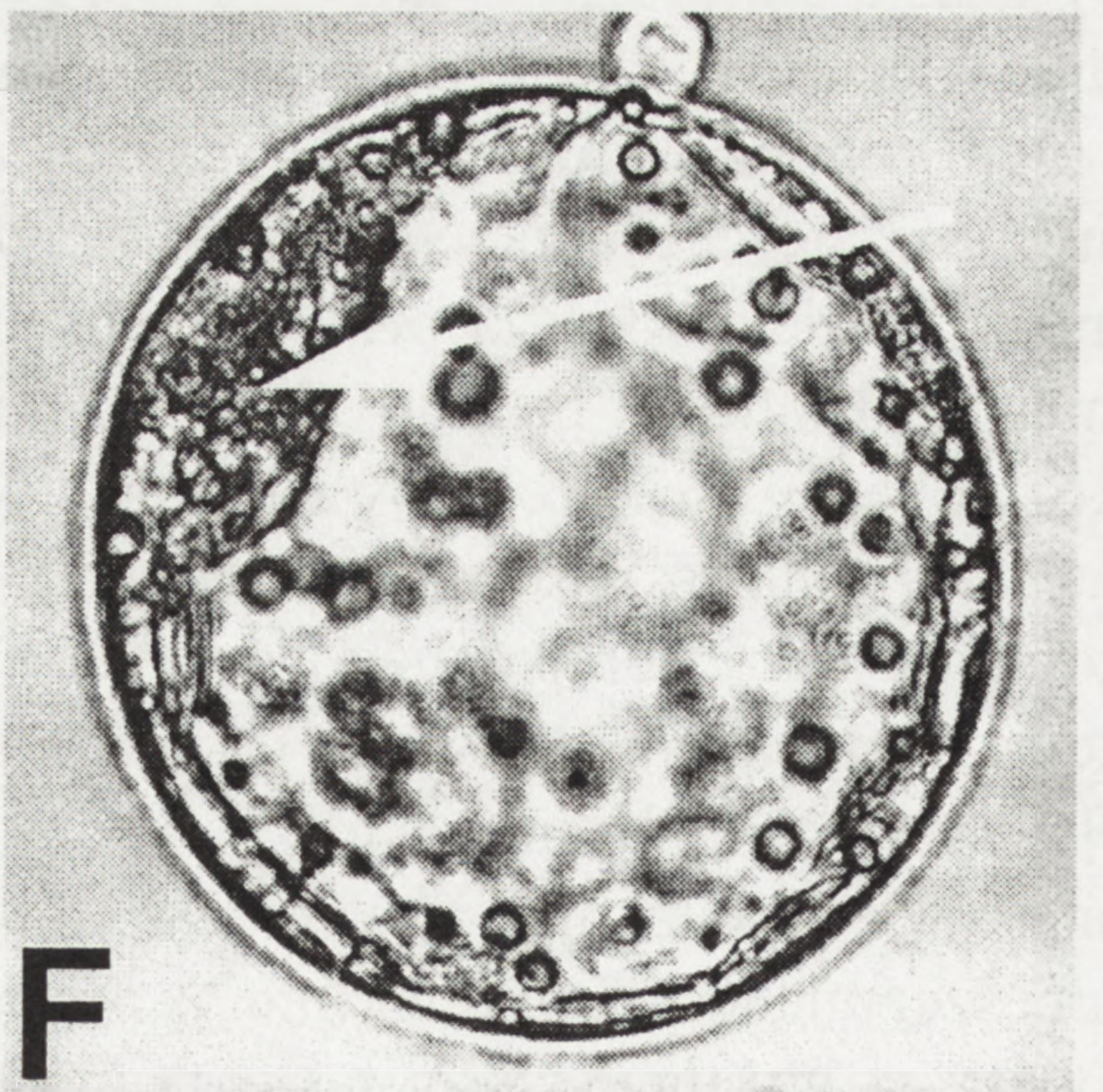
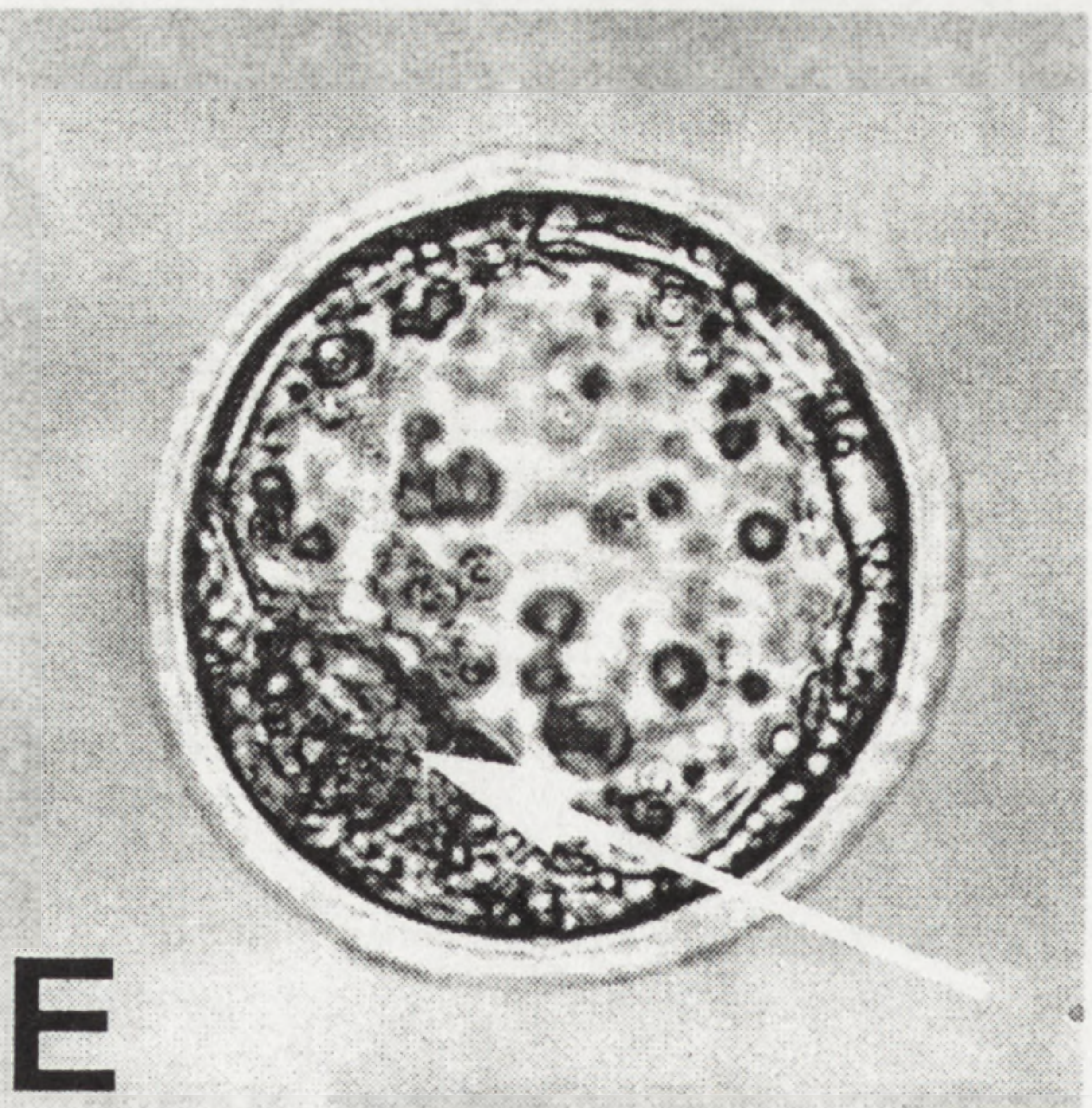
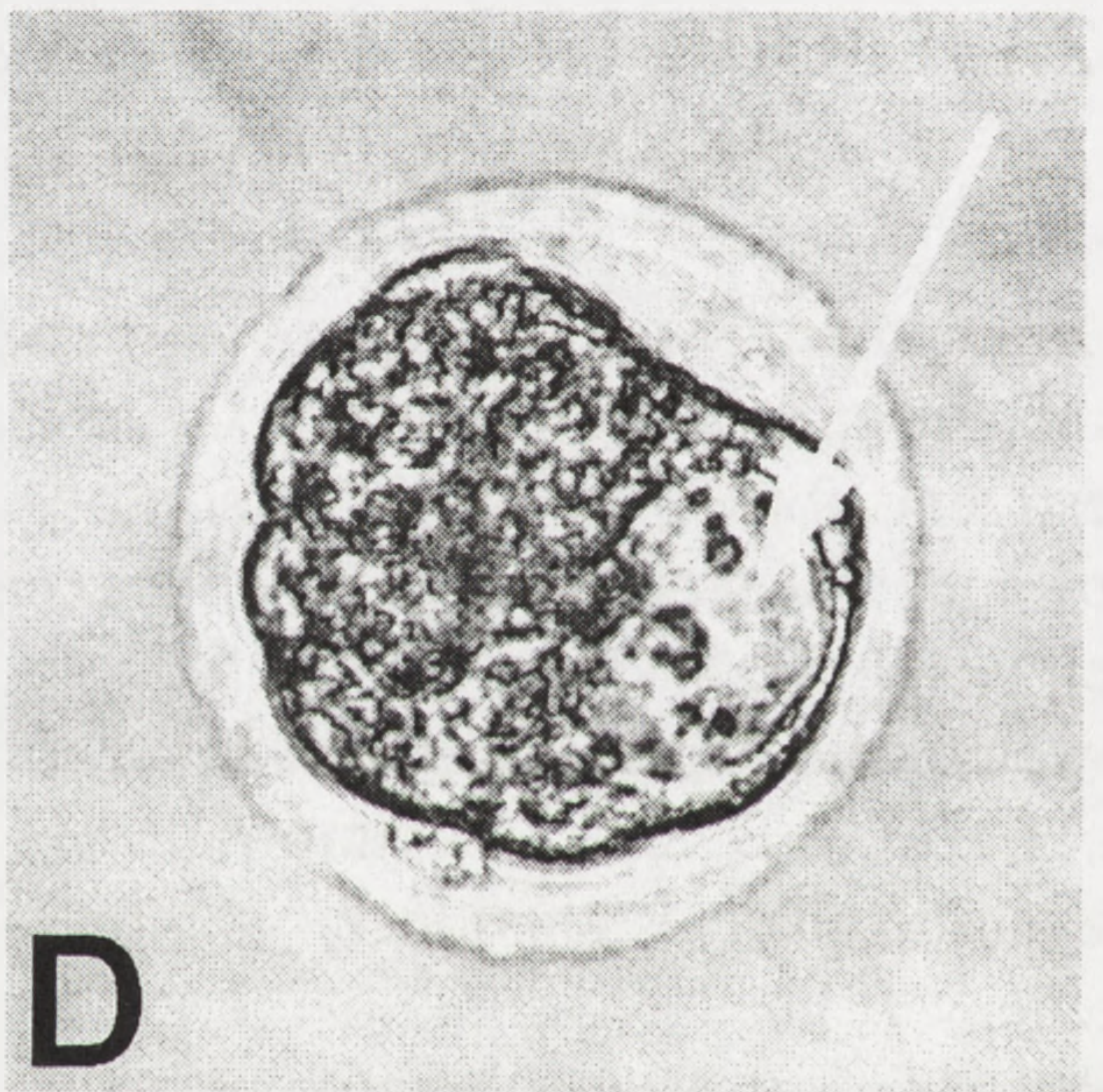
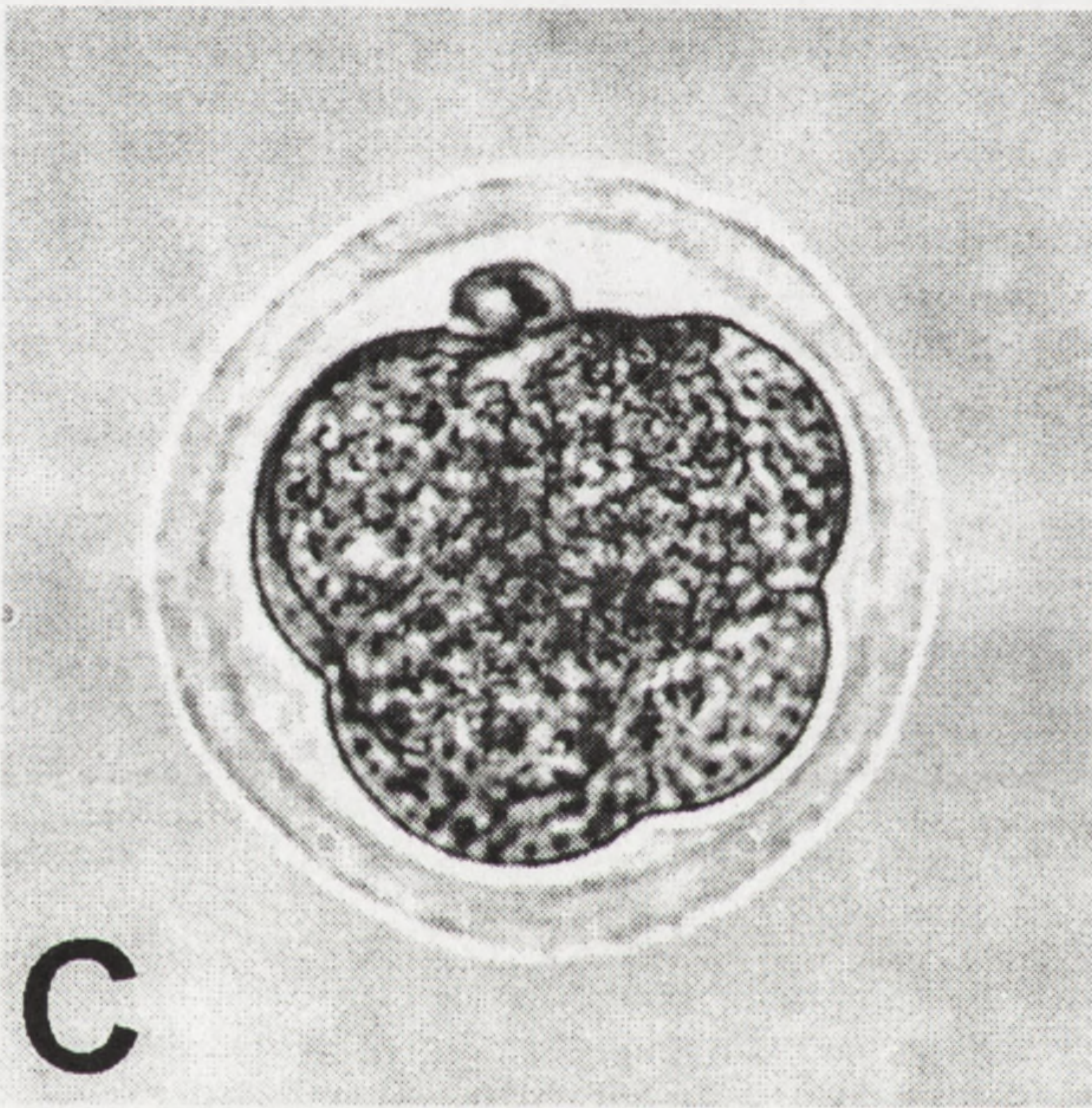
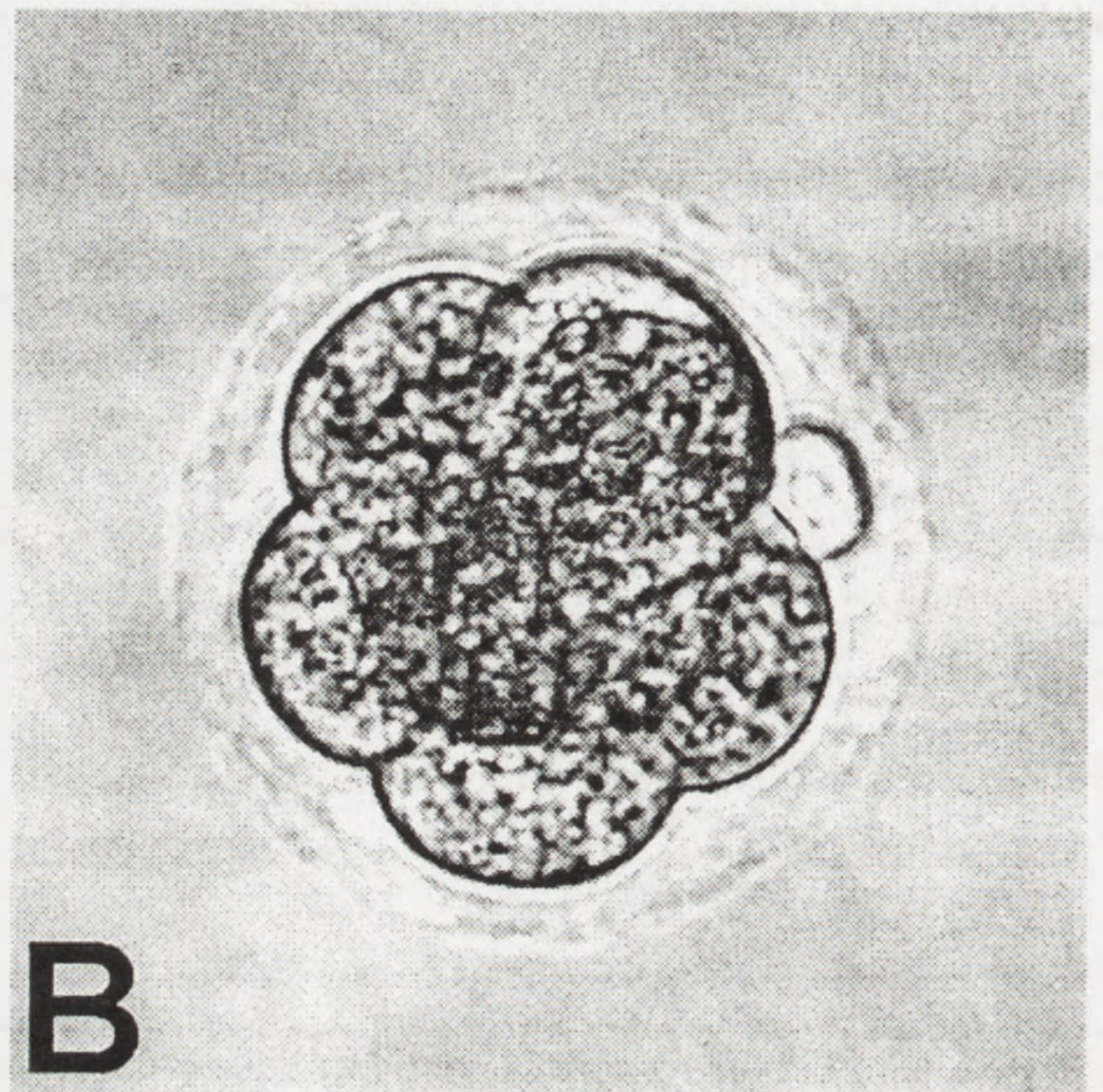
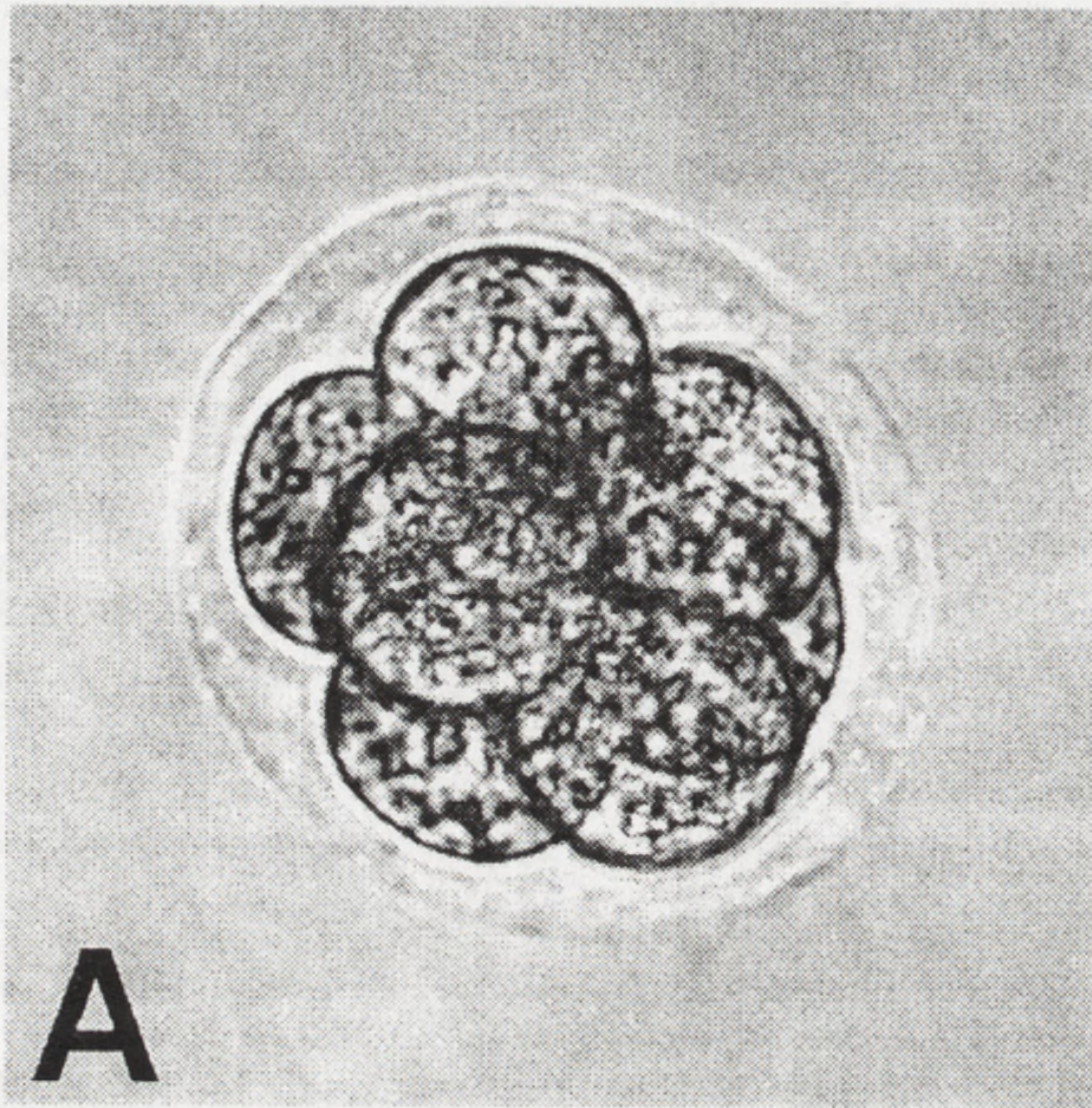
W czasie bruzdkowania w zarodkach ssaków zachodzi zmiana typu połączeń między blastomerami. Zjawisko to nosi nazwę kompaktacji i odróżnia bruzdkujące zarodki ssaków od zarodków innych grup zwierząt (fot. 1, A–C). W kompaktnym zarodku ssaka po raz pierwszy możemy obserwować zróżnicowanie blastomerów. Ten etap różnicowania komórkowego prowadzi do wytworzenia w blastocystie (blastuli ssaka) dwóch grup komórek: trofektodermi budującej ścianę pęcherzy-

kowatej blastocysty i węzła zarodkowego (ang. *inner cell mass*, w skrócie ICM), który położony jest wewnątrz pęcherzyka trofektodermalnego i zawiera materiał na ciało zarodka i większość błon płodowych (fot. 1, D-F). W obrębie trofektodermi wyróżnić możemy dodatkowo część przylegającą do węzła zarodkowego – trofektodermę biegunową i część pozostałą – trofektodermę ścienną. W późniejszym okresie rozwoju obie te części trofektodermi będą u gryzoni pełniły różne funkcje. W dalszej części artykułu zajmować się będziemy mechanizmami, które kontrolują procesy różnicowania komórkowego, jakie zachodzą w czasie rozwoju przedimplacyjnego zarodka. Większość informacji, jakie udało się na ten temat uzyskać, dotyczy rozwoju zarodka myszy.

KOMPAKCJA ZARODKA – BLASTOMERY ZACZYNAJĄ WZAJEMNIE ODDZIAŁYWAĆ NA SIEBIE, TWORZĄ SIĘ PIERWSZE DWIE LINIE KOMÓRKOWE

Do stadium 8-komórkowego blastomery w zarodku myszy są ułożone luźno, stykają się niewielkimi powierzchniami, a pomiędzy nimi pozostaje dużo wolnej przestrzeni (fot. 1, A). Błony komórkowe blastomerów są wtedy jeszcze niespolaryzowane, a blastomery dość łatwo można od siebie oddzielić po usunięciu osłonki przejrzystej. W stadium 8-komórkowym zmiany zachodzące w błonach komórkowych blastomerów sprawiają, że komórki te zaczynają ściśle przylegać do siebie (fot. 1, B-C). Dzięki programowi rozwojowemu, który jest wtedy uruchamiany, zaczyna działać system adhezji komórkowej, niezbędnej dla różnicowania i organogenezy [8].

W czasie czwartego cyklu komórkowego zarodka (stadium 8 blastomerów) sąsiednie blastomery zaczynają na siebie oddziaływać, co prowadzi do polaryzacji ich błon komórkowych [12,13]. Znakowanie przy pomocy substancji fluorescencyjnych cząsteczek obecnych na powierzchni blastomerów pokazało, że w czasie kompaktacji wiele spośród nich zmienia wzór rozmieszczenia na powierzchni blastomerów. Białkiem bezpośrednio odpowiedzialnym za adhezję blastomerów jest glikozylowane białko błonowe o masie 120 kD, kadheryna E (uvomorulina) [11, 28]. Przeciwciała skierowane przeciw temu białku zapobiegają kompaktacji i powodują dekompaktację już kompaktowego zarodka, co sugeruje, że zachodząca w czasie kompaktacji translokacja i aktywacja kadheryny E są konieczne dla adhezji blastomerów [28]. Wykryto, że kadheryna E występuje na powierzchni błony komórkowej blastomerów od początku rozwoju zarodka. Przed kompaktacją jednak kadheryna E rozmieszczona jest równomiernie na powierzchni blastomerów, zaś w kompaktnym zarodku jej występowanie jest ograniczone tylko do tych rejonów blastomerów, które kontaktują się z blastomerami sąsiednimi. Oznacza to, że kompaktacja zarodka



jest kontrolowana przez aktywację i translokację białka już obecnego w zarodku, a nie przez zainicjowanie ekspresji genu kadheryny E. Nie do końca wiadomo, w jaki sposób w czasie kompaktacji aktywowana jest kadheryna E: możliwe, że aktywacja zachodzi poprzez fosforylację kadheryny przez kinazę C [25, 30, 37]. Stwierdzono, że w czasie adhezji komórek somatycznych w hodowli *in vitro* aktywowany jest szlak przekazywania, w którym ma miejsce oddziaływanie cytoplazmatycznej domeny kadheryny E z mikrofilamentami aktynowymi za pośrednictwem białek, które noszą nazwę katenin [32]. Sugeruje się występowanie podobnego mechanizmu w zarodkach, w których zachodzi kompaktacja [18, 22]. Niedawno wykazano, że fosforylacja β -kateniny za pośrednictwem kinazy C jest prawdopodobnym elementem szlaku przekazywania, który funkcjonuje w blastomerach zarodka przechodzącego kompaktację [24]. Także stężenie wolnych jonów Ca^{2+} w cytoplazmie blastomerów wydaje się być czynnikiem kontrolującym kompaktację zarodka. Stwierdzono, że obniżenie stężenia jonów wapnia w środowisku otaczającym kompaktny zarodek myszy lub zablokowanie kanałów wapniowych w kompaktym zarodku powoduje jego dekompaktację. Prawdopodobnie dzieje się tak dlatego, że lokalizacja i funkcjonowanie różnych elementów cytoszkieletu komórki regulowane są poprzez zmiany stężenia jonów wapnia w cytoplazmie [27].

W kompaktym zarodku 8-komórkowym blastomery zaczynają nabierać właściwości komórek nabłonkowych. Wiąże się to z wyraźnym zróżnicowaniem api-

FOTOGRAFIA 1. Na zdjęciach przedstawione są kolejne stadia rozwoju przedimplantacyjnego myszy, poczynając od wczesnego okresu stadium 8-komórkowego, a kończąc na wyrosniętej blastocyste. W tym czasie w zarodku zachodzą dwa istotne wydarzenia morfogenetyczne: kompaktacja i kawitacja. Przez cały ten okres zarodek pozostaje otoczony osłonką przejrzystą i przebywa w jajowodzie. Pod koniec przedimplantacyjnej fazy rozwoju zarodek z jajowodu przechodzi do macicy. **A** – wczesny zarodek 8-komórkowy w stadium poprzedzającym kompaktację. Blastomery są luźno ułożone i stykają się ze sobą tylko niewielkimi fragmentami błon komórkowych. **B** – zarodek 8-komórkowy, w którym rozpoczęła się kompaktacja. Blastomery zaczynają mocniej przylegać do siebie i nie ma już pomiędzy nimi wolnej przestrzeni. W poszczególnych blastomerach wytwarza się polaryzacja wzdłuż osi apikalno-bazalnej. **C** – kompaktny zarodek 8-komórkowy. Bazolateralne powierzchnie blastomerów przylegają ściśle do siebie i trudno jest odnaleźć granice pomiędzy blastomerami. W tym stadium blastomery jeszcze nie różnią się od siebie i wszystkie kontaktują się ze środowiskiem. W zarodku 16-komórkowym wyróżnić już jednak będzie można dwie grupy blastomerów: zewnętrzne – kontaktujące się ze środowiskiem i wewnętrzne – mające kontakt tylko z innymi blastomerami. **D** – w zarodku liczącym około 30 komórek rozpoczęła się kawitacja. Dzięki gromadzeniu się płynu początkowo lity zarodek przekształca się w blastocystę. Strzałką zaznaczono tworzący się blastocel. **E** – blastocysta, w której wyróżnić możemy pierwsze dwie linie komórkowe zarodka: trofektodermę i węzeł zarodkowy (pokazany na zdjęciu strzałką). W tym stadium zarodek liczy od 60 do 120 komórek i ma postać pęcherzyka, którego ścianę tworzą ściśle przylegające do siebie komórki trofektodermy. Węzeł zarodkowy przyczepiony jest ekscentrycznie do wewnętrznej powierzchni trofektodermy. Ciało zarodka (a także większość błon płodowych) powstaje tylko z komórek węzła zarodkowego. **F** – wyrosnięta blastocysta wkrótce przed opuszczeniem osłonki przejrzystej. Pod wpływem ciśnienia wywieranego przez płyn nagromadzony w jamie blastocysta rozszerza się rozciągając osłonkę przejrzystą. Strzałką zaznaczony jest węzeł zarodkowy. Niewielki pęcherzyk widoczny w górnej części zdjęcia na zewnętrznej powierzchni osłonki przejrzystej to fragment trofektodermy, który wyrzucił się przez otwór w osłonce. Jest to początek wychodzenia blastocysty z osłonki obserwowany *in vitro*. Nie wiadomo, jak przebiega wychodzenie blastocysty z osłonki przejrzystej w warunkach naturalnych (w macicy).

kalnej (kontaktującej się ze środowiskiem) i bazolateralnej (kontaktującej się z sąsiednimi blastomerami) powierzchni błony komórkowej, a także z polaryzacją cytoplazmy blastomeru wzdłuż osi apikalno-bazalnej [9, 12, 13]. Na apikalnej powierzchni blastomerów występują mikrokosmki. Brak ich na powierzchni bazolateralnej, na której występują struktury związane z powstawaniem połączeń między komórkami zarodka. Jednym z białek, których rozmieszczenie zmienia się w czasie kompaktacji, jest ezryna. Ezryna (ang. *ezrin*) to białko, o którym sądzi się, że w komórkach typu nabłonkowego odgrywa rolę w tworzeniu bogatych w aktyne struktur powierzchniowych, takich jak np. mikrokosmki [2]. W bruzdkującym zarodku myszy przed kompaktacją ezryna zlokalizowana jest równomiernie w warstwie korykalnej blastomerów. Jednakże w kompaktnym zarodku 8-komórkowym jej występowanie zostaje ograniczone do mikrokosmków, które występują wtedy tylko w apikalnych rejonach blastomerów [17]. W późniejszym okresie rozwoju ezryna znajduje się również tylko w mikrokosmkach na powierzchni apikalnej blastomerów zewnętrznych [17].

Adhezja blastomerów w stadium 8-komórkowym prowadzi następnie po dalszych podziałach do wytworzenia połączeń ścisłych (ang. *tight junction*) pomiędzy blastomerami. Połączenia ścisłe są charakterystyczne dla wszelkiego typu nabłonek. Dzięki takim połączeniom międzykomórkowym nabłonek stanowi barierę o selektywnej przepuszczalności, po obu stronach której mogą znajdować się roztwory o różnym składzie. Powstanie ścisłych połączeń pomiędzy blastomerami zarodka jest niezbędne do tego, aby w wyniku selektywnego transportu jonów kompaktny zarodek z litego skupienia komórek przekształcił się w blastocystę, czyli jednowarstwowy pęcherzyk z węzłem zarodkowym przyczepionym ekscentrycznie do jego wewnętrznej powierzchni.

Z powstawaniem ścisłych połączeń międzykomórkowych związane jest występowanie białek ZO-1 i cinguliny (ang. *cingulin*) [8]. Stwierdzono, że ekspresja genu ZO-1 rozpoczyna się pod koniec trzeciego cyklu komórkowego zarodka myszy, a samo białko można wykryć na powierzchni blastomerów wkrótce po rozpoczęciu kompaktacji. Cingulina pojawia się w powstających połączeniach ścisłych pomiędzy blastomerami zarodka 8- i 16-komórkowego, a ekspresja kodującego ją genu rozpoczyna się w zarodku już w stadium 2-komórkowym.

Tworzenie połączeń ścisłych między blastomerami bruzdkującego zarodka, które rozpoczęło się w stadium 8-komórkowym, jest kontynuowane w stadium 16- i 32-komórkowym. Aż do stadium 8-komórkowego poszczególne blastomery zarodka nie różniły się od siebie pod względem biochemicznym, morfologicznym i funkcjonalnym. Zarodek 16-komórkowy jest już jednak zbudowany z dwóch typów komórek: spolaryzowanych komórek powierzchniowych, które kontaktują się ze środowiskiem apikalnym fragmentem błony komórkowej i niespolaryzowanych komórek wewnętrznych, które na całej powierzchni kontaktują się tylko z innymi blastomerami. To początkowe zróżnicowanie blastomerów stanowi punkt wyjścia

dla wytworzenia dwóch wspomnianych wcześniej linii komórkowych o zupełnie różnych właściwościach i losie: węzła zarodkowego i trofektodermy. Wszystko wskazuje bowiem na to, że ciągle zachowuje aktualność hipoteza *inside-outside*, sformułowana jeszcze w 1967 roku przez Tarkowskiego i Wróblewską [33]. Hipoteza ta głosi, że trofektoderma wywodzi się z komórek powierzchniowych, a węzeł komórkowy z komórek wewnętrznych kompaktne zarodka 16-komórkowego. To przypuszczenie znalazło potwierdzenie również w pracach opublikowanych w okresie późniejszym [np: 10, 31]. Jednak dla wyróżnicowania się w zarodku węzła i trofektodermy po kompaktacji musi zajść kolejne zjawisko morfogenetyczne nazywane kawitacją. Kompaktny zarodek (u myszy w stadium ok. 30 komórek) przekształca się wtedy w wypełnioną płynem sferyczną blastocystę.

KAWITACJA: PROCES FORMOWANIA BLASTOCYSTY

Wyczerpujące omówienie procesów molekularnych, które prowadzą do powstania blastocysty, czytelnik znaleźć może w artykule przeglądowym Watsona [35]. Jak już wspomniano, przed kawitacją zarodek musi przejść kompaktację, w trakcie której pomiędzy blastomerami zarodka powstają połączenia ściste. Dzięki temu wewnątrz zarodka może tworzyć się blastocel (jama blastocysty) – jamka wypełniona płynem. Dalsze nagromadzenie się tego płynu pozwoli później na rozszerzenie się blastocelu i ułatwi wyjście wyrosniętej blastocysty z osłonki przejrzystej. Płyn znajdujący się w jamie blastocysty zawiera jony Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{2+} i Mg^{2+} w stężeniu wyższym niż w płynie otaczającym zarodek [4]. W tworzeniu się jamy blastocysty musi więc uczestniczyć mechanizm aktywnego transportu jonów z płynu otaczającego zarodek do blastocelu. W wyniku aktywnego transportu powstaje gradient stężenia jonów, dzięki któremu głównie drogą osmozy woda wnika do rozszerzającego się blastocelu.

Podstawową rolę w powstawaniu blastocelu odgrywa enzym wykazujący aktywność pompy sodowo-potasowej zależnej od ATP (ATPaza sól-potas) [19, 36]. Pompa sodowo-potasowa występuje w błonach komórkowych komórek eukariotycznych i odgrywa ważną rolę w utrzymywaniu równowagi jonowej w komórce [6]. Aktywny enzym składa się z dwóch podjednostek: katalitycznej podjednostki α i niekatalitycznej podjednostki β . W bruzdkującym zarodku myszy obie podjednostki pompy sodowo-potasowej wykrywa się przez cały czas rozwoju przedimplantacyjnego, ale zaraz przed rozpoczęciem kawitacji obserwuje się zwiększenie ilości tego enzymu, a także pojawianie się nowych izoform jego podjednostek [1, 35]. W czasie tworzenia się blastocelu pompa sodowo-potasowa jest przemieszczana w komórkach zarodka, skupienia tego białka wykrywa się wtedy w bazolateralnej powierzchni komórek trofektodermy ściennej [19, 34]. Bezpośredniego dowodu na udział pompy sodo-

wo-potasowej w tworzeniu blastocelu dostarczają doświadczenia, w których wykazano, że inhibitory tego enzymu hamują kawitację [18] równie skutecznie jak usunięcie z pożywki jonów Na^+ [20]. Czas i tempo kawitacji są prawdopodobnie kontrolowane poprzez zróżnicowaną ekspresję genów kodujących izoformy podjednostek pompy sodowo-potasowej. Stwierdzono występowanie co najmniej sześciu takich izoenzymów, zasadniczą rolę podczas kawitacji odgrywa jednak forma $\alpha 1\beta 1$ [19, 36]. mRNA kodujący podjednostkę $\alpha 1$ wykrywa się w zygotach myszy, jednak w zarodkach 2-komórkowych jest on prawie niewykrywalny. Następnie $\alpha 1$ mRNA jest stopniowo gromadzony, a najwyższe stężenie tego transkryptu wykrywa się w stadium blastocysty [36]. Transkrypt kodujący podjednostkę $\beta 1$ początkowo także występuje w zygotie, ale nie znajduje się go w zarodkach 2-, 4- i 8-komórkowych. Pojawia się ponownie w kompaktnym zarodku, a w blastocyście jest go bardzo dużo [36]. Taka sekwencja pojawiania się podjednostek pompy sodowo-potasowej sugeruje, że ekspresja genu kodującego podjednostkę β może kontrolować rozpoczęcie kawitacji [36]. Wiadomo, że zarodki myszy rozwijają się *in vitro* do stadium blastocysty w pożywce, która nie zawiera żadnych czynników wzrostowych. Przypuszcza się jednak, że *in vivo* czynniki wzrostowe, takie jak TGF- α i EGF, mogą stymulować kawitację przez pośrednie indukowanie aktywności pompy sodowo-potasowej [35].

W wyniku dalszego działania pompy sodowo-potasowej zachodzi rozszerzanie się blastocelu, co ułatwia wyjście blastocysty z otaczającej ją do tej pory osłonki przejrzystej. Dzięki temu blastocysta może wejść w bezpośredni kontakt z tkankami macicy. W ten sposób kończy się przedimplantacyjny okres życia zarodka.

EKSPRESJA GENÓW W PRZEDIMPLANTACYJNYM ZARODKU SSAKA

Szczegółowe omówienie regulacji ekspresji genów w przedimplantacyjnym zarodku ssaka wykracza poza zamierzone ramy tego artykułu. We wcześniejszych rozdziałach zostało już podane, kiedy w zarodku rozpoczyna się ekspresja genów kodujących niektóre białka ważne dla zajścia kompaktacji i kawitacji. Poniżej zostaną przedstawione ogólne uwagi dotyczące tego, co poza tym wiemy o aktywności genetycznej przedimplantacyjnego zarodka ssaka. Po dane szczegółowe czytelnik powinien sięgnąć do obszernych prac przeglądowych, dotyczących tego tematu [14, 15]. Należy także dodać, że większość doświadczeń, które dostarczyły informacji dotyczących ekspresji genów w zarodku ssaka, przeprowadzona została na myszy.

Jak wspomniano w pierwszej części tego artykułu, u ssaków aktywacja genomu zarodkowego zachodzi w czasie bruzdkowania. U myszy w stadium dwóch blastomerów ma miejsce masowa aktywacja genów zarodka, która niezbędna jest do

tego, aby rozwinął się on poza stadium 2-komórkowe [3, 7]. Jednakże przy zastosowaniu bardzo czułych metod transkrypcję można wykryć już w 1-komórkowym zarodku myszy [5]. Wiadomo, że wszystkie fazy rozwoju przedimplantacyjnego wymagają ekspresji genów zarodkowych, nie ulega jednak wątpliwości, że również mRNA nagromadzony w czasie oogenezy odgrywa ważną rolę w przedimplantacyjnym życiu zarodka.

Z badań nad nagromadzaniem się poszczególnych typów transkryptów wyciągnięto wniosek, że większość genów aktywnych podczas przedimplantacyjnej fazy rozwoju rozpoczyna transkrypcję w stadium 2–4-komórek [14]. Stwierdzono także, że geny, które uległy aktywacji na początku bruzdkowania, są potem konsekwentnie transkrybowane przez cały okres przedimplantacyjny aż do stadium blastocysty. Nie udało się bowiem zidentyfikować ani jednego transkryptu, który pojawiałby się na krótko w okresie przedimplantacyjnym i znikałby następnie w którymś z późniejszych etapów tego okresu rozwoju [14]. Pozostaje to w zgodzie z wynikami wcześniejszych prac, które pokazywały stabilność wzoru syntezy białek w zarodkach przez cały okres przedimplantacyjny [np. 16].

Kidder [14] w artykule przeglądowym zestawił interesujące obserwacje dotyczące wrażliwości poszczególnych zjawisk morfogenetycznych zachodzących w przedimplantacyjnej fazie rozwoju zarodka na zablokowanie transkrypcji. Okazuje się, że gromadzenie produktów transkrypcji niezbędnych dla zajścia kompaktacji trwa tylko do połowy stadium 4-komórkowego. Zarodki poddane od tego momentu działaniu α -amanityny przechodzą kompaktację pomimo obecności inhibitora transkrypcji. Natomiast do rozpoczęcia kawitacji wymagana jest nieprzerwana transkrypcja aż do momentu zapoczątkowania tego zjawiska. Gdy jednak blastocel zacznie już powstawać, to zarówno dla jego ekspansji, jak i dla opuszczenia osłonki przejrzystej przez blastocystę transkrypcja wydaje się zbędna, gdyż procesy te zachodzić mogą w obecności inhibitora transkrypcji. Dla powstania blastocelu w zarodku prawdopodobnie konieczna jest transkrypcja genu(ów), które aktywowane są nieco później niż większość genów czynnych w czasie rozwoju przedimplantacyjnego. Jak było już wspomniane wyżej, takim genem może być gen kodujący podjednostkę β pompy sodowo-potasowej [36].

Bardzo interesujące pozostaje pytanie, które geny są odpowiedzialne za określenie różnych losów rozwojowych komórek węzła zarodkowego i trofektodermy w blastocystyście. Doświadczenia ostatnich lat pokazują, że jednym z takich genów może być gen Oct-4, kodujący czynnik transkrypcyjny należący do rodziny białek POU [29]. Gen Oct-4 ulega ekspresji w zarodku myszy przez cały okres rozwoju przedimplantacyjnego, a w organizmie dorosłym jego ekspresja ograniczona jest tylko do komórek linii płciowej [23, 26]. Sugeruje się, że aktywność tego genu związana jest z zachowaniem przez komórki totipotencji. Zróżnicowana tkankowo ekspresja genu Oct-4 obserwowana jest po raz pierwszy w rozwoju wtedy, gdy tworzy się blastocysta. Stwierdzono brak białka Oct-4 w komórkach trofektodermy, wykrywa

się je tylko w węźle zarodkowym [23]. Znaczenie genu Oct-4 przy powstawaniu tych dwóch linii komórkowych potwierdziły doświadczenia, w których wykorzystano technikę rekombinacji homologicznej dla uzyskania zarodków myszy ze znokautowanym genem Oct-4 [21]. Stwierdzono, że zarodki homozygotyczne pod względem mutacji w genie Oct-4 rozwijają się prawidłowo aż do momentu kawitacji. Jednakże tworzące się blastocysty pozbawione były węzła zarodkowego, a komórki normalnie wchodzące w skład węzła w zarodkach Oct-4⁻/Oct-4⁻ różnicowały się w komórki trofektodermy. Wyniki te sugerują, że produkt genu Oct-4 jest konieczny, aby zapobiec różnicowaniu się komórek prekursorowych węzła w kierunku trofektodermy

PODSUMOWANIE

W czasie rozwoju przedimplantacyjnego u ssaków dochodzi po raz pierwszy do różnicowania się komórek w zarodku. Różnicowanie to polega przede wszystkim na wytworzeniu trofektodermy. Jej powstanie poprzedzone jest aktywacją genów, które sprawiają, że zewnętrzne komórki kompaktnego zarodka 16-komórkowego tworzą tkankę o charakterze nabłonkowym: ścianę pęcherzykowej blastocysty. Jednocześnie komórki wewnętrzne tworzą węzeł zarodkowy, czyli skupienie komórek, które dzięki aktywności genu(ów) związanych z utrzymaniem totipotencji, pozostają niezróżnicowane.

Podziękowanie

Za krytyczną lekturę manuskryptu tej pracy pragnę złożyć serdeczne podziękowania Panu Profesorowi Andrzejowi K. Tarkowskiemu, Pani doktor Marii A. Ciemerych i Panu magistrowi Dariuszowi Maluchnikowi.

LITERATURA

- [1] BALTZ JM, SMITH SS, BIGGERS JD, LECHENE C. Intracellular ion concentrations and their maintenance by Na⁺/K⁺-ATPase in preimplantation mouse embryo. *Zygote* 1997; **5**: 1–9.
- [2] BERRYMAN M, FRANCK Z, BRETSCHER A. Ezrin is concentrated in the apical microvilli of a wide variety of epithelial cells whereas moesin is found primarily in endothelial cells. *J Cell Sci* 1993; **105**: 1025–1043.
- [3] BOLTON VN, OADES PJ, JOHNSON MH. The relationship between cleavage, DNA replication, and gene expression in the mouse 2-cell embryo. *J Embryol Exp Morph* 1984; **79**: 139–163.
- [4] BORLAND RM, BIGGERS JD, LECHENE CP. Studies on the composition and formation of the mouse blastocoele fluid using electron probe microanalysis. *Dev Biol* 1977; **68**: 440–452.
- [5] BOUNIOL C, NGUYEN E, DEBEY P. Endogenous transcription occurs at the 1-cell stage in the mouse embryo. *Exp Cell Res* 1995; **218**: 57–62.

- [6] CANTLEY LC. Structure and mechanism of the Na/K-ATPase. *Curr Top Bioenerg* 1981; **11**: 201–237.
- [7] FLACH G, JOHNSON MH, BRAUDE PR, TAYLOR RAS, BOLTON VN. The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo. *EMBO J* 1982; **1**: 681–686.
- [8] FLEMING TP, BUTLER L, LEI X, COLLINS J, JAVED Q, SHETH B, STODDART N, WILD A, HAY M. Molecular maturation of cell adhesion systems during mouse early development. *Histochemistry* 1994; **101**: 1–7.
- [9] GUETH-HALLONET C, MARO B. Cell polarity and cell diversification during early mouse embryogenesis. *Trends Genet* 1992; **8**: 274–279.
- [10] HILLMAN N, SHERMAN H, GRAHAM CF. The effects of spatial arrangement of cell determination during mouse development. *J Embryol Exp Morph* 1972; **28**: 263–278.
- [11] HYAFIL F, MORELLO D, BABINET C, JACOB F. A cell surface glycoprotein involved in the compaction of embryonal carcinoma cells and cleavage stage embryos. *Cell* 1980; **21**: 927–934.
- [12] JOHNSON MH, CHISHOLM JC, FLEMING TP, HOULISTON E. A role for cytoplasmic determinants in the development of the mouse early embryo? *J Embryol Exp Morph* 1986; **97 Suppl.**: 97–121.
- [13] JOHNSON MH, MARO B, TAKEICHI M. The role of cell adhesion in the synchronization and orientation of polarization in 8-cell mouse blastomeres. *J Embryol Exp Morph* 1986; **93**: 239–255.
- [14] KIDDER GM. The genetic program for preimplantation development. *Dev Genet* 1992; **13**: 319–325.
- [15] KIDDER GM. Genes involved in cleavage, compaction, and blastocyst formation. [w] Gwatkin RBL [red.] Genes in Mammalian Reproduction (Modern Cell Biology, vol 12). New York: Wiley-Liss Inc. 1993: 45–71.
- [16] LATHAM KE, GARRELS JI, CHANG C, SOLTER D. Quantitative analysis of protein synthesis in mouse embryos. I. Extensive reprogramming at the one- and two-cell stages. *Development* 1991; **112**: 921–932.
- [17] LOUVET S, AGHION J, SANTA-MARIA A, MANGEAT P, MARO B. Ezrin becomes restricted to outer cells following asymmetrical division in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol* 1996; **177**: 568–579.
- [18] MACPHEE DJ, BARR KJ, WATSON AJ, KIDDER GM. Role of the α and β subunits of Na^+ , K^+ -ATPase in trophoblast differentiation and cavitation. *Trophoblast Res* 1998; **11**: 87–99.
- [19] MACPHEE DJ, JONES DH, BARR KJ, BETTS DH, WATSON AJ, KIDDER GM. Differential involvement of Na(+), K(+)-ATPase isozymes in preimplantation development of the mouse. *Dev Biol* 2000; **222**: 486–498.
- [20] MANEJWALA FM, CRAGOE EJ JR, SCHULTZ RM. Blastocoel expansion in the preimplantation mouse embryo: Role of extracellular sodium and chloride and possible apical routes of their entry. *Dev Biol* 1989; **133**: 210–220.
- [21] NICHOLS J, ZEVNIK B, ANASTASSIADIS H, NIWA D, KLEWE-NEBENIUS I, CHAMBERS I, SCHÖLER H, SMITH A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct-4. *Cell* 1998; **95**: 379–391.
- [22] OHSUGI M, HWANG SY, BUTZ S, KNOWLES BB, SOLTER D, KEMLER R. Expression and cell membrane localization of catenins during mouse preimplantation development. *Dev Dyn* 1996; **206**: 391–402.
- [23] OVIT CE, SCHÖLER HR. The molecular biology of Oct-4 in the early mouse embryo. *Mol Hum Rep* 1998; **11**: 1021–1031.
- [24] PAUKEN CM, CAPCO DG. Regulation of cell adhesion during embryonic compaction of mammalian embryos: roles for PKC and β -catenin. *Mol Reprod Dev* 1999; **54**: 135–144.

- [25] PAUKEN CM, CAPCO DG. The expression and stage-specific localization of protein kinase C isotypes during mouse preimplantation development. *Dev Biol* 2000; **223**: 411–421.
- [26] PESCE M, ANASTASSIADIS K, SCHÖLER HR. Oct-4: lessons of totipotency from embryonic stem cells. *Cells Tiss Org* 1999; **165**:144–152.
- [27] PEY R, VIAL C, SCHATTEN G, HAFNER M. Increase of intracellular Ca^{2+} and relocation of E-cadherin during experimental decompaction of mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 12977–12982.
- [28] PEYRIERAS N, HYAFIL F, LOUVARD D, PLOEGH HL, JACOB F. Uvomorulin: a non integral membrane protein of early mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**: 6274–6277.
- [29] RYAN AK, ROSENFELD MG. POU domain family values: flexibility, partnerships, and developmental codes. *Genes Dev* 1997; **11**: 1207–1225.
- [30] SEFTON M, JOHNSON MH, CLAYTON L. Synthesis and phosphorylation of uvomorulin during mouse early development. *Development* 1992; **115**: 313–318.
- [31] SUTHERLAND AE, SPEED TP, CALARCO PG. Inner cell allocation in the mouse morula: the role of oriented division during fourth cleavage. *Dev Biol* 1990; **137**: 13–25.
- [32] TAKEICHI M. Cadherin cell adhesion receptors as morphogenetic regulator. *Science* 1991; **251**: 1451–1455.
- [33] TARKOWSKI AK, WRÓBLEWSKA J. Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *J Embryol Exp Morph* 1967; **18**: 155–180.
- [34] VAN WINKLE LJ, CAMPIONE AL. Ouabain-sensitive Rb^{+} uptake in mouse eggs and preimplantation conceptuses. *Dev Biol* 1991; **146**: 158–166.
- [35] WATSON AJ. The cell biology of blastocyst development. *Mol Reprod Dev* 1992; **33**: 492–504.
- [36] WATSON AJ, PAPE C, RETTIG EMANUEL J, LEVENSON R, KIDDER GM. Expression of Na,K-ATPase α and β subunit genes during preimplantation development of the mouse. *Dev Genet* 1990; **11**: 41–48.
- [37] WINKEL GK, FERGUSON JE, TAKEICHI M, NUCCITELLI R. Activation of protein kinase C triggers premature compaction in the four-cell stage mouse embryos. *Dev Biol* 1990; **138**: 1–15.

*Adres Autora: Zakład Embriologii IZ UW
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa*

METODY TRANSFEKCJI KOMÓREK EUKARIOTYCZNYCH PRZY UŻYCIU ODCZYNNIKÓW GIBCO BRL

GIBCO BRL REAGENTS FOR EUKARYOTIC TRANSFECTIONS

Radosław WÓJTOWICZ

ALAB Sp. z o.o.

Streszczenie: Różnorodne metody są wykorzystywane do wprowadzania dużych cząsteczek (DNA, RNA, białka) do wnętrza komórek eukariotycznych. Proces ten nazywa się transfekcją. Metoda ta umożliwia analizę ekspresji genów i syntezy białek. Pozwala m.in. na badanie indukcji lub hamowania dojrzewania i różnicowania komórek, a także przebiegu transformacji nowotworowej. Nie istnieje jedna, uniwersalna metoda transfekcji, dlatego też firma GIBCO BRL (*Life Technologies*) prezentuje całą rodzinę odczynników do transfekcji komórek eukariotycznych.

(*Postępy Biologii Komórki 2000; Supl. 15: 145–149*)

Słowa kluczowe: transfekcja, LIPOFECTAMINE, Cellfectin, kationowe odczynniki lipidowe, komórka eukariotyczna

Summary: A wide variety of techniques are used to deliver macromolecules (DNA, RNA, proteins) into eukaryotic cells. This process is transfection. This method allows examining gene expression, protein synthesis as well as malignant transformation. No single method works best, that's why GIBCO BRL (*Life Technologies*) presents eukaryotic transfection reagent family.

(*Advances in Cell Biology 2000; Supl. 15: 145–149*)

Key words: transfection, Lipofectamine, Cellfectin, cationic lipid reagents, eukaryotic cell

WSTĘP

Transfekcja to proces, w którym gen jest wprowadzany do komórki eukariotycznej za pośrednictwem metod biochemicznych lub fizycznych. Techniki transfekcji pomagają w badaniu ekspresji i regulacji genów eukariotycznych. Obecnie stosowane

techniki to: transfekcja wapniowo-fosforanowa, elektroporacja, transfekcja przy użyciu DEAE-dextranu oraz kationowych odczynników lipidowych (liposomów).

Metoda wapniowo-fosforanowa polega na dodaniu DNA do mieszaniny chlorku wapnia oraz buforu fosforanowego, co powoduje wytrącenie kompleksów fosforanu wapnia z DNA. Kompleksy dodane do komórek przyczepiają się do ich powierzchni, a następnie są fagocytowane do ich wnętrza. W metodzie tej krytyczne jest właściwe przygotowanie mieszaniny reakcyjnej, gdyż nawet najmniejsze odstępstwa od wskazanego składu odczynników lub pH mieszaniny w istotny sposób obniżają efektywność transfekcji [6].

Elektroporacja to wprowadzenie makrocząsteczki do komórki w wyniku podania komórek pulsowi elektrycznemu o dużej sile. Pole elektryczne powoduje wytworzenie różnicy potencjału na błonie komórkowej, indukując jej chwilową destabilizację. Skuteczność metody zależy przede wszystkim od prawidłowego ustawienia parametrów pulsu elektrycznego. Nieuniknionym efektem ubocznym jest jednak to, że wydajnej elektroporacji towarzyszy duża (50% lub większa) śmiertelność komórek.

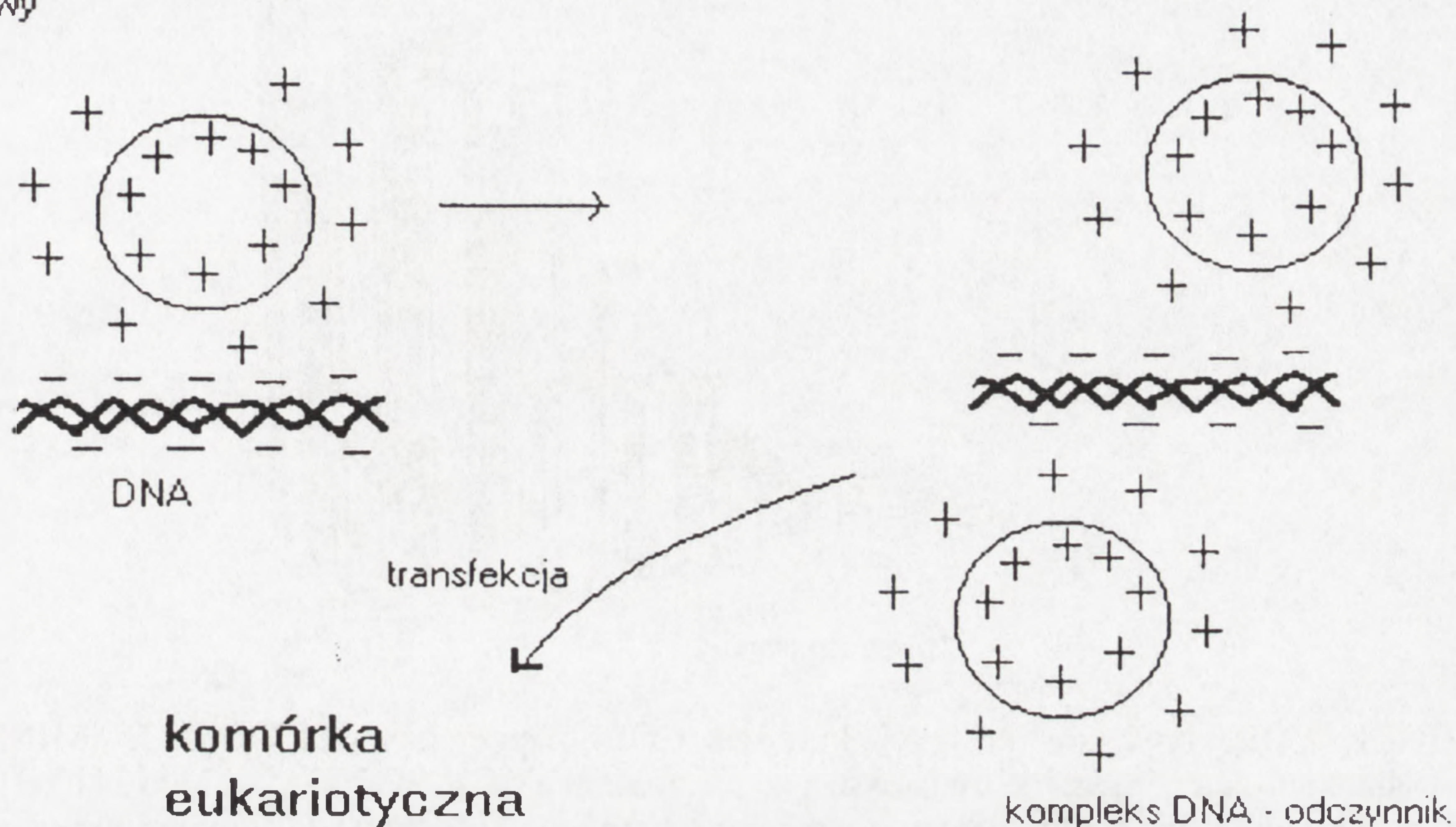
DEAE-dextran ma dodatni ładunek. Polimery dekstranowe lub polibrenowe tworzą kompleksy z DNA, umożliwiając związanie DNA z powierzchnią komórki. Kompleks DEAE-dekstran-DNA jest wprowadzany do komórki poprzez szok osmotyczny wywołany przez DMSO lub glicerol. Metodę tę jednak stosuje się tylko do transfekcji przejściowych [5].

Kationowe odczynniki lipidowe w odpowiednich warunkach tworzą małe (średnia wielkość 100–400 nm) liposomy. Powierzchnia liposomów jest obdarzona ładunkiem dodatnim i elektrostatycznie oddziałuje z resztami fosforanowymi DNA oraz błoną komórkową. DNA nie jest umieszczany wewnątrz liposomu lecz tworzy powierzchniowe kompleksy DNA-liposomy (rys. 1). Uważa się, że 2 do 4 liposomów asocjuje z pojedynczym plazmidem o masie ok. 5 kb. Wprowadzenie DNA do komórki następuje przez endocytozę kompleksów [1].

KATIONOWE ODCZYNNIKI LIPIDOWE GIBCO BRL (*Life Technologies*)

Firma Gibco BRL (*Life Technologies*) jest światowym liderem w tworzeniu innowacyjnych odczynników do transfekcji komórek. Rodzina kationowych odczynników lipidowych jest alternatywą dla pozostałych metod transfekcji. Kationowe odczynniki lipidowe znajdują zastosowanie zarówno w stabilnej, jak i przejściowej transfekcji wielu linii komórkowych, nawet tych, dla których inne metody zawodzą [1,2,3,4]. Dostępne są różne odczynniki liposomowe przeznaczone do transfekcji (tab. 1).

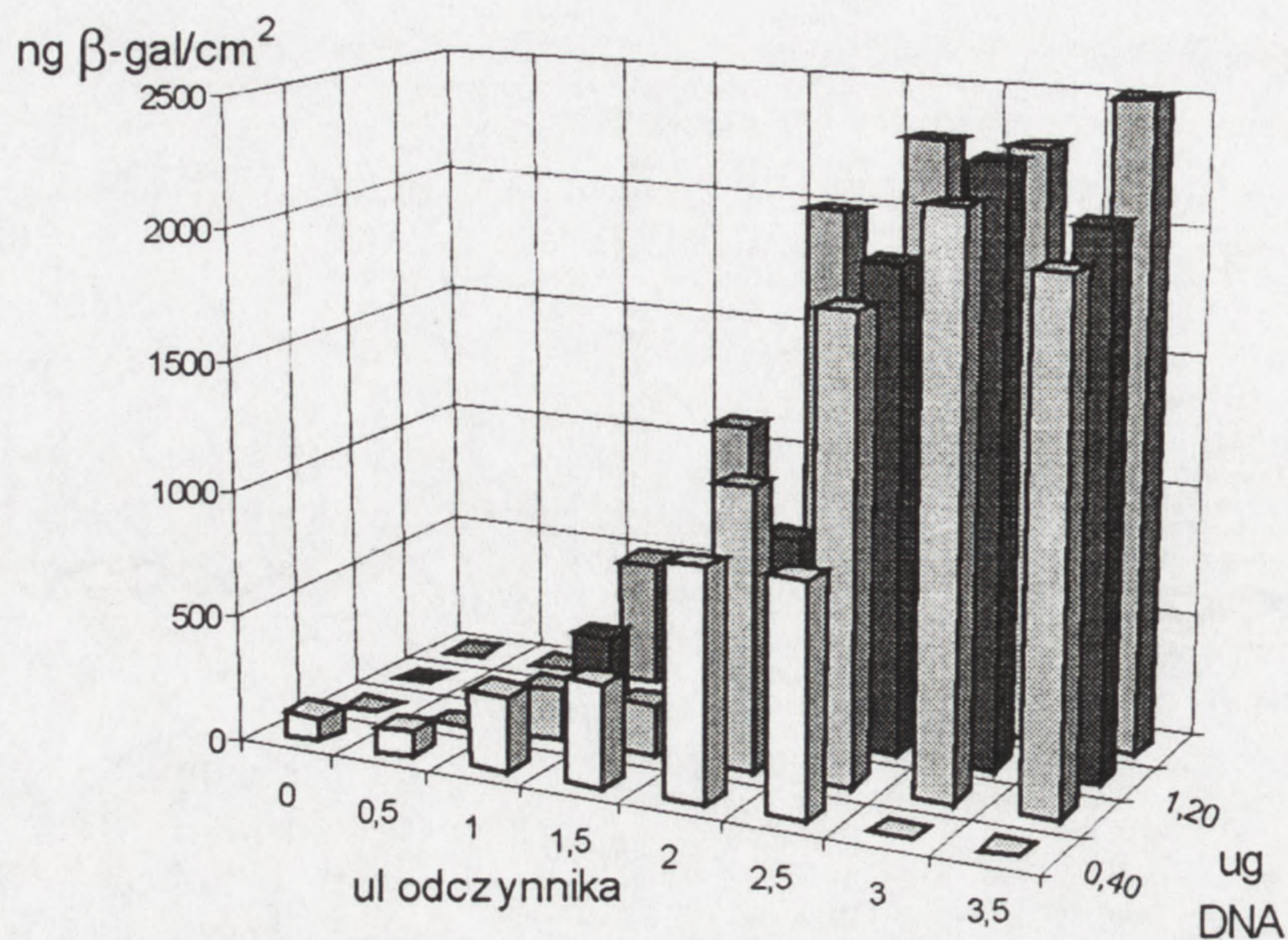
kationowy odczynnik
lipidowy



RYSUNEK 1. Schemat mechanizmu transfekcji z użyciem kationowych odczynników lipidowych (liposomów)

TABELA 1. Rodzina kationowych odczynników lipidowych (liposomowych) firmy GIBCO BRL (*Life Technologies*)

<p>LIPOFECTAMINE 2000™</p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ duża efektywność transfekcji w większości linii komórkowych ❖ pełna efektywność w obecności surowicy ❖ dobra do linii komórkowych używanych w badaniach nad ekspresją białek ❖ rekomendowana do zastosowań na płytkach 96-dołkowych
<p>LIPOFECTAMINE PLUS™</p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ wysoka wydajność w większości linii komórek przyklejających się do podłoża ❖ łatwa w użyciu – nie wymaga optymalizacji ilości DNA w stosunku do odczynnika ❖ wymaga jedynie połowy ilości DNA i odczynnika w porównaniu do LIPOFECTAMINE™
<p>LIPOFECTAMINE™</p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ duża skuteczność w wielu liniach komórek przyklejających się do podłoża
<p>DMRIE-C</p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ wysoka wydajność w liniach komórek rosnących w zawiesinie
<p>CELLFECTIN®</p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ stosowana w liniach komórek owadzych
<p>LIPOFECTIN®</p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ duża skuteczność w liniach komórkach nabłonkowych ❖ dobre wyniki z użyciem oligonukleotydów



RYSUNEK 2. Efektywność transfekcji komórek COS7-L przy użyciu LIPOFECTAMINE 2000 w środowisku z surowicą. Komórki transfekowano plazmidem pMCV-SPORT- β -gal. Po 24 h od transfekcji mierzono aktywność β -galaktozydazy z użyciem odpowiedniego substratu. Poziom aktywności β -gal przedstawiono w ng na cm² (ng β -gal/cm²)

LIPOFECTAMINE 2000™ wykazuje dużą efektywność, tj. procent komórek z ekspresją transfekowanego genu oraz aktywność transfekowanego produktu w większości linii komórkowych. Zachowuje pełną efektywność w obecności surowicy. Jest skuteczna w transfekcjach linii komórkowych COS-7, CHO, 293 wykorzystywanych do badania ekspresji białka; efektywność przekracza 90%. Stosowanie LIPOFECTAMINE 2000 jest bardzo łatwe, ponieważ kompleks DNA-odczynnik może być dodawany bezpośrednio do środowiska hodowlanego, a odczynnik nie musi być usuwany po transfekcji [2].

Odczynnik **LIPOFECTAMINE Plus™** został opracowany by zwiększyć efektywność transfekcji komórek przyklejających się do podłoża. Użycie LIPOFECTAMINE Plus nie wymaga optymalizacji ilości DNA w stosunku do odczynnika, aby uzyskać dużą efektywność. Duża efektywność z użyciem LIPOFECTAMINE Plus jest możliwa bez ścisłego ustawiania warunków transfekcji. Transfekcja z użyciem LIPOFECTAMINE Plus wymaga połowy ilości DNA w porównaniu z LIPOFECTAMINE, a osiąga się ten sam efekt końcowy [5].

DMRIE-C – jest efektywnym odczynnikiem do transfekcji linii komórkowych rosnących w zawiesinie, np. komórek limfoidalnych. Odczynnik ten może być również stosowany do transfekcji RNA do komórek przyczepiających się na podłożu z plastyku.

CELLFECTIN – jest odczynnikiem do transfekcji linii komórek owadzych. Próby z komórkami Sf9 i Sf21 przy użyciu bakulowirusów wykazały bardzo wysoką efektywność transfekcji.

LIPOFECTIN – jest odczynnikiem polecanym do transfekcji komórek nabłonkowych. Odczynnik daje pozytywne wyniki w transfekcjach komórek nabłonkowych ludzkich i innych.

PODSUMOWANIE

Kationowe odczynniki lipidowe (liposomy) wykorzystywane do transfekcji mają wiele zalet:

- wysoka efektywność transfekcji różnych linii komórkowych,
- proste stosowanie,
- niska toksyczność przy dużej aktywności,
- możliwość stosowania w obecności surowicy i w niektórych środowiskach wolnych od surowicy,
- nadają się do transfekcji stabilnej i przejściowej,
- są odpowiednie do komórek rosnących w zawieszynie i komórek przyklejających się do podłoża [1,2,3].

W celu uzyskania dodatkowych informacji na temat kationowych odczynników lipidowych (liposomów) firmy GIBCO BRL (*Life Technologies*) oraz rekomendowanych odczynników do określonej linii komórkowej prosimy o kontakt z firmą Alab lub odwiedzenie strony internetowej firmy GIBCO BRL www.lifetech.com

LITERATURA

- [1] FAWCETT TW, HAWLEY-NELSON P. High-Efficiency Transfection of Human Dermal Keratinocytes. *Focus* 1999; **21**: 56.
- [2] CICCARONE V, CHU Y, SCHIFFERLI K, PICHET JP, EVANS K, ROY L, BENNETT S. Lipofectamine 2000 Reagent for Rapid, Efficient Transfection of Eukaryotic Cells. *Focus* 1999; **21**:54.
- [3] SCHIFFERLI KP, JESSEE J, CICCARONE VC. Transfection of Suspension Cultures of CHO Cells. *Focus* 1999; **21**: 16.
- [4] EVANS K, SCHIFFERLI KP, HAWLEY-NELSON P. High Efficiency Transfection of HeLa cells. *Focus* 1999; **21**: 15.
- [5] COONROD A, LI FQ, HORWITZ M. On the Mechanism of DNA Transfection: Efficient Gene Transfer without Viruses. *Gene Ther* 1997; **4**: 1313–1320.
- [6] SANES JR, RUBENSTEIN JLR, NICHOLAS JF. Use of Rekombinant Retroviruses to Study Post-implantation Cell Lineage. *EMBO J.*1986; **5**: 3133–3142.

Alab Sp. z o.o.
Ul. Żelazna 68, 00-866 Warszawa
www.alab.com.pl
alabalab.com.pl

REGULACJA MIOGENEZY

REGULATION OF MYOGENESIS

Jerzy MORACZEWSKI

Zakład Cytologii Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego

1. Tworzenie się somitów z mezodermy przyosiowej i ich znaczniki molekularne.
2. Różnicowanie się somitów na: sklerotom i dermomiom, ekspresja genów *Pax1* i *Pax3*.
3. Rola czynników epigenetycznych w determinowaniu linii miogennych komórek dermomiomu.
4. Kompleksowe działanie białek regulatorowych z rodziny Wnt produkowanych przez strunę grzbietową, białek BMP4 wydzielanych przez mezoderme boczną oraz białek sonic hedgehog syntetyzowanych przez cewę nerwową i strunę grzbietową.
5. Indukcja miogenezy – wędrówki komórek prekursorowych mięśni.
6. Miogenne czynniki regulatorowe (MRF) genów mięśniowych należące do rodziny MyoD.
7. Działanie czynników MRF, ich aktywacja i inhibicja.
8. Drogi regulacji syntezy mięśniowego czynnika regulatorowego myf 5 *in vitro* i *in vivo*.
9. Regulacja ekspresji genu *MyoD* i *miogeniny*.
10. Rola czynnika transkrypcyjnego MEF-2 w miogenezie
11. Chronologia regulacji aktywności genów białek mięśniowych: aktyny, miozyny i kinazy kreatynowej.
12. Fuzja mioblastów i różnicowanie się miotub, białka fuzji.
13. Aktywacja komórek satelitowych podczas regeneracji mięśni.

Adres autora: ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

RÓŻNICOWANIE KOMÓREK NABŁONKOWYCH GRASICY

DIFFERENTIATION OF THE THYMIC EPITHELIAL CELLS

Renata BRELIŃSKA

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

Streszczenie: Komórki nabłonkowe zrębu grasicy są główną komponentą mikrośrodowiska tego narządu, odpowiedzialną za dojrzewanie immunokompetentnych limfocytów T. Różnicowanie komórek nabłonkowych jest uwarunkowane serią interakcji, które zachodzą w określonym miejscu i stadium rozwoju grasicy. W pierwszych stadiach histogenezy grasicy są to interakcje pomiędzy komórkami endodermy pragardzieli a komórkami mezenchymy grzebieni nerwowych, regulowane aktywnością wielu genów i ich produktów, czynników transkrypcyjnych. Wyłączenie ekspresji tych genów wywołuje zmiany rozwojowe grasicy o różnym zasięgu. Następnym etapem różnicowania komórek nabłonkowych jest inicjowany zasiedlanie nabłonkowego zawiązka grasicy przez komórki limfoidalne. Limfo-nabłonkowe oddziaływania pomiędzy komórkami z udziałem cząsteczek adhezyjnych i czynników wzrostu indukują proces różnicowania i zmiany fenotypowe zarówno w tymocytach, jak i w komórkach nabłonkowych. Warunkują one zróżnicowanie fenotypowe komórek nabłonkowych na subpopulacje i kontrolują mikroarchitekturę grasicy.

(*Postępy Biologii Komórki 2000; Supl. 15: 151–176*)

Słowa kluczowe: komórki nabłonkowe, grasica, rozwój zarodkowy, różnicowanie, interakcje komórkowe

Summary: Thymic epithelial cells constitute the major component of the thymus microenvironment responsible for maturation of immunocompetent T-cells. Differentiation of epithelial cells requires a series of stage- and site-specific cellular interactions. In the early stages of histogenesis of the thymus the interactions between pharyngeal endoderm and mesenchymal cells of neural crest take place. They are controlled by the activity of several genes and its products, transcription factors. Suppression of these genes results in various developmental changes in thymus. Next stage in the differentiation of epithelial cells is initiated by the process of colonisation of epithelial primordium of the thymus by lymphoid cells. The interactions between lymphoid and epithelial cells via several adhesion molecules and growth factors induce the process of differentiation and cause phenotypic changes both in thymocytes and epithelial

*Praca wykonana w ramach grantu KBN nr. 4PO5A 027 16

cells. These interactions lead to the appearance of epithelial cell subpopulations and control microarchitecture of the *thymus*.

(*Advances in Cell Biology 2000; Supl. 15: 151–176*)

Key words: epithelial cells, thymus, embryonic development, differentiation, cellular interactions

Wykaz skrótów: **A2B5** – antygen lokalizowany na komórkach glejowych; **B7** – antygen powierzchniowy, cząsteczka kostymulująca oddziałująca z CD28 na limfocytach; **CD** (*cluster of differentiation*) – gronko różnicowania; **ChA** - chromogranina A; **ck** – cytokeratyna; **DN** (*double negative*) - tymocyty podwójnie negatywne, CD4⁻CD8⁻; **DP** (*double positive*) – tymocyty podwójnie pozytywne, CD4⁺CD8⁺; **dpc** (*day post coitum*) – dzień po zaplemnieniu; **EGF** (epithelial growth factor) – naskórkowy czynnik wzrostu; **Ep-CAM** (*epithelial cell adhesion molecule*) – cząsteczka adhezji komórek nabłonkowych; **IFN** – interferon; **IGF** (*insulin-like growth factor*) – insulino-podobny czynnik wzrostu; **IL** – interleukina; **NSE** (*neuron specific enolase*) – enolaza specyficzna dla neuronów; **PGP 9.5** (*protein gene product 9.5*) – białko specyficzne dla neuronów; **RA** (*retinoic acid*) – kwas retinowy; **TcR** – receptor dla antygeny na limfocytach T; **TGF** (*transforming growth factor*) – transformujący czynnik wzrostowy; **UEA** (*Ulex europaeus*) – lektyna z kolcolistu;

WSTĘP

Grasica jest centralnym narządem limfoidalnym, którego mikroarchitektura i unikalne własności mikrośrodowiska wynikają z roli, jaką pełnią komórki nabłonkowe zrębu w indukcji programu dojrzewania tymocytów w kierunku immunokompetentnych limfocytów T. W świetle badań ostatnich lat, aktywność fizjologiczna komórek nabłonkowych, ich cechy fenotypowe, a zarazem organizacja mikrośrodowiska tego narządu są uwarunkowane ich interakcją z tymocytami w poszczególnych stadiach zróżnicowania. Tak więc wzajemne oddziaływanie pomiędzy komórkami typu „komórka-komórka” wraz z udziałem czynników wzrostu są induktorem procesu różnicowania i zmian fenotypowych zarówno w tymocytach, jak i w komórkach nabłonkowych. Opisane zależności pomiędzy komórkami wyraża termin wprowadzony przez Van Ewijk – *crosstalk* [97].

Złożony układ informacji międzykomórkowej w obrębie grasicy ma decydujące znaczenie na wszystkich etapach organogenezy. Prawidłowy rozwój grasicy jest bowiem uwarunkowany serią oddziaływań, jakie zachodzą w określonym miejscu i stadium jej zróżnicowania wyznaczając w morfogenezie tego narządu dwa etapy. W pierwszym etapie są to oddziaływanie pomiędzy komórkami nabłonkowymi endodermy i ektodermy oraz mezenchymy, a w następnym, oddziaływanie pomiędzy komórkami nabłonkowymi i tymocytami. Sugeruje się, że w różnicowaniu komórek nabłonkowych istnieją rozwojowo uwarunkowane punkty restrykcyjne, jednak mechanizmy leżące u podstawy tych zjawisk nie są w pełni poznane.

Opisy histogenezy grasicy pochodzące z ubiegłego stulecia, uzupełnione o obserwacje z pierwszej połowy XX wieku, kiedy funkcja grasicy nie była poznana, są nadal aktualne. Pozostały jednak nierozwiązane wątpliwości, które dotyczą udziału poszczególnych listków zarodkowych w tworzeniu zawiązka grasicy, mechanizmy ich różnicowania oraz identyfikacja.

HISTOGENEZA GRASICY

1.1. Pochodzenie nabłonkowego zawiązka grasicy

W okresie zarodkowym pierwsze stadia histogenezy grasicy są związane z formowaniem się jelita pierwotnego, kiedy wzdłuż jego górnego odcinka tworzącego pragardziel powstają wyniosłości, tzw. łuki gardłowe (inna nazwa: łuki skrzelowe) pooddzielane szczelinami. Jednocześnie wzdłuż bocznych ścian pragardzieli powstają obustronnie wpuklenia nazwane kieszonkami gardłowymi (inna nazwa: kieszonki skrzelowe; 4–5 tydzień u człowieka, około 8–9 dpc u gryzoni). Każdy z łuków jest od strony zewnętrznej pokryty ektoderma, od strony kieszzonek endoderma, natomiast jego rdzeń stanowią komórki mezenchymatyczne z których większość pochodzi z grzebienia nerwowego. Prekursorowe komórki zawiązka grasicy lokalizuje się w nabłonku endodermalnym III kieszonki gardłowej w skrzydełku brzuszonym, podczas gdy nabłonek grzbietowego skrzydełka tej kieszonki różnicuje się w przytarczycę (dolną). Komórki endodermalne kieszonki gardłowej zagłębiając się do mezenchymy kontaktują się z ektoderma, która w postaci cienkiej błony gardłowej wypełnia niewielkie szczeliny pomiędzy łukami. Wykazano, że kontakt pomiędzy komórkami w obszarze błony gardłowej włącza komórki ektodermalne do endodermalnego zawiązka grasicy [20]. Komórki te identyfikowano w grasicach tylko u niektórych gatunków, stąd też udział ektodermy z opisanego źródła, zdaniem szeregu autorów nie jest w pełni udokumentowany. U myszy, około 10 dpc proliferacja komórek i ich zwiększona liczba w obszarze III kieszonki gardłowej, pozwalają na pierwszą morfologiczną identyfikację zawiązka grasicy. Skupiska komórek nabłonkowych, początkowo związane ze ścianą pragardzieli uwalniają się i w postaci bilateralnych zawiązków rozpoczynają migrację w kierunku brzuszonym, dośrodkowo (u gryzoni od 12 do 16 dpc), tworząc w obrębie śródpiersia narząd nieparzysty, składający się z dwóch płatów (około 17 dpc).

W okresie migracji zawiązka kończy się pierwszy etap różnicowania komórek nabłonkowych, które osiągają stadium kompetencji wyrażającej się ich gotowością oddziaływania na protymocyty. Równocześnie, w różnicowaniu tych komórek rozpoczyna się drugi etap, związany z zasiedlaniem zawiązka przez protymocyty. Etap ten poprzedza kolejno: powstanie błony podstawnej pomiędzy komórkami zewnętrznej warstwy zawiązka a otaczającymi je komórkami mezenchymy, powstanie sieci naczyń, które w pierwszej fazie oplatają powierzchnię zawiązka, oraz formowanie się pierwszych przegród łącznotkankowych.

1.2. Rola komórek mezenchymy

Koncepcję, że w prawidłowym rozwoju grasicy odgrywa rolę mezenchyma podjęto w latach sześćdziesiątych, badając jej wpływ na grasicę mysia. Badania

te pozwoliły ustalić, że wpływ mezenchymy jest skoordynowany z odpowiednim stadium rozwoju zawiązka, a jej oddziaływanie ma charakter „przyzwolenia” na proliferację komórek zdeterminowanych. Nowe spojrzenie na rolę mezenchymy wniosły badania nad komórkami grzebieni nerwowych, ich migracji i zasiedlania łuków gardłowych, gdzie przekształcając się w komórki mezoektodermalne tworzą specyficzną tkankę mezenchymatyczną. Na podstawie klasycznych już doświadczeń przeszczepu fragmentów cewy nerwowej pomiędzy kurczakiem i przepiórką prześledzono, że zdolność różnicowania się do mezenchymy w obrębie III łuków gardłowych mają komórki grzebieni migrujące z odcinka czaszkowego. Z komórek tych dalej powstaje tkanka łączna tworząca torebkę grasicy, przegrody, ścianę naczyń krwionośnych z wyjątkiem śródbłonna. Szczegółowe analizy ostatecznej lokalizacji i zróżnicowania komórek grzebieni nerwowych wykazały, że III łuki gardłowe są zasiedlane przez populacje migrujące z grzebieni czaszkowych z okolic tyłomózgowia, wywodzące się z tylnej części rombomeru 5. i prawdopodobnie 6. [27, 49, 87]. U zarodków ssaków łuki gardłowe są zasiedlane również przez wagalne komórki grzebieni nerwowych migrujące z poziomu dolnych somitów, a także z odcinków pomiędzy rombomerem 6 a 3 somitem, które tworzą ektomezenchymę i prawdopodobnie dają początek niektórym komórkom zrębu grasicy [44, 85]. Nie przedstawiono dotychczas dowodów transdyferencji tych komórek w komórki nabłonkowe zrębu, choć zdaniem niektórych autorów reprezentują one subpopulację o własnościach wydzielniczych i można je zidentyfikować w grasicy na podstawie ekspresji markerów neuroendokrynowych [36, 54].

W wyniku uszkodzenia różnych odcinków grzebieni nerwowych u zarodków kury Bockman obserwował zahamowanie rozwoju zawiązka grasicy wyrażone w różnym stopniu w zależności od okolicy uszkodzenia oraz okresu rozwoju zawiązka [7]. Omawiając wyniki swoich prac doświadczalnych w tym zakresie autor ten zauważył, że oddziaływania pomiędzy komórkami mają charakter bezpośrednich kontaktów, lub/oraz za pośrednictwem cząsteczek sygnałowych produkowanych lokalnie przez komórki mezoektodermy, które indukują proliferację, migrację i różnicowanie endodermalnych komórek nabłonkowych do stanu kompetencji [7]. Potwierdzeniem tego mogą być zmiany fenotypowe w tych komórkach, jakie prześledził Shinohara i wsp. w rozwoju grasic u myszy [89]. Zgodnie z tymi obserwacjami mezenchyma jest nie tylko źródłem tkanki łącznej, lecz także stymuluje pojawienie się antygenów MHC klasy I i II na komórkach nabłonkowych wpływając tym samym na wytworzenie odpowiednich warunków do kolonizacji pierwotnego zawiązka grasicy przez komórki limfoidalne.

Dalszych dowodów decydującego wpływu komórek grzebieni na rozwój grasicy dostarczyły obserwacje defektów różnicowania komórek grzebieni, których przykładem jest zespół DiGeorge’a. Zespół ten wiąże się z anomalią chromosomu 22 w regionie q11.2, której następstwem jest niedorozwój grasicy, pierwotny niedobór immunologiczny, a także niedorozwój przytarczyc, dysmorfia twarzy, wada serca

i dużych naczyń [82]. Obserwowane w zespole DiGeorge'a zaburzenia opisano również w płodowym zespole alkoholowym, a także w następstwie działania 13-cis RA na zarodki we wczesnym okresie rozwoju embrionalnego [50]. U zarodków myszy poddanych działaniu RA w 9 dpc obserwuje się zaburzenia rozwoju III kieszonki gardłowej i łuków, ich redukcję i/lub fuzję z sąsiednim, IV łukiem, a w następstwie tego ektopię grasicy, hypoplazję i poważne zaburzenia w rozwoju tymocytów [56]. Podobny fenotypowo zespół wad można prześledzić u zwierząt doświadczalnych przez wykluczenie migracji czaszkowego odcinka grzebieni nerwowych, a także przez wykluczenie szeregu genów różnicowania, między innymi genu *pax3* u myszy *splotch*, lub genu *hoxA-3* u mutantów mysich *HoxA-3^{-/-}* [16, 19].

1.3. Geny morfogenezy grasicy

W pierwszym etapie morfogenezy grasicy najważniejszymi wydarzeniami są kolejno: predeterminacja i determinacja komórek endodermalnych pragardzieli w rejonie kieszonki gardłowej, zasiedlenie łuków gardłowych przez komórki grzebieni nerwowych i ich różnicowanie oraz powstanie nabłonkowego zawiązka i różnicowanie komórek do stadium kompetencji. Najmniej poznane są sygnały determinujące komórki endodermalne pragardzieli. Z badań zarodków kury wynika, że determinacja nabłonkowych komórek prekursorowych zachodzi przed utworzeniem kieszzonek gardłowych. W świetle doniesień z ostatnich lat, procesy te są indukowane pod wpływem sygnałów ze strony komórek grzebieni nerwowych, a nadrzędną rolę w tych interakcjach odgrywa RA [27, 50, 56]. Aby określić rolę RA w predeterminacji komórek endodermy i ich wpływ na inicjalną fazę formowania się łuków gardłowych, badano zarodki mysie po podaniu antagonisty RA [104]. W odpowiedzi na zablokowanie sygnałów, wykazano całkowitą agenezę III i IV kieszonki gardłowej oraz zmiany w ekspresji *Hoxa1*, *Hoxb1*, *Pax1*, *Pax9* w komórkach endodermalnych. Badania te pozwoliły bliżej określić rolę RA w predeterminacji endodermy gardłowej sugerując, że jego oddziaływanie ma znaczenie w lokalnym „przyzwoleniu” do migracji komórek grzebieni [104].

Analizując oddziaływania indukcyjne pomiędzy komórkami w obrębie łuków i kieszonki gardłowej, wykazano ekspresję szeregu genów różnicowania, aktywnych w okresie poprzedzającym oraz w czasie formowania się zawiązka grasicy myszy, których aktywność jest modulowana sygnałami RA [27, 50, 104].

Kluczowym regulatorem rozwoju narządów powstających z III i IV kieszonki gardłowej są geny *pax* i ich produkty, czynniki transkrypcyjne. Gen *pax-9* oraz wykazujący z nim dużą homologię *pax-1* są aktywne w nabłonkach endodermalnych w inicjalnej fazie formowania się kieszzonek gardłowych i dalej w okresie powstawania zawiązków grasicy, przytarczyc i ciałek pozaskrzelowych oraz ich rozwoju [65, 74]. Począwszy od okresu formowania się kieszonki gardłowej, w komórkach en-

dodermalnych wykrywa się mRNA Pax 1. Ekspresję Pax-1 wykazano również w większości komórek nabłonkowych grasic pourodzeniowych, a z wiekiem aktywność genu *pax 1* jest ograniczona do niektórych komórek korowych [103]. Spontaniczne mutacje i monoalleliczna ekspresja genów *pax* lub ich niedobór są przyczyną szeregu wad w rozwoju, zmniejszenia masy, a nawet braku narządów [21]. Homozygotyczne mutanty mysie *Pax-9* umierają wkrótce po urodzeniu bez grasicy, przytarczyc i ciałek pozaskrzelowych [66]. Wykluczenie tego genu nie wpływa jednak na inicjalną fazę formowania się kieszonek, ponieważ brak genu hamuje rozwój tych narządów w okresie, kiedy ich zawiązki wchodzą w stadium oddzielania się od ściany pra-gardzieli (w 11.5 dpc), [74]. Myszy z delecją w locus *pax 1* (*undulated^{extensive}* i *Undulated^{shorttail}*) w przeciwieństwie do homozygotycznych mutantów mysich *Pax-9* mają grasicę, choć są one o około połowę mniejsze od grasic myszy kontrolnych i wykazują szereg istotnych zmian w mikrośrodowisku, prawdopodobnie związanych z terminalnym różnicowaniem komórek nabłonkowych [26, 103]. Można więc przypuszczać, że oba geny *pax* biorą udział w regulacji różnych procesów w rozwoju grasicy.

Ekspresja genu *pax-1* w nabłonku endodermalnym kieszonek gardłowych poprzedza ekspresję genu *hoxA-3* w tych komórkach (od 10,5 dpc myszy), [52]. Nie wyjaśniono wprawdzie, czy ekspresja genów *hox* jest konsekwencją ich interakcji z komórkami grzebieni nerwowych z aktywnym genem *hoxA-3*. Wykazano natomiast, że wykluczenie *hoxA-3* nie ma wpływu na liczbę komórek grzebieni nerwowych migrującą do łuków i ich koncentrację w sąsiedztwie nabłonków sugerując tym samym, że brak tego genu wiąże się prawdopodobnie z utratą przez komórki grzebieni zdolności do różnicowania w obrębie łuków i/lub zdolności do indukcji różnicowania komórek w tych obszarach. Defekt rozwoju grasicy u mutantów mysich *HoxA-3*^{-/-} zachodzi we wczesnym okresie histogenezy i towarzyszy mu wyłączenie genu *pax-1* od 11,5 dpc [52]. Dyskutuje się więc rolę produktów genu *hoxA-3* jako czynników podtrzymujących ekspresję genu *pax-1* jak również *pax-9* [52, 74]. Efekty mutacji obu czynników transkrypcyjnych, *Hoxa-3* i *Pax-1* wskazują jednak, że białka te działają synergistycznie, a ich brak wywołuje hypoplazję i ektopię grasicy [92]. Czynniki transkrypcyjne *Hoxa*, jak i *Pax* wpływają na funkcję komórek nabłonkowych prawdopodobnie we wszystkich okresach ontogenezy i pośrednio regulują procesy związane z różnicowaniem tymocytów [35, 92].

Od dawna znane są zaburzenia rozwoju grasicy u gryzoni z mutacją *nude* (*nu*) prowadzące do agenezy grasicy i braku owłosienia, które wiąże się z defektem rozwoju komórek pochodzących z ektodermy [20]. Alternatywnym wytłumaczeniem zakłóceń rozwoju grasicy jest niezdolność komórek nabłonkowych zawiązka do oddziaływania na komórki prekursorowe tymocytów [6, 8, 77]. W tym przypadku zahamowanie różnicowania nabłonkowego zawiązka u zwierząt z mutacją alleli *nude* w 11,5 dpc, miałoby charakter wtórny. Badania nad molekularnym mechanizmem uszkodzeń w mutacji *nude* wykazały, że locus *nude* koduje czynniki

transkrypcyjne Whn, które w komórkach nabłonkowych grasicy regulują procesy różnicowania natomiast nie wpływają na ich determinację i inicjalne etapy formowania zawiązka [6, 61]. Aktywność Whn w nabłonkowym zawiązku przed zasiedleniem go przez komórki limfoidalne jest prawdopodobnie odpowiedzialna za „efektywność” procesu kolonizacji kontrolując tym samym przejście ze stadium zawiązka o charakterze nabłonkowym do stadium narządu limfoidalnego. Ekspresję Whn wykazano również w grasicach w okresie pourodzeniowym i u zwierząt dojrziałych sugerując, że są one odpowiedzialne za różnicowanie fenotypowe komórek nabłonkowych w kierunku powierzchniowych, korowych i rdzennych [62]. Funkcję czynników transkrypcyjnych Whn w tkankach nabłonkowych innych typów określono bardziej precyzyjnie wiążąc je z regulacją przejścia komórek ze stadium aktywności proliferacyjnej w stadium postmitotyczne i z inicjacją różnicowania terminalnego [47].

W okresie zarodkowym w nabłonkowym zawiązku grasicy wykryto również czynniki transkrypcyjne, białka Smad (1 i 2), co świadczy, że wczesne stadia rozwoju są również kontrolowane przez rodzinę cząsteczek sygnałowych TGF β [25].

2. DRUGI ETAP ROZWOJU NABŁONKOWEGO ZAWIĄZKA GRASICY

2.1. Kolonizacja nabłonkowego zawiązka grasicy

Drugi etap w rozwoju grasicy i różnicowania komórek nabłonkowych rozpoczyna się w momencie jej zasiedlenia przez komórki limfoidalne i przypada w okresie migracji parzystych zawiązków z okolicy pragardzieli w kierunku brzuszny do śródpiersia.

Kolonizacja grasicy jest procesem regulowanym przebiegającym falowo w odpowiedzi na gradient czynników chemotaktycznych, wydzielanych przez komórki nabłonkowe. Kluczowym regulatorem procesu zasiedlenia grasicy są chemokiny, które odgrywają rolę również w wewnątrz-narządowej migracji tymocytów. Chemokiny są w grasicy produkowane głównie przez komórki nabłonkowe, a ich wybiórcze oddziaływanie na określone subpopulacje tymocytów wydaje się być regulowane poziomem ekspresji receptorów błonowych na tymocytach [108]. W płodowych grasicach myszy, w okresie pierwszej fali kolonizacji, za produkcję chemokin są odpowiedzialne komórki nabłonkowe z ekspresją MHC klasy II a ich działanie chemotaktyczne na izolowane protymocyty zachodzi w drodze interakcji ze swoistym receptorem, współpracującym z białkiem G [107]. Proces zasiedlenia grasicy jest również regulowany przez białka substancji międzykomórkowej. W grasicach wykazano aktywność genu *lamC2* kodującego łańcuch $\gamma 2$ lamininy 5 [43]. Ekspresja lamininy 5, głównie w komórkach podtorebkowych odgrywa rolę

w interakcjach z tymocytami DN. W narządowych hodowlach grasic płodowych obecność lamininy 5 warunkuje przeżycie obu populacji komórek i ich różnicowanie [43].

Pierwsza fala komórek limfoidalnych pochodzi z wątroby płodowej i zasiedla grasicę poprzedzając rozwój naczyń krwionośnych w obrębie mięszu (u myszy około 12 dpc, u szczura około 14,5 dpc [37, 70, 101]. Z pierwszej fali powstaje pierwsza generacja tymocytów, którą identyfikuje się do końca pierwszego tygodnia po urodzeniu. Druga fala prekursorów zasiedla grasicę w okresie okołoporodowym dając drugą generację komórek identyfikowaną od drugiego tygodnia po urodzeniu [37].

Liczebność komórek limfoidalnych, niezróżnicowanych jest regulowana aktywnością białek HES, których ekspresja jest kontrolowana przez transbłonowe białka Pref-1 (inna nazwa to: SCP-1, *stromal-cell-derived protein*) wykryte na komórkach nabłonkowych [39]. Ekspresja Hes 1 jest również kontrolowana przez transbłonowe białko Notch, które jest aktywowane przez ligandy obecne na powierzchni komórek sąsiednich [22]. Wykluczenie Notch lub Hes-1 w hematopoetycznych komórkach prekursorowych blokuje rozwój tymocytów na etapie komórek DN, hamując równocześnie rozwój grasicy [22, 76, 95]. Należy podkreślić, że decyzje rozwojowe tymocytów są regulowane ich interakcją z komórkami nabłonkowymi. W każdym kluczowym punkcie rozwojowym przeżycie tymocytów jest uwarunkowane przez sygnalizację od receptorów cytokinowych, receptora TcR, cząsteczek adhezyjnych, regulowane ekspresją genów w obu populacjach, tj. w tymocytach i w komórkach nabłonkowych [42, 95].

W okresie pojawienia się komórek limfoidalnych, w zawiązku grasicy tworzą się pierwsze przegrody łącznotkankowe, a komórki nabłonkowe, początkowo jednorodnie pod względem kryteriów morfologicznych, przechodzą wieloetapowy proces zmian. Proces ten obejmuje w pierwszym etapie wzrost liczebności komórek, a następnie ich aktywację. Jest to etap zmian fenotypowych wyrażonych ekspresją szeregu receptorów, charakterystycznych białek cytoszkieletu, aktywnością wydzielniczą i reorganizacją przestrzenną. Wymienione etapy, choć poznane fragmentarycznie są procesami regulowanymi, skoordynowanymi z kinetyką wewnątrz-narządowej migracji tymocytów, wyznaczone przez kolejne stadia ich dojrzewania [8].

W ciągu pierwszych dwóch dni kolonizacji grasicy, zdecydowana większość komórek nabłonkowych ma fenotyp korowo-swoisty, wyrażający się ekspresją antygenów MHC klasy II [101]. Równocześnie w różnych obszarach mięszu identyfikuje się pojedyncze komórki o odrębnych cechach antygenowych, które u szczurów scharakteryzowano na podstawie ekspresji γ NSE [14]. U myszy z kolei wykryto w nich bliżej nieokreślony antygen wewnątrzkomórkowy reagujący z surowicą anti-95 [60]. Surowica anti-95, wg klasyfikacji przyjętej w Rolduc (1989) należy do grupy II przeciwciał (*clusters of thymic epithelium staining II*, CTES

II) wykrywających antygeny w komórkach nabłonkowych podtorebkowych oraz w rdzeniu grasicy [38]. Prawdopodobnie niewielka liczba komórek NSE- jak i 95-pozytywnych występuje w nabłonkowym zawiązku przed jego kolonizacją i jak wykazano, są one „prekursorami” subpopulacji komórek rdzenia grasicy. Należy podkreślić, że w kryteriach cytologicznych uwzględniających cechy ultrastrukturalne i antygenowe, proces różnicowania komórek w rdzeniu przebiega z charakterystyczną kinetyką i w innym okresie rozwoju grasicy płodowej jak różnicowanie komórek na terenie kory.

2.2. Różnicowanie komórek na terenie rdzenia grasicy

Wstępnym etapem w organizacji rdzenia grasicy u gryzoni jest migracja, a następnie koncentracja komórek „prekursorowych” rdzenia w części wewnętrznej grasicy w postaci niewielkich rozproszonych ognisk i ich rozrost. U gryzoni proces ten zapoczątkowany w 14 dniu, wyraźniej zaznacza się pomiędzy 15 a 16 dpc. W grasicach myszy wyróżniono w tym okresie dwie subpopulacje komórek rdzennych [60]. Pierwsza obejmuje komórki rozgałęzione, reagujące z surowicą anti-95 z których wywodzą się komórki o fenotypie ER-TR5⁺, 95⁺ z ekspresją MHC I-O [8, 93]. Subpopulację drugą zidentyfikowano od 15 dpc na podstawie ekspresji błonowego epitopu reagującego z surowicą anti-29 oraz zdolności wiązania lektyny UEA [60]. Komórki 29⁺ wykazują silną ekspresją MHC klasy II lub MHC klasy I, a w grasicach po urodzeniu, antygen B7 [63, 93]. Są one większe od komórek 95-pozytywnych, występują pojedynczo lub w postaci agregatów. W badaniach mutantu myszy *RelB*^{-/-} dezorganizację rdzenia grasicy u tych zwierząt powiązano z brakiem subpopulacji 29⁺UEA⁺ sugerując, że komórki te w drodze bezpośredniej lub pośrednio wywierają wpływ na organizację pozostałych komórek zrębu grasicy. Należy zauważyć, że subpopulacja komórek 29⁺, UEA⁺ odpowiada prawdopodobnie subpopulacji komórek o fenotypie NSE⁺, ck8⁺, ck10⁺ u szczurów, które odznaczają się obfitą cytoplazmą i grupując się w większe skupiska wyznaczają w kolejnych dniach centralną część rdzenia grasicy [14, 70].

Ponieważ rozwój rdzenia jest najczęściej rozpatrywany w kontekście interakcji tymocyt-komórka nabłonkowa, należy zwrócić uwagę, że na rozrost tego obszaru mają wpływ zarówno wzrost liczebności komórek nabłonkowych i ich wzajemne oddziaływania (16 dpc – najwyższa aktywność mitotyczna u szczura), jak również powstanie sieci naczyniowej w tym obszarze, z czym wiąże się jego reorganizacja przestrzenna [3, 71]. Ważnym elementem w rozwoju mikrośrodowiska tego obszaru są również zmiany w składzie komórkowym, a przede wszystkim pojawienie się komórek dendrytycznych, które przechodzą pewne etapy różnicowania migrując przez korę [5, 15, 79, 100]. Tak więc, przynajmniej w stadium rozrostu rdzenia należy uwzględnić indukcyjny wpływ mezenchymy, a także wzajemne oddziaływania pomiędzy komórkami nabłonkowymi oraz ze strony komórek dendrytycznych. W

tym okresie w grasicach szczurów można prześledzić pierwsze etapy formowania się ciałek Hassala z bezpośrednim udziałem komórek dendrytycznych, S-100-pozytywnych [15].

Szereg dalszych dowodów wskazuje, że około 16 dpc u gryzoni zainicjowany jest pierwszy etap aktywacji komórek rdzennych. Wydaje się, że etap ten wyznacza stan kompetencji komórek nabłonkowych do interakcji z określoną subpopulacją tymocytów. W grasicach myszy w komórkach tych wykazano produkt protoonkogenu *c-ret*, który jest receptorową kinazą tyrozynową i w części zewnątrzkomórkowej zawiera sekwencje podobną do domeny kadheryn [96]. Jej aktywność obserwowana od 16,5 dpc wzrasta w grasicach po urodzeniu. W tym samym okresie odnotowano na terenie rdzenia najwyższy w życiu płodowym poziom ekspresji genu *rel/NF-κB*, jednak ta droga sygnałów wydaje się odgrywać rolę w aktywacji komórek nabłonkowych w interakcjach z udziałem tymocytów [23, 60].

Od 17 dpc gryzoni, równoległe z pierwszą generacją tymocytów DP i SP, w kolejnych pseudopłacikach stopniowo wyodrębnia się obszar rdzenny o charakterystycznej organizacji przestrzennej. W tym czasie pierwsza generacja tymocytów z receptorem TcR ($\alpha\delta$ lub $\gamma\delta$) rozpoznaje ligand prezentowany przez komórki nabłonkowe. O ile jednak etap rozrostu komórek nabłonkowych wydaje się być niezależny od sygnałów z udziałem TcR, to aktywacja tych komórek indukowana przez tymocyty jest uwarunkowana ekspresją pełnego kompleksu TcR-CD3 [90]. Zwraca uwagę, że organizacja rdzenia może być modyfikowana w zależności od charakteru i przebiegu procesów selekcji tymocytów. U myszy z transgenicznym TcR silne sygnały selekcji pozytywnej tymocytów wywołują zmiany w organizacji rdzenia na część centralną i obwodową, a w przypadku silnej selekcji negatywnej dezorganizację architektury tego obszaru [9]. Ważkość tych obserwacji wynika z wniosków wskazujących, że mechanizm sygnałów za pośrednictwem których TcR reguluje architekturę rdzenia musi operować w sposób ciągły w życiu osobniczym i w takim przypadku organizacja tego obszaru musi podlegać dynamicznym zmianom w zależności od charakteru selekcji. Potwierdzają to liczne przykłady zmian w grasicy u genetycznie zmodyfikowanych zwierząt laboratoryjnych, a także wywołane działaniem związków immunosupresyjnych, czynników toksycznych, w przebiegu chorób autoimmunologicznych oraz u ciężarnych samic [4, 12, 17, 59, 72, 83].

Należy również zauważyć, że pierwsze stadia organizacji tego kompartmentu i różnicowania komórek nabłonkowych mogą być regulowane przez ich interakcje z tymocytami TcR $\gamma\delta$, tym bardziej że u myszy transgenicznych-TcR $\gamma\delta$ obserwuje się wyraźny rozrost tego obszaru [29, 30]. Subpopulacje tymocytów $\gamma\delta$ z zależności od budowy receptora dojrzewają przed (około 15 dpc) oraz w okresie dojrzewania tymocytów z TcR $\alpha\beta$ (od 17 dpc do dnia urodzenia) i są one również poddane procesom selekcji [73, 94].

W tym aspekcie szczególnie interesujące są morfologiczne wykładniki interakcji pomiędzy komórkami rdzenia a tymocytami, które w okresie pomiędzy 17 dpc

gryzoni do dnia urodzenia tworzą kompleksy limfo-nabłonkowe. Niewielki odsetek kompleksów tego typu spotyka się w grasicach w okresie po urodzeniu [11]. W adhezji mysich tymocytów DP uczestniczą cząsteczki gp23/45 wykryte na komórkach nabłonkowych, które wiążą się z receptorem na tymocytach [2]. Stosując techniki immunocytochemiczne na poziomie mikroskopii elektronowej, w rejonie kontaktu pomiędzy komórkami wykazano cząsteczki gp40, które są mysim homologiem ludzkich cząsteczek Ep-CAM, uczestniczących w homotypowej adhezji, niezależnej od jonów wapniowych [64]. Najwyższa liczba komórek z ekspresją gp40 i jej wysoki poziom w 14 dpc, w kolejnych dniach stopniowo spada wraz ze wzrostem liczby tymocytów TcR $\alpha\beta$ w obrębie rdzenia. Tak więc adhezja komórek tworzących kompleksy jest regulowana przez udział kolejnych rodzin cząsteczek adhezyjnych i ich ligandy, których ekspresja zmienia się równolegle ze zmianą fenotypu komórek uczestniczących w tych interakcjach [58]. Markerem komórek wiążących tymocyty w kompleksy limfo-nabłonkowe jest u szczura $\gamma\gamma$ NSE, a wzajemne oddziaływania komórek obrazują liczne mitozy (tymocytów, jak i komórek nabłonkowych), a w innych kompleksach apoptozy [14, 70].

Komórki nabłonkowe rdzenia, począwszy od 17 dpc można charakteryzować na podstawie szeregu dalszych antygenów, typowych dla grasic w okresie po urodzeniu. U szczurów są to bliżej niezdefiniowane antygeny RMC-20 oraz His-39, a także ekspresja charakterystycznych cytokeratyn [54, 68, 69, 101]. Na podstawie cech ultrastrukturalnych oraz lokalizacji $\gamma\gamma$ NSE wyróżnia się w tym okresie dwie subpopulacje komórek rdzennych, które odpowiadają fenotypowo komórkom spotykanym u szczurów dojrzałych [13]. Subpopulacja komórek NSE-pozytywnych o fenotypie NSE⁺, ck8⁺, ck10⁺, jest we wszystkich etapach ontogenezy reprezentowana przez komórki na różnych etapach zróżnicowania pod względem cech ultrastrukturalnych i aktywności biologicznej; od słabo zróżnicowanych komórek z silną ekspresją NSE i ChA do komórek zorganizowanych w ciała Hassala [14]. Z kolei subpopulacja NSE⁻, ck8⁺ w życiu płodowym, kończy swój program różnicowania, zastępowana przez komórki o podobnych cechach fenotypowych [70].

2.3. Różnicowanie komórek na terenie kory grasicy

Wraz z dynamicznym rozwojem rdzenia grasicy, pomiędzy 16 a 17 dpc wyodrębnia się obszar zewnętrzny, obejmujący korę tego narządu. Do tego okresu dominująca populacja komórek nabłonkowych zawiązka jest jednorodna. Jedyne różnice pomiędzy komórkami wynikają z aktywności mitotycznej (we wszystkich strefach kory) oraz zmiany ich kształtu w miarę zasiedlania zawiązka przez komórki limfoidalne i wzrostu ich liczby. Na uwagę zasługuje fakt, iż do 17 dpc komórki korowe wykazują ekspresję MHC klasy II i I, a tylko pojedyncze komórki w głębokiej korze, ck8 [54, 68, 69, 101].

TABELA 1. Antygeny spotykane w subpopulacjach komórek nabłonkowych grasicy gryzoni

Przeciwciało Lektyna	Antygen	Typy komórek nabłonkowych			
		powierzchniowe	korowe	rdzenne	ciałek Hassala
	(53–68 kD), ck5		+		
	ck7	+/-		+	
	ck8	+	+	+	+
	(40–57kD),ck 10			+/-	+
	ck 13			+/-	
	ck 16	+/-		+/-	+/-
	ck 18		+	+/-	+/-
	ck 19	+		+	+
HIS 37	*	+		+	+
HIS 38	*		+		
HIS 39	*	+		+	+
UEA	α -L-fukoza			+	
RMC 13	*		+		
RMC 17	*		+		
RMC 18	*			+	+/-
RMC 19	*			+	+/-
TE-3	*		+		
TE-4	*	+		+	
	A2B5	+		+	+/-
	ChA	+/-		+/-	+/-
	γ NSE	+/-		+	+/-
	PGP 9,5		+		

Oznaczenia: + większość komórek z odczynem dodatnim

+/- pojedyncze komórki z odczynem dodatnim

* – epitopy bliżej niezdefiniowane

Skróty:ck – cytokeratyny

ChA – chromogranina A

NSE – enolaza specyficzna dla neuronów

PGP 9,5 – białko specyficzne dla neuronów

A2B5 – antygen komórek glejowych

W odpowiedzi na zasiedlające zawiązek komórki limfoidalne (większość migruje od strony torebki) sąsiadujące ze sobą komórki nabłonkowe za pomocą licznych połączeń typu przylegania (opisywanych jako *desmosome-like*) szczelnie zamykają je w niewielkich przestrzeniach, początkowo pojedynczo, a w kolejnych dniach w grupach coraz liczniejszych. Komunikację pomiędzy komórkami (nabłonkowa-

nabłonkowa, jak i nabłonkowa-tymocyt) zapewniają liczne połączenia komunikacyjne utworzone przez koneksynę 43 [1]. W homotypowej adhezji komórek nabłonkowych i tymocytów decydującą rolę odgrywają E-kadheryny, których najwyższy poziom wykazano pomiędzy 14 a 16 dpc myszy [58]. Maksymalna ekspresja E-kadheryn na tymocytach DN, CD25⁻, równoległe z różnicowaniem się tymocytów do stadium o fenotypie DN, CD25⁺ stopniowo spada [47, 57]. Adhezja tymocytów i komórek nabłonkowych (zarówno homotypowa, jak i heterotypowa) jest regulowana rozwojowo, modulowana przez szereg czynników produkowanych przez tymocyty (głównie IFN γ), komórki nabłonkowe (cytokiny, siarczan heparanu) a także na drodze segregacji alternatywnych ligandów zlokalizowanych w różnych obszarach grasicy [80, 91, 105]. Komórki w najwcześniejszych etapach rozwoju grasicy komunikują się wykorzystując EGF [31], IGF-1, IGF-2 i ekspresję swoistych dla IGF receptorów [40], a także za pośrednictwem cytokin i hormonów [109]. Limfo-nabłonkowa adhezja warunkuje przeżycie i różnicowanie zarówno tymocytów, jak również komórek nabłonkowych [86]. Interakcje limfo-nabłonkowe, w których pośredniczą integryny podrodziny β 1, indukują aktywację NF-(κ)B w komórkach nabłonkowych [86].

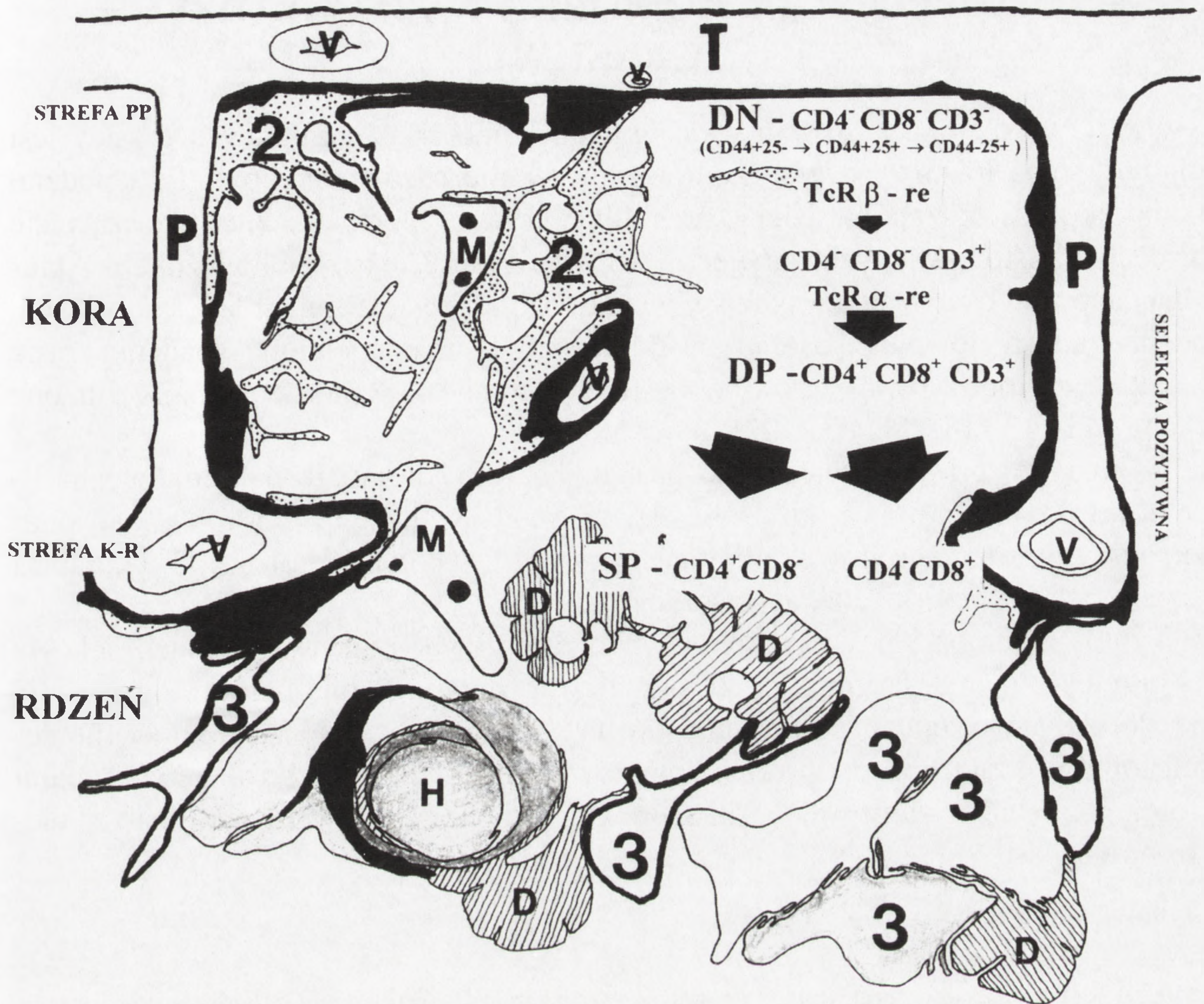
Zablokowanie rozwoju tymocytów w stadium protymocyta wywołuje drastyczne zmiany w grasicy. Stąd uważa się, że interakcje protymocytów z komórkami zawiązka mają decydujące znaczenie w indukcji pierwszych etapów różnicowania komórek nabłonkowych tego obszaru [34]. Należy jednak zwrócić uwagę, że wyraźne zmiany w architekturze kory i w komórkach zrębu tego obszaru, zachodzą równoległe z procesem angiogenezy i powstaniem naczyń krwionośnych od około 17 dpc [70]. Naczynia włosowate, zaopatrujące korę, są odgałęzieniami naczyń biegnących w rdzeniu i łączą się w tym okresie z siecią naczyń włosowatych oplatających powierzchnię pseudopłacików. Czynnikiem mogącym bezpośrednio wpływać na komórki nabłonkowe powierzchniowe są endoteliny działające przez aktywację receptora podtypu A, regulując w ten sposób aktywność proliferacyjną komórek w tych obszarach [51]. Komórki nabłonkowe powierzchniowe stopniowo zmieniają swoje przestrzenne ułożenie względem tkanki łącznej torebki, przegród i naczyń. Rozciągając się równoległe do przedziału łącznotkankowego, łączą się one z komórkami w głębszych warstwach tego obszaru, tworząc trójwymiarową sieć nabłonkową. Ułożenie komórek o takim charakterze ma zdaniem wielu autorów fundamentalne znaczenie warunkując prawidłowy przebieg procesu dojrzewania tymocytów [98]. Innym czynnikiem indukującym trójwymiarową organizację komórek korowych jest przejście tymocytów DN ze stadium CD44⁺CD25⁻ w stadium CD44⁻CD25⁺ [99]. Zdaniem autorów charakterystyczna reorganizacja komórek nabłonkowych w korze warunkuje rozwój rdzenia.

Zwraca uwagę, że o ile komórki rdzenne w 17 dpc wykazują już wysoki stopień zróżnicowania pod względem cech fenotypowych, to uwzględniając podobne kryteria, różnicowanie komórek korowych jest w tym okresie zapoczątkowane, dotyczy

komórek w jej głębszych obszarach, ck8-pozytywnych i jest kontynuowane do końca okresu neonatalnego.

Spośród markerów charakterystycznych dla komórek korowych grasicy szczurów, od 17 dpc wykrywa się ekspresję antygenów reagujących z surowicą anty-RMC 17 i RMC-20 (wykrywają bliżej nieznane determinanty), natomiast ekspresję HIS 38 wykazano w pierwszych dniach po urodzeniu [54, 101]. Markerem komórek korowych, wykrywanym u szczurów od 18 dpc jest również PGP 9.5 [13]. Ekspresja tego białka pozwala wyróżnić subpopulacje w tym obszarze o fenotypie PGP 9.5⁺,ck8⁺ i PGP 9.5⁻,ck8⁺ oraz komórki negatywne na oba antygeny, zlokalizowane w większości w strefie podtorebkowej [68, 70]. W okresie płodowym komórki PGP 9.5⁺ występują we wszystkich strefach kory, a w kolejnych dniach po urodzeniu, koncentrują się w głębokiej korze; komórki strefy podtorebkowej są w większości PGP 9.5-negatywne [13]. Zwraca uwagę, że PGP 9.5 jest markerem komórek korowych, które oplatając szerokimi wypustkami niewielkie grupy tymocytów, tworzą kompleksy limfo-nabłonkowe, odpowiadające kompleksom znanym jako *thymic nurse cells*, TNC [11, 13]. Są to komórki o dużej aktywności fizjologicznej, wydzielające w obrębie kory mikroobszary, w których indukowane są proliferacja, różnicowanie, jak i apoptoza tymocytów [10, 11, 81]. Oddziaływania pomiędzy komórkami w obrębie kompleksów są przykładem interakcji o charakterze kryptokrynowym i parakrynowym [11]. W komórkach nabłonkowych TNC u myszy wykryto mRNA dla IL-5, GM-CSF i IFN- γ [28]. Wykazano w nich również prostaglandynę, PGE2 i 6-keto-PGF1 [54] oraz wazopresynę i oksytocynę [33, 55].

W okresie okołoporodowym i w kolejnych dniach okresu neonatalnego gryzoni można wyraźniej wyróżnić odmienną antygenowo grupę komórek powierzchniowych nazywanych również podtorebkowymi oraz strefę korowo-rdzenną [101]. W grasicach ludzkich zróżnicowanie komórek w tych obszarach przebiega prawdopodobnie już w okresie płodowym. Wśród komórek powierzchniowych dominują komórki wykazujące ekspresję MHC klasy I, markerów neuroendokrynowych, takich jak: A2B5, NSE, ChA, wydzielające IL-1 i IL-7 [12, 32, 36, 67]. Są one odpowiedzialne za sekrecję hormonów grasicy, a ponadto zlokalizowano w nich neuropeptydy, neurofizynę, oksytocynę/wazopresynę [41, 55, 78, 102, 106]. Endokrynowa funkcja tej subpopulacji, ekspresja charakterystycznych cytokeratyn, markerów neuroendokrynowych oraz ich aktywność proliferacyjna są modulowane przez szereg hormonów i neuropeptydów [12, 17, 33, 55, 72]. Komórki powierzchniowe wykazują wspólne cechy fenotypowe z niektórymi komórkami rdzenia grasicy. Na tej podstawie wysunięto koncepcję, iż w obszarze podtorebkowym znajduje się pula odnawiająca komórki rdzenne, która migrując przez korę w kierunku rdzenia przechodzi szereg zmian fenotypowych i w terminalnym etapie zróżnicowania wchodzi w skład ciałek Hassala [88]. Niezależnie, na podstawie badań grasic myszy zaproponowano, że populacja odnawiająca dla komórek korowych znajduje się z kolei w części korowo-rdzennej [45]. Jest to niewielka liczba komórek o fenotypie ck8⁺ck5⁺, które



SCHEMAT przedstawia skład komórkowy w poszczególnych obszarach topograficznych grasicy, tj. na terenie kory, rdzenia oraz w strefie podtorebkowej (PP) i w strefie korowo-rdzennej (K-R). W schemacie uwzględniono występowanie głównych typów komórek nabłonkowych (typ 1,2,3 i ciała Hassala, H), makrofagów (M), komórek dendrytycznych (D), a także kolejne etapy różnicowania tymocytów od komórek podwójnie negatywnych (DN), podwójnie pozytywnych (DP) do komórek pojedynczo pozytywnych (SP). W schemacie zaznaczono obszar grasicy, w którym zachodzi proces rearanżacji genów kodujących łańcuch β receptora TcR (TcR β -re) oraz łańcuch α TcR (TcR α -re), a także obszary, w których odbywają się procesy selekcji pozytywnej tymocytów i selekcji negatywnej tych komórek. Oznaczenia: T – torebka grasicy, P – przegroda łącznotkankowa oddzielająca pseudopłaciki, V – naczynia krwionośne

różnicując się pod wpływem indukcyjnych sygnałów ze strony protymocytów przechodzą w dominującą w tym obszarze populację $ck8^+ck5^-$ [45, 46]. W ostatnich latach dyskutowane są również koncepcje jednej komórki prekursorowej dla wszystkich subpopulacji komórek nabłonkowych grasicy. Opierają się one na obserwacjach zmian patologicznych w tym narządzie, głównie nowotworowych, którym towarzyszy występowanie komórek o wspólnych cechach fenotypowych dla komórek rdzenia i kory grasicy (dyskutowane w : 24,102].

3. KLASYFIKACJA KOMÓREK NABŁONKOWYCH GRASICY

Podstawą szeroko stosowanej klasyfikacji komórek nabłonkowych grasicy jest topograficzna lokalizacja tych komórek na terenie pseudopłacików. Taki podział komórek potwierdzają bardziej szczegółowe kryteria morfologiczne odnoszące się do cech ultrastrukturalnych, antygenowych oraz do własności fizjologicznych. Aktualne dane z tego zakresu uzyskano w wyniku badań grasic zwierząt laboratoryjnych, pochodzących głównie od osobników dojrzałych, które uzupełnione o badania grasic ludzkich zwróciły uwagę, że u wszystkich gatunków komórki te mają zbliżone cechy [11, 13, 18, 24, 87, 102].

W mięszu grasic wyróżniono następujące typy komórek nabłonkowych: 1 – komórki powierzchniowe, które w zależności od lokalizacji określa się jako podtorebkowe, podprzegrodowe i okołonaczyniowe; 2 – komórki korowe; 3 – komórki rdzenne; 4 – komórki ciała Hassala.

Typ 1 – komórki powierzchniowe tworzące zewnętrzną warstwę nabłonkową na granicy z tkanką łączną torebki, przegród i naczyń. Są one płaskie, odznaczają się dobrze wykształconą błoną podstawną, z którą łączą się za pomocą półdesmosomów. Mają liczne wiązki filamentów pośrednich, dobrze rozwinięty aparat Golgiego, liczne cysterny siateczki szorstkiej i niekiedy widoczne, ziarnistości elektronowo gęste.

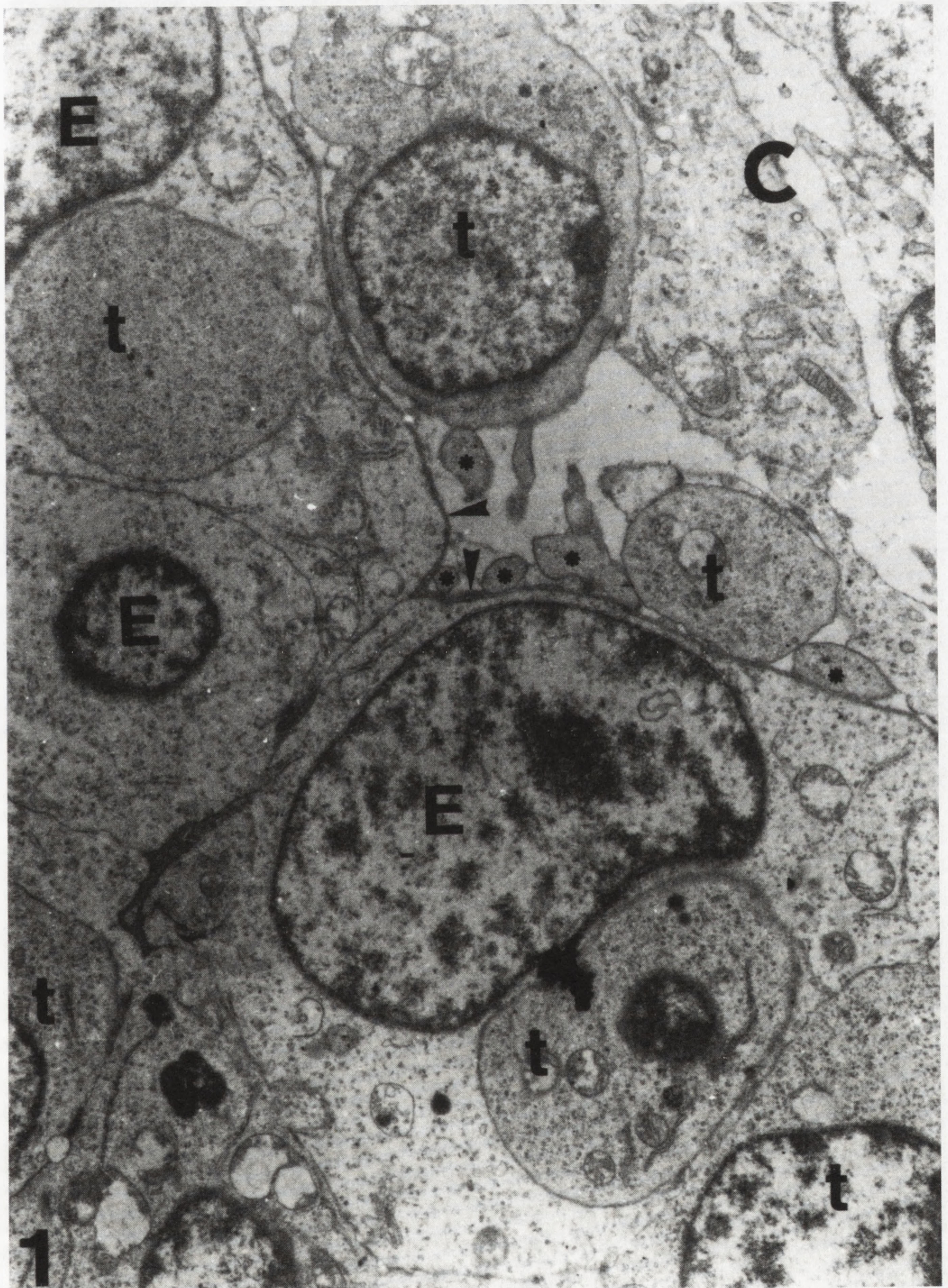
RYSUNEK 1. Fragment przekroju przez grasicę szczura w 15. dniu życia płodowego, w okresie zasiedlania narządu przez pierwszą falę komórek limfoidalnych. Komórki nabłonkowe powierzchniowe (E) z dobrze wykształconą błoną podstawną (►) graniczą z tkanką łączną otaczającą zawiązek grasicy (C). Komórki limfoidalne (t) widoczne są w mięszu grasicy między szerokimi fałdami cytoplazmy komórek nabłonkowych oraz w przedziale łącznotkankowym, w bezpośrednim sąsiedztwie komórek nabłonkowych powierzchniowych. Drobne wypustki komórek limfoidalnych (*) w przedziale łącznotkankowym wyznaczają drogę ich migracji do mięszu narządu pomiędzy komórkami powierzchniowej warstwy nabłonkowej (x 9600)

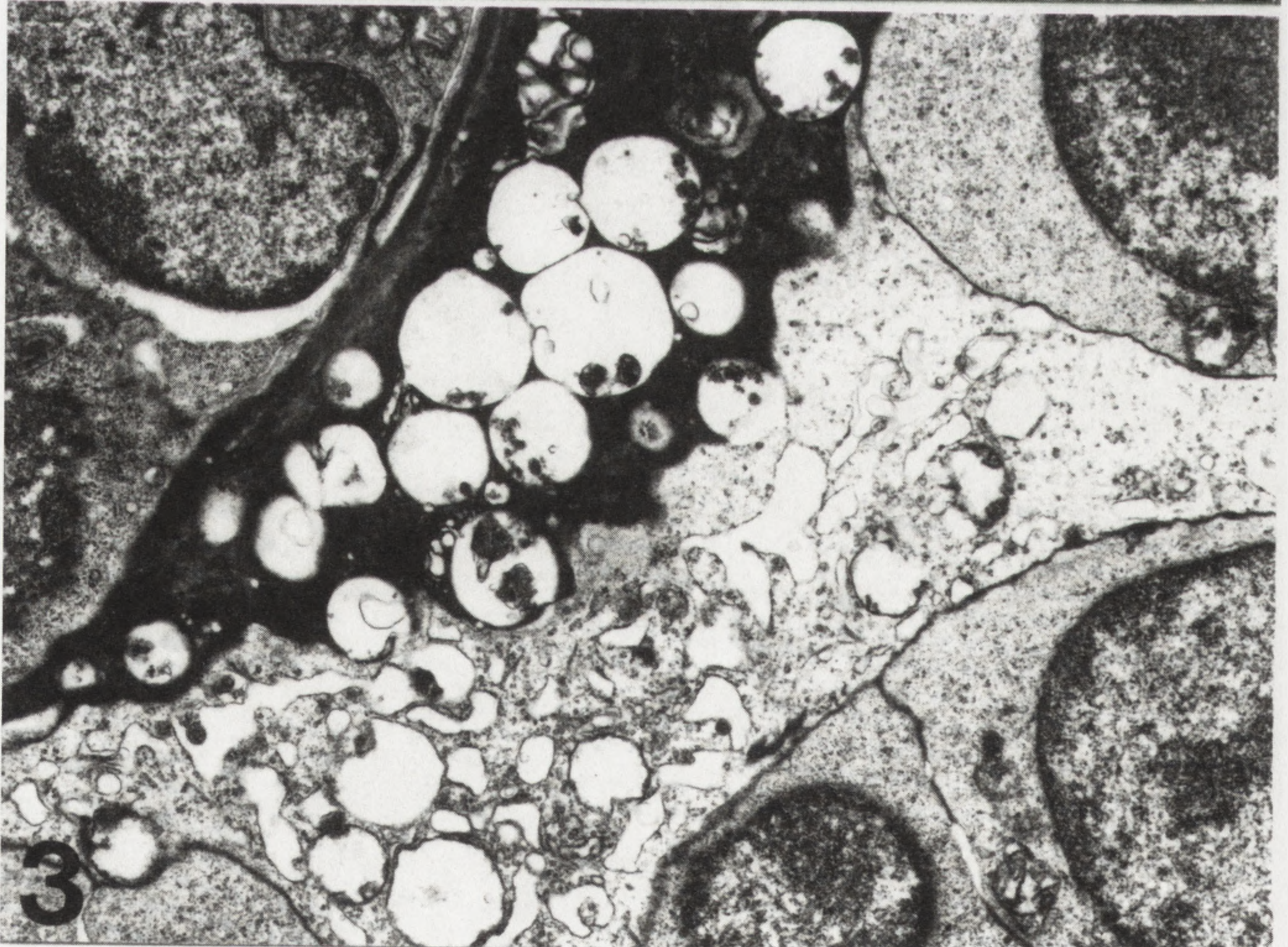
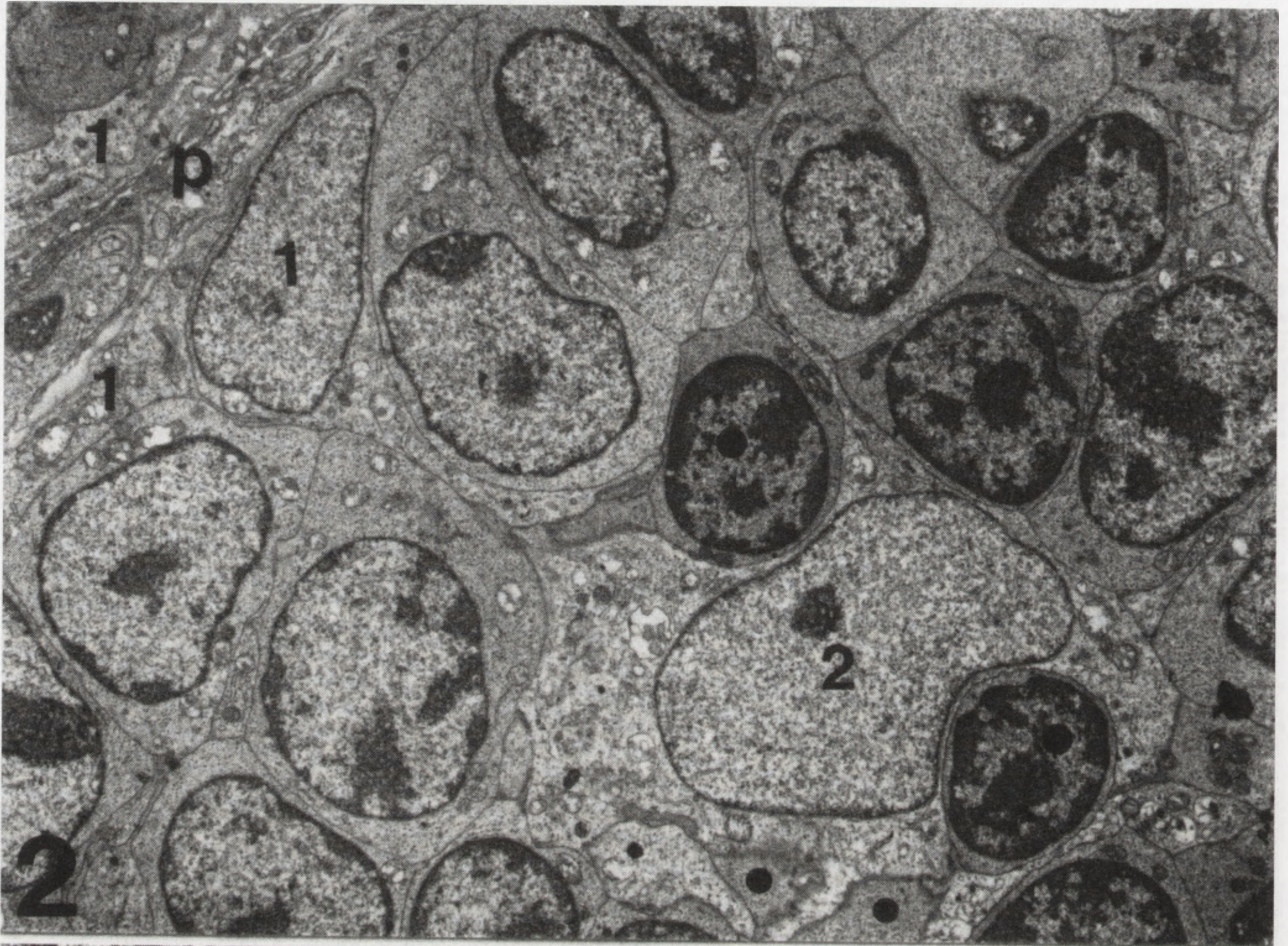
RYSUNEK 2. Fragment przekroju przez korę grasicy szczura w okresie neonatalnym. Komórki powierzchniowe (typ 1. –1) graniczą z tkanką łączną przegrody (p), a ich wypustki łączą się z komórkami tego samego typu oraz komórkami typu 2. (2), które znajdują się w głębszych obszarach kory. Cytoplazma komórki typu 2. tworzy szerokie fałdy otaczające pojedyncze tymocyty (•) – x 3500

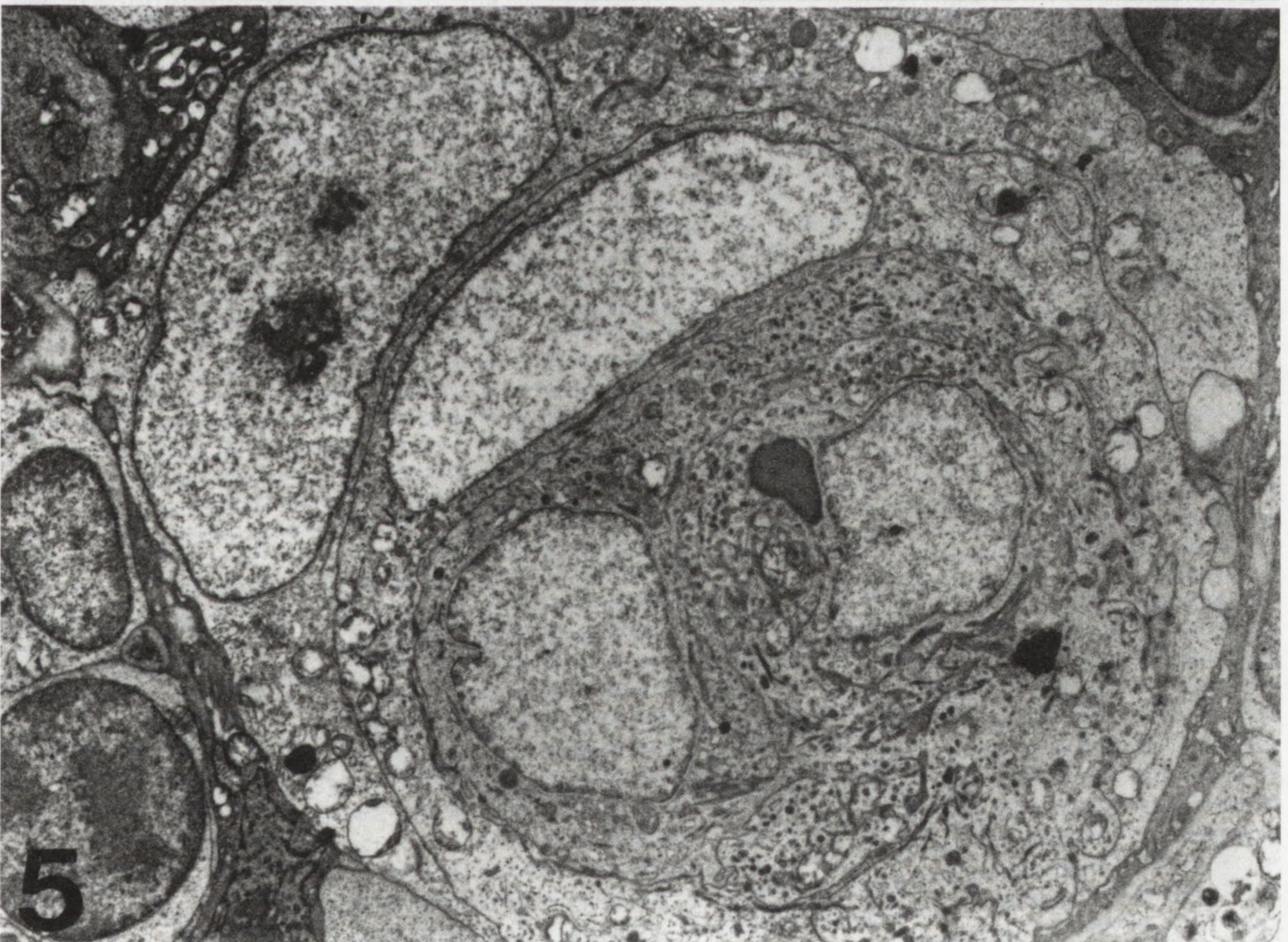
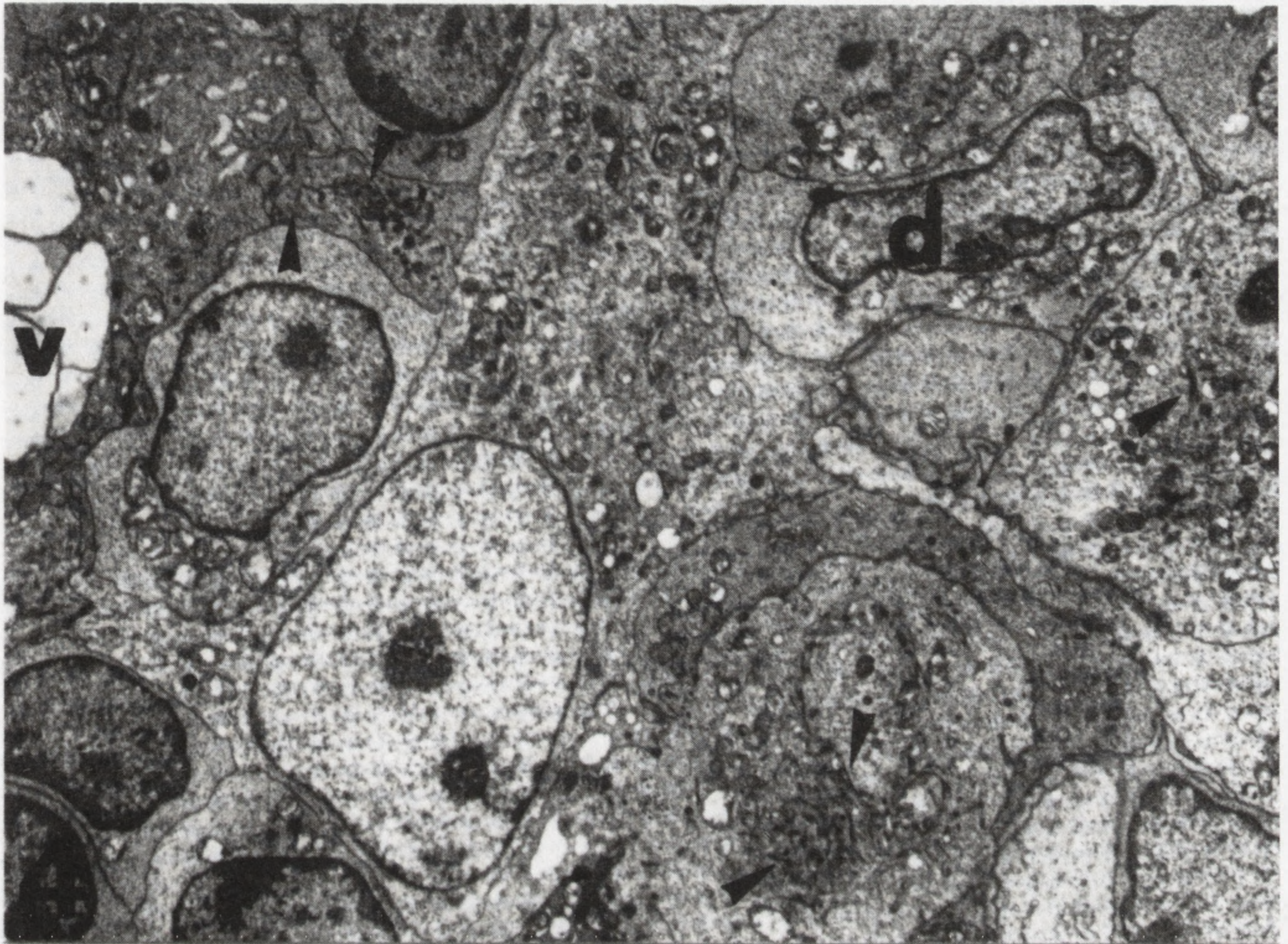
RYSUNEK 3. Wypustki komórek nabłonkowych typu 2. na terenie głębokiej kory grasicy szczura. Cytoplazma komórek podtypu 3. jest elektronowo-gęsta, natomiast w komórkach podtypu 2. wykazuje pośrednią gęstość w porównaniu z podtypem 1. (x 10 000)

RYSUNEK 4. Fragment przekroju przez centralną część rdzenia grasicy u szczura w okresie neonatalnym. Komórki nabłonkowe typu 3. tworzą w tym obszarze większe skupiska. Na terenie cytoplazmy komórek nabłonkowych widoczne są wiązki filamentów pośrednich (►), charakterystyczne wakuole (v) oraz ziarnistości elektronowo-gęste. W bezpośrednim sąsiedztwie komórek typu 3. występują komórki dendrytyczne (d) (x 3500)

RYSUNEK 5. Ciało Hassala w rdzeniu grasicy szczura w okresie neonatalnym. W komórkach nabłonkowych ciała Hassala widoczne są liczne ziarnistości elektronowo-gęste oraz wiązki filamentów pośrednich (x 4500) – zdjęcia 1–5 na sąsiednich stronach







Typ 2 – komórki korowe, przeważnie rozgałęzione tworzą w tym obszarze sieć nabłonkową. Ich cechą charakterystyczną są elektronowo jasne wakuole. W świetle wakuoli spotyka się niekiedy struktury błoniaste, pojedyncze, jasne pęcherzyki lub niewielką ilość materiału o średniej gęstości elektronowej. Komórki korowe różnią się pomiędzy sobą gęstością elektronową cytoplazmy i budową jądra. Równoległe ze wzrostem gęstości cytoplazmy jądra tych komórek zmieniają kształt i obrys oraz wzrasta stopień kondensacji chromatyny. Na podstawie tych cech niekiedy wyróżnia się podtypy tych komórek. Komórki podtypu 1. mają jądro euchromatyczne, o regularnym obrysie, przeważnie owalne. W ich cytoplazmie, niekiedy obfitej, występują pojedyncze wiązki filamentów, dobrze rozwinięty aparat Golgiego. Komórki te najliczniej występują w korze zewnętrznej. W kolejnych dwóch podtypach, stopniowo wzrasta gęstość substancji podstawowej w cytoplazmie, wzrasta liczba wolnych rybosomów, niekiedy wakuoli. Jądra tych komórek, z przewagą heterochromatyny, przybierają nieregularny kształt i obrys. O ile komórki, wykazujące pośrednią gęstość elektronową, są rozproszone w różnych obszarach kory, komórki elektronowo-gęste najliczniej występują w głębokiej korze, a ich cechy morfologiczne można wiązać z apoptozą.

Typ 3 – komórki rdzenne przeważnie dzieli się na dwa typy, choć sugeruje się, że reprezentują one jedną linię komórek na różnych etapach zróżnicowania bądź aktywności biologicznej. Komórki podtypu 1. określa się jako „niezróżnicowane komórki nabłonkowe”, a ich ilość szacuje się na ok. 1% całkowitej populacji komórek rdzenia. Charakterystyczną cechą tych komórek jest niewielka gęstość elektronowa zarówno cytoplazmy, jak i ich jądra. W ich cytoplazmie zwraca uwagę przewaga polisomów, dobrze rozwinięty aparat Golgiego, liczne pęcherzyki, niekiedy ziarnistości elektronowo-gęste. Komórki podtypu 2. są duże, wieloboczne z obfitą cytoplazmą, wyraźnie spolaryzowaną pod względem ułożenia organelli. Ekscentrycznie ułożone duże jądro tych komórek jest euchromatyczne, najczęściej okrągłe lub głęboko wpukłone. W przeciwnym do jądra obszarze cytoplazmy spotyka się różnej wielkości wakuole, niekiedy z mikrokosmkami, dobrze rozwinięty aparat Golgiego, liczne pęcherzyki, ziarnistości elektronowo-gęste i niewielką ilość filamentów. Są one w literaturze określane jako „cystic” lub, uwzględniając ich obfitą cytoplazmę, hypertroficzne. Komórki omawianego typu są odpowiedzialne za sekrecję hormonów grasiczych.

Typ 4 – komórki wchodzące w skład ciałek Hassala, które stanowią odrębny typ komórek rdzenia grasicy ze względu na podobieństwo antygenowe do keratynocytów. Pierwotną strukturą morfologiczną ciała są skupiska komórek nabłonkowych, których cechy morfologiczne, jak i antygenowe są w wielu przypadkach wspólne z pozostałymi komórkami w rdzeniu. Kolejnym stadium formowania się ciała jest struktura, w której wyróżnia się komórkę centralną otoczoną warstwą lub kilkoma warstwami komórek nabłonkowych. W komórkach zewnętrznych tych struktur lokalizuje się szereg hormonów grasicy i wykazują one cechy komórek

wydzielniczych. Uważa się, że komórki wchodzące w skład ciałek Hassala reprezentują postaci zróżnicowane terminalnie.

Na podstawie badań rdzenia grasicy szczurów, powyższą klasyfikację uzupełniono, uwzględniając występowanie w rdzeniu komórek, które morfologicznie odpowiadają komórkom kory zarówno 1 i 2 typu. Na terenie rdzenia komórki te zawierają znacznie więcej filamentów pośrednich [24]. Rdzenne komórki typu 1-go są zlokalizowane okołonaczyniowo natomiast typu 2. są na terenie rdzenia rozproszone.

Charakterystyka morfologiczna wyróżnionych typów komórek nabłonkowych wskazuje, że komórki w poszczególnych typach, obok wspólnych cech fenotypowych wykazują szereg odmiennych cech antygenowych. Tak więc dalsze badania tych komórek pozwolą prawdopodobnie wyróżnić w obrębie typów kolejne ich subpopulacje.

Podziękowanie

Składam podziękowanie mojemu mężowi za pomoc w redakcji piśmiennictwa.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ALVES LA, CAMPOS de CARVALHO AC, CIRNE LIMA EO, ROCHA e SOUZA CM, DARDENNE M, SPRAY DC, SAVINO W. Functional gap junctions in thymic epithelial cells are formed by connexin 43. *Eur J Immunol* 1995; **25**: 431–437
- [2] AMARANTE-MENDES JG, COUTURE C, POTWOROWSKI EF. Identification of a 16-kDa thymocyte membrane glycoprotein involved in the thymocyte/thymic medullary epithelial cell interaction. *Immunol Lett* 1993; **37**: 47–52
- [3] ANDERSON M, ANDERSON SK, FARR AG. Thymic vasculature: organizer of the medullary epithelial compartment? *Int Immunol* 2000; **12**: 1105–1110
- [4] ATLAN-GEPNER C, NASPETTI M, VALERO R, BARAD M, LEPAULT F, VIALETES B, NAQUET P. *Autoimmunity* 1999; **31**: 249–260
- [5] ARDAVIN C. Thymic dendritic cells. *Immunol Today* 1997; **18**: 350–361
- [6] BLACKBURN CC, AUGUSTINE CL, LI R, HARVEY RP, MALIN MA, BOYD RL, MILLER JFAP, MORAHAN G. The *nu* gene acts cell-autonomously and is required for differentiation of thymic epithelial progenitors. *Proc Natl Acad Sci* 1996; **93**: 5742–5746
- [7] BOCKMAN DE. Development of the thymus. *Microsc Res Tech* 1997; **38**: 209–215
- [8] BOYD R, TUCEK C, GODFREY D, IZON D, WILSON T DAVIDSON N, BEAN A, LADYMAN H, RITTER M, HUGO P. The thymic microenvironment. *Immunol Today* 1993; **14**: 445–449
- [9] BRABB T, HUSEBY ES, MORGAN TM, SANT'ANGELO DB, KIRCHNER J, FARR AG, GOVERMAN J. Thymic stromal organization is regulated by the specificity of T cell receptor/major histocompatibility complex interactions. *Eur J Immunol* 1997; **27**: 136–146
- [10] BRELIŃSKA R, SEIDEL H-J, KREJA L. Thymic nurse cells: differentiation of thymocytes within complexes. *Cell Tissue Res* 1991; **264**: 175–183
- [11] BRELIŃSKA R, WARCHOŁ JB. Thymic nurse cells: their functional ultrastructure. *Microsc Res Tech* 1997; **38**: 250–266.
- [12] BRELIŃSKA R, ZABEL M, PACZKOWSKA A. Effects of pregnancy on the rat thymic cortex. *Histochem Cell Biol* 1997; **108**: 274–275.

- [13]BRELIŃSKA R, OSTALSKA D, ZABEL M. Subsets of thymic epithelial cells defined by neuroendocrine markers. *Histochem Cell Biol* 2000; w druku
- [14]BRELIŃSKA R, OSTALSKA D, JAROSZEWSKI J. Development of rat thymic medulla during ontogeny. *Immunol Today*, 2000; **73**: 121.
- [15]BRELIŃSKA R, OSTALSKA D. Komórki dendrytyczne grasicy w rozwoju. *Folia Histochem Cytobiol* 2000, w druku
- [16]CHISAKA O, CAPECCHI M. Regionally restricted developmental defects resulting from the targeted disruption of the mouse homeobox gene *hox 1.5*. *Nature* 1991; **350**: 473–479.
- [17]CLARKE A, GIL A, KENDALL M. The effects of pregnancy on the mouse thymic epithelium. *Cell Tissue Res* 1994; **275**: 309–318.
- [18]COLIC M, JANOVIC D, MITROVIC S, DUJIC A. Immunohistochemical identification of six cytokeratin-defined subsets of the rat thymic epithelial cells. *Thymus* 1989; **13**: 175–185.
- [19]CONWAY SJ, HENDERSON DJ, COPP AJ. *Pax3* is required for cardiac neural crest migration in the mouse: evidence from the *spotch* (*Sp^{2H}*) mutant. *Development* 1997; **124**: 505–514.
- [20]CORDIER AC, HAUMONT SM. Development of thymus, parathyroids, and ultimobranchial bodies in NMRI and nude mice. *Am J Anat* 1980; **157**: 227–263.
- [21]DAHL E, KOSEKI H, BALLING R. Pax genes and organogenesis. *Bioessays* 1997; **19**: 755–765.
- [22]DEFTOS ML, BEVAN MJ. Notch signaling in T cell development. *Curr Opin Immunol* 2000; **12**: 166–172.
- [23]DeKONING J, DiMOLFETTO L, REILLY C, WEI Q, HAVRAN W, LO D. Thymic cortical epithelium is sufficient for the development of mature T cells in *relB*-deficient mice. *J Immunol* 1997; **10**: 2558–2566.
- [24]DE WAAL EJ, RADEMAKERS LHPM. Heterogeneity of epithelial cells in the thymus. *Microsc Res Tech* 1997; **38**: 227–236.
- [25]DICK A, RISAU W, DREXLER H. Expression of Smad1 and Smad2 during embryogenesis suggests a role in organ development. *Dev Dyn* 1998; **211**: 293–305.
- [26]DIETRICH S, GRUSS P. *undulated* phenotypes suggest a role of *Pax-1* for the development of vertebral and extravertebral structures. *Dev Biol* 1995; **167**: 529–548.
- [27]DUPE V, GHYSELINCK NB, WENDLING O, CHAMBON P, MARK M. Key roles of retinoic acid receptors λ and β in the patterning of the caudal hindbrain, pharyngeal arches and otocyst in the mouse. *Development* 1999; **126**: 5051–5059.
- [28]FAAS SJ, ROTHSTEIN JL, KREIDER BL, ROVERA G, KNOWLES BB. Phenotypically diverse mouse thymic stromal cell lines which induce proliferation and differentiation of hematopoietic cells. *Eur J Immunol* 1993; **23**: 1201–1214.
- [29]FARR A, HOSIER S, NELSON S, ITOHARA S, TONEGAWA S. Distribution of thymocytes expressing receptors in the murine thymus during development. *J Immunol* 1990; **144**: 492–498.
- [30]FERRICK DA, CHAN A, RAHEMTULLA A, WIDACKI SM, XIA M, BROUGHTON H, GAJEWSKI DA, BALLHAUSEN W, ALLISON JP, BLUESTONE JA, BURKI K, VAN EWIJK W, MAK TW. Expression of T cell receptor α -chain (V1.1J4C4) transgene in mice influences T cell receptor ontogeny and thymic architecture during development. *J Immunol* 1990; **145**: 20–27.
- [31]FREITAS CS, DALMAU SR, KOVARY K, SAVINO W. Epidermal growth factor modulates fetal thymocyte growth and differentiation. *Dev Immunol* 1998; **5**: 169–182.
- [32]GINDA W, GRATZL M, MAYERHOFER A, WARCHOŁ J. Chromogranin A immunoreactivity in epithelial cells of the thymus. *Folia Histochem Cytobiol* 1996; **34**: 91–93.
- [33]GEENEN V, ROBERT F, MARTENS H, De GROOTE D, FRANCHIMONT P. The thymic education of developing T cells in self neuroendocrine principles. *J Endocrinol Invest* 1992; **15**: 621–629.
- [34]HOLLANDER G, WANG B, NICHOGIANNPOULOU A, PLATENBURG PP, van EWIJK W, BURAKOFF SJ, GUTIERREZ-RAMOS JC, TERHORST C. Developmental control point

- in induction of thymic cortex regulated by a subpopulation of prothymocytes. *Nature* 1995; **373**: 350–353.
- [35] IZON DJ, ROZENFELD S, FONG ST, KOMUVES L, LARGMAN C, LAWRENCE HJ. Loss of function of the homeobox gene *Hoxa-9* perturbs early T-cell development and induces apoptosis in primitive thymocytes. *Blood* 1998; **92**: 383–393.
- [36] JONES GV, BOTHAM CA, CLARKE AG, KENDALL MD. Immunoreactivity of neural crest-derived cells in thymic tissue developing under the rat kidney capsule. *Brain Behav Immun* 1998; **12**: 163–180.
- [37] JOTERAU FV, HEUZE F, SALOMAN-VIE V, GASCAN H. Cell kinetics in the fetal mouse thymus: precursor cell input, proliferation and emigration. *J Immunol* 1987; **138**: 1026–1037.
- [38] KAMPINGA J, BERGES S, BOYD RL, BREKELMANS P, COLIC M, Van EWIJK W, KENDALL MD, LADYMAN H, NIEUWENHUIS P, RITTER MA, SCHUURMAN H-J, TOURNEFIER A. Thymic epithelial antibodies: immunohistological analysis and introduction of nomenclature. *Thymus* 1989; **13**: 165–173.
- [39] KANETA M, OSAWA M, OSAWA M, SUDO K, NAKAUCHI H, FARR AG, TAKAHAMA Y. A role for Pref-1 and HES-1 in thymocyte development. *J Immunol* 2000; **164**: 256–264.
- [40] KECHA O, BRILOT F, MARTENS H, FRANCHIMONT N, RENARD C, GREIMERS R, DEFRESNE MP, WINKLER R, GEENEN V. Involvement of insulin-like growth factors in early T cell development: a study using fetal thymic organ cultures. *Endocrinology* 2000; **141**: 1209–1217.
- [41] KENDALL MD, STEBBINGS RJ. The endocrine thymus. *Endocr J* 1994; **2**: 333–339.
- [42] KILLEEN N, IRVING BA, PIPPIG S, ZINGER K. Signaling checkpoints during the development of T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 1998; **10**: 360–367.
- [43] KIM MG, LEE G, LEE SK, LOLKEMA M, YIM J, HONG SH, SCHWARTZ RH. Epithelial cell-specific laminin 5 is required for survival of early thymocytes. *J Immunol* 2000; **165**: 192–201.
- [44] KIRBY ML, WALDO KL. Neural crest and cardiovascular patterning. *Circ Res* 1995; **77**: 211–215.
- [45] KLUG DB, CARTER C, CROUCH E, ROOP D, CONTI CJ, RICHIE ER. Interdependence of cortical thymic epithelial cell differentiation and T-lineage commitment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 11822–11827.
- [46] KLUG DB, CROUCH E, CARTER C, COGHLAN L, CONTI CJ, RICHIE ER. Transgenic expression of cyclin D1 in thymic epithelial precursors promotes epithelial and T cell development. *J Immunol* 2000; **164**: 1881–1888.
- [47] LEE D, PROWSE DM, BRISSETTE JL. Association between mouse *nude* gene expression and the initiation of epithelial terminal differentiation. *Dev Biol* 1999; **208**: 362–374.
- [48] LEE MG, SHARROW SO, FARR AG, SINGER A, UDEY MC. Expression of the homotypic adhesion molecule E-cadherin by immature murine thymocytes and thymic epithelial cells. *J Immunol* 1994; **152**: 5653–5659.
- [49] MADEN M, HORTON C, GRAHAM A, LEONARD L, PIZZEY J, SIEGENTHALER G, LUMSDEN A, ERIKSSON U. Domains of cellular retinoic acid-binding protein I (CRABP I) expression in the hindbrain and neural crest of the mouse embryo. *Mech Dev* 1992; **37**: 13–23.
- [50] MAKORI N, PETERSON PE, WEI X, HUMMLER H, HENDRICKX AG. 13-cis-Retinoic acid alters neural crest cells expressing Krox-20 and Pax-2 in macaque embryos. *Anat Rec* 1999; **255**: 142–154.
- [51] MALENDOWICZ LK, BRELINSKA R, De CARO R, TREJTER M, NUSSDORFER GG. Endotelin-1, acting via the α receptor subtype, stimulates thymocyte proliferation in the rat. *Life Sci* 1998; **62**: 1959–1963.
- [52] MANLEY NR, CAPECCHI MR. The role of *Hoxa-3* in mouse thymus and thyroid development. *Development* 1995; **121**: 1989–2003.

- [53]McCORMACK JE, KAPPLER J, MARRACK P, WESTCOTT JY. Production of prostaglandin E2 and protacyclin by mouse nurse cells in culture. *J Immunol* 1991; **146**: 239–243.
- [54]MICIC M, EIDEEB S, COLIC M, DAMJANOVIC M, ISAKOVIC K. Expression of antigens on rat thymic epithelial cells during ontogenesis. *Dev Comp Immunol* 1991; **15**: 443–450.
- [55]MOLL UM. Functional histology of the neuroendocrine thymus. *Microsc Res Tech* 1997; **38**: 300–310.
- [56]MULDER GB, MANLEY N, MAGGIO-PRICE L. Retinoic acid-induced thymic abnormalities in the mouse are associated with altered pharyngeal morphology, thymocyte maturation defects, and altered expression of *Hoxa3* and *Pax1*. *Teratology* 1998; **58**: 263–275.
- [57]MULLER KM, LUEDECKER CJ, UDEY MC, FARR AG. Involvement of E-cadherin in thymus organogenesis and thymocyte maturation. *Immunity* 1997; **6**: 257–164.
- [58]MUNRO SB, DUCLOS AJ, JACSON AR, BAINES MG, BLASCHUK OW. Characterization of cadherins expressed by murine thymocytes. *Cell Immunol* 1996; **169**: 309–1996.
- [59]NAQUET P, NASPETTI M, BOYD R. Development, organization and function of the thymic medulla in normal, immunodeficient or autoimmune mice. *Sem Immunol* 1999; **11**: 47–55.
- [60]NASPETTI M, AURRAND-LIONS M, DeKONING J, MALISSEN M, GALLAND F, LO D, NAQUET P. Thymocytes and RelB-dependent medullary epithelial cells provide growth-promoting and organisation signals, respectively, to thymic medullary stromal cells. *Eur J Immunol* 1997; **27**: 1392–1397.
- [61]NEHLS M, PFIEFER D, SCHORPP M, HEDRICH HJ, BOEHM T. New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse and rat *nude* mutation. *Nature* 1994; **372**: 103–107.
- [62]NEHLS M, KYEWSKI B, MESSERLE M, WALDSCHUTZ R, SCHUDDEKOPF K, SMITH AJH, BOEHM T. Two genetically separable steps in the differentiation of thymic epithelium. *Science* 1996; **272**: 886–888.
- [63]NELSON AJ, HOSIER S, BRADY W, LINSLEY PS, FARR AG. Medullary thymic epithelium expresses a ligand for CTLA4 *in situ* and *in vitro*. *J Immunol* 1993; **151**: 2453–2461.
- [64]NELSON AJ, DUNN RJ, PEACH R, ARUFFO A, FARR AG. The murine homolog of human Ep-CAM, a homotypic adhesion molecule, is expressed by thymocytes and thymic epithelial cells. *Eur J Immunol* 1996; **26**: 401–408.
- [65]NEUBUSER A, KOSEKI H, BALLING R. Characterization and developmental expression of *Pax9*, a paired-box-containing gene related to *Pax1*. *Dev Biol* 1995; **170**: 701–716.
- [66]NEUBUSER A, KRATOCHWIL K, BALLING R. *Pax9*-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes Dev* 1998; **12**: 2735–2747.
- [67]OOSTERWEGEL MA, HAKS MC, JEFFRY U, MURRAY R, KRUISBEEK AM. Induction of TCR gene rearrangements in uncommitted stem cells by a subset of IL-7 producing, MHC class-II-expressing thymic stromal cells. *Immunity* 1997; **6**: 351–360.
- [68]OSTALSKA D, BRELIŃSKA R, ZABEL M. Histogenesis of epithelial cells in the rat thymus. *Folia Morphol* 1998; **51**: 45–46.
- [69]OSTALSKA D, BRELIŃSKA R, JAROSZEWSKI J. Pattern of cytokeratin 8 expression in the developing rat thymus. *Folia Histochem Cytobiol* 1999; **37**: 159–160.
- [70]OSTALSKA D. Różnicowanie komórek nabłonkowych w rozwoju zrębu grasicy szczura w świetle badań immunohistochemicznych i ultrastrukturalnych. *Rozprawa doktorska*, Poznań, Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego, 2000.
- [71]OSTALSKA D, KACZMAREK E, BRELIŃSKA R. Kinetyka rozwoju zrębu grasicy w okresie embrionalnym. *Folia Histochem Cytobiol* 2000, w druku.
- [72]PACZKOWSKA-FAJGARA A. Immunohistochemiczna charakterystyka komórek nabłonkowych zrębu grasicy ciężarnych szczurzy. *Rozprawa doktorska*, Poznań, Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego, 1999.

- [73]PASSONI L, HOFFMAN ES, KIM S, CROMPTON T, PAO W, DONG MQ, OWEN MJ, HAYDAY AC. Intrathymic δ selection events in $\gamma\delta$ cell development. *Immunity* 1997; **7**: 83–95.
- [74]PETERS H, NEUBUSER A, KRATOCHWIL K. *Pax9*-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes Dev* 1998; **12**: 2735–2747.
- [75]PORCELLINI S, PANIGADA M, GRASSI F. Molecular and cellular aspects of induced thymus development in recombinase-deficient mice. *Eur J Immunol* 1999; **29**: 2476–2483.
- [76]RADTKE F, WILSON A, STARK G, BAUER M, van MEERWIJK J, MACDONALD HR, AGUET M. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch 1. *Immunity* 1999; **10**: 547–555.
- [77]RITTER MA, BOYD RL. Development in the thymus: it takes two to tango. *Immunol Today* 1993; **14**: 462–469.
- [78]ROBERT FR, MARTENS H, CORMANN N, BENHIDA A, SCHOENEN J, GEENEN V. The recognition of hypothalamo-neurohypophysial functions by developing T cell. *Dev Immunol* 1992; **12**: 131–140.
- [79]SACEDON R, VICENTE A, VARAS A, JIMENEZ E, ZAPATA AG. Early differentiation of thymic dendritic cells in the absence of glucocorticoids. *J Neuroimmunol* 1999; **94**: 103–108.
- [80]SALOMON DR, CRISA L, MOJCIK CF, ISHII JK, KLIER G, SHEVACH EM. Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed by cortical epithelial cells and mediates thymocytes adhesion. Implications for the function of $\alpha 4\beta 1$ (VLA4) integrin in T-cell development. *Blood* 1997; **89**: 2461–2471.
- [81]SAMMS M, PHILP D, EMANUS F, OSUJI O, PEZZANO M, GUYDEN JC. Lysosomal-mediated degradation of apoptotic thymocytes within thymic nurse cells. *Cell Immunol* 1999; **197**: 108–115.
- [82]SCAMBLER PJ. Deletions of human chromosom 22 and associated birth defect. *Curr Opin Genet Dev* 1993; **3**: 432–437.
- [83]SCHUURMAN H-J, KUPER CF. Pathology of the thymus: changes induced by xenobiotics and gene targeting. *APMIS* 1995; **103**: 481–500.
- [84]SCHUURMAN H-J, KUPER CF, KENDALL MD. Thymic microenvironment at the light microscopic level. *Microsc Res Tech* 1997; **38**: 216–226
- [85]SCREPANTI I, SCARPA S, MECO D, BELLAVIA D, STUPPIA L, FRATI L, MODESTI A, GULINO A. Epidermal growth factor promotes a neuronal phenotype in thymic epithelial cells and enhances neuropoietic cytokine expression. *J Cell Biol* 1995; **130**:183–192.
- [86]SCUPOLI MT, FIORINI E, MARCHISIO PC, POFPE O, TAGLIABUE E, BRENTGANI M, TRIDENTE G, RAMARLI D. Lymphoid adhesion promotes human thymic epithelial cell survival via NF-(κ)B activation. *J Cell Sci* 2000; **113**: 169–177.
- [87]SECHRIST J, SERNEZDZIJA G, SCHERSON T, GRASER S, BRONNER-FRASER M. Segmental migration of the hindbrain neural crest does not arise from segmental migration. *Development* 1993; **118**: 691–703.
- [88]SHEZEN E, OKON E, BEN-HUR H. Cytokeratin expression in human thymus: immunohistochemical mapping. *Cell Tissue Res* 1995; **279**: 221–231.
- [89]SHINOHARA T, HONJO T. Studies *in vitro* on the mechanism of the epithelial/mesenchymal interaction in the early fetal thymus. *Eur J Immunol* 1997; **27**: 522–529.
- [90]SHORES EW, VAN EWIK W, SINGER A. Maturation of medullary thymic epithelium requires thymocytes expressing fully assambled CD3-TcR complex. *Int Immunol* 1994; **6**: 1393–1402.
- [91]SINGER KH, DENNING SM, WHICHARD LP, HAYNES BF. Thymocyte LFA-1 and thymic epithelial cell ICAM-1 molecules mediate binding of activated human thymocytes to thymic epithelial cells. *J Immunol* 1990; **144**: 2931–2939.
- [92]SU D, MANLEY NR. *Hoxa3* and *Pax 1* transcription factors regulate the ability of fetal thymic epithelial cells to promote thymocyte development. *J Immunol* 2000; **164**: 5753–5760.

- [93] SURH CD, ERNST B, SPRENT J. Growth of epithelial cells in the thymic medulla is under the control of mature T cells. *J Exp Med*. 1992; **176**: 611–616.
- [94] TATSUMI Y, DELUCA D, CRON RQ, BLUESTONE JA. Differential effects of T cell receptor ligation of TCR on thymocyte development in fetal thymic organ culture. *Thymus* 1995; **23**: 131–153.
- [95] TOMITA K, HATTORI M, NAKAMURA E, NAKANISHI S, MINATO N, KAGEYAMA R. The bHLH gene HES 1 is essential for expansion of early T cell precursors. *Genes Dev* 1999; **13**: 1203–1213.
- [96] TSUZUKI T, TAKAHASHI M, ASAIN, IWASHITA T, MATSUYAMA M, ASAI J. Spatial and temporal expression of the *ret* proto-oncogene product in embryonic, infant and adult rat tissues. *Oncogene* 1995; **10**: 191–198.
- [97] VAN EWIJK W, SHORES EW, SINGER A. Crosstalk in the mouse thymus. *Immunol Today* 1994; **15**: 214–217.
- [98] VAN EWIJK W, WANG BP, HOLLANDER G, KAWAMOTO H, SPANOPOULOU E, ITOI M, AMAGAI T, JIANG Y-F, GERMERAAD WTV, CHEN W-F, KATSURA Y. Thymic microenvironments, 3-D versus 2-D? *Semin Immunol* 1999; **11**: 57–64.
- [99] VAN EWIJK W, HOLLANDER G, TERHORST C, WANG B. Stepwise development of thymic microenvironments *in vivo* is regulated by thymocyte subsets. *Development* 2000; **127**: 1583–1591.
- [100] VICENTE A, VARAS A, ALONSO L, GOMEZ DE MORAL M, ZAPATA AG. Ontogeny of rat thymic dendritic cells. *Immunology* 1994; **82**: 75–81.
- [101] VICENTE A, VARAS A, SACEDON VR, ZAPATA AG. Histogenesis of the epithelial component of rat thymus: an ultrastructural and immunohistological analysis. *Anat Rec* 1996; **244**: 506–519.
- [102] VON GAUDECKER B, KENDALL MD, RITTER MA. Immuno-elektron microscopy of the thymic epithelial microenvironment. *Microsc Res Tech* 1997; **38**: 237–249.
- [103] WALLIN J, EIBEL H, NEUBUSER A, WILTING J, KOSEKI H, BALLING R. *Pax1* is expressed during development of the thymus epithelium and is required for normal T-cell maturation. *Development* 1996; **122**: 22–30.
- [104] WENDLING O, DENNEFELD, CHAMBON P, MARK M. Retinoid signaling is essential for patterning the endoderm of the third and fourth pharyngeal arches. *Development* 2000; **127**: 1553–1562.
- [105] WERNECK CC, OLIVEIRA-DOS-SANTOS AJ, SILVA LC, VILLA-VERDE DM, SAVINO W, MOURAO PA. Thymic epithelial cells synthesize a heparan sulfate with a highly sulfated region. *J Cell Physiol* 1999; **178**: 51–62.
- [106] WIEMANN M, EHRET G. Subcellular localization of immunoreactive oxytocin within thymic epithelial cells of the male mouse. *Cell Tissue Res* 1993; **273**: 79–87.
- [107] WILKINSON B, OWEN JJT, JENKINSON EJ. Factors regulating stem cell recruitment to the fetal thymus. *J Immunol* 1999; **162**: 3873–3881.
- [108] WURBEL MA, PHILIPPE JM, NGUYEN C, VICTORERO G, FREEMAN T, WOODING P, MIAZEK A, MATTEI MG, MALISSEN M, JORDAN BR, MALISSEN B, CARRIER A, NAQUET P. The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9. *Eur J Immunol* 2000; **30**: 262–271.
- [109] ZLOTNIK A, MOORE T. Cytokine production and requirements during T-cell development. *Curr Opin Immunol* 1995; **7**: 206–213.

Adres autora: 60-781 Poznań, ul. Świącickiego 6

INFORMACJE DLA AUTORÓW

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

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

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

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

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

Tekst pracy i załączniki należy przysyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 w układzie normalnym 1800 znaków na stronie. Ostateczna wersja tekstu i rysunki (wskazówki s. 657) powinna być przysłana na dyskietce 3,5" jako plik (file) Windows lub ASCII. Pierwsza strona nienumerowana przeznaczona dla redakcji winna zawierać: imiona, nazwiska, tytuły naukowe autorów i adresy: w pracy, domowy wraz z telefonem i e-mail, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rysunków. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następna strona powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 1 str.) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (Index Medicus), o ile są tam zawarte. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rysunków, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, rys. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawić alfabetycznie według następującego wzoru:

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

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

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

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu doby. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 1 egz. zeszytu PBK z opublikowaną pracą oraz mogą zamówić odbitki odpłatnie odsyłając korektę. Redakcja prosi o propozycję do 5 osób (nazwisko, imię, adres, fax), które byłyby odpowiednimi recenzentami maszynopisu, nie powinny jednak być pracownikami instytucji, w której pracuje autor, ani jego współpracownikami. Poprawioną po recenzji wersję pracy należy zwrócić do redakcji koniecznie w ciągu 30 dni. Redakcja zrezygnuje z publikacji maszynopisu, którego autorzy do 30 dni nie odpowiedzą na list redaktora.

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

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

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

podpisy wszystkich autorów

TREŚĆ – CONTENTS

NOWOTWORY: BIOLOGIA, GENETYKA, IMMUNOLOGIA CANCER: BIOLOGY, GENETICS, IMMUNOLOGY	1
Wprowadzenie – Introduction	3
BARTNIK E., LORENC A.: Nowotwory a geny – Genes and cancer	5
GRZELAKOWSKA-SZTABERT B.: Apoptoza i nowotwory – Apoptosis and tumors	9
BALIŃSKA M., BRZEZIŃSKA A., WIŃSKA P.: Nowotwory a starzenie – Cancer and aging	45
PIKUŁA S.: Lipidy komórki nowotworowej – Wybrane zagadnienia Lipids of cancer cell – Selected topics	57
SIEDLECKI J. A.: Zastosowanie diagnostyki genetycznej w chorobach nowotworowych – Genetic diagnostics of cancer	79
KAWIAK J., HOSER G.: Niektóre mechanizmy immunologiczne w nowotworach. Immunoterapia nowotworów w modelach zwierzęcych oraz w klinice Immunological mechanisms in cancer. Cancer immunotherapy in animal models and in the clinic	91
RÓŻNICOWANIE KOMÓREK EUKARIOTA – DIFFERENTIATION OF EUKARYOTIC CELLS	119
Wprowadzenie – Introduction	120
KLOC M., BILIŃSKI S.: Lokalizacja morfogenów w oocytach kręgowców Localization of maternal determinants in the oocytes of vertebrates	121
MALESZEWSKI M.: Różnicowanie się komórek we wczesnych stadiach rozwoju myszy – Cellular differentiation in early development of the mouse	133
WÓJTOWICZ R.: Metody transfekcji komórek eukariotycznych przy użyciu odczynników GIBCO BRL – GIBCO BRL reagents for Eukaryotic transfections	145
MORACZEWSKI J.: Regulacja miogenezy – Regulation of myogenesis	150
BRELIŃSKA R.: Różnicowanie komórek nabłonkowych grasicy Differentiation of the thymic epithelial cells	151