

Nr indeksu 362808
PL ISSN 0023-4249

Polskie Towarzystwo Przyrodników
im. KOPERNIKA

KOSMOS

BIOLOGIA NOWOTWORÓW



Tom 44

WARSZAWA 1995

Numer 2 (227)

ERRATA

W artykule Piotra Mikołajczyka — *Wpływ inhibitorów syntezy chityny na produkcję kutikuli in vitro w dyskach imaginalnych skrzydeł larw Spodoptera frugiperda (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)* prawidłowe streszczenie w języku angielskim powinno brzmieć:

EFFECT OF CHITIN SYNTHESIS INHIBITORS ON CUTICLE PRODUCTION IN VITRO IN WING IMAGINAL DISCS OF SPODOPTERA FRUGIPERDA (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) LARVAE

Summary

Chitin is a major supportive component in insect cuticles. Because of its critical importance to insect survival and its absence in plants and vertebrates it is regarded as a good target for selective pesticide action.

The effects of three benzoylphenyl urea chitin synthesis inhibitors, chlorfluazuron (CFA), diflubenzuron (DFB), and teflubenzuron (TFB) on 20-hydroxyecdysone (20-OHE)-stimulated chitin production were studied *in vitro* in wing imaginal discs from the last instar larvae of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera), a major agricultural pest. Chitin synthesis was quantitatively measured as uptake and incorporation of [^{14}C]N-acetyl-D-glucosamine ([^{14}C]NAGA).

All three inhibitors blocked 20-OHE-dependent [^{14}C]NAGA incorporation into chitin by the wing imaginal discs in a similar, dose-dependent manner. Their potency was not affected by the time of their application, i.e. exposures before, during, or after 20-OHE treatment were equally effective in blocking chitin synthesis. The inhibition was rapid and could not be reversed by removing an inhibitor from the culture medium. This may indicate immediate and irreversible binding of the inhibitor molecules in the imaginal disc epithelial cells. However, while all three compounds inhibited [^{14}C]NAGA incorporation, only DFB and TFB in some cases reduced but did not block the uptake of [^{14}C]NAGA by the tissue.

Also, ultrastructural effects of CFA on 20-OHE-stimulated cuticle secretion by the wing imaginal discs were studied using electron microscopy and chitin labelling with Wheat Germ Agglutinin-gold (WGA). Treatment with CFA resulted in two types of structural response depending on the duration of the exposure of the wing discs to the inhibitor: 1) total absence of chitin in procuticle with disrupted architecture (long inhibitor treatment), and 2) formation of procuticle which was WGA-positive but lacked its usual lamellar structure and did not contain polymerized chitin (short inhibitor treatment).

These results suggest that the site of inhibition may reside in the transport of NAGA to the surface of the epithelium and/or final assemblage of NAGA molecules into chitin.

Kosmos 44, nr 1 (226): 43, rok wydania 1995

Redakcja przeprasza Autora i Czytelników za powstałe błędy.

KOSMOS

BIOLOGIA NOWOTWORÓW

Rok założenia 1876

WARSZAWA 1995

MEDYCZNA AGENCJA WYDAWNICZO INFORMACYJNA

RADA REDAKCYJNA

LESZEK KUŹNICKI (wiceprzewodniczący), WŁODZIMIERZ OSTROWSKI,
HENRYK SZARSKI, PRZEMYSŁAW TROJAN,
ADAM URBANEK (przewodniczący), KAZIMIERZ ZIELIŃSKI

KOMITET REDAKCYJNY

BRONISŁAW CYMBOROWSKI, WŁADYSŁAW
GOLINOWSKI (zastępca redaktora naczelnego), LUCYNA GRĘBECKA,
KAZIMIERZ L. WIERZCHOWSKI (redaktor naczelny),
BARBARA BIERZYŃSKA (sekretarz)

REDAKTOR ZESZYTU

MAŁGORZATA BALIŃSKA

ADRESY REDAKCJI

Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika
ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

Redaktor Naczelny
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa
tel. 658-47-29

Sekretarz
Muzeum i Instytut Zoologii PAN, Wilcza 64, 00-679 Warszawa
tel. 29-32-21 wew. 24

Wydano z pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych

Nr indeksu 362808

PL ISSN 0023-4249

MEDYCZNA AGENCJA WYDAWNICZO INFORMACYJNA

Warszawa, ul. Złota 60/28

Druk: Drukarnia Nr 1, Rakowiecka 37, Warszawa

WPROWADZENIE — BIOLOGIA NOWOTWORÓW

Choroby nowotworowe w długo żyjących społecznościach wysoko rozwiniętych krajów świata są pierwszą przyczyną zgonów, stąd też poznanie przyczyn powstawania nowotworów i wprowadzenie nowych, skutecznych a zarazem mniej drastycznych metod ich zwalczania budzi ogromne zainteresowanie nie tylko wśród wąskiego grona badaczy, ale również szerokiego ogółu społeczeństwa. W Polsce na choroby nowotworowe zapada rocznie ponad sto tysięcy osób, w tym notuje się około tysiąca zachorowań wśród dzieci.

Niezwykle dynamiczny w ostatnich latach postęp w badaniach nad poznaniem molekularnych i komórkowych mechanizmów powstawania nowotworów, pociągający za sobą pojawienie się lepszych metod diagnostycznych i otwierający nowe perspektywy w leczeniu chorób nowotworowych, powoduje ogromny wzrost zainteresowania ich biologicznymi aspektami. Redakcja *Kosmosu* postanowiła więc wydać specjalny zeszyt poświęcony tej problematyce, aby ją przybliżyć Czytelnikom pisma.

Badania ostatnich lat w dużej mierze koncentrują się na genetycznie uwarunkowanych czynnikach własnych organizmu, pobudzających wzrost nowotworowy lub hamujących ten proces. Stąd też wybrane zagadnienia zostały omówione w zeszycie tematycznym *Genetyka w medycynie* (*Kosmos* 3-4 t. 43, 1994) w artykułach DANUTY ROŻYŃKOWEJ, ANTONIEGO HORSTA, ANDRZEJA L. PAWLAKA, KRZYSZTOFA SZYFTERA. W niniejszym zeszycie Czytelnicy znajdą bardziej całościowe ujęcie tej problematyki.

Proces nowotworowy polega na utrwalonej dziedzicznie zmianie w charakterze komórki somatycznej, wynikiem której komórka staje się niepodatna na mechanizmy regulacyjne, kierujące jej wzrostem i różnicowaniem się, co powoduje niepokohamowane podziały komórek prowadzące do powstania nowotworu. Biologii procesów nowotworzenia w szerokim pojęciu jest poświęcony otwierający zeszyt artykuł MIECZYŚŁAWA CHORAŻEGO i KAZIMIERZA DUXA *Wstęp do biologii nowotworów*. Scharakteryzowano w nim również czynniki wywołujące nowotwory i efekty ich działania, a także podano wstępne wiadomości na temat onkogenów i genów supresorowych. Te ostatnie zagadnienia będą się w różnych aspektach przewijały przez większość artykułów stanowiących niniejszy zeszyt *Kosmosu*, a szczegółowo zostały omówione w pracach JANUSZA SIEDLECKIEGO *Molekularne podstawy chorób nowotworowych* i BARBARY GRZELAKOWSKIEJ-SZTABERT *Geny supresorowe — molekularne mechanizmy ich działania i ich znaczenie w kontroli proliferacji komórek*.

JANUSZ LIMON w artykule *Dlaczego cytogenetycy analizują aberracje chromosomowe, które pojawiają się w komórkach nowotworowych człowieka* wyjaśnia związki między zmianami w wyglądzie chromosomów a zmianami genetycznymi

prowadzącymi do takiej deregulacji procesów wzrostu komórki, która powoduje powstanie nowotworu. Ma to kolosalne znaczenie z punktu widzenia diagnostyki, jak również w rokowaniach postępu leczenia nowotworów.

Diagnostyka wielu chorób nowotworowych opiera się nie tylko na określeniu aberracji chromosomowych. Ogromny rozwój wiedzy i technik biologii molekularnej pozwolił na określenie zmian genetycznych prowadzących do powstania danego typu nowotworu. Przyczyniły się do tego w dużym stopniu badania populacyjne nad predyspozycjami dziedzicznymi zachorowalności na nowotwory złośliwe. Niezwykle wnikliwie zagadnienie to zostało omówione w artykule JANA STEFFENA *Uwarunkowania dziedziczne w zachorowaniach na nowotwory złośliwe u ludzi*, w którym pokazano nie tylko różne zespoły genetycznych zmian towarzyszących procesowi nowotworowemu, ale również możliwości diagnostyki i próby, co jest niezwykle ważne z punktu widzenia społecznego, zapobiegania rozwojowi tych nowotworów na drodze odpowiedniej profilaktyki i poradnictwu rodzinnemu. Kolejnym zagadnieniem, które jest istotne ze względu na etiologię procesów nowotworowych jest tworzenie przez wiele nowotworów przerzutów, czyli metastaz. Mechanizmy migracji komórek nowotworowych prowadzące w konsekwencji do wytworzenia metastaz omawia LUCYNA GRĘBECKA w artykule *Migracja komórek nowotworowych w organizmie*.

Zwalczanie chorób nowotworowych na obecnym etapie wiedzy polega głównie na próbach doprowadzenia wybiórczo do śmierci komórek nowotworowych. Stąd też ogromne zainteresowanie mechanizmami śmierci komórki, a szczególnie kontrolowanym genetycznie procesem apoptozy. Zagadnieniu temu jest poświęcony artykuł EWY SIKORY *Apoptoza a onkogeneza*, w którym są poruszone także zagadnienia chemioterapii nowotworowej w aspekcie wywoływanej przez cytostatyki apoptozy. *Biochemiczne podstawy chemioterapii nowotworów*, polegające na regulacji poprzez różnego rodzaju leki (nie tylko cytostatyki) mechanizmów metabolicznych prowadzących do śmierci komórek nowotworowych przy jednoczesnej ochronie dzielących się komórek prawidłowych omawia MAŁGORZATA BALIŃSKA, DOROTA JACEWICZ i KATARZYNA KACZOROWSKA. Jednym z ograniczeń w stosowaniu cytostatyków jest wytwarzanie się oporności komórek na stosowane leki przeciwnowotworowe, a przeciwdziałanie tym zjawiskom jest bardzo trudne i wymaga dużej ostrożności w stosowaniu różnego rodzaju leków. Zagadnienie to omawia BARBARA GRZELAKOWSKA-SZTABERT w artykule *Mechanizmy oporności komórek na leki przeciwnowotworowe*.

W związku z niedogodnościami w powszechnie stosowanej chemioterapii nowotworów współczesna medycyna stara się znaleźć nowoczesne, mniej toksyczne i skuteczniejsze metody zwalczania nowotworów. Należą do nich immunoterapia nowotworów i terapia genowa. Obie metody w pewnym stopniu są komplementarne. Pierwszej metodzie, polegającej między innymi na takiej biernej lub czynnej immunomodulacji organizmu, w wyniku której następuje zniszczenie komórek nowotworowych, jest poświęcony artykuł ZYGMUNTA POJDY *Immunoterapia nowotworów*. Pewnym, bardzo szczególnym uzupełnieniem tej pracy jest artykuł ELŻBIETY WAŁAJTYS-RODE *Czynnik martwicy nowotworów (TNF)* o jednym z endogennych czynników mogących wywoływać immunomodulacyjny efekt w zwalczaniu chorób nowotworowych. Zeszyt zamyka artykuł JERZEGO NOWAKA *Możliwości i perspektywy terapii genowej chorób nowotworowych po-*

święcony genetycznym metodom zwalczania chorób nowotworowych budzącym obecnie rosnącą nadzieję.

Podjmując się przygotowania monotematycznego zeszytu *Kosmosu* poświęconego nowotworom starałam się, jako biolog, skupić na aspektach biologicznych, a nie medycznych tego zagadnienia. Zdaję sobie oczywiście doskonale sprawę, że zebrane artykuły stanowią niepełny przegląd obecnej wiedzy w tej dziedzinie. Wnikliwy Czytelnik może pogłębić swoją wiedzę sięgając do wspomnianego zeszytu *Kosmosu* i do innych polskich czasopism, takich jak *Nowotwory*, czy wydane w ubiegłym roku tematyczne zeszyty *Postępów Biochemii* i *Postępów Biologii Komórki*.

Wszystkim Autorom, którzy zechcieli poświęcić swój cenny czas i przygotować materiały do tomu poświęconego biologicznym podstawom chorób nowotworowych i metodom zwalczania nowotworów, składam tą drogą serdeczne podziękowania.

Matgorzata Balińska

INTRODUCTION IN CANCER BIOLOGY

In highly developed societies, in which life-span is long, cancer is most frequent cause of death. Therefore not only anarrow circle of researches but also ordinary people are keenly interested in carcinogenesis and the efforts of oncologists to introduce new less drastic methods of anticancer therapy. Cancer morbidity in Poland is about ten thousand persons per year, with recognition of one thosand causes among children.

The unusually dynamic progress in studies on molecular and cellular mechanisms of carcinogenesis made within the last few years was accompanied by introduction of better diagnostic methods, opened new perspectives for treatment of cancer and simultaneously led to a greatly increased interest in biological phenomena underlyning its development. That is why the editors have decided to publish a special issue of *Kosmos* devoted to these problems.

Recent studies have been focused mainly on the genetically controlled molecular factors of organisms which promote or inhibit tumor growth. That is the reasons why chosen problems in this field were presented and disscused in *Genetics in Medicine*, a topical issue of *Kosmos* (3-4/43, 1994), in the papers by DANUTA ROŻYŃKOWA, ANTONI HORST, ANDRZEJ L. PAWLAK and KRZYSZTOF SZYFTER.

The development of cancer is a consequence of such transformation of somatic cell, which can generate deregulation of cell division and differentiation, leading malignancy. MIECZYSLAW CHORAŻY and KAZIMIERZ DUX in the first paper of the present issue entitled *Cancer biology — an introduction* — concentrated on biology of carcinogenesis and the action of carcinoges. They presented also some data concerning oncogenes and suppressors genes. JANUSZ SIEDLECKI (*Molecular basis of cancer disease*) and BARBARA GRZELAKOWSKA-SZTABERT (*Suppressors genes — molecular mechanisms of their action and importance for control of cellular proliferation*) disscussed in more detail the tumor suppressors genes, oncogenes and the mechanism of their action in controlling of cell cycle. Many other papers in this issue refer to the same problems. The article by JANUSZ LIMON *Why should chromosome abberations in human neoplastic cells be anlyzed by cytogenetists?* deals with chromosome abberations in cancer cells, which probably play an important role in patogenesis of cancer and can provide a clue to the location of relevant genes and their products as well as to function of the cell. The chromosome abberations specific to the particular type of cancer can also serve as the disease markers that help to reach more precise diagnosis, prognosis and monitoring of the patient treated. Analysis of chromosomal abberations is not the only way of tumor recognition. The progress in molecular biotechnology also can help to define the genetic changes that cause specific tumor types. Epidemiological studies on hereditary cancer predispositions can

help in solving the problem. This very important question is presented by JAN STEFFEN (*Hereditary factors in human cancer*) who discusses recent studies on expression of hereditary gene defects on evaluation hereditary risk, prospects of reducing cancer mortality in carriers through early detection of gene defects, and monitoring of pharmacological treatment. Another essential factor in the development of cancer invasion in this process of metastasis, which has been presented by LUCYNA GRĘBECKA (*Migration of the tumour cells*). The molecular mechanism of migration of normal and neoplastic cells through the surrounding matrix have been outlined.

Selective death of cancer cells is the main aim of present-day anticancer therapy. EWA SIKORA in the paper *Apoptosis and oncogenesis* discusses mechanisms of apoptosis regulation in neoplastic cells and introduction of this process by a variety of antineoplastic drugs. On the other hand, the selective action of the anticancer drug can also be achieved by pharmacological manipulation of the intracellular drugs metabolism within a malignant cell. The rationale of this approach to anticancer chemotherapy has been presented by MAŁGORZATA BALIŃSKA, DOROTA JACEWICZ and KATARZYNA KACZOROWSKA in brief paper *Experimental basis of cancer chemotherapy*. The use of anticancer drugs is limited, among others, by the cell resistance. The cellular mechanism of this phenomenon, including multidrug resistance, is presented by BARBARA GRZELAKOWSKA-SZTABERT in the article *Mechanisms of cellular resistance to anticancer drugs*.

In view of the known disadvantages of cancer chemotherapy, modern medicine is looking for new, less toxic and more powerful methods of cancer treatment. The last decade brought two new tools, two complementary methods: those of gene therapy and immunotherapy. ZYGMUNT POJDA in *Immunotherapy of cancer*, discusses various methods of the immunomodulation of the organism leading to destruction of cancer cells. A very particular aspects connected with immunotherapy has been presented by ELŻBIETA WĄŁAJTYS-RODE in the paper *Tumor necrosis factor (TNF)*. The last position in the issue, *Cancer gene therapy — future applications and perspectives* by JERZY NOWAK, presents gene therapy, a method which now gives rise to great hopes in treatment and prevention of cancer.

When preparing this issue of *Kosmos* on biology of cancer I focused attention on biological, not medical, aspects of the problem. I realize that the papers presented do not bring a comprehensive review of the modern knowledge of the subject. However, some complementary aspects of the biology of cancer were recently presented in *Kosmos* (issue 3/4, vol 43, 1994) and in the 1994 volumes of *Postępy Biochemii* (*Progress in Biochemistry*) and *Postępy Biologii Komórki* (*Progress in Cell Biology*).

I would like to thank very warmly all the Authors who have contributed to present issue of *Kosmos*.

Małgorzata Balińska

MIECZYSLAW CHORAŻY i KAZIMIERZ DUX

*Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie
Zakład Biologii Molekularnej Centrum Onkologii
Armii Krajowej 44, 44-100 Gliwice*

WPROWADZENIE DO BIOLOGII NOWOTWORÓW

Proces nowotworowy polega na utrwalonej dziedzicznie zmianie charakteru komórki somatycznej w wyniku czego komórka staje się niepodatna na mechanizmy regulujące procesy wzrostu i różnicowania (specjalizacji). Masa komórek nowotworowych w organizmie człowieka (zwierzęcia) rośnie w sposób ciągły i autonomiczny.

W medycynie nowotwory złośliwe stanowią problem o wielkiej wadze społecznej, ponieważ zapadalność na nowotwory jest wysoka, choroba jest wyniszczająca i często prowadzi do przedwczesnego zgonu. W Polsce na nowotwory złośliwe zapada każdego roku około 100 000 ludzi.

W medycynie nastawienie badawczego wysiłku na ratowanie organizmu ukierunkowało wyobrażenia o nowotworach według klasycznych pojęć patologii o przyczynach choroby (etiologii) oraz jej pochodzeniu i rozwoju (patogenezie). Celem działania medycznego jest rozpoznanie nowotworów (diagnostyka), ich leczenie (terapia) oraz zapobieganie im (profilaktyka). Wyłoniła się ważna, o rozległym zasięgu specjalność medyczna, zwana onkologią, której zadaniem jest organizacja walki z rakiem, optymalizacja postępowania lekarskiego w klinice nowotworów (onkologia kliniczna), jak i badania podstawowe (onkologia doświadczalna).

PODSTAWOWE, BIOLOGICZNE CECHY NOWOTWORÓW

Historia naturalna nowotworów, a więc ich powstawanie i rozrost w organizmach wielokomórkowych najtrafniej daje się opisać w kategoriach biologii. Nowotwory stanowią jednak nadal wyzwanie dla biologii, gdyż złożoność tego zjawiska, a zwłaszcza na poziomie molekularnym, rodzi stale nowe pytania.

Wzrost nowotworów różni się od wzrostu normalnych tkanek zorganizowanych w narządy: te ostatnie zarówno w stanach prawidłowych, jak i chorobowych podlegają mechanizmom regulacyjnym ustroju. Wszystkie nie nowotworowe rozrosty, odrosty i przerosty są reakcją na uszkodzenie tkanek lub zakłócenie ich czynności i mają charakter wyrównawczy. Komórki normalne, nieraz bardzo żywo proliferujące podczas regeneracji, prędzej czy później zaczynają dojrzewać i przestają się dzielić, co jest wyrazem ich podporządkowania regulującym

mechanizmom ustroju. Brak tego podporządkowania we wzroście nowotworowym rozumiemy jako jeden z przejawów jego autonomii.

W normalnych tkankach dorosłego organizmu stała liczba komórek, mimo szybkiego tempa ich podziału, tłumaczy się kompensacyjnym charakterem proliferacji. Oznacza to, że na przykład w nabłonku jelita tempo proliferacji jest ściśle dostrojone do tempa ubytku komórek w następstwie ich dojrzenia czynnościowego i złuszczenia. Tempo rozmnażania się komórek nowotworowych jest w przybliżeniu takie samo, często nawet mniejsze niż tempo podziału komórek wielu tkanek prawidłowych. Nowotwory zwiększają jednak swoją objętość mimo względnie słabego tempa podziałów komórkowych głównie dlatego, że zachwiała się w nich równowaga między przyrostem a utratą komórek. W populacji komórek nowotworowych mniejsza liczba komórek ginie lub wyłącza się z cyklu życiowego, niż stanowi ich przybytek w wyniku podziałów.

Komórki nowotworowe, rozmnażając się w miejscu swego powstania, tworzą ogniskowe zgrubienie zwane guzem (tumor). Nazwa ta jest używana na ogół w takim samym zakresie i znaczeniu jak „nowotwór”, choć niekiedy rozróżnia się te pojęcia. Jeśli nowotwór przybiera postać guza o kształcie kulistym, dobrze odgraniczonym od tkanki prawidłowej, mówimy o wzroście rozprężliwym, czyli ekspansywnym. W takim przypadku komórki nowotworowe, rosnąc w zwartej masie, nie mieszają się z sąsiednimi komórkami normalnymi, tylko je odsuwają, powodując ich uciskanie i nadając układ koncentryczny sąsiednim strukturom narządu.

Komórki nowotworowe mogą indukować tworzenie się nowej, własnej sieci naczyń krwionośnych — nazywa się to angiogenezą nowotworową. Rozrastające się od obwodu rozgałęzienia naczyń zapewniają odżywianie szybko rosnących guzów i osiąganie przez nie znacznych rozmiarów. W przypadkach, gdy nie dochodzi do rozwoju takich naczyń, centralne okolice guza ulegają martwicy. Angiogeneza nowotworowa tłumaczy się wytwarzaniem i wydzielaniem przez komórki nowotworowe swoistego czynnika wzrostowego, który ma zdolność wybiórczego pobudzania komórek, śródbłonek naczyń włosowatych do rozmnażania. Taki czynnik nazywamy nowotworowym czynnikiem angiogenezy, w skrócie TAF (tumor angiogenic factor).

Często komórki nowotworowe wyosabniają się z pierwotnego ogniska rozrostu i wnikają pomiędzy komórki normalne. Ten proces nazywamy naciekaniem albo infiltracją. Naciekanie i wędrowkę komórek nowotworowych w głąb otaczających tkanek narządu nazywamy inwazją, a zdolność do inwazji, czyli inwazyjność, pojmujemy jako jedną z cech złośliwości nowotworów.

Drugą cechą nowotworów złośliwych jest zdolność do tworzenia przerzutów (*metastasis*). Przerzuty powstają wtedy, gdy pojedyncze komórki lub niewielkie ich agregaty wyosabniają się ze struktury guza pierwotnego i porwane prądem limfy lub krwi przenoszą się do odległych narządów. Część takich komórek, tworząc zatory naczyniowe, zagnieżdża się i rozmnaża, dając nowe ogniska rozrostu.

Nowotwory łagodne, w odróżnieniu od nowotworów złośliwych, są ogniskowymi rozrostami wysoko zróżnicowanych komórek. Przybierają postać guzów, brodawek, wyrosły lub torbieli. Nie mając zdolności do inwazji i przerzutów, są wyraźnie odgraniczone od tkanek sąsiednich, niekiedy otoczone torebką i po

wycięciu lub wyłuszczeniu nie odrastają. Odróżnianie nowotworów złośliwych od nowotworów łagodnych ma swoją dawną tradycję w medycynie ze względu na odmienne postępowanie lecznicze i pomyślną prognozę w przypadkach guzów łagodnych.

NAZEWNICTWO I MORFOLOGIA

Nowotwory w swym bogactwie morfologicznych odmian wymagają odpowiedniej klasyfikacji i nomenklatury. Tradycyjne mianownictwo opracowane dla celów onkologii znalazło również zastosowanie w opisie nowotworów występujących u najrozmaitszych gatunków zwierząt. Wynika to z faktu, że u człowieka nowotwory są częstą chorobą i przedstawiają największą różnorodność typów i odmian, toteż z konieczności zostały najlepiej poznane pod względem histologicznym.

Nowotwór może rozwinać się w obrębie każdego narządu, w którym zachodzą podziały komórkowe. Toteż podstawą klasyfikacji nowotworów jest ich morfologiczne podobieństwo do narządów i tkanek, w obrębie których się rozwinęły. Komórki nowotworowe mogą przejawiać znaczny stopień zdolności do różnicowania się i organizowania w narząd (tak zwane zdolności histoformatywne). W następstwie reagowania komórek nowotworowych pochodzenia nabłonkowego z normalnymi komórkami tkanki łącznej mogą wytwarzać się histologiczne struktury charakterystyczne dla narządu.

Nazwę dla nowotworów tworzy się przez dodanie końcówki -ak do rdzenia nazwy tkanki czy narządu. Kończówka ta przypomina tradycyjne określenie „rak”. Najbardziej ogólny podział wynika z rozróżnienia nowotworów wywodzących się z tkanek nabłonkowych, zwanych nabłoniakami (*epithelioma*), oraz z tkanek łącznych czyli mięsaków (*sarcoma*). W grecko-łacińskich odpowiednikach nazw nowotworów występuje końcówka -oma od *carcinoma*. Jeśli na podstawie badania histologicznego nie można o nowotworze nic powiedzieć ponad to, że jest nabłoniakiem albo mięsakiem (niekiedy nawet i takie rozróżnienie jest niemożliwe) — mówimy o nowotworach anaplastycznych, a więc bardzo słabo zróżnicowanych pod względem morfologicznym. Jeśli dobrze jest znane umiejscowienie pierwotnego ogniska rozrostu guza anaplastycznego, możemy do nazwy nabłoniak lub mięsak dodać jako bliższe określenie nazwę narządu czy okolicy ciała.

Jeśli w mięsaku pojawiają się struktury będące produktem czynności komórek łącznotkankowych, tworzymy nazwy złożone, na przykład włókniakomięsak (*fibrosarcoma*), śluzakomięsak (*myxosarcoma*), mięsak kostny (*osteosarcoma*), mięsak chrzęstny (*chondrosarcoma*).

Jeżeli w nowotworze pochodzenia łącznotkankowego przeważają produkty czynności komórkowej, natomiast same komórki nowotworowe rozmnażają się leniwie, guz zaś w całości ma kliniczne cechy nowotworu łagodnego, używamy nazw charakteryzujących wyłącznie produkt czynności komórek nowotworowych, na przykład: włókniak (*fibroma*), chrzęstniak (*chondroma*), kostniak (*osteoma*), śluzak (*myxoma*).

Takie same reguły obowiązują w określaniu nowotworów wywodzących się z układu chłonnego, czyli z narządów limfoidalnych, na przykład mięsak limfa-

tyczny (*lymphosarcoma*), chłoniak (*lymphoma*). *Plasmocytoma* oznacza nowotwór wywodzący się z komórek plazmatycznych. Ponieważ nowotwór ten u człowieka rozwija się wieloogniskowo w szpiku kostnym, nazwano go szpiczakiem mnogim (*myeloma multiplex*).

Nowotwory wywodzące się z różnych składników układu krwiotwórczego nazywamy białaczkami (*leucaemia*), gdyż komórki nowotworowe, na wzór komórek normalnych, przedostają się obficie do krwi, nadając jej białawe, jakby mleczne podbarwienie. Niektóre jednakże białaczki rosną w postaci guzów lub nacieków umiejscowionych w jednym z narządów limfoidalnych, jak węzły chłonne czy śledziona, a niekiedy rozmnażają się w jamie otrzewnowej.

PROLIFERACJA KOMÓREK, PROGRESJA I STADIALNOŚĆ ROZWOJU NOWOTWORÓW

Podstawową koncepcją w biologii nowotworów jest zwiększona proliferacja (namnażanie) zmienionych nowotworowo komórek. Istotnie, zjawisko nowotworzenia jest immanentnie związane z podziałami komórkowymi. Kontrola podziałów komórkowych w organizmie jest złożona i stale poznajemy jej nowe ogniwa i elementy molekularnych mechanizmów regulujących cykl komórkowy. Tempo podziałów komórkowych jest różne dla różnych komórek organizmu i jest w stanie dynamicznej równowagi z wymieraniem komórek. Niektóre komórki nie dzielą się wcale, na przykład komórki nerwowe i komórki mięśni prążkowanych. Nie jest jasne, czy wysoki stopień proliferacji komórkowej jest sam w sobie czynnikiem grającym istotną rolę w powstawaniu i rozwoju nowotworu. Jeśli stoimy na stanowisku, że rak jest wynikiem mutacji somatycznej, a replikacja DNA zachodząca w każdym cyklu komórkowym ma pewien stopień naturalnej skłonności do popełniania błędów (na przykład spontaniczne zmiany tautomeryczne, występujące w nukleotydach) to wysokie tempo proliferacji *per se* może być elementem karcynogenezy.

Komórki rosnące przechodzą cykl komórkowy złożony z dwóch zasadniczych okresów: interfaza i podział komórki. W istocie można w cyklu wyróżnić kilka dyskretnych faz. Replikacja DNA zachodzi w fazie S w okresie interfazy. Poprzedza ją faza G₁ — okres, w którym zachodzi stała synteza makrocząsteczek (RNA, białek) i toczą się głównie procesy metaboliczne. Po fazie S następuje krótkotrwała faza G₂ i podział komórki (faza M). Komórki nieproliferujące (komórki nerwowe, komórki mięśni prążkowych) są zatrzymane w fazie określanej jako G₀, której cechą jest brak procesów przygotowawczych do replikacji DNA. Również inne komórki organizmu, które nie zwiększają swej masy i nie wchodzą w cykl komórkowy pozostają w fazie G₀. W takich komórkach, zwanych komórkami spoczynkowymi, toczą się wszystkie charakterystyczne funkcje i procesy z wyjątkiem funkcji i procesów przygotowawczych do replikacji DNA. W fazie G₀ pozostają także komórki hodowane w kulturach komórkowych, gdy pozbawi się je czynników odżywczych i wzrostowych.

Znamy znaczną liczbę czynników wzrostowych, krążących w ustroju i stanowiących elementy złożonego układu, który sygnalizuje komórce potrzebę wzrostu. Czynniki te poprzez system receptorów błonowych i cytoplazmatycznych

uruchamiają molekularny system transmisji sygnału aktywujący geny niezbędne dla rozpoczęcia reakcji przygotowawczych dla replikacji DNA. Krytycznym momentem określanym jako „punkt restrykcyjny” (R) jest krótki okres w końcowej fazie G₁, gdzie następuje decyzja co do rozpoczęcia replikacji DNA. Molekularne podłoże mechanizmów operujących w punkcie restrykcyjnym obejmują interakcje wielu genów, w tym genów kodujących, czynniki transkrypcyjne, cykliny, genów supresorowych (porównaj niżej) oraz swoistych kinaz białkowych. Zdarzenia molekularne zachodzące w punkcie restrykcyjnym są istotne dla procesu nowotworowego.

Nowotwory w swym naturalnym rozwoju ujawniają szereg skokowych zmian, zmierzających w kierunku coraz to większej złośliwości. Śledzenie zmienności morfologicznej raków gruczołu młecznego i płuc myszy doprowadziło Fouldsa do sformułowania ogólnych prawidłowości w rozwoju raka, które zostały nazwane progresją nowotworów. Według tej koncepcji rozwój złośliwych nowotworów jest procesem złożonym, który polega na pojawieniu się różnych i rozmaicie kombinujących się cech jednostkowych.

Spośród licznych cech nowotworów rosnących w organizmie, najłatwiej dostępne dla obserwacji są następujące: przyspieszanie tempa wzrostu, utrata zdolności do różnicowania, pojawienie się zdolności do naciekania (inwazyjność), do tworzenia przerzutów, do wzrostu w formie wysiękowej w przypadku przeniknięcia komórek do jamy otrzewnowej lub opłucnej, stopniowe uniezależnianie się od wpływów hormonalnych, utrata zdolności do wytwarzania i wydzielania określonych substancji, które są charakterystyczne dla zróżnicowanych komórek macierzystych.

Ogólną regułą w rozwoju nowotworów jest długi czas utajenia choroby. Upływa wiele lat między czasem ekspozycji na ewidentny czynnik przyczynowy, jak na przykład promieniowanie jonizujące lub określony związek chemiczny, zwłaszcza narządowo swoisty, a klinicznym ujawnieniem nowotworu.

W naturalnym rozwoju nowotworów pierwszą fazę nazywamy zapoczątkowaniem (inicjacja). Inicjacja dotyczy indukowanych czynnikiem rakotwórczym zmian w pojedynczej komórce. Współczesna nauka wskazuje, że pierwotna zmiana w fazie inicjacji polega na mutacji w takim kluczowym genie, który może determinować niekontrolowany wzrost i tłumić procesy różnicowania. Taka komórka, nosząca „piętno nowotworowe” może pozostawać przez długi okres w stanie „uśpienia” do czasu, gdy pojawią się następne mutacje i nastąpią dalsze uszkodzenia molekularnych mechanizmów kontrolujących wzrost. Morfologicznie zaawansowana inicjacja może przejawiać się jako nieprawidłowy rozrost komórek.

Progresja nowotworów pojmowana pierwotnie jako skokowa zmienność fenotypowa znalazła swą interpretację genetyczną dzięki badaniom doświadczalnym nad karcynogenezą, która z reguły okazywała się procesem wielostopniowym. Klasycznym przykładem takiej stadialności jest możliwość wyróżnienia dwóch stadiów w rozwoju raków skóry. W pierwszym substancja rakotwórcza powodując mutację zapoczątkowuje proces (inicjacja). W drugim — kokarcynogen, uruchamiając mechanizmy epigenetyczne doprowadza do ekspresji cech złośliwości (promocja). Zrakowaciałe komórki zaczynają się mnożyć w sposób niekontrolowany (progresja).

Transformacja nowotworowa komórek w hodowli *in vitro* również przebiega dwustopniowo. Pierwszą zmianą jest tak zwana immortalizacja, czyli unieśmiertelnienie komórek, druga zaś zmiana polega na pojawieniu się zdolności tumorogennych. Należy tu wyjaśnić, że komórki izolowane z organizmu i hodowane *in vitro* dzielą się jedynie przez ograniczony okres, dając w wyniku najwyżej 20–50 generacji, później zaś zamierają. W obrębie takiej populacji komórek o ograniczonym okresie życia może wyłonić się linia zdolna do ciągłego rozmnażania, a więc nieśmiertelna, jeśli tylko zostanie zapewniona dla niej przestrzeń i odżywianie. Linie ciągle pojawiają się bądź w następstwie samoistnych mutacji, które zdarzają się rzadko, bądź też w następstwie mutacji indukowanych przez czynniki karcynogenne. Linie ciągle są fenotypowo bardzo zbliżone do komórek normalnych i nie mają zdolności tumorogennych, a więc po wszczepieniu do organizmu zwierzęcego nie rosną. Jeśli w obrębie linii ciągłej zdarzy się druga mutacja, lub jeśli wprowadzi się do komórek na drodze transfekcji jeden z genów *c-onc*, to może dojść do pełnej transformacji nowotworowej. Wyraża się ona zanikiem hamowania kontaktowego, a przyczepność do podłoża (tak zwane zakotwiczenie) przestaje być warunkiem wzrostu. Komórki po wszczepieniu zwierzęciu rosną w postaci guza, są więc tumorogenne.

Ogólnie można powiedzieć, że skokowe zmiany fenotypowe obserwowane podczas procesu złośliwienia nowotworów są wyrazem mutacji, zachodzących w różnych generacjach tej samej linii komórek. Każda następna generacja przerasta poprzedzającą i w ten sposób ostatnia populacja mutantów przedstawia się jako jeden klon, w którym doszło do nagromadzenia się wielu jednostkowych cech złośliwości. Za taką interpretacją, sięgającą 1957 roku, przemawiają badania statystyczne nad zależnościami między częstością występowania nowotworów u ludzi a wiekiem ich życia. Badania statystyczne doprowadziły wielu badaczy do sformułowania hipotezy, że przeciętnie zachodzi 6 lub 7 kolejnych mutacji, zanim u człowieka rozwinie się populacja złośliwych komórek, dających pełny obraz kliniczny choroby nowotworowej.

Rozwój nowotworów złośliwych u ludzi jest również wieloetapowy. Każda z następujących po sobie faz rozwojowych ma charakterystyczne cechy morfologiczne. Podłoże stadialnego rozwoju na poziomie molekularnym jest jeszcze słabo poznane. Z badań grupy B. Vogelsteina nad rozwojem raka jelita grubego rysuje się pewien obraz sekwencji zdarzeń mutacyjnych w genach *onc* i genach supresorowych. W miarę wzbogacania naszej wiedzy molekularne modele opisujące stadialność rozwoju nowotworów ulegają rozszerzeniu i modyfikacji.

Każdy czynnik środowiskowy, który zwiększa częstość występowania nowotworów w populacji człowieka i zwierząt nazywamy czynnikiem rakotwórczym albo karcynogennym lub też krócej karcynogenem. Unikamy świadomie i celowo określenia „czynnik onkogenny”, gdyż w języku polskim fonetyczne podobieństwo może skłaniać do błędnych skojarzeń z onkogenami, czyli genami *onc*. Czynniki rakotwórcze są niestylachanie różnorodne i najogólniej można je podzielić na chemiczne, fizyczne i biologiczne. Do pierwszych należy ogromna liczba substancji z rozmaitych grup chemicznych, do drugich — promieniowanie jonizujące i UV, a do trzecich — wirusy karcynogenne, zwane też tradycyjnie wirusami onkogennymi.

CZYNNIKI RAKOTWÓRCZE

KARCINOGENY CHEMICZNE

Karcynogenami chemicznymi nazywamy substancje, które w swej aktywnej postaci mogą wiązać się kowalennie z DNA komórek i — powodując zmiany genetyczne o charakterze mutacji — mogą w organizmie zapoczątkować ogniska transformacji.

Genetycznym efektem rozmaitych reakcji chemicznych między karcynogenami a DNA jest mutacja, a więc trwała zmiana informacji strukturalnej bądź regulacyjnej lub też obu jej rodzajów. Mutacje genów kodujących białka o kluczowych funkcjach komórkowych, w tym genów *onc* i genów supresorowych mogą stanowić istotę karcynogenezy chemicznej.

Od karcynogenów, które działając mutagennie i zapoczątkowują proces nowotworowy, odróżniamy kokarcynogeny, które — wywołując odwracalne początkowo zmiany epigenetyczne — powodują promocję nowotworów, czyli ekspresję ich cech złośliwości.

Jednym z kryteriów, które rozstrzyga o przypisaniu jakiejś substancji chemicznej właściwości rakotwórczych jest wykazanie, że substancja ta, sprawdzana w odpowiedni sposób na grupie zwierząt doświadczalnych, zwiększa częstość powstawania nowotworów — w porównaniu z grupą kontrolną. Drugim jest ewidentny, udokumentowany badaniami epidemiologicznymi związek przyczynowy między ekspozycją (głównie zawodową) na określony czynnik chemiczny a zapadalnością na określony nowotwór w populacji ludzkiej.

Wstępem do czasochłonnych i kosztownych testów na zwierzętach laboratoryjnych jest sprawdzanie, czy substancje chemiczne podejrzane o właściwości rakotwórcze są mutagenne dla bakterii. W teście bakteryjnym opracowanym w laboratorium w 1973 roku przyjęto założenie, że właściwości karcynogenne są identyczne z mutagennymi. Znalazło to potwierdzenie w fakcie, że niemal wszystkie znane karcynogeny dały w teście Amesa wynik dodatni, natomiast substancje nierakotwórcze z reguły nie przejawiały zdolności mutagennych.

Inny test, używany do sprawdzania różnych substancji chemicznych na karcynogenność, polega na liczeniu ognisk transformacji komórek w hodowlach poza ustrojem. Wartość tego testu, oceniana według stopnia zbieżności wyników pozytywnych i negatywnych z testami na zwierzętach, jest zbliżona do testu Amesa.

Niektóre karcynogeny chemiczne, na przykład uretan, są aktywne biologicznie w takiej postaci, w jakiej istnieją poza organizmem.

Większość substancji rakotwórczych, występujących w środowisku człowieka i używanych w badaniach doświadczalnych, a więc między innymi policykliczne węglowodory rakotwórcze (ang. PAH — polycyclic aromatic hydrocarbons), na przykład benzopyren, metylocholantren, dwubenzooantracen oraz aminy aromatyczne (na przykład acetyloaminofluoren), mykotoksyny (na przykład aflatoksyna B1) jest nieczynna w swej trwałej, naturalnej postaci i ulega aktywacji dopiero po przemianach metabolicznych w organizmie. Tego rodzaju substancje nazywa się niekiedy prokarcynogenami. Ich przetworzenie w ostate-

czne karcynogeny dokonuje się pod wpływem odpowiednich cytozolowych i mikrosomalnych enzymów (monooksygenazy, epoksydazy), których obecność stwierdzono w komórkach wielu narządów organizmu. Enzymy biorące udział w aktywacji metabolicznej PAH są kodowane przez rodzinę genów cytochromu P450 zwanych genami CYP tworzących wielką polimorficzną rodzinę (około 150 genów). Aktywacja metaboliczna substancji rakotwórczych (a ściślej ksenobiotyków, czyli związków chemicznych nie mających dla organizmu wartości odżywczych) stanowi tak zwaną fazę I procesu odtruwania. Aktywny chemicznie ksenobiotyk jest następnie sprzęgany (faza II) z na przykład glutationem do rozpuszczalnego w wodzie kompleksu, który wydala się z moczem. Proces sprzęgania z glutationem jest pod kontrolą S-transferazy glutationowej, kodowanej przez geny GST. Związki rakotwórcze aktywowane w fazie I mogą jednak uciekać z naturalnego toru odtruwania i tworzyć koniugaty z białkiem RNA i DNA jako tak zwane addukty. Addukty DNA stanowią wstępny etap mutacji, między innymi genów *onc*. Przy jednakowej ekspozycji na ten sam karcynogen indywidualne ryzyko wystąpienia raka jest bardzo różne. Fakt indywidualnej wrażliwości na czynniki rakotwórcze i predyspozycji do zapadania na nowotwory zależy od genotypu w zakresie polimorficznych genów CYP i genów GST. Genotyp determinujący fenotyp intensywnie metabolizujący ksenobiotyki w fazie I jest związany z podwyższonym ryzykiem zapadalności na raka płuc i innych narządów. Interesujący jest fakt, że w rasie kaukaskiej około 50% populacji ma genotyp *GSTM1* typu zero/zero, czyli nie ma zdolności przeprowadzenia reakcji fazy II.

Do prokarcynogenów zaliczamy tak zwane prekursory karcynogenów, a więc substancje, które nie są groźne w swej naturalnej postaci, w pewnych warunkach jednak mogą w organizmie stanowić materiał do syntezy substancji o bardziej złożonej budowie wykazującej aktywność rakotwórczą. Za przykład niech posłużą azotyny, które wraz z aminami drugorzędowymi mogą w obecności kwasu solnego żołądka łączyć się w nitrozoaminy, którym przypisuje się wielkie znaczenie w powstawaniu niektórych nowotworów u człowieka.

Sądzi się, że indywidualna predyspozycja do rozwoju nowotworu może zależeć między innymi od genotypu warunkującego przemiany metabolizmu karcynogenów (utlenianie, acetylacja), tworzenie adduktów DNA i naprawy uszkodzeń w DNA.

KOKARCENOGENY

Doświadczenia nad rozwojem raków skóry u zwierząt doświadczalnych doprowadziły do wniosku, że karcynogeneza jest procesem wielostopniowym, w którym można wyróżnić co najmniej dwa stadia: zapoczątkowanie i promocję. Karcynogeny stosowane w bardzo małych — podprogowych dawkach mogą wprawdzie spowodować mutację niezbędną dla zapoczątkowania nowotworu, nie wystarczają jednak do jego ekspresji, czyli ciągłego rozmnażania się komórek i ich wzrostu w postaci guza. Wzrost taki może jednak dojść do skutku dopiero wtedy, gdy na populację zapoczątkowanych komórek zadziała drugi czynnik, zwany promotorem lub kokarcynogenem. Tak więc kokarcynogenami, albo czynnikami współrakotwórczymi, określamy substancje chemiczne, które

w zasadzie nie będąc mutagenne, nie mają zdolności do zapoczątkowania nowotworu, mogą jednak spowodować promocję komórek zapoczątkowanych wcześniej przez któryś z właściwych karcynogenów.

Klasycznym przedstawicielem kokarcynogenów jest olej krotonowy, którego aktywnymi składnikami są dwuestry forbolu. Wśród nich najbardziej aktywny i najczęściej używany w doświadczeniach jest związek znany pod skrótem TPA (13-octan, 12-O-tetradekanoilforbolu). Związek ten, zastosowany na zdrową skórę myszy, powoduje przejściowe rozmnażanie i odróżnicowanie komórek naskórka, w następstwie czego rozwijają się łagodne brodawczakowate rozrosty. Jeśli natomiast stosowanie TPA zostanie wyprzedzone mutagennym działaniem karcynogenu, to w naskórku mogą się rozwinąć złośliwe brodawczaki i raki.

W 1982 roku opisano nowy promotor 100-krotnie bardziej aktywny niż TPA, mianowicie dwuhydroteleocydynę B, izolowaną z grzybni *Streptomyces*. Ten kokarcynogen wywołuje transformację w komórkach zapoczątkowanych przez metylocholantrén względnie napromienianie nadfioletowe. Zapoczątkowany proces karcynogenezy chemicznej może być zatrzymany zarówno w doświadczeniach na zwierzętach, jak i w hodowlach komórkowych *in vitro* przez retinoidy, które są substancjami chemicznymi działającymi antagonistycznie w stosunku do kokarcynogenów. Retinoidy stanowią wielką rodzinę naturalnych i syntetycznych związków chemicznych, będących analogami retinolu, czyli witaminy A.

KARCINOGENY FIZYCZNE

Zaliczamy tu różne rodzaje promieniowania jonizującego. Jonizującym nazywamy takie promieniowanie, które w interakcji z różnymi substancjami powoduje dysocjację cząsteczek na jony, czyli atomy obdarzone ładunkiem elektrycznym. Promieniowania jonizujące indukują jonizację wody i powstanie aktywnych rodników tlenowych, które uszkadzają DNA i indukują replikację naprawczą. W dostatecznie wysokiej dawce promieniowanie jonizujące może dać pełny efekt rakotwórczy, to znaczy stanowić dla procesu nowotworowego zarówno czynnik zapoczątkowania, jak i promocji.

Nowotwory mogą być indukowane przez promieniowanie elektromagnetyczne o określonej długości fali, jak i przez promieniowanie korpuskularne. Z szerokiego widma promieni pierwszego rodzaju jako czynnik rakotwórczy wchodzi w grę tylko promieniowanie nadfioletowe, promieniowanie rentgenowskie i promienie gamma. Jeśli chodzi o promieniowanie korpuskularne, to wszystkie jego rodzaje okazały się karcynogenne, a więc cząstki alfa, beta, protony i neutrony.

Promieniowanie nadfioletowe jest głównym czynnikiem w powstawaniu raka skóry u człowieka, co wynika z badań epidemiologicznych. Mechanizm powstawania tego nowotworu tłumaczy się różnymi sposobami działania promieni nadfioletowych na układy biologiczne, jak zahamowanie podziałów komórkowych, inaktywacja enzymów, indukcja mutacji oraz uśmiercanie komórek. Niektóre z biologicznych efektów napromieniania nadfioletem można wyjaśnić zmianami fizycznymi i chemicznymi w DNA. Spośród wielu możliwych zmian strukturalnych w DNA, indukowanych przez promienie nadfioletowe, najbardziej trwałymi i najłatwiej tworzącymi się związkami chemicznymi, które mogą

być mutagenne, są dimery pirymidyn. Mogą one tworzyć się przez wiązanie między tyminą a cytozyną lub między parami samych cząsteczek cytozyny lub tyminy.

Rakotwórcze efekty promieni X, promieniowania gamma i neutronów ujawniły się w populacjach ludzkich po napromieniowaniach, które zdarzały się w różnych okolicznościach: przypadkowych, leczniczych, diagnostycznych, w trakcie wykonywania zawodu i podczas wybuchów atomowych.

Raki skóry pojawiały się dawniej u rentgenologów, którzy nie dysponowali dostateczną osłoną osobistą przed źródłem promieniowania. Powstawanie nowotworów płuc zaobserwowano u górników w kopalniach rudy uranowej, pierwotnie w Czechach, a później także w USA. Wśród ludności, która przeżyła wybuch bomby atomowej w Hiroszimie i Nagasaki, w okresie od 5 do 25 lat po wybuchu zwiększyła się częstość występowania białaczek głównie u młodych osobników.

WIRUSY ONKOGENNE

Badania nad rolą wirusów w karcynogenezie odegrały doniosłą rolę w odkryciu komórkowych genów *onc* i w wyjaśnieniu molekularnych mechanizmów transformacji nowotworowej.

Wirusy rozmnażają się i przejawiają swe funkcje metaboliczne jedynie w obrębie komórek. Podstawowym warunkiem istnienia wirusów są mechanizmy gwarantujące powielanie się ich kwasu nukleinowego oraz istnienie w ich genomie informacji dla syntezy białek wirusowych. Istotnymi białkami dla wirusa są te, które osłaniają genom i umożliwiają infekcyjność.

Ewolucyjnie wirusy są stosunkowo młodą formą życia, gdyż mogły powstać dopiero po pojawieniu się na Ziemi komórek gospodarza, a więc bakterii (prokariotów) i komórek wyżej zorganizowanych, zaopatrzonych w jądro (eukariotów). Istnieją dobrze uzasadnione hipotezy, że ewolucyjnie retrowirusy pochodzą z ruchomych elementów genetycznych (transpozonów), które w normalnych komórkach mają znaczenie dla regulacji procesów różnicowania. W toku ewolucji wirusów wykształciło się bardzo dużo ich odmian o zróżnicowanej i złożonej budowie oraz o szerokiej skali wymiarów. Wiele z nich okazało się czynnikami chorobotwórczymi, wywołującymi choroby zakaźne. Nieliczne tylko odmiany wirusów mogą w warunkach naturalnych indukować rozrosty o charakterze nowotworowym.

Najogólniej dzielimy wirusy na dwa typy: wirusy DNA oraz wirusy RNA, w zależności od rodzaju kwasu nukleinowego, w którym jest zakodowana informacja genetyczna w dojrzałej, to jest infekcyjnej formie wirusa. Informacja ta, choć stosunkowo uboga, wystarcza jednak do spełnienia kilku podstawowych funkcji życiowych wirusów onkogennych. Do takich należy synteza białka strukturalnego tworzącego kapsyd (otoczkę), który w infekcyjnej fazie cyklu życiowego wirusa osłania jego kwas nukleinowy, umożliwia przyczepianie się do błony komórkowej, a następnie wniknięcie do wnętrza komórki. W wirusach typu RNA kluczowym genem jest gen *pol*, kodujący tak zwaną rewertazę (RNA zależną polimerazę DNA) niezbędną dla syntezy komplementarnego do genomu RNA dwupasmowego DNA, który następnie integruje się z genomem gospodarza.

WIRUSY DNA

Część zwierzęcych wirusów tej grupy obejmuje się nazwą *papova*, będącą zestawieniem pierwszych sylab nazw trzech następujących wirusów: 1) papilloma virus, 2) polyoma virus i 3) vacuolating simian virus typ 40 (SV40).

1) Najdawniej poznanym przedstawicielem wirusów papilloma jest wirus Shope'a, który w warunkach naturalnych powoduje endemicznie występujące brodawczaki uszu u królików z odmiany Cottontail. Doświadczalne zakażenie królików domowych wirusem Shope'a powoduje rozwój złośliwych nabłoniaków naskórka.

2) Wirus polyoma ma zdolność do wywołania różnego rodzaju nowotworów zarówno nabłonkowego, jak i łącznotkankowego pochodzenia nie tylko u myszy, lecz u chomika i innych gatunków.

3) Wirus oznaczony symbolem SV40, został izolowany z hodowli komórkowej nerki małp. Odznacza się zdolnością do wywoływania mięsaków u chomików i szczurów, a także powoduje transformację w hodowlach komórek różnego pochodzenia.

Zdolność wirusów polyoma do transformacji komórek zależy od wytwarzania białek kodowanych przez wirusa i nazywanych średnim antygenem T. Średni antygen T ma aktywność kinazy tyrozynowej. Mutanty wirusa pozbawione takiej aktywności enzymatycznej nie mają zdolności transformacji komórek.

Transformacja komórek pod wpływem wirusa SV40 dokonuje się za pośrednictwem białka kodowanego przez tego wirusa. Białko to gromadzi się w jądrze komórkowym i jest znane pod nazwą dużego antygenu T. Ten jądrowy antygen ma niezwykle właściwości, gdyż sam (bez obecności wirusa) wystarcza do transformacji komórek hodowanych *in vitro*, jak również do wywoływania guzów nowotworowych u nowonarodzonych chomików.

W patogenezie nowotworów u ludzi szczególnie zainteresowanie budzą wirusy określane skrótem HPV (human papilloma virus), które u człowieka są przyczyną pospolitych brodawczaków skóry. Z brodawczaków takich wyosobniono kilkanaście odmian wirusów HPV. Znaczna ich większość ma związek przyczynowy z łagodnymi brodawczakami umiejscowionymi w określonych okolicach ciała, jednakże wirusy HPV-5, HPV-16 i HPV-18 mogą prowadzić do zmian przedrakowych a następnie rozwoju nowotworów złośliwych skóry i narządów płciowych oraz krtani. Duża część tych nowotworów ma zintegrowane z genomem komórek sekwencje HPV, które konstytutywnie (stałe) wyrażają dwa wczesne geny wirusa E6 i E7.

Mechanizm rozwoju złośliwych nowotworów człowieka pod wpływem wirusa HPV nie jest jeszcze znany, wiadomo jednak, że oprócz wirusów odgrywają tu rolę zarówno genetyczne uwarunkowania organizmu, jak i czynniki pochodzące z zewnątrz.

Wśród wirusów DNA patogenicznych dla człowieka należy wymienić wirusa Epsteina-Barr (EBV) uważany za czynnik indukujący chłoniaka Burkitta we wschodniej Afryce równikowej i raka jamy nosowo-gardłowej w południowej Azji. Wirus EBV należy do wirusów z grupy opryszczki (herpes virus); inne wirusy z tej grupy były łączone także z patogenizacją niektórych typów nowotworów.

U chorych na AIDS zainfekowanych wirusem HIV spostrzega się (w populacji Stanów Zjednoczonych Ameryki Północnej) około 20 000 razy częściej tak zwane mięsaki Kaposi oraz w późniejszych okresach choroby częstsze (niż w populacji ogólnej) chłoniaki wywodzące się z komórek B. Udział wirusa HIV w molekularnej patogenezie obu tych nowotworów jest wysoce złożony.

W niektórych regionach globu (południowo-wschodnia Azja) zidentyfikowano wysoki stopień nosicielstwa wirusa (typ B) zapalenia wątroby (HBV — hepatitis B virus) skorelowany z wielokrotnie większą zapadalnością na pierwotnego raka wątroby.

WIRUSY RNA

Wirusy RNA zdolne do wywoływania nowotworów u przedstawicieli różnych gatunków kręgowców określa się nazwą wirusów onkorna. Stanowią one podrodzinę z rodziny *Retroviridae* (retrowirusy).

Genom retrowirusów jest zakodowany w nici RNA. Genom retrowirusów zawiera zwykle gen rewertazy noszący symbol *pol* (RNA-zależna polimeraza DNA), gen kodujący białko otoczki (kapsydu) i wewnątrzvirusowe białko strukturalne. W cyklu życiowym retrowirusów można wyróżnić dwa okresy. W pierwszym, który trwa kilka godzin i zaczyna się infekcją komórki, wirion przyczepia się do błony komórkowej i przenika do jej wnętrza. Odwrotna transkryptaza (rewertaza) wirionu powoduje syntezę DNA na matrycy wirusowego RNA. Nowy DNA jest podwójną nicią zamkniętą w koło o średnicy $5,7 \times 10^6$ Å i w tej formie ulega integracji z komórkowym DNA, stając się prowirusem. W drugim okresie opisywanego cyklu zachodzi ekspresja prowirusowego DNA przez normalne procesy transkrypcji. Produktem tego są dwa typy RNA: pierwszy jest genomem nowego wirionu, drugim typem jest mRNA dla syntezy białek wirusowych. Prototypem onkogennych retrowirusów jest wirus leukozy ptaków (ALV). Należy on do tak zwanych łagodnych wirusów onkogennych. Wywołuje białaczki i rozrosty komórek układu krwiotwórczego po długim okresie utajenia i u małego odsetka nosicieli. Druga grupa retrowirusów onkogennych jest zaliczana do grupy tak zwanych ostrych wirusów, które indukują nowotwory (białaczki, erytroblastozy, chłoniaki, a także nabłoniaki i mięsaki) w krótkim okresie po infekcji i u wysokiego odsetka zakażonych zwierząt. Charakterystyczną cechą genomu tych wirusów jest obecność w nim wirusowego genu *onc* (*v-onc*). Typowym przedstawicielem tej grupy jest wirus mięsaka Rousa (RSV). W genomie tego wirusa oprócz trzech genów niezbędnych w cyklu życiowym wirusa (*gag*, *pol*, *env*) znajduje się gen *src* odpowiedzialny za indukcję mięsaków (*sarcoma* — stąd symbol *src*) u kur. Wirus RSV jest ostrym wirusem onkogennym niedefektywnym, to znaczy genom jego posiada te geny, które są niezbędne dla cyklu życiowego. Inne ostre retrowirusy onkogenne są zwykle defektywne. Charakterystyczną cechą ich genomu jest obecność genu *v-onc* i brak lub szczątkowe sekwencje genów „własnych” wirusa (*gag*, *pol*, *env*). Brak lub defekty w tych ostatnich genach uniemożliwiają przejście wirusa przez jego cykl życiowy. Cykl życiowy wirusów defektywnych może się odbywać tylko, gdy w czasie zakażenia jest obecny także wirus wspomagający, zawierający funkcjonalny gen kodujący rewertazę (*pol*) i geny kodujące strukturalne białka wirusa.

Na podkreślenie zasługuje ogromne rozpowszechnienie onkogennych wirusów RNA. Okazało się mianowicie, że niemal wszystkie gatunki zwierząt są nosicielami prowirusowego DNA jednego lub kilku typów retrowirusów. Prowirusowa informacja przekazuje się pionowo — a więc dziedzicznie — z rodziców na potomstwo wraz z normalnymi genami, zgodnie z prawami Mendla. Prowirusy mają ściśle określoną lokalizację w chromosomach, tak jak każdy inny gen. Wyjątkowym przykładem jest pionowe przekazywanie wirusów Bittnera u myszy z niektórych szczepów za pośrednictwem mleka matki. Przez niedopuszczenie do wykarmiania osesków mysich mlekiem własnej matki można je uchronić przed zakażeniem wirusem Bittnera i zapobiegać w znacznym stopniu pojawieniu się raków gruczołu mlecznego w późniejszych okresach życia.

Oprócz pionowego przenoszenia się informacji genetycznej retrowirusów są znane przykłady zakażeń poziomych, to znaczy takich, jakie wchodzą w grę przy epidemicznym szerzeniu się chorób zakaźnych. W zakażeniu poziomym wiriony przenoszą się z osobnika na osobnika w obrębie współcześnie istniejących obok siebie generacji. W obrębie jednego narządu normalne fibroblasty zakażają się wirionami RSV wytwarzanymi przez komórki mięsaka Rousa, który wszczepiono doświadczałnym kurom.

U człowieka jedynym udowodnionym i dobrze zbadanym przykładem nowotworu wywołanego przez zakaźnego wirusa jest białaczka wywodząca się z limfocytów T. Stąd retrowirus nazwano skrótem HTLV (human T-cell leukaemia virus). Genomy HTLV posiadają u końca 3' otwartą ramkę odczytu i kodują dwa białka tax i rex uruchamiające transformację nowotworową, między innymi poprzez aktywację genów receptorowych niektórych interleukin. HTLV nie jest spokrewniony z żadnym ze znanych wirusów zwierzęcych z wyjątkiem wirusa białaczki bydła BLV (bovine leukaemia virus).

Endemiczne ogniska zakażenia wirusem HTLV wykryto w Ameryce w basenie Morza Karaibskiego oraz w południowo-zachodniej Japonii.

ROLA GENÓW *ONC* W ROZWOJU NOWOTWORÓW

Fakt, że nowotworowa transformacja komórek somatycznych jest nieodwracalna, a cechy złośliwości z komórki macierzystej przechodzą na komórki potomne wskazuje na genetyczne mechanizmy procesu nowotworowego na poziomie komórki. Stanowisko takie rodzi z miejsca pytanie, jakie geny i jakie ich uszkodzenia mają kluczową rolę w procesie rakowacenia.

Odkrycie wirusowych genów *onc* (*v-onc*) w ostrych, transformujących retrowirusach miało pierwszorzędne znaczenie w postępie dociekań nad istotą procesu nowotworzenia. W wirusie mięsaka Rousa (RSV) zidentyfikowano gen *v-src* odpowiedzialny za indukcję mięsaków kur. Wkrótce okazało się, że homologiczny gen znajduje się w niezakażonych zdrowych komórkach kury. Gen ten nazwano komórkowym genem *src* (*c-src*). W latach 80-tych wykryto inne komórkowe geny homologiczne do wirusowych genów *v-onc*. W prawidłowej komórce eukariotycznej geny te nazywamy genami *proto-onc*. Przedrostek „proto” wskazuje, że wyjściowy pierwotny gen tego typu jest prekursorem genu nowotworowego, transformującego genu *c-onc*. Obecnie mamy ugruntowane dowody, że geny

proto-*onc* są naturalnymi i prawidłowymi składnikami genomu i występują u wszystkich gatunków świata zwierzęcego. Pełnią one różne, kluczowe, nieodzowne w biologii komórki funkcje (procesy embriogenezy, różnicowanie, proliferacja). Wśród poznanych dotychczas około 100 genów proto-*onc* znajdują się geny kodujące czynniki wzrostowe i receptory dla tych czynników. Produkty białkowe niektórych genów proto-*onc* mają funkcje swoistych kinaz białkowych biorących udział w cyklu komórkowym, jeszcze inne biorą udział w przenoszeniu sygnałów przez błonę komórkową, pełnią rolę wewnątrzkomórkowych receptorów hormonalnych, mają właściwości enzymatyczne (na przykład rozszczepiają wysokoenergetyczne wiązania w GTP). Wiele genów proto-*onc* koduje czynniki transkrypcyjne o pleiotropowych właściwościach, aktywujące dużą liczbę różnych genów. Jeszcze inne biorą udział w wytwarzaniu nowych naczyń krwionośnych.

Są dowody naukowe wskazujące, że ostre transformujące retrowirusy powstały w wyniku przeniesienia i zrekombinowania z genomem łagodnego retrowirusa sekwencji genów proto-*onc* z komórki eukariotycznej. W procesie ewolucji najpierw powstały i istniały geny proto-*onc* w komórkach eukariotycznych a dopiero w późniejszych etapach ewolucji pojawiły się wirusy onkogenne, powstałe w drodze transdukcji genów proto-*onc* z komórek zakażonego gospodarza. Sądzymy, że sekwencje komórkowego genu proto-*onc* nabrały właściwości genów transformujących po przeniesieniu w sąsiedztwo takich sekwencji wirusowych, które mają silne właściwości promotorowe, to znaczy właściwości pobudzające do stałej transkrypcji każdego genu, który znajdzie się w pobliżu takich silnych promotorów.

Retrowirusy onkogenne nie są odpowiedzialne za indukcję nowotworów u ludzi (wyjątek stanowią wirusy HIV i HTLV). Geny proto-*onc* nabierają właściwości transformujących, czyli przekształcają się w komórkowe geny c-*onc* w różnych okolicznościach. Należy w tym miejscu zauważyć, że kluczowe, prawidłowe funkcje białek kodowanych przez geny *onc* mogą być spełnione tylko wówczas, gdy białko jest syntezowane w prawidłowych ilościach, gdy pojawia się w komórce w ściśle określonych okresach i gdy ich struktura nie jest zmieniona. Wszelkie odstępstwa od tych prawidłowości sprawiają, że produkty komórkowych genów *onc* stają się elementami aktywującymi rozwój nowotworu.

Zatem wszelkie zdarzenia molekularne prowadzące do nienormalnej, nasilonej aktywności genów proto-*onc*, do aktywacji tych genów w nieodpowiednim czasie lub wreszcie do mutacji genów proto-*onc* narzucają genom proto-*onc* piętno i cechy transformujących genów c-*onc*. Te istotne rozróżnienia stanu strukturalnego i funkcji genów proto-*onc* i c-*onc* w potocznym użyciu są zacierane; mówimy po prostu o komórkowych genach *onc* (c-*onc*), a z kontekstu dyskusji wynika, czy są to geny o prawidłowej strukturze i funkcji, czy geny o cechach genów transformujących (na przykład mutanty genów).

Komórkowe geny c-*onc* są genami silnie konserwowanymi w procesie ewolucji. Są one takie same (a więc mają taką samą sekwencję nukleotydów) u człowieka i u przedstawicieli różnych gatunków zwierzęcych: myszy, szczurów, małp, kotów, ptaków, ryb i innych. Taka nieswoistość gatunkowa dowodzi, że geny c-*onc* w ciągu wielu milionów lat ewolucji gatunków nie ulegały zagubieniu i zmianom w procesach doboru naturalnego. Dokładna selekcja oraz konserwatywizm ich kodu wskazuje, że geny c-*onc* mają istotne znaczenie dla życia organi-

zmów różnych gatunków i funkcji eukariotycznych o czym wspomniano już wyżej.

Zmiany strukturalne genów *c-onc* mogą być wywołane różnymi czynnikami mutagennymi i uszkodzającymi DNA. Następstwem tych zmian, o ile nie ulegną one reperacji, są różnego rodzaju mutacje.

MUTACJA PUNKTOWA

Zmiana jednego nukleotydu w triplecie (kodonie) w obrębie genu *c-onc* przez inny nukleotyd powoduje zmianę treści kodu genetycznego, co w konsekwencji może zmienić skład aminokwasów białka transformującego (mutacja typu missens) lub wprowadzić kodon typu stop (mutacja typu nonsens). Ta ostatnia sytuacja daje w rezultacie skrócony łańcuch białkowy. Mutację typu missens spostrzeżono po raz pierwszy w genie *c-Ha-ras* wyizolowanym z raka pęcherza u ludzi. Podobnie jak w globinie w anemii sierpowatej, zmutowane białko *Ha-ras* (białko p21) w pozycji 12 zamiast glicyny posiada walinę. To podstawienie jednego aminokwasu zmienia strukturę białka p21, które jest GTP-azą i przez to obniża powinowactwo do substratu — GTP. W innych kodonach genu *c-Ha-ras* spostrzegano także inne mutacje punktowe.

Mutacje punktowe w genach *c-onc* występują w wielu różnych typach nowotworów u ludzi.

TRANSLOKACJE CHROMOSOMALNE

Złamania chromosomów z przemieszczeniem genu *c-onc* w okolicę aktywną innego chromosomu prowadzą do trwałej aktywacji onkogenu. Jest to częsty mechanizm transformacji nowotworowej. Stałe występowanie aberracji chromosomów stwierdzono w kilku typach białaczek u człowieka i u myszy doświadczalnych oraz w chłoniakach.

Chłoniaki typu Burkitta są złośliwym rozrostem limfocytów B. Stałe występującą zmianą kariotypową jest złamanie chromosomu w miejscu 8q24, gdzie znajduje się onkogen *c-myc*. W mechanizmie wzajemnej translokacji odcinek złamanego chromosomu 8 z onkogenem *c-myc* łączy się z odcinkiem chromosomu 14 (translokacja t(8,14), złamanego w miejscu występowania genów kodujących ciężkie łańcuchy immunoglobulin. W następstwie przemieszczenia się w sąsiedztwo aktywnych genów kodujących immunoglobuliny gen *c-myc* ulega aktywacji, gdyż dostaje się pod wpływ ich promotorów.

Translokacje genów *c-onc* mogą prowadzić do powstania białek hybrydowych o patologicznej funkcji.

AMPLIFIKACJA GENÓW C-ONC

Geny *onc* jak większość innych genów występuje w komórkach diploidalnych w liczbie 2 kopii. W niektórych nowotworach występuje zjawisko amplifikacji genu *c-onc*, to jest zwielokrotnienie liczby kopii komórkowych onkogenów od kilku do kilkudziesięciu razy, co znajduje swój wyraz w wytwarzaniu większej ilości białka transformującego. Taką amplifikację genów *c-myc* stwierdzono w białaczce promielocytowej oraz w raku jelita grubego u człowieka, a także

genów *Ki-ras* w nowotworze kory nadnerczy u myszy. W neuroblastoma opisano przypadek amplifikacji genu *N-myc* do 1200 kopii.

WSTAWIENIE CZYLI INSERCJA PROMOTORA

Mechanizm ten wyjaśnia powstanie transformacji nowotworowej w komórkach wyższego organizmu po zakażeniu wirusami nie mającymi w swym genomie genów *onc*. Chodzi tu o tak zwane powoli transformujące wirusy RNA a także wirusy DNA, które wywołują zmiany nowotworowe dopiero po 4–12-miesięcznym okresie utajenia i nie wykazują zdolności do transformacji komórek w hodowli *in vitro*. W badaniach nad prowirusową postacią (DNA) powoli transformujących wirusów białaczkowych wykazano, że zespół genów strukturalnych prowirusa jest z obu stron „oflankowany” przez długie odcinki DNA, które nazwano powtarzającymi się długimi końcówkami (long terminal repeats) — w skrócie LTR. Odcinki te odgrywają rolę promotora dla sąsiednich genów strukturalnych. Aktywację genu *c-myc* przez insercję promotora opisano u kurcząt w chłoniakach wywodzących się z uchyłku Fabrycusa. Niektóre typy tak zwanych sekwencji transpozonalnych (wędrujących) mogą dawać podobny skutek jak insercja promotora wirusowego.

Mechanizmów prowadzących do przemiany genów *proto-onc* w aktywne geny transformujące *c-onc* jest znacznie więcej.

Mutacje w genach *c-onc* mają charakter mutacji dominujących. Oznacza to, że mutacja w jednym tylko allelu genu *c-onc* może dać efekt transformacyjny; produkt prawidłowego genu w nienaruszonym allelu nie jest w stanie zrekomensować patologiczny efekt genu zmutowanego. Mutacje dominujące w genach *c-onc* nie dziedziczą się. Prawdopodobnie zarodki z komórki zygotycznej, zawierającej mutację nawet w jednym allelu genu *c-onc*, giną we wczesnych okresach rozwoju.

W procesie inicjacji i promocji nowotworów spostrzega się mutacje różnych genów *c-onc*. Sądzi się, że przynajmniej 2 geny *c-onc* muszą być zmutowane, aby proces karcynogenezy mógł być rozpoczęty. W wyłaniających się w procesie karcynogenezy klonach komórkowych kumulują się mutacje kolejnych genów.

Synergistyczny efekt mutacji w różnych genach *c-onc* był obserwowany u myszy transgenicznych z wprowadzonym mutantem genu *c-myc* i genu *c-ras*. Zapadalność na nowotwory była znacznie większa w przypadku wprowadzenia obu transgenów *onc* niż po wprowadzeniu tylko jednego z nich.

Ostatnio zwraca się uwagę na możliwość wystąpienia mutacji w obrębie poza genowych sekwencji niekodujących typu sekwencji powtarzających się (mikrosatelitarnych). Są to tak zwane mutacje dynamiczne, które prowadzą do zmian w liczbie kopii sekwencji powtarzających się. W konsekwencji mogą zmieniać się konformacje dużych domen DNA i wpływać na funkcję genów zawartych w tych domenach. Biologiczne skutki aktywnych genów *c-onc* realizują się ostatecznie w zwiększonej aktywności proliferacyjnej komórek.

GENY SUPRESOROWE (ANTY-ONKOGENY)

W hybrydach komórek nowotworowych z komórkami prawidłowymi, powstałych w wyniku fuzji obu rodzajów tych komórek nie ujawniają się cechy złośliwości, a więc fenotyp nowotworowy jest tłumiony. Podobną supresję fenotypu nowotworowego uzyskano po wprowadzeniu do komórek nowotworowych izolowanych chromosomów komórek prawidłowych, a użycie pojedynczych chromosomów pozwoliło na określenie tych chromosomów, które wywoływały efekt supresyjny. W miarę upływu czasu niektóre komórki odzyskiwały swój złośliwy charakter (rewertowały), a zjawisku temu towarzyszyła utrata określonego chromosomu lub części chromosomu. Te spostrzeżenia wskazywały na istnienie genów supresorowych, od których zależał efekt supresyjny. Innym dowodem na obecność w genomie genów supresorowych były spostrzeżenia, że pewnym typom nowotworów towarzyszą aberracje struktury chromosomów, zwłaszcza delecje. Takie delecje ujawniano na poziomie molekularnym techniką analizy długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP — restriction fragment length polymorphism). Analiza techniką RFLP umożliwiła mapowanie na chromosomach tych loci, w których wystąpiło zjawisko utraty heterozygotyczności (LOH — loss of heterozigoty) to znaczy loci, gdzie rezydowały geny supresorowe. Niezwykle użyteczne okazały się też analizy aberracji chromosomalnych w przypadkach dziedzicznych predyspozycji do rozwoju nowotworów wskazujące na istnienie genów supresorowych. Analiza sporadycznej (jednostronnej) i dziedzicznej, dwustronnej postaci siatkówczaka oka (*retinoblastoma*) pozwoliła sformułować hipotezę, w myśl której dziedziczny siatkówczak powstał w wyniku dwustopniowej mutacji w obrębie domniemanego genu *Rb* mającego funkcje supresorowe, którego locus przypisano do długiego ramienia chromosomu 13. W 1985 roku gen *Rb* został zidentyfikowany, następnie poznano jego budowę a potem budowę i funkcję jego produktu — białka p105^{Rb}. Molekularny proces odpowiedzialny za rozwój dziedzicznych postaci siatkówczaka polega na wystąpieniu w komórce zygoteicznej mutacji jednego allelu, mutacji obecnej w plemniku ojca lub komórce jajowej matki. Drugi allel genu *Rb* ulega mutacji w życiu płodowym lub po urodzeniu i dopiero wówczas rozwija się nowotwór. Mutacja w supresorowym genie *Rb* ma więc charakter recesywny tak długo, jak utrzymuje się nie naruszony („dziki”) allel *Rb*, czyli tak długo, jak długo locus *Rb* jest w stanie heterozygotyczności choroba nie rozwija się. Produkt dzikiego allelu *Rb* kompensuje funkcję zmutowanego allelu. Eliminacja normalnego genu *Rb* (na przykład na drodze delecji) manifestująca się jako LOH prowadzi do ujawnienia się choroby nowotworowej.

Dziś znamy kilkanaście genów supresorowych, ich strukturę i funkcję ich produktów białkowych oraz udział w rozwoju dziedzicznych postaci nowotworów.

Białka, produkty genów supresorowych mają zwykle funkcje plejotropowe. Ogólnie rzecz biorąc geny supresorowe są antagonistami genów *onc*, stąd synonim geny anty-*onc*. Białka supresorowe (produkty na przykład genu *Rb*,

genu *p53*) mają właściwość kompleksowania z białkami onkogennymi wirusów, grają rolę regulatorów ekspresji genów i kontroli cyklu komórkowego.

Gen kodujący białko *p53* jest jednym z genów najczęściej zmutowanych w różnych typach nowotworów. Białko *p53* jest strażnikiem prawidłowego cyklu komórkowego. Spostrzeżono, że uszkodzenia DNA w fazie G_1 indukuje aktywność genu *p53* a ekspresja białka *p53* uniemożliwia poprzez złożony mechanizm molekularny rozpoczęcie replikacji DNA (wejście komórki w fazę S) dopóty, dopóki procesy naprawcze nie usuną uszkodzeń. Komórka z nie naprawionym materiałem genetycznym nie wchodzi w fazę replikacji, lecz jest skierowana na drogę wiodącą do apoptozy czyli genetycznie programowanej śmierci komórki.

Współdziałanie genów supresorowych *p53*, *Rb* z genami kodującymi inhibitory (na przykład białka *p15*, *p16*, *p21*, *p27*) kinaz zależnych od cyklu komórkowego (na przykład *Cdk 4,6*) z cyklinami A, B, E, D i czynnikiem transkrypcyjnym E2F stanowi złożony mechanizm regulujący cykl komórkowy i kontrolujący proliferację komórek.

Rozwój nowotworu złośliwego jest wynikiem interakcji między szeroko pojętymi czynnikami środowiskowymi a genami. W przypadku tak zwanych nowotworów samorzutnych czynniki dziedziczne nie manifestują się lub też nie dostrzegamy ich. Przyjmuje się, że w takich przypadkach nowotwór był spowodowany czynnikiem środowiskowym.

W niektórych rodzinach nowotwory występują w niezwykle wielkiej liczbie. Takie rodzinne agregacje nowotworów mogą być przypadkowe, mogą powstawać w następstwie ekspozycji członków rodzin na wspólny czynnik rakotwórczy lub wreszcie mogą być przejawem obarczeń dziedzicznych. Nie spostrzegano dotychczas, aby w przypadku nowotworów dziedziczyły się dominujące mutacje w genach *c-onc*. Przypuszcza się, że mutacje takie są letalne; co oznacza, że zarodki z komórki zygotycznej niosącej mutacje w genach *onc* nie mogą się rozwijać. Inaczej dzieje się z recesywnym genem supresorowym, gdzie mutacja jest skompensowana „dzikim” allelem tego genu. Zarodki heterozygotyczne ze zmutowanym allelem genu supresorowego mogą rozwijać się prawidłowo a osobnicy heterozygotyczni są klinicznie zdrowi. Dopiero mutacja lub delecja drugiego, normalnego allelu prowadzi do osiągnięcia stanu homozygotyczności, co pozwala na rozwój nowotworu. Mechanizm taki postulowano w przypadkach dziedzicznej postaci siatkówczaka (*retinoblastoma*), gdzie rozwija się dwuoczną, wieloogniskową postać nowotworu. Pierwsza mutacja w jednym z alleli supresorowego genu *Rb* jest wniesiona do komórki zygotycznej ze strony ojca lub matki. Inaktywacja drugiego allelu następuje w życiu płodowym lub we wczesnym okresie życia noworodka.

Oprócz siatkówczaka są znane inne dziedzicznie występujące nowotwory związane z mutacjami genów supresorowych. Stanowią one na ogół mały odsetek nowotworów samorzutnych. Zalicza się tu raki sutka z mutacją w genie *p53* (tak zwanej rodziny Li-Fraumeni), raki sutka i jajnika (mutacje w genie *BRCA1* i *BRCA2*), guz Wilmsa (nowotwór nerki u dzieci), mnogie nowotwory gruczołów dokrewnych (mutacje w genach *MEN*), neurofibromatoza typ 1 (choroba Recklinghausena) i typ 2 (oponiaki i nowotwory z komórek Schwanna), rak jelita grubego na tle rodzinnej polipowatości, rzadziej rak płuca i innych narządów.

W większości tych nowotworów stwierdzono stan homozygotyczności w odpowiednich loci genów supresorowych.

Rodzinne zespoły dziedziczne (*Ataxia teleangiectasia*, *Xeroderma pigmentosum*, anemia Fankoniego, zespół Blooma, progeria i in.) cechują się predyspozycją do rozwoju nowotworów złośliwych. W zespołach tych występują dziedziczne wady w układach enzymatycznych naprawiających uszkodzenia w DNA, w związku z czym częstość uszkodzeń DNA powodowanych przez czynniki fizyczne (na przykład promieniowanie UV) i chemiczne jest wysoka.

Indywidualna wrażliwość na czynniki rakotwórcze jest związana z genetycznie uwarunkowanym wzorem metabolizmu ksenobiotyków i procesami detoksyfikacji, o czym była wzmianka wyżej.

Jak widać z tego krótkiego przeglądu rozwój nowotworów złośliwych jest niezwykle złożonym zjawiskiem biologicznym. Kluczową rolę w procesie nowotworzenia mają oddziaływania środowisko — geny. Obecnie zwraca się baczna uwagę na komponenty dziedziczne w rozwoju chorób nowotworowych.

CANCER BIOLOGY — AN INTRODUCTION

The general biological features of cancer cells, type of carcinogens and mechanism of cancer transformation were discussed.

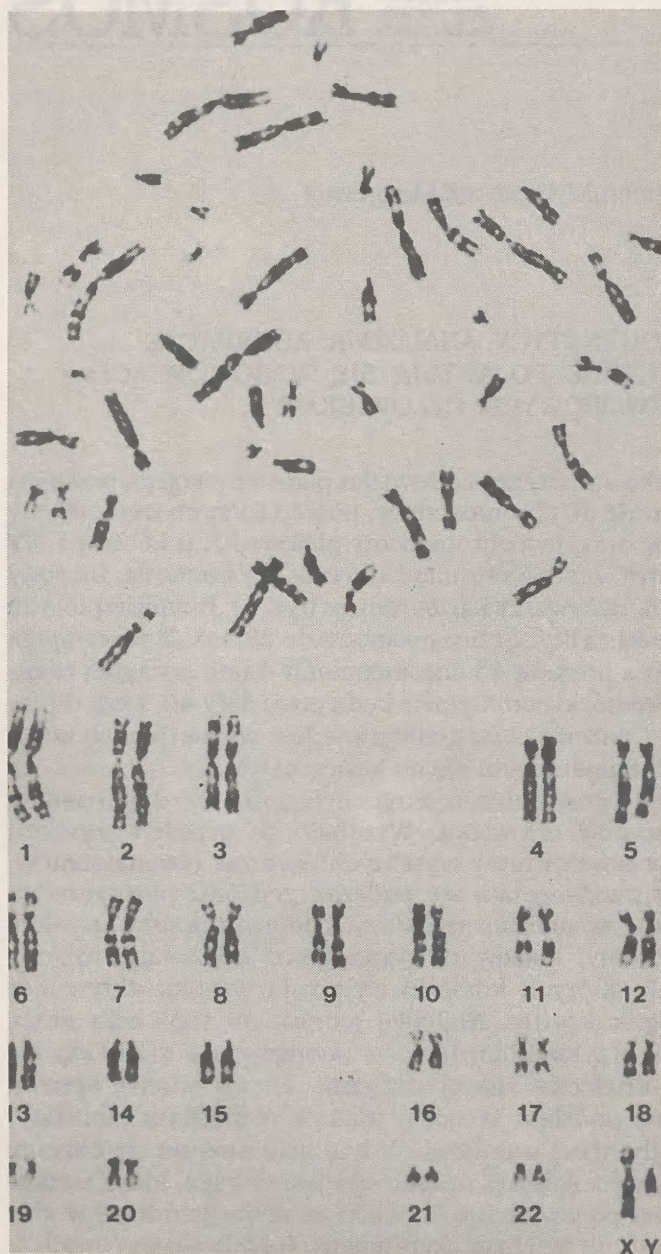
JANUSZ LIMON

*Katedra i Zakład Biologii i Genetyki Akademii Medycznej
Dębinki 1; 80-211 Gdańsk*DLACZEGO CYTOGENETYCY ANALIZUJĄ ABERRACJE
CHROMOSOMOWE, KTÓRE POJAWIAJĄ SIĘ W KOMÓRKACH
NOWOTWOROWYCH CZŁOWIEKA?*

Każda prawidłowa komórka somatyczna człowieka podczas swojego podziału mitotycznego wykazuje obecność 46 chromosomów, spośród których wyróżniamy 44 chromosomy autosomalne oraz dwa chromosomy płciowe XX u kobiety i XY u mężczyzny. Reprezentatywny zestaw chromosomów danej komórki, ułożony według obowiązujących zasad, nazywamy kariogramem (ryc. 1). Komórki płciowe natomiast posiadają zredukowaną liczbę chromosomów do 23, tak że powstająca w procesie zapłodnienia zygota posiada 46 chromosomów dając początek organizmowi, którego wszystkie komórki somatyczne będą posiadały 46, czyli diploidalną liczbę chromosomów (nazewnictwo genetyczne jest wyjaśnione w słowniku terminów genetycznych znajdującym się na końcu artykułu).

Upłynęło wiele lat żmudnych doświadczeń, zanim cytogenetycy zdołali ustalić prawidłową liczbę chromosomów człowieka. Wynikało to przede wszystkim z trudności metodycznych w uzyskiwaniu czytelnych obrazów chromosomów. Jak wiadomo, chromosomy uwidaczniają się podczas podziału mitotycznego komórki, szczególnie wyraźnie w stadium metafazy. Dlatego też, aby uzyskać czytelne do analizy chromosomy, stosowano początkowo tak zwane metody bezpośrednie analizy tkanek, których komórki wykazują wysoką aktywność mitotyczną, na przykład szpik kostny. Najlepiej jednak do tego celu służą hodowle komórek *in vitro*, na przykład fibroblastów pobranych ze skóry czy też limfocytów T pobranych z krwi obwodowej pacjenta. Drugą ważną sprawą metodyczną było zatrzymanie podziału komórki właśnie w stadium metafazy, kiedy to chromosomy są najbardziej widoczne. W tym celu stosuje się obecnie kolchicynę (alkaloid roślinny wyizolowany z ziemowita jesiennego), która uszkadzając mikrotubule wrzeciona podziałowego komórki zatrzymuje mitozę w stadium metafazy. Wreszcie ostatnim ważnym czynnikiem okazało się wprowadzenie szoku hipotonicznego komórki będącej w stadium metafazy — komórka taka poddana działaniu, na przykład, wody pęcznieje, a po jej utrwaleniu w preparacie mikroskopowym obserwuje się duży rozrzut chromosomów w tak zwanej płycie metafazalnej, co umożliwia wykonanie analizy liczby lub struktury chromoso-

*Praca finansowana przez Komitet Badań Naukowych. Numer projektu badawczego 4 S405 018 06

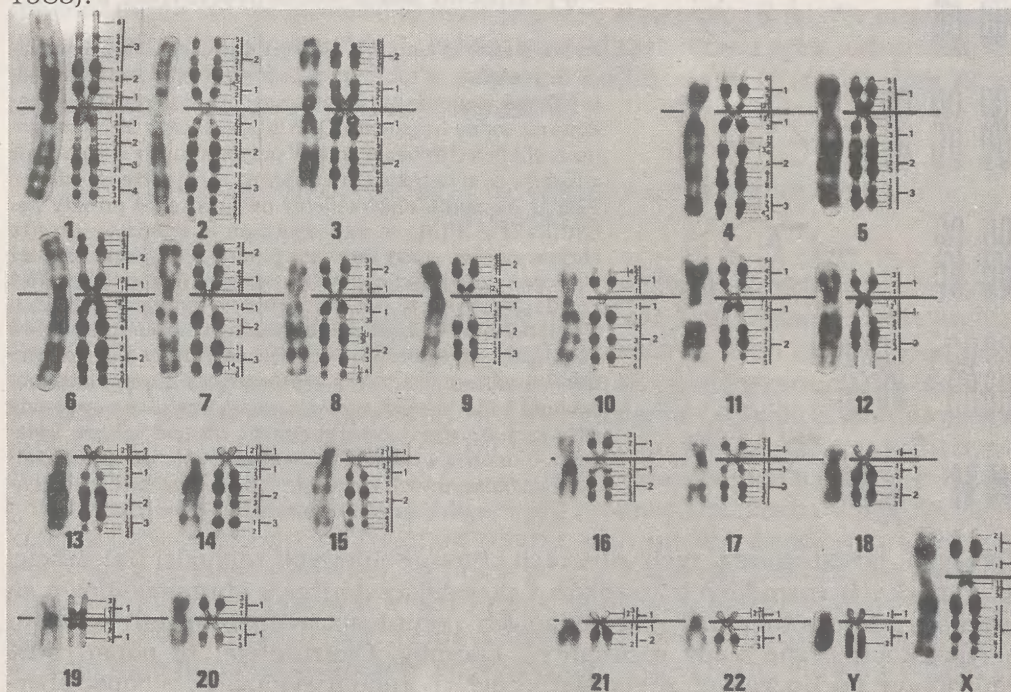


Ryc. 1. Górna część ryciny przedstawia chromosomy człowieka w stadium metafazy podziału komórki wybarwione techniką prążkową. W dolnej części znajduje się kariogram ułożony z tychże chromosomów według obowiązujących zasad. Prawidłowy zapis tego kariogramu: 46,XY (LIMON i MITELMAN 1994).

mów. Dopiero równoczesne zastosowanie wszystkich powyższych osiągnięć metodycznych doprowadziło do odkrycia prawidłowej liczby chromosomów człowieka przez szwedzkich badaczy TIJO i LEVANA w 1956 roku.

Kolejnym postępowaniem w badaniach cytogenetycznych było odkrycie przez CASPERSSONA i współpracowników (1970), także szwedzkich badaczy, zjawiska nierównomiernej, tak zwanej prążkowej fluorescencji ramion chromosomów w mikroskopie fluorescencyjnym po wybarwieniu ich pochodnymi akrydyny (BEIL i LIMON 1973). Okazało się mianowicie, że każdy chromosom człowieka wykazuje wzdłuż swoich ramion charakterystyczną budowę prążkową, która pozwala na jego precyzyjną identyfikację pośród pozostałych chromosomów i w konsekwencji umożliwia wykrycie ewentualnych jego mutacji wskutek zmiany liczby chromosomów w zaburzeniach podziału w komórce, bądź też uszkodzeń jego struktury. W chwili obecnej cytogenetycy stosują kilkadziesiąt różnych technik ujawniających prążkową strukturę chromosomów oraz opracowali mapy rozkładu powtarzalnych prążków w poszczególnych chromosomach człowieka (ryc. 2)

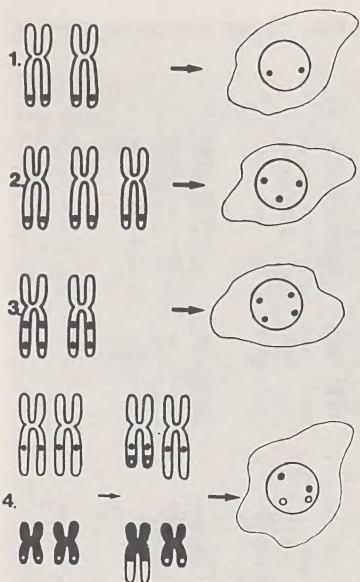
wraz z zasadami zapisu uszkodzeń (aberracji) tychże chromosomów (ISCN, 1985).



Ryc. 2. Prawidłowy kariotyp człowieka. Obok każdego chromosomu wybarwionego techniką prążkową znajduje się mapa występujących w nim regionów i prążków. Ramiona krótkie określamy literą „p” a długie literą „q”. Regiony i prążki zapisujemy cyframi arabskimi. Na przykład prążek 3 regionu 1 ramion długich chromosomu 2 zapisujemy: 2q31.

Najnowszym osiągnięciem technik cytogenetycznych jest połączenie analizy prążkowej chromosomów z hybrydyzacją *in situ*. Hybrydyzacja *in situ* umożliwia identyfikację całych chromosomów (tak zwane malowanie chromosomów), ewentualnie wybranych ich regionów lub prążków, a nawet niewielkich odcinków DNA (genów) w ramionach chromosomów lub w jądrach komórek będących w stanie spoczynku (interfazalne komórki). Należy w tym celu dysponować odpowiednią sondą (odcinkiem) DNA, którą po sprzężeniu na przykład z biotyną hybrydyzuje się z komplementarnymi odcinkami DNA w chromosomach lub w jądrach interfazowych. Specyficzne miejsce hybrydyzacji wykrywa się przeciwciałami sprzężonymi ze związkiem fluorescencyjnym (technika FISH — fluorescence *in situ* hybridization) i w konsekwencji obserwuje się pod mikroskopem fluoryzujący odcinek chromosomu metafazowego, ewentualnie świecący punkt w jądrze interfazalnym komórki w miejscu odpowiadającym lokalizacji badanego chromosomu czy też genu (ryc. 3) (GRAY i PINKEL 1992). Szczegółowy opis tych molekularnych technik cytogenetycznych oraz ich zastosowanie w medycynie i biologii jest zawarty w kilku publikacjach polskich autorów (ZAWADA i LATOS-BIELEŃSKA 1993, BOCIAN 1993, GRONWALD i współaut. 1994).

W patologii człowieka jest znany cały szereg chorób czy też zespołów chorobowych wywołanych zaburzeniami liczby bądź też struktury chromosomów.



Ryc. 3. Schemat efektów barwień cytologicznych w przypadku zastosowania hybrydyzacji *in situ*.

Po lewej stronie znajdują się wybrane chromosomy w stadium metafazy, a po prawej jądra interfazalne komórek, w których znajdują się te chromosomy. Zastosowano znakowaną sondę fragmentu DNA znajdującego się w ramionach długich chromosomów. W przypadku gdy w metafazie znajdują się dwa takie chromosomy, to w jądrze interfazalnym tej komórki obserwujemy dwa świeące punkty (technika FISH) (A), a gdy występuje trisomia tychże chromosomów — trzy świeące punkty (B). Można również stosować znakowanie dwóch różnych fragmentów DNA znajdujących się w pobliżu siebie w ramionach długich chromosomów — w jądrze interfazalnym obserwujemy dwa świeące punkty blisko siebie (C). Gdy natomiast dojdzie do translokacji pomiędzy dwoma chromosomami i dla których wyznakowania zastosowano sondy DNA sprzężone ze fluorochromami o różnym kolorze świecenia — można wykryć tę translokację w jądrze interfazalnym w postaci dwóch znajdujących się obok siebie świeących różnymi kolorami punktów (D).

Zjawisko powstawania tych aberracji chromosomowych zachodzi najczęściej w komórkach rozrodczych rodziców i powstające mutacje chromosomowe są przekazywane potomstwu powodując ich poronienia samoistne lub w wielu przypadkach liczne wady rozwojowe i choroby. Okazuje się, że ponad 50% embrionów pochodzących ze spontanicznych poronień wykazuje obecność aberracji chromosomowych. Do najbardziej częstych zespołów chorobowych wywołanych aberracjami chromosomowymi (tak zwane chromosomopatie) należy tak zwany „mongolizm” — zespół Downa (trisomia chromosomu 21). Tak więc niektóre aberracje chromosomowe, występujące we wszystkich komórkach organizmu człowieka, są najczęściej letalne (wywołują poronienia embrionów obciążonych tą zmianą) lub wywołują choroby.

Do powstawania aberracji chromosomowych może dochodzić również w pojedynczych komórkach somatycznych różnych tkanek i narządów ciała ludzkiego podczas rozwoju osobniczego na skutek działania znanych lub najczęściej nie poznanych dotąd czynników mutagennych. Oczywiście nie każda aberracja chromosomowa prowadzi do transformacji nowotworowej komórki, w niektórych przypadkach prowadzi do jej śmierci, w innych do powstania klonu komórek (potomstwa jednej komórki) o „niegroźnej dla organizmu mutacji chromosomowej”. Jak się obecnie sądzi, tylko niektóre aberracje chromosomowe prowadzą do transformacji nowotworowej komórki i te właśnie aberracje będą omówione w dalszej części tego artykułu. Należy wyraźnie podkreślić, że w przypadku choroby nowotworowej, aberracje chromosomowe występują wyłącznie w komórkach nowotworowych przy równoczesnym prawidłowym składzie chromosomów w komórkach pozostałych tkanek i narządów organizmu. Dlatego też proces powstawania nowotworu jest nazywany przez wielu autorów chorobą genetyczną pojedynczej komórki somatycznej, w której dochodzi do powstania aberracji chromosomowej, aby następnie poprzez nie kontrolowany rozrost tej komórki doprowadzić do powstania guza nowotworowego (wyjątek

stanowią rzadkie zespoły dziedzicznej predyspozycji do nowotworów). Należy również pamiętać, że zjawisko to może powstać w dowolnej komórce organizmu, praktycznie każdego narządu i w dowolnym okresie czasu życia człowieka. Co więcej, proces ten trwa niekiedy wiele lat zanim zostanie rozpoznany przez lekarza lub bezpośrednio przez chorą osobę.

OBSERWACJE CHROMOSOMÓW W KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH CZŁOWIEKA

Analiza chromosomów komórek nowotworowych ma swoją długą tradycję. Już pod koniec ubiegłego stulecia patolog niemiecki, D. von Hanseemann zauważył w preparatach mikroskopowych tkanek nowotworowych człowieka nieprawidłowe podziały mitotyczne komórek, co skłoniło go do wysnucia hipotezy, że u podłoża powstawania nowotworów są zaburzenia podziałów komórkowych prowadzące do nierównego podziału jądra komórki. Jak to czasami bywa w nauce, na skutek silnej krytyki jego poglądów przez innych badaczy, w latach późniejszych wycofał się ze swojej koncepcji (według SANDBERGA 1990). Dopiero kolejny badacz niemiecki, THEODOR BOVERI, sformułował mutacyjną teorię powstawania nowotworów w swojej pracy pt. *Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren*, którą opublikował w 1914 roku. Ujmując problem w dużym uproszczeniu: Boveri uważał, że nieprawidłowe podziały mitotyczne zachodzące w komórkach nowotworowych prowadzą do różnej liczby chromosomów, co z kolei prowadzi do transformacji nowotworowej komórki. Koncepcja ta, nazywana teorią mutacji somatycznej, jest uznawana obecnie za jeden z podstawowych mechanizmów powstawania nowotworów i coraz więcej dowodów na istnienie tego mechanizmu dostarczają współczesne wyniki badań cytogenetycznych oraz molekularnych.

Proces powstawania nowotworów jest wieloetapowy i został przedstawiony w artykule CHORAŻEGO i DUXA (1995) w tym zeszycie *Kosmosu*. Obserwacje chromosomów w komórkach nowotworowych, aczkolwiek dotyczą tylko jednego elementu tego złożonego procesu, wydają się tworzyć istotny czynnik w badaniach mechanizmów karcynogenezy. Wynika to z faktu, że rozrastające się w organizmie człowieka komórki nowotworowe wykazują obecność licznych aberracji (mutacji) chromosomowych i to zarówno liczbowych (genomowych), jak i strukturalnych. Dotychczasowe obserwacje wykazują, że liczba chromosomów w komórce nowotworowej wykazuje duże wahania i może zmniejszyć się z prawidłowej do niekiedy liczby okołohaploidalnej, to znaczy około 23, albo, i tak jest najczęściej, zwiększa się, osiągając niekiedy liczbę dochodzącą do kilkuset chromosomów w jednej komórce. Co więcej, chromosomy komórek nowotworowych ulegają niekiedy bardzo licznym aberracjom strukturalnym — praktycznie obserwuje się w nich wszystkie rodzaje aberracji występujących w komórkach ssaków — delecje, duplikacje, różnego rodzaju translokacje i inwersje. O ile początkowo cytogenetycy nie byli w stanie dokonać szczegółowej charakterystyki tych niekiedy bardzo złożonych aberracji chromosomowych, to od kilku lat, dzięki istotnemu rozwojowi technik hodowli komórek i barwień prążkowych chromosomów, zaczęli dostrzegać pewne korelacje pomiędzy okre-

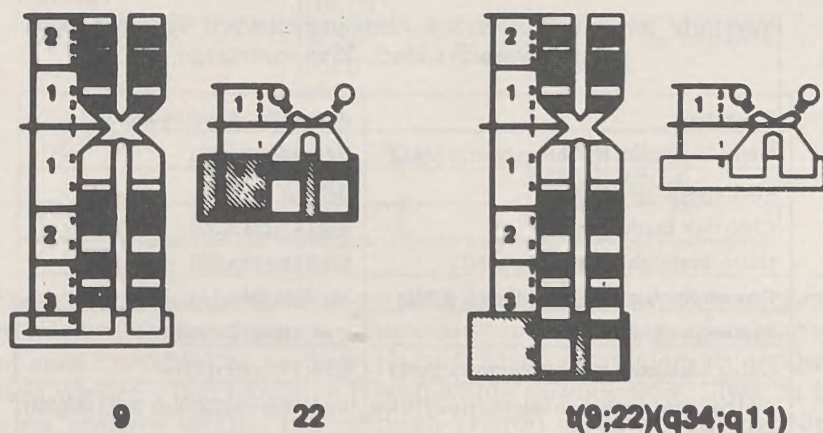
ślonymi aberracjami chromosomowymi, nazywanymi aberracjami pierwotnymi, a rodzajem histologicznym nowotworu, z komórek którego uzyskano te chromosomy (HEIM i MITELMAN 1987, SANDBERG 1990, LIMON i MITELMAN 1994). Ponadto zauważono, że wyniki analizy cytogenetycznej mogą mieć implikacje praktyczne w prognozowaniu klinicznym pacjentów.

ABERRACJE CHROMOSOMOWE W KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH UKŁADU KRWIOTWÓRCZEGO (BIAŁACZKI)

Pierwszą swoistą aberracją chromosomową wykryto w komórkach nowotworowych pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową (CML). NOWELL i HUNDERFORD (1960) zauważyli, że w metafazach tychże komórkach występuje mały chromosom, który powstał według nich jako wynik delecji jednego z chromosomów grupy G, jak ustalono potem, chromosomu 22. Należy zaznaczyć, że komórki innych tkanek badanych pacjentów wykazywały obecność prawidłowego zestawu chromosomów. Tak więc tylko komórki szpiku zmienione nowotworowo posiadały nieprawidłowy chromosom, który nazwano, ze względu na miasto, w którym dokonano tej obserwacji — chromosomem filadelfijskim (w skrócie Ph). Wkrótce inni autorzy potwierdzili fakt występowania chromosomu Ph w komórkach nowotworowych pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową oraz w części przypadków ostrej białaczki szpikowej. Co więcej, zaobserwowano, że podczas przełomu blastycznego choroby pojawiają się dodatkowe aberracje chromosomowe, które niekiedy pojawiają się na kilka miesięcy przed wystąpieniem objawów chorobowych (HAUS 1992). Jakie miało to ówczesnie implikacje praktyczne w medycynie? Otóż analiza cytogenetyczna stała się postępowaniem diagnostycznym i prognostycznym w białaczkach oraz zachęciła cytogenetyków i hematologów do dalszych poszukiwań swoistych aberracji chromosomowych w różnych nowotworach układu krwiotwórczego.

Na przykładzie chromosomu filadelfijskiego można prześledzić dalszy rozwój badań genetycznych, w tym molekularnych, w hematologii. Otóż w roku 1973 ROWLEY dzięki zastosowaniu techniki prążkowej identyfikacji chromosomów wykryła, że chromosom Ph nie powstaje, jak początkowo przypuszczano, w wyniku delecji, lecz translokacji wzajemnej pomiędzy chromosomami 9 i 22 i dokładnie sprecyzowała miejsca pęknięć obu chromosomów $t(9;22)(q34;q13)$ (ryc. 4). Obserwacja ta zainteresowała genetyków molekularnych, którzy podjęli się analizy molekularnej genów znajdujących się w miejscu pęknięć tych chromosomów lub w ich pobliżu wychodząc z założenia, że tam właśnie powinny znajdować się geny odpowiedzialne za transformację nowotworową. Już wkrótce wykryto, że w wyniku translokacji pomiędzy chromosomami 9 i 22 dochodzi do przeniesienia protoonkogenu *c-abl* (homologa retrowirusowego onkogenu) znajdującego się w chromosomie 9q34 na chromosom 22q13 w pobliże nie poznanego dotychczas genu *bcr*. Pomimo, iż wkrótce poznano produkt białkowy nowo powstałego genu *bcr/abl*, nie wyjaśniono do końca roli tego białka w procesie transformacji nowotworowej komórek szpiku (NOWELL 1994, RABBITT 1994). Dalsze badania molekularne chromosomu Ph doprowadziły do sklonowania i pełnej charakterystyki genu *bcr/abl* wskazujące, między innymi, na różnice

w miejscu pęknięcia genu *bcr* w procesie formowania chromosomu Ph pomiędzy komórkami przewlekłej białaczki szpikowej oraz ostrej białaczki szpikowej. Efektem tego jest mniejszy produkt białkowy genu *bcr/abl* w ostrej białaczce szpikowej, co wydaje się determinować odmienny przebieg kliniczny obu chorób (NOWELL 1994). Z chwilą gdy sonda genu *bcr/abl* stała się osiągalna dla badaczy i to nawet w formie gotowych do użycia zestawów odczynników, nastąpił zasadniczy przełom w diagnostyce i monitorowaniu leczenia przewlekłej białaczki szpikowej oraz niektórych innych postaci białaczek — w tym ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL) występującej zarówno u dzieci, jak i dorosłych (KOWALCZYK 1994) oraz ostrej białaczki szpikowej (AML) u dorosłych. Wykrycie chromosomu Ph w komórkach tych ostatnich białaczek ma znaczenie dla pacjentów, gdyż znacznie pogarsza rokowanie kliniczne (KOWALCZYK 1994, SKOTNICKI 1993).



Ryc. 4. Schemat translokacji t(9;22)(q34;q13) powstającej w komórkach przewlekłej białaczki szpikowej. Powstały w wyniku tej translokacji chromosom będący pochodnym chromosomu 22 (z prawej strony) nazywany chromosomem Ph.

Aczkolwiek badania cytogenetyczne chromosomów powinny być nadal wykonywane w diagnostyce tych chorób, to dysponując sondą genu *bcr/abl* możemy wykryć obecność komórek z tą specyficzną translokacją dzięki metodzie PCR. Jest to wysoce czuła technika biologii molekularnej, która pozwala na wykrycie, na przykład, jednej komórki z tą translokacją na milion prawidłowych komórek szpiku (NOWAK i JANUSZKIEWICZ 1994). Co więcej, dysponując znakowaną sondą tego genu można wykonać opisane powyżej molekularne badanie cytogenetyczne, tak zwaną hybrydyzację *in situ* polegającą na łączeniu się (hybrydyzacji) tej sondy z genem translokacyjnym, znajdującym się w jądrze interfazowym komórki i wykrywaniu miejsca hybrydyzacji metodami immunohistochemicznymi pod postacią barwnych reakcji lub fluorescencji. Tak więc aby wykryć chromosom Ph u pacjenta z podejrzeniem określonej białaczki, nie musimy w niektórych przypadkach hodować komórek szpiku w celu uzyskania chromosomów, lecz możemy identyfikować tę translokację w jądrze interfazalnym komórki szpiku na zwykłym rozmazie cytologicznym tychże komórek, a jeżeli komórki nowotwo-

rowe przedostaną się ze szpiku do krwi obwodowej to znajdujemy je w rozmazie tej krwi na szkiełku mikroskopowym.

Przedstawiony powyżej przykład chromosomu Ph ilustruje postęp metodyczny genetyków w badaniach chorób nowotworowych układu krwiotwórczego. Jakie zasadnicze implikacje poznawcze i praktyczne wynikają z osiągniętego postępu tych badań?

Po pierwsze, okazało się, że większość chorób nowotworowych układu krwiotwórczego wykazuje obecność swoistych aberracji chromosomowych dla określonego rodzaju białaczki. Stąd też analiza aberracji chromosomowych stała się niezależnym czynnikiem wspomagającym diagnostykę różnicową tych chorób. Tabela 1 przedstawia wybrane (najbardziej częste) choroby nowotworowe szpiku, w których wykryto swoiste aberracje chromosomowe.

Tabela 1

Przykłady swoistych aberracji chromosomowych występujących w nowotworach układu krwiotwórczego

Choroba	Anomalie chromosomowe
Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL)	t(1;19)(q23;p13)
Mielodysplazje (MDS)	del(5q)
Chłoniak Burkitt'a	t(8;14)(q24;q32)
Ostra białaczka szpikowa (AML)	t(8;21)(q22;q22)
Przewlekła białaczka szpikowa (CML)	t(9;22)(q34;q11)
Chłoniak złośliwy	t(14;18)(q32;q21)
Ostra białaczka promielocytowa (APL)	t(15;17)(q22;q11)
Ostra białaczka mielomonocytowa (AMMol)	inv(16)(p13q22) lub del(16)(q22)

Po drugie, kompleksowa analiza korelacji pomiędzy aberracjami chromosomowymi a przebiegiem klinicznym choroby wykazały, że obserwacje cytogenetyczne komórek nowotworowych mają znaczenie prognostyczne w klinice. Tabela 2 przedstawia znaczenie prognostyczne aberracji chromosomowych występujących w komórkach nowotworowych chorych z ostrą białaczką szpikową i ostrą białaczką limfoblastyczną (SKOTNICKI 1993). Należy podkreślić, że właściwe rozpoznanie choroby oraz znajomość czynnika ryzyka decydują o wyborze przez lekarzy określonej strategii leczenia to znaczy wyboru odpowiednich leków cytostatycznych i, niekiedy, wielkości dawek i czasu podawania tych leków (SKOTNICKI 1993, KOWALCZYK 1994).

Po trzecie, ponieważ analiza molekularna PCR lub hybrydyzacja *in situ* pozwalają na wykrycie niewielkiej liczby komórek nowotworowych (GRAY i PINKEL 1992), to wyniki tych badań mogą pomóc lekarzowi w szczególnych przypadkach postępowania klinicznego, kiedy lekarzowi niezbędna jest informacja — czy w organizmie pacjenta, pomimo intensywnego leczenia, pozostały komórki białaczkowe (tak zwana choroba resztkowa)? Podobnie w przypadku przeszczepu prawidłowych komórek szpiku pacjentowi, u którego w postępowaniu transplantacyjnym zniszczono promieniowaniem komórki nowotworowe szpiku, pojawia się pytanie — czy przeszczepione normalne komórki szpiku przyjęły się i tworzą

zdrową tkankę szpikową, a może nie zniszczone do końca komórki nowotworowe zaczynają się rozmnażać i „wypierać” prawidłowe komórki szpikowe uzyskane od zdrowego dawcy?

Tabela 2

Znaczenie prognostyczne aberracji chromosomowych u chorych z ostrą białaczką szpikową (AML) oraz z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL). (Według: SKOTNICKI 1993, zmodyfikowany)

Rokowanie kliniczne	Rodzaje aberracji chromosomowych	
	AML	ALL
Dobre	inv (16) del (16) t(8;21) t(15;17)	hiperdiploidia
Pośrednie	t(9;22) t(v;11) del(9q) +8	zbliżony do haploidii diploidia
Złe	t(6;9), del(5q), del(7q) t(1;7), inv(3) t(3;3)	t(1;19), t(4;11) t(9;22), t(8;14) t(11;14), t(v;12) del(6q)

Po czwarte, uzyskane informacje o genach zlokalizowanych w miejscach lub w pobliżu miejsc pęknięć chromosomów zaangażowanych w swoiste translokacje oraz znajomość produktów białkowych tych nowo powstających genów pogłębiają naszą wiedzę o mechanizmie powstawania nowotworów. Stwarza to także nadzieję na swoistą terapię przyczynową chorób nowotworowych. Niezwykle interesująca jest ostatnio dokonana obserwacja, że w wyniku translokacji pomiędzy chromosomami 15 i 17 w komórkach ostrej białaczki promielocytowej (APL) dochodzi do uszkodzenia genu (w chromosomie 17) odpowiedzialnego za budowę podjednostki receptora kwasu retinowego. Dlatego też w leczeniu powyższej białaczki stosuje się, z pozytywnym rezultatem, wysokie dawki kwasu retinowego (NOWELL 1994).

ABERRACJE CHROMOSOMOWE W KOMÓRKACH LITYCH GUZÓW NOWOTWOROWYCH

Dlaczego lite guzy nowotworowe człowieka stały się tak intensywnie badanym polem działania cytogenetyków? Na pewno sprawiły to odkrycia cytogenetyczne dokonane w komórkach nowotworowych układu krwiotwórczego, które zostały opisane w poprzednim podrozdziale. Albowiem, jeżeli wyjdziemy z założenia, że proces powstawania nowotworu jest związany z mutacją somatycznej komórki, należy oczekiwać, że podobnie jak w komórkach szpiku, w komórkach innych tkanek człowieka dochodzi do powstawania swoistych aberracji chromosomowych, które mają związek z transformacją nowotworową tychże komórek. Wyniki badań cytogenetycznych licznych guzów nowotworowych człowieka ostatnich lat wykazały, że oczekiwania genetyków były słuszne. Tabela 3 przedstawia najczę-

stsze swoiste aberracje chromosomowe występujące w niektórych litych guzach człowieka.

Tabela 3

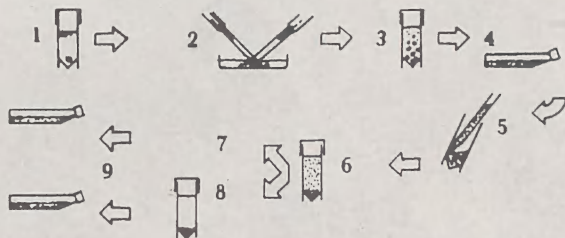
Przykłady swoistych aberracji chromosomowych występujących w litych guzach nowotworowych człowieka

Choroba	Anomalie chromosomowe
Guzy mezenchymalne: Łagodnie: Tuszczak	translokacje chromosomu 12q13-15 chromosomy pierścieniowe t(12;14)(q14-15;q23-24)
Mięśniak macicy Złośliwie: Tuszczakomięsak śluzowaty Maziówczak złośliwy Mięśniako-mięsak prażkowanokomórkowy	t(12;16)(q13.3;p11.2) t(X;18)(p11;q11) t(2;13)(q35-37;q14)
Guzy nabłonkowe: Rak oskrzela Rak nerek Guz Wlms'a (nerki)	del(3)(p14-23) del(3)(p11-14) oraz t(3;5)(p13;q22) del(11)(p13)
Guzy neurogenne, neuroektodermalne: Oponiak Siatkówczak Zwojak zarodkowy Guz Ewing'a	del(22)(q12-13) oraz -22 del(13)(q14) del(1)(p31-pter) oraz HSR/DMS t(11;22)(q24;q12) oraz +8

Wyniki te uzyskano po wielu latach przełamywania trudności metodycznych, albowiem o ile uzyskanie chromosomów ze szpiku kostnego człowieka nie przedstawia obecnie problemu metodycznego dla doświadczonego zespołu cytogenetyków, to analiza chromosomów komórek litych guzów nowotworowych stanowi nadal dość duży problem metodyczny. Wydaje się paradoksem, że komórki złośliwie rosnącego guza nowotworowego w zasadzie powinny „dostarczać” dużo komórek w stadium metafazy. Tymczasem praktyka wykazuje, że wyprowadzanie hodowli pierwotnych *in vitro* tychże komórek, które, jak wspomniano powyżej, stanowią główne źródło chromosomów, nie jest proste. Te niekiedy szybko dzielące się komórki w tkance guza nowotworowego, z chwilą „wyrwania” poprzez działanie chirurga z naturalnego środowiska jakim jest guz, tracą aktywność mitotyczną w hodowli *in vitro* i dość często hodowle te przeraśają prawidłowymi komórkami znajdującymi się w obrębie guza, na przykład fibroblastami. Zainteresowanych tym problemem Czytelników odsyłam do prac przeglądowych z tego zakresu (LIMON i MITELMAN 1994, LIMON 1994a).

W drugiej połowie lat osiemdziesiątych dokonano przełomu metodycznego w analizie chromosomów komórek litych guzów człowieka i obecnie najczęściej stosuje się następującą procedurę (ryc. 5): podczas operacji chirurg wycina w jałowych warunkach fragment tkanki guza nowotworowego i w sterylnym naczyniu przesyła do laboratorium cytogenetycznego. Tam również w warunkach jałowych rozdrabnia się nożyczkami tkankę guza i poddaje działaniu enzymu zwanego kolagenazą przez okres od kilku do kilkunastu godzin. Enzym ten powoduje uwolnienie komórek z tkanki guza i tym samym uzyskuje się zawiesinę pojedynczych komórek nowotworowych, z których po eliminacji mar-

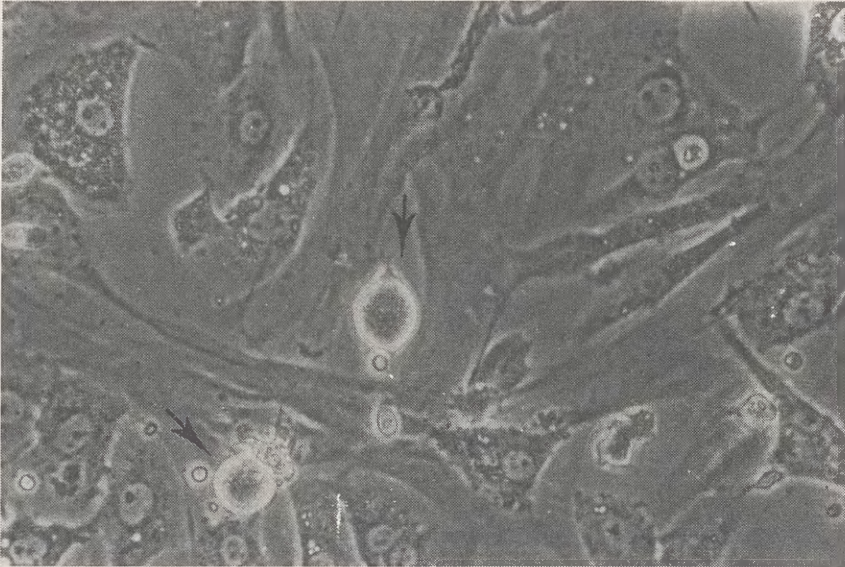
tych komórek zakłada się w naczyniach hodowlanych (najczęściej plastikowych) pierwotną hodowlę komórkową stosując różnego rodzaju wzbogacone pożywki (LIMON i MITELMAN 1994, LIMON 1994a). W ten sposób komórki nowotworowe, wprowadzone do pierwotnej hodowli *in vitro* po kilkunastu godzinach, a najczęściej po kilku dobach zaczynają się rozmnażać (ryc. 6) i stają się źródłem chromosomów dla cytogenetyka poszukującego swoistych aberracji chromosomowych w różnych rodzajach guzów nowotworowych.



Ryc. 5. Proces zakładania pierwotnej hodowli *in vitro* z litego guza nowotworowego (LIMON i MITELMAN 1994). Kolejne etapy tej procedury są opisane w tekście.

Fakt występowania swoistych aberracji chromosomowych w niektórych rodzajach guzów nowotworowych człowieka, podobnie jak w chorobach nowotworowych hematologicznych, nadał nową rolę cytogenetyce w diagnostyce różnicowej tych guzów. Oczywiście, podstawowe rozpoznanie tych nowotworów opiera się na rutynowych badaniach histopatologicznych prowadzonych przez patologów, czy też immunohistochemicznych czy też w mikroskopie elektronowym. Cytogenetyk może jednak wypowiedzieć się co do rozpoznania histopatologicznego w przypadku tak zwanych anaplastycznych, niskodróżnicowanych złośliwych guzów, kiedy to wyniki wyżej wspomnianych metod stosowanych przez patologów nie dają jednoznacznej odpowiedzi (LIMON i MITELMAN 1994).

Podobnie jak w przypadku chorób nowotworowych szpiku genetycy molekularni zainteresowali się odkryciami cytogenetyków dokonanymi na materiale pochodzącym z litych guzów nowotworowych. Na przykładzie nowotworu dziecięcego, nazywanego mięsakiem Ewing'a, opiszę dokonany w ostatnich latach postęp metodyczny w rozpoznawaniu tego guza, które dość często przysparza kłopotów diagnostycznych patologom, a wczesna diagnoza tego złośliwego nowotworu ma istotne znaczenie w wyborze terapii. W roku 1984 TURC-CAREL i współpracownicy odkryli, że komórki tego nowotworu posiadają translokację pomiędzy chromosomami 11 i 22 — $t(11;22)(q24;q12)$. Już wkrótce okazało się, że ponad 90% tych nowotworów wykazuje obecność tej translokacji i w ten sposób analiza cytogenetyczna stała się ważnym czynnikiem diagnostycznym tego nowotworu. Fakt ten ma również implikacje dotyczące pochodzenia tkankowego tego nowotworu. Otóż przez wiele lat sądzono, że nowotwór ten wywodzi się z tkanki mezenchymalnej i dlatego nazywano ten guz mięsakiem. Tymczasem identyczną translokację pomiędzy chromosomami 11 i 22 wykryto także w guzach nowotworowych o jednoznacznym pochodzeniu z komórek zarodkowego grzebienia nerwowego. Podobieństwo tej translokacji sugeruje zatem, że guz Ewing'a wywodzi się z tkanki neuroektodermalnej i nie jest mięsakiem — tak więc wyniki badań cytogenetycznych mogą niekiedy dostarczać informacji



Ryc. 6. Fotografia hodowli pierwotnej nadnerczaka. Widoczne są rosące *in vitro* komórki pośród których dwie komórki, znajdują się w stadium metafazy (strzałki) — jest to właściwy moment do dodania do hodowli kolchicyny zatrzymującej podziały komórkowe w stadium metafazy.

o etiologii niektórych nowotworów. W roku 1993 wyizolowano i sklonowano gen obejmujący tę translokację i scharakteryzowano produkt białkowy tego genu (SANDBERG i BRIDGE 1994)). Osiągnięcie to zostało natychmiast wykorzystane w praktyce klinicznej. Podobnie jak w przypadku genu *bcr/abl* w hematologii onkologicznej można obecnie rozpoznawać guz Ewing'a technikami molekularnymi badając bezpośrednio gen translokacyjny w izolowanym DNA komórek nowotworowych techniką PCR lub, bez hodowli komórkowej, identyfikować obecność tego genu w jądrach interfazalnych komórek tego nowotworu z użyciem opisanej uprzednio techniki hybrydyzacji *in situ* (FISH) (GIOVANNINI i współaut. 1992). Obie techniki są szybkie i cechują się wysokim stopniem swoistości, ale niestety i wysokimi kosztami.

ZNACZENIE ABERRACJI CHROMOSOMOWYCH W PROGNOZOWANIU KLINICZNYM

Na obecnym etapie rozwoju cytogenetyki litych guzów człowieka stosunkowo niewiele można powiedzieć o roli tych badań w prognozowaniu klinicznym. Najlepiej udokumentowaną zależność pomiędzy obrazem cytogenetycznym guza a przebiegiem klinicznym choroby znajdujemy w przypadku zwojaka zarodkowego (neuroblastoma) — guza nowotworowego występującego w wieku dziecięcym. Okazuje się, że o pacjentach w wieku poniżej pierwszego roku życia, w guzach których występuje hiperdiploidalna lub okołotriploidalna liczba chromosomów z brakiem lub niewielką liczbą aberracji strukturalnych, można rokować dobrze. Natomiast pacjenci powyżej 5 roku życia z zaawansowanymi

guzami o okołodiploidalnej lub okołotetraploidalnej liczbie chromosomów z równoczesną delecją ramion krótkich chromosomu 1 nie rokują wyzdrowienia (SANDBERG i BRIDGE 1994). Dokonano szeregu obserwacji podobnych korelacji w innych guzach nowotworowych człowieka, a szczególnie w rakach pęcherza moczowego, stercza, jajników i okrężnicy oraz gwiaździaków mózgu. Jednak większość tych obserwacji jest jeszcze na wstępnym etapie i wymaga dalszych badań na większej liczbie pacjentów (LIMON i MITELMAN 1994, LIMON 1994b).

Na obecnym stopniu rozwoju naszej wiedzy można wymienić następujące praktyczne i poznawcze znaczenia badań cytogenetycznych w patologii i klinice litych guzów nowotworowych człowieka.

Po pierwsze, już sam fakt wykrycia w jakichkolwiek komórkach powtarzalnych licznych aberracji chromosomowych wskazuje na nowotworowy charakter badanych komórek.

Po drugie, wykrycie swoistej aberracji chromosomowej w komórkach nowotworowych umożliwia, w niektórych przypadkach, przeprowadzenie diagnostyki różnicowej tych guzów. Uściślenie tej diagnozy z kolei decyduje niekiedy o wyborze sposobu leczenia pacjenta z danym guzem nowotworowym. Należy jednak zaznaczyć, że zbyt mała liczba danych powoduje, że analiza aberracji chromosomowych w guzach litych nie jest niezależnym czynnikiem diagnostycznym, tak jak ma to miejsce w nowotworach układu krwiotwórczego.

Po trzecie, niektóre obserwacje cytogenetyczne komórek litych guzów mają zastosowanie w prognozowaniu klinicznym. Uzyskane do tej pory dane upoważniają do przypuszczenia, że zgromadzenie większej liczby danych pozwoli, w najbliższej przyszłości, na ściśle określenie zależności pomiędzy rodzajami i złożonością aberracji chromosomowych występujących w komórkach guza nowotworowego a przebiegiem klinicznym choroby.

Po czwarte, obserwowane częste utraty materiału genetycznego w litych guzach, szczególnie pochodzenia nabłonkowego, pod postacią delecji fragmentu lub braku całego chromosomu doprowadziły do odkrycia tak zwanych genów supresorowych pełniących istotną rolę w regulacji funkcji onkogenów. A zatem wyniki połączonych badań cytogenetycznych i molekularnych dostarczają wiele istotnych informacji o mechanizmie powstawania i progresji nowotworów.

Do przedstawionych w tabelach 1 i 3 wykazów chorób nowotworowych człowieka, w komórkach których znaleziono swoiste aberracje chromosomowe, stale przybywają nowe i należy oczekiwać, że do końca XX wieku większość swoistych aberracji chromosomowych oraz powstające w ich wyniku specyficzne białka w nowotworach człowieka zostaną zdefiniowane. Dynamiczny postęp metodyczny badań cytogenetycznych oraz molekularnych sprawia, że cytogenetyk oraz biolog molekularny stają się pomocnikami patologa w diagnostyce chorób nowotworowych. Już obecnie wyniki badań genetycznych znalazły zastosowanie w klinicznej diagnozie, w prognozowaniu i monitorowaniu leczenia niektórych chorób nowotworowych człowieka. Najistotniejszym wydaje się jednak postęp badań genetycznych nad mechanizmem procesu powstawania nowotworów, albowiem poznawanie tego złożonego procesu działa stymulująco na poszukiwania nowych rozwiązań terapeutycznych i stwarza nadzieję na swoiste leczenie jednej z najczęstszych poważnych chorób trapiących współczesnego człowieka — choroby nowotworowej.

SŁOWNIK TERMINÓW GENETYCZNYCH

Aberracje chromosomowe liczbowe (genomowe):

Diploidia — prawidłowa liczba chromosomów w komórce (u człowieka $46 = 2n$).

Aneuploidia — zwiększenie lub zmniejszenie się liczby chromosomów w komórce o liczbę 22 lub mniejszą, to znaczy $46 + 22$. Zwiększenie się liczby chromosomów nazywamy hiperdiploidią, a zmniejszenie hipodiploidią. Zwiększenie liczby chromosomów o jeden nazywamy trisomią i na przykład dla chromosomu 7 zapisujemy +7, a utratę jednego chromosomu nazywamy monosomią i zapisujemy -7.

Poliploidia — zwiększenie liczby chromosomów w komórkach, na przykład u człowieka o liczbę $23 = n$. Komórka triploidalna posiada $46 + 23 = 69$ chromosomów, tetraploidalna 92 itd.

Aberracje chromosomowe strukturalne:

Delecja — utrata fragmentu dystalnego chromosomu (jedno pęknięcie) lub śródechmatydowego (dwa pęknięcia). Jeżeli dystalne delecje dotyczą na przykład prażka 12 ramion krótkich chromosomu 7 to zapisujemy: $\text{del}(7)(p12)$, a prażka 21 ramion długich tego chromosomu: $\text{del}(7)(q21)$.

Translokacja — przemieszczanie się fragmentów ramion chromosomów pomiędzy nimi. Może być wymiana wzajemna lub niewzajemna. Dotyczyć może więcej niż dwóch chromosomów. Jeżeli doszło do wzajemnej translokacji pomiędzy chromosomami 9 i 22 z miejscami pęknięć $9q34$ i $22q11$, to zapisujemy: $t(9;22)(q34;q11)$.

Duplikacja — podwojenie się fragmentów chromosomów. Stosujemy zapis: $\text{dup}(2)(p23-p14)$.

Inwersja — na skutek dwóch pęknięć w obrębie chromatyd jednego chromosomu dochodzi do odwrócenia się tego odcinka o 180 i następnie do ponownego połączenia się obu końców. Inwersja może być pericentryczna obejmująca centromer, lub paracentryczna zachodząca w obrębie jednego z ramion chromosomu. Najprostszy zapis inwersji: $\text{inv}(2)(p21q31)$.

Izochromosomy — chromosomy zbudowane wyłącznie z ramion długich lub krótkich chromosomu. Jeżeli izochromosom jest zbudowany z ramion długich chromosomu 7 to zapis wygląda następująco: $i(7)(q10)$.

Centromer — przewężenie pierwotne chromosomu, miejsce połączenia obu chromatyd. W zależności od jego umiejscowienia wyróżniamy chromosomy: metacentryczne (u człowieka nr 1, 3, 16, 19, 20), akrocentryczne (odp. 13, 14, 15, 21, 22 i Y), submetacentryczne (wszystkie pozostałe chromosomy). Patrz rycina. 1.

Chromosomy „double minutes” (DMS): malutkie chromosomy pojawiające się w metafazach w liczbie od kilku do kilkuset. Występują głównie w komórkach nowotworowych niektórych guzów — uważa się, że są cytologicznym efektem amplifikacji (powielenia się wielu kopii) genów.

HSR — Homogenously Staining Regions: jednolicie wybarwiające się regiony ramion chromosomów komórek nowotworowych. Uważa się, że podobnie jak DMS są efektem cytologicznym amplifikacji genów.

Kariotyp — reprezentatywny zestaw chromosomów danego osobnika (lub guza nowotworowego) ułożony według obowiązujących zasad). Kariogram: zestaw chromosomów jednej komórki — nie zawsze stanowi kariotyp danej osoby, gdyż czasami organizm jest tworzony przez komórki o różnych kariogramach (tak zwane organizmy mozaikowe).

Klonowanie — wyizolowanie określonego fragmentu DNA (na przykład znanego genu) i jego namnożenie w koloniach bakteryjnych.

Geny supresorowe (antyonkogeny) — geny działające supresyjnie na aktywność onkogenów. Dziedziczą się autosomalnie recesywnie. Do tej pory zlokalizowano w chromosomach człowieka około 10 takich genów, między innymi gen *p53* w chromosomie 17p13. Uważa się, że utrata tych genów prowadzi do wzrostu ekspresji protoonkogenów.

Hybrydyzacja — łączenie się dwóch pojedynczych i komplementarnych nici DNA w cząsteczkę dwuniciową.

Protoonkogeny — zlokalizowane w jądrze komórkowym geny homologiczne do retrowirusowych onkogenów. Scharakteryzowano ponad 20 takich genów, które między innymi kontrolują różnicowanie się i proliferację komórek. W przypadku mutacji tych genów może dochodzić do powstawania nieprawidłowych produktów białkowych uczestniczących w procesie transformacji nowotworowej.

PCR — technika molekularna polegająca na wielokrotnym powtórzeniu reakcji replikacji określonego fragmentu DNA w wyniku czego otrzymuje się setki lub tysiące kopii takiego samego odcinka DNA (może to być określony gen).

Sonda — sklonowany fragment DNA lub RNA, oznakowany radioaktywnie (lub innym znacznikiem na przykład fluorochromem) służący do wykrycia sekwencji komplementarnych nukleotydów poprzez hybrydyzację, na przykład, z chromosomami lub jądrami interfazowymi komórek.

WHY SHOULD CHROMOSOME ABERRATIONS IN HUMAN NEOPLASTIC CELLS BE ANALYZED BY CYTOGENETISTS?

Cancer and leukemia are genetic diseases not at the organism level, although occasionally this is the case, but at the level of individual cells. The main difference between a neoplastic cell and a normal one is that the former has undergone DNA change(s) — mutation(s) that enable it to escape the organism's normal proliferation control mechanisms. On the cytological level, during mitosis the genome (DNA) of the cell takes the form of chromosomes. Many hematologic malignancies and solid tumors in man are characterized by acquired genetic rearrangements that can be detected by cytogenetic methods as clonal chromosomal abnormalities mostly as deletions or translocations, or by molecular studies as a gene mutations. A combination of cytogenetic and molecular genetic techniques has been used to provide considerable information on the development of leukemias and solid tumors. Chromosome aberrations may be primary, i.e. occurring at the beginning of a tumor's life and presumably playing an important role in the pathogenesis of neoplastic cells, or secondary, i.e. occurring during later tumor evolution-progression. In general, chromosome studies of human cancer and leukemias have provided important clues to the location of relevant genes and their products (tumor-specific proteins) and to the mechanisms by which their growth regulatory functions have been altered. The specific chromosome aberrations in a particular tumor type or leukemia also serve as disease markers that help in reaching a more precise diagnosis, including a better assessment of the prognosis in individual cases. Thus, the distinct chromosomal aberrations and molecular genetic findings have already found clinical application in differential diagnosis, prognosis, and monitoring of the treated patients, and will be helpful in designing a therapy based on molecular understanding and methodology.

LITERATURA

- BEIL B., LIMON J., 1973. *Teoretyczne aspekty współczesnych metod cytogenetycznych*. Przegl Zool. XVII: 411-420.
- BOCIAN E., 1993. *Zastosowanie nowoczesnych technik analizy chromosomowej w diagnostyce klinicznej chorób genetycznych — hybrydyzacja „in situ”*. Klinika 2, 42-46.
- CASPERSSON T., ZECH L., JOHANSSON C., 1970. *Differential banding of alkylating fluorochromes in human chromosomes*. Exp Cell Res, 60, 315-319.
- GIOVANNINI M., SELLERI L., BIEGEL J. A., SCOTLANDI K., EMANUEL B. S., EVANS G., 1992. *Interphase cytogenetics for the detection of the t(11;22)(q24;q12) in small round cell tumors*. J Clin Invest 90, 1911-1918.
- GRAY J. W., PINKEL D., 1992. *Molecular cytogenetics in human cancer diagnosis*. Cancer 69, 1536-1542.
- GRONWALD J., LUBIŃSKI J., ZAJĄCZEK St., 1994. *Cytogenetyka interfazalna w diagnostyce aberracji chromosomowych w nowotworach*. Nowotwory. Supl. 1, 44, 34-39.
- HAUS O., 1992. *Aberracje chromosomów w przewlekłej białaczce szpikowej*. Acta Haematol Pol., 23, supl. 1, 5-11.
- HEIM S., MITELMAN F., 1987. *Cancer Cytogenetics*. Alan R. Liss, New York;
- ISCN, 1985. *An International System for Human Cytogenetics Nomenclature*. Birth Defects: Original Article Series, 21, National Foundation — March of Dimes, New York.
- KOWALCZYK J. R., 1994. *Cytogenetyka ostrych białaczek*. Nowotwory. Supl. 1, 44, 5-10.
- LIMON J., 1994a. *Rak sutka u kobiet — postępy metodyczne w badaniach cytogenetycznych*. Nowotwory. Supl. 1, 44, 27-33.
- LIMON J., 1994b. *Cytogenetics of astrocytoma*. Folia Neuropathol. 32, 205-207.
- LIMON J., MITELMAN F., 1994. *Znaczenie aberracji chromosomowych w litych guzach nowotworowych człowieka*. Pat Pol, 45, 1-15.
- NOWAK J., JANUSZKIEWICZ D., 1994. *Monitorowanie chemioterapii białaczki limfoblastycznej metodą PCR*. Nowotwory. Supl. 1, 44, 90-101.
- NOWELL P. C., HUNDERFORD D. A., 1960. *A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia*. Science 132, 1487.
- NOWELL P. C., 1994. *Cytogenetic approaches to human cancer genes*. FASEB J 8, 408-413.
- RABBITT T. H., 1994. *Chromosomal translocations in human cancer*. Nature 372, 143-149.
- ROWLEY J. D., 1973. *A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining*. Nature 54, 39-45.
- SANDBERG A. A., 1990. *Chromosomes in Human Cancer and Leukemia*. Elsevier. New York.
- SANDBERG A. A., BRIDGE J., 1994. *The Cytogenetics of Bone and Soft Tissue Tumors*. Medical Intelligence Unit. Wyd. R.G.Landes Company, Austin.
- SKOTNICKI A. A., 1993. *Białaczki. Diagnostyka i chemioterapia ostrych białaczek i zespołów mielodysplastycznych*. Kraków. Wyd. Upjohn Poland.
- TURC-CAREL C., PHILIP I., BERGER M. P., PHILIP T., LENOIR G. M., 1984. *Chromosome study of Ewing's sarcoma (ES) cell lines. Consistency of a reciprocal translocation t(11;22)(q24;q12)*. Cancer Genet Cytogenet., 12, 1-19.
- ZAWADA M., LATOS-BIELEŃSKA A., 1993. *Hybrydyzacja in situ (ISH) w cytogenetyce*. Post Biol Kom, 20, 363-371.

JAN STEFFEN

*Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie,
Wawelska 15, 00-973 Warszawa*

UWARUNKOWANIA DZIEDZICZNE W ZACHOROWANIACH NA NOWOTWORY ZŁOŚLIWE U LUDZI

Badania ostatnich lat dostarczają wielu dowodów na to, że predyspozycje dziedziczne są bardzo istotnym czynnikiem w zachorowalności na nowotwory złośliwe w skali populacyjnej nie tylko w wieku dziecięcym lecz także u ludzi dorosłych. Jednakże nosicielstwo przeważającej większości takich predyspozycji oraz ich związek przyczynowy z zachorowaniami na nowotwory złośliwe w indywidualnych przypadkach są w dalszym ciągu rzadko rozpoznawalne.

Obecny szybki postęp wiedzy o dziedzicznych uwarunkowaniach zachorowań na nowotwory złośliwe wynika głównie z trzech kierunków badań (STEFFEN 1993):

- z analiz metodami epidemiologicznymi częstości drugich zachorowań na różne nowotwory wśród krewnych, zwłaszcza pierwszego stopnia;
- z poszukiwań związków przyczynowych pomiędzy zachorowaniami na nowotwory złośliwe a polimorfizmem lub dziedzicznymi defektami genów, które mogą zwiększać wrażliwość na znane czynniki rakotwórcze;
- z rozwoju metod, które umożliwiają lokalizowanie w chromosomach i analizę dziedzicznych mutacji genowych w badaniach rodzin obciążonych silnymi dziedzicznymi predyspozycjami do rozwoju nowotworów złośliwych.

Te ostatnie badania mają szczególnie istotne znaczenie dla praktyki onkologicznej; rozpoznanie predyspozycji przed jej ujawnieniem się otwiera bowiem między innymi perspektywę wcześniejszego rozpoznania i skuteczniejszego leczenia nowotworów u jej nosicieli.

PROBLEMY ZWIĄZANE Z ROZPOZNAWANIEM NOSICIELSTWA PREDYSPOZYCJI DZIEDZICZNYCH W PRAKTYCE ONKOLOGICZNEJ

Liczbę predyspozycji dziedzicznych, które mogą warunkować zwiększone ryzyko zachorowania na jeden lub kilka typów nowotworów złośliwych można na podstawie obecnego stanu wiedzy oszacować na kilkaset.

Względnie łatwo są rozpoznawalne jednak tylko dziedziczne defekty genowe przejawiające się rodzinnymi zachorowaniami na nowotwory złośliwe — złasz-

cza wieku dziecięcego — rzadkie w populacji — a także predyspozycje, którym towarzyszą inne łatwo uchwytne zmiany funkcjonalne i/lub morfologiczne w różnych układach lub narządach lub w których nowotwory rozwijają się na podłożu dziedzicznych stanów przedrakowych. Dotychczas poznano około 100 silnych, w większości rzadkich lub bardzo rzadkich dziedzicznych predyspozycji do rozwoju nowotworów, które udało się wyodrębnić w badaniach rodzinnych na podstawie takich kryteriów (STEFFEN 1984, CANNON-ALBRIGHT i współaut. 1991). Do nowotworów wieku dziecięcego, których dziedziczne uwarunkowanie jest względnie łatwo rozpoznawane, należą między innymi siatkówczak (*retinoblastoma*), guz Wilms'a (*nephroblastoma*) i rozwijające się w tym okresie życia guzy w gruczołach wydzielania wewnętrznego. Od lat znane i względnie łatwo rozpoznawalne są także liczne genodermatozy, na podłożu których rozwijają się raki skóry oraz kilka zespołów rodzinnej polipowatości jelit, która jest stanem przednowotworowym w rozwoju raków jelita grubego. Podstawą do rozpoznania homozygotycznego nosicielstwa defektów genowych, które są podłożem bardzo wysokiego ryzyka wczesnych zachorowań na białaczkę i nowotwory centralnego układu nerwowego u chorych na zespoły Fanconiego, Blooma i *ataxia teleangiectasia* są wczesne objawy dysfunkcji różnych układów w tym zwłaszcza immunologicznego i — w przypadku *ataxia teleangiectasia* — nerwowego.

Większości dziedzicznych predyspozycji do rozwoju nowotworów złośliwych nie towarzyszą jednak takie łatwo uchwytne zmiany fenotypu.

Praktycznie niemożliwe jest rozpoznawanie na podstawie analiz zachorowalności rodzinnej predyspozycji ujawniających się jedynie w warunkach ekspozycji na określone czynniki rakotwórcze.

Rozpoznawanie silnych predyspozycji do rozwoju nowotworów nie pozostających w uchwytym związku z narażeniami egzogennymi, dziedziczonych jako cechy dominujące, może ułatwić stwierdzenie rodzinnych agregacji zachorowań na jeden lub kilka typów nowotworów złośliwych. Innymi przyczynami takich agregacji mogą być jednak zarówno rodzinna ekspozycja na ten sam silny egzogeny czynnik rakotwórczy, jak i — w przypadku nowotworów częstych w populacji — losowe skupienie zachorowań. Nowotwory uwarunkowane dziedzicznymi predyspozycjami nie wyróżniają się z reguły dostatecznie umiejscowieniem, cechami budowy histologicznej ani przebiegiem. Wczesny wiek zachorowania i/lub rozwój u tego samego chorego kolejnego nowotworu w innej lokalizacji mogą być pomocne w rozpoznaniu nosicielstwa genów predyspozycji jedynie w kontekście innych cech, w tym zwłaszcza występowania rodzinnego. Kryterium rodzinnego występowania nowotworów jest mało użyteczne w rozpoznawaniu obciążenia dziedzicznego w niewielkich rodzinach, ponieważ prawdopodobieństwo nosicielstwa dotyczy średnio 50% krewnych pierwszego stopnia, wiek zachorowania nosicieli jest różny a u niektórych z nich nie dochodzi do ekspresji defektu genowego. Trudności w rozpoznawaniu dziedzicznego tła zachorowań w takich rodzinach są odpowiednio większe, jeżeli dotyczą nowotworów rozwijających się tylko u jednej płci — na przykład raków sutka, jajnika, trzonu macicy, stercza czy męskiej gonady.

EPIDEMIOLOGIA RODZINNYCH ZACHOROWAŃ NA NOWOTWORY ZŁOŚLIWE

Badania epidemiologiczne a zwłaszcza analizy przyczyn zgonów bliskich krewnych na podstawie danych zgromadzonych w tak zwanych rejestrach genealogicznych umożliwiają oszacowanie wpływu wszystkich predyspozycji dziedzicznych na zachorowalność na nowotwory złośliwe w poszczególnych lokalizacjach narządowych — niezależnie od wiedzy o ich naturze oraz o prawdopodobieństwie ich ekspresji u nosicieli. Z analiz tego typu (CANNON-ALBRIGHT i współaut. 1991, 1994, GOLDGAR i współaut. 1994) wynika, że czynniki dziedziczne odgrywają istotną rolę w zachorowalności na wszystkie nowotwory złośliwe dotąd badane tą metodą. Ryzyko drugiego zachorowania na ten sam typ nowotworu wśród krewnych pierwszego stopnia na raki: żołądka, jelita grubego, płuca, jajnika, sutka, stercza czy nerki jest, na przykład, zwiększone w stosunku do populacji kontrolnej 2 do 3-krotnie a ryzyko drugiego zachorowania na raka krtani aż 8-krotnie. Spośród nowotworów rzadszych w populacji szczególnie wysokim bo aż 5–9-krotnie zwiększonym ryzykiem drugiego zachorowania wśród krewnych pierwszego stopnia wyróżniają się białaczki limfatyczne, złośliwe nowotwory jądra i raki tarczycy. W większości z wymienionych lokalizacji wskaźniki zwiększonego rodzinnego ryzyka zachorowania obliczone w ten sposób są z reguły jeszcze wyższe, jeżeli uwzględnić tylko nowotwory rozpoznane przed 50-tym lub 60-tym rokiem życia.

Analizy danych z rejestrów nowotworowych uzupełnione informacjami o zachorowaniach lub przyczynach zgonów wśród bliskich krewnych dostarczają również danych użytecznych dla wyodrębnienia różnych typów dziedzicznych predyspozycji do rozwoju poszczególnych nowotworów złośliwych. W wyniku takich badań ustalono na przykład, że obok predyspozycji do rozwoju raka sutka u młodych kobiet istnieją też predyspozycje ujawniające się zachorowaniami rodzinnymi na ten nowotwór w starszych grupach wieku (METTLIN i współaut. 1990). Na podstawie analiz epidemiologicznych wykazano również, że zachorowania na jeden typ nowotworu mogą wiązać się ze zwiększonym ryzykiem zachorowania wśród krewnych pierwszego stopnia na nowotwory złośliwe w innych lokalizacjach (GOLDGAR i współaut. 1994). W uzupełnieniu do tego, dzięki analizom danych zawartych w rejestrach genealogicznych zidentyfikowano rodziny, w których występują różne „wzory” asocjacji zachorowań, na przykład: rak sutka — rak jajnika; rak sutka — rak stercza; rak sutka — nowotwory układu limfatycznego, centralnego układu nerwowego i mięsaki (CANNON-ALBRIGHT i współaut. 1991, STEFFEN 1994).

Wyodrębnienie zachorowań rodzinnych na jeden typ nowotworu występujących w różnych grupach wieku, a zwłaszcza analizy „wzorów” asocjacji zachorowań na nowotwory w różnych lokalizacjach dowodzą więc, że:

- podłożem dziedzicznie uwarunkowanych zachorowań na jeden i ten sam typ nowotworu mogą być różne typy predyspozycji;
- niektóre dziedziczne defekty lub polimorficzne warianty genowe mogą przejawiać się predyspozycjami do rozwoju nowotworów złośliwych w kilku różnych lokalizacjach narządowych.

MECHANIZMY DZIEDZICZNYCH PREDYSPOZYCJI DO ROZWOJU NOWOTWORÓW ZŁOŚLIWYCH

Mnogość predyspozycji dziedzicznych do rozwoju nowotworów złośliwych wynika stąd, że ryzyko zachorowania na nie może być modyfikowane w kolejnych fazach karcynogenezy przez wiele grup genów o różnej funkcji. W szczególności:

1. Prawdopodobieństwo powstania mutacji somatycznych w krytycznych genach komórkowych pod wpływem różnych czynników rakotwórczych pozostaje w związku z funkcją genów, które kontrolują metabolizm chemicznych czynników rakotwórczych, odporność i naprawę uszkodzonego DNA.

2. Proces nowotworowego przekształcenia komórek w różnych tkankach i narządach może przebiegać torami mutacyjnymi dotyczącymi różnych genów. Prosty, chociaż nie jedynym efektem dziedzicznych defektów któregośkolwiek z takich genów jest skrócenie u nosicieli toru mutacyjnego, prowadzącego w komórkach somatycznych do rozwoju nowotworu, o jedno ogniwo.

3. Rozwój klinicznie wykrywalnego nowotworu staje się możliwy dopiero wówczas, gdy komórki przekształcone uzyskają warunki do rozplemu. Warunki te podlegają kontroli szeregu genów zarówno w komórkach przekształconych, jak i nienowotworowych komórkach z różnych tkanek obciążonego ustroju.

Propozycję klasyfikacji dziedzicznych predyspozycji według kryterium odnoszącego działanie warunkujących je genów do kolejnych faz karcynogenezy — szerzej rozwiniętą w innym miejscu (STEFFEN 1993) przedstawiono w tabelach 1–3. Przedstawiona klasyfikacja wydaje się być użyteczna między innymi dla wyjaśnienia uwarunkowań mieszanych (to jest oddziaływań czynników środowiskowych i genów w zachorowaniach na nowotwory) a także sugeruje kierunki badań nad dziedzicznymi predyspozycjami dotychczas niedostatecznie rozpoznanymi.

Ekspresja predyspozycji dziedzicznych zestawionych w tabeli 1 jest uwarunkowana narażeniem na działanie różnych czynników rakotwórczych. Dziedziczny polimorfizm enzymów zwłaszcza z różnych rodzin monooksygenaz kontrolowanych przez geny z rodzin CYP 1, CYP 2 i 3 oraz enzymów detoksyfikujących — zwłaszcza transferazy S-glutationu i N-acetylotransferaz, przejawiający się zróżnicowaną akumulacją i detoksyfikacją aktywnych metabolitów różnych egzo- i endogennych karcynogenów chemicznych — znajduje swoje odzwierciedlenie w kilkukrotnie zwiększonym ryzyku zachorowania nosicieli niektórych wariantów polimorficznych między innymi na raka płuca, pęcherza moczowego, jelita grubego i wątroby (SMITH i współaut. 1994). Defekty lub polimorfizm genów kontrolujących neutralizację silnie rakotwórczych wolnych rodników powstających w tkankach napromienianych jest prawdopodobnie jednym z czynników warunkujących osobniczo zróżnicowaną wrażliwość na karcynogenne działanie promieniowania o wysokich energiach (COX 1994). Czynniki dziedziczne determinują zapewne również ryzyko rozwoju nowotworów inicjowanych przez wirusy onkogenne, gdyż z badań rodzinnych wynika, że odporność na czynniki infekcyjne jest silnie dziedzicznie zdeterminowana (SØRENSEN i współaut. 1988).

Tabela 1

Wpływ różnych grup genów na przebieg karcynogenezy I.
Modyfikacja działania karcynogenów inicjujących

Funkcja genów	Predyspozycje dziedziczne	Częstość w populacji — najczęstsze nowotwory
A. Efektywna ekspozycja na karcynogeny		
Metabolizm ksenobiotyków i karcynogenów endogennych (w tym wolnych rodników)	polimorfizm enzymów: monooksygenazy hydroksylaza aryłowa transferaza-S glutationu transferaza acetylowa dysmutaza nadtlenkowa	bardzo częste: nowotwory „tytonio zależne”, zawodowe, radiogenne, środowiskowe (?), współwarunkowane karcynogenami endogennymi (?) — raki płuca, pęcherza, jelita grubego i wątroby
Metabolizm sterydów	polimorfizm enzymów (?)	częste (?): nowotwory hormonozależne — raki sutka, trzonu macicy, stercza (?)
Ochrona przed U. V.	albinizm (polimorfizm enzymów syntetyzujących melaninę ?)	rzadkie — raki skóry bardzo częste — raki skóry, czerniak
Odporność infekcyjna	?	bardzo częste (?): niektóre białaczki i chłoniaki; rak szyjki macicy, odbytu, niektóre raki skóry, rak wątroby (?)
B. Naprawa zmian premutacyjnych		
Naprawa DNA i chromosomów	<i>xeroderma pigmentosum</i> zespół Wernera zespół Blooma zespół Fanconiego <i>ataxia teleangiectasia</i> niektóre genodermatozy	homozygoty — rzadkie: białaczki, raki skóry i guzy centralnego układu nerwowego; heterozygoty — bardzo częste: nowotwory w różnych lokalizacjach narządowych w wieku dojrzłym

Prawdopodobieństwo utrwalenia się zmian mutacyjnych indukowanych przez karcynogeny fizyczne i chemiczne jest uwarunkowane dziedzicznie zdeteminowaną wydolnością mechanizmów enzymatycznej naprawy uszkodzonego DNA. Dowodem tego jest wielokrotnie zwiększona, wczesna zachorowalność na nowotwory złośliwe u homozygotycznych nosicieli różnych dziedzicznych defektów genów kontrolujących te procesy. Znacznie częstsze w populacji, heterozygotyczne, klinicznie niewykrywalne nosicielstwo defektów tych genów, warunkuje bardziej umiarkowane, kilkakrotnie zwiększone ryzyko zachorowania na różne nowotwory złośliwe w wieku dojrzłym (KNIGHT i współaut. 1993). Szacuje się na przykład, że heterozygotyczne nosicielstwo genu *ataxia teleangiectasia* występujące w populacji z częstością 1%–2% warunkuje około 9% zachorowań na raka sutka; ponadto nosiciele tego genu są obciążeni kilkakrotnie zwiększonym ryzykiem zachorowania na inne nowotwory narządów wewnętrznych (SWIFT i współaut. 1991). Różne dziedzicznie uwarunkowane defekty przejawiające się upośledzoną naprawą uszkodzeń chromosomów po napromienianiu komórek poza ustrojem występują w populacji z częstością około 25%, a ich nosicielstwo warunkuje kilkakrotnie zwiększone ryzyko zachorowania na nowotwory złośliwe (KNIGHT i współaut. 1993). Podobne współzależności stwierdzono w badaniach,

w których analizowano częstość uszkodzeń chromosomalnych po ekspozycji limfocytów na standardowe stężenia mutagennego leku przeciwnowotworowego — bleomycyny; liczbę uszkodzeń chromatydowych przekraczającą 0,80 na jedną metafazę stwierdzono u około 12% zdrowych dawców i aż u około 50% chorych na nowotwory złośliwe jamy ustnej, gardła i krtani, płuca i jelita grubego (Hsu i współaut. 1989).

Scharakteryzowane wyżej różne typy predyspozycji dziedzicznych — zwłaszcza uwarunkowanych dziedzicznym polimorfizmem enzymów kontrolujących przemiany różnych karcynogenów chemicznych i heterozygotycznym nosicielstwem defektów genów kontrolujących naprawę uszkodzonego DNA — ze względu na częstość występowania — wpływają w sposób istotny, chociaż obecnie jeszcze trudno wymierny na zachorowalność na nowotwory złośliwe uwarunkowane ekspozycją na różne egzogenne czynniki rakotwórcze, szczególnie w młodych grupach wieku; w tym zwłaszcza raki płuca, jamy ustnej, krtani, pęcherza moczowego i wątroby. Szereg danych sugeruje również, że ten sam typ predyspozycji odgrywa istotną rolę w zachorowalności na nowotwory — w tym zwłaszcza przewodu pokarmowego i sutka — w których inicjacji istotną rolę mogą odgrywać karcynogeny endogenne, powstające odpowiednio w przebiegu trawienia i w przemianach hormonów sterydowych. Generalnie, badania nad predyspozycjami omówionymi powyżej sugerują, że nawet w warunkach długotrwałych ekspozycji na silne karcynogeny, nowotwory złośliwe rozwijają się przede wszystkim i najwcześniej u nosicieli cech dziedzicznych warunkujących zwiększoną wrażliwość na ich działanie.

W tabeli 2 zestawiono predyspozycje uwarunkowane dziedzicznymi defektami genów, których mutacje pozostają w bezpośrednim związku przyczynowym z nowotworowym przekształceniem komórek. Do pełnej ekspresji „fenotypu nowotworowego” przejawiającego się zdolnością do nieograniczonego namnażania się komórek, naciekania i niszczenia przez nie normalnych struktur tkankowych oraz ich zasiedlaniem się i namnażaniem w lokalizacjach odległych, w większości tkanek dochodzi dopiero wskutek sekwencji mutacji w kilku onkogenach i genach supresji wzrostu nowotworowego (anty-onkogenach). Wśród dziedzicznych mutacji genów współwarunkujących ten fenotyp, stanowiących podłoże silnych predyspozycji do rozwoju nowotworów, zlokalizowanych i scharakteryzowanych dotychczas, przeważają heterozygotyczne defekty anty-onkogenów, z których większość przejawia się rodzinnym występowaniem nowotworów wieku dziecięcego (KNUDSON 1993, KINZLER i VOGELSTEIN 1993). Ekspresja defektu na poziomie komórki jest uwarunkowana wypadnięciem funkcji obu alleli anty-onkogenu; jest prawdopodobne, że u nosicieli mutacji dziedzicznych do utraty normalnego allelu dochodzi wskutek rekombinacji somatycznej (wymiany fragmentów pomiędzy homologicznymi chromosomami w czasie mitozy). Z nowszych badań wynika, że nosiciele większości dziedzicznych defektów anty-onkogenów warunkujących rodzinne zachorowania na nowotwory wieku dziecięcego są w późniejszym wieku obciążeni ryzykiem zachorowania także na niektóre inne nowotwory złośliwe. Wynika to z faktu, że defekty jednego i tego samego anty-onkogenu mogą stanowić ogniwa w szlakach mutacyjnych prowadzących do rozwoju nowotworów w różnych lokalizacjach.

Tabela 2

Wpływ różnych grup genów na przebieg karcynogenezy

II. Dziedziczne defekty genów warunkujące bezpośrednio nowotworowe przekształcenie komórek

Funkcja genów	Predyspozycje dziedziczne (geny)	Częstość w populacji — najczęstsze nowotwory
Antyonkogeny (regulacja transkrypcji genów cyklu komórkowego, naprawy DNA i/lub apoptozy; regulacja adhezji; inne)	retinoblastoma (<i>RB-1</i>) guz Wilms'a (<i>WT-1</i>) zespół Beckwith-Wiedemana zespół v. Hippel-Lindau (<i>VHL</i>) neurofibromatosis 1 (<i>NF-1</i>) neurofibromatosis 2 (<i>NF-2</i>) polipowatość jelit (<i>APC</i>) zespół Li-Fraumeni (<i>TP53</i>) „Multiple endocrine neoplasia” — typ 2 (<i>RET</i>)	rzadkie: retinoblastoma, osteosarcoma, różne lokalizacje u dorosłych nosicieli nephroblastoma hepatoblastoma, rhabdomyosarcoma rak nerki neurofibroma schwannoma, meningioma rak jelita grubego, rzadziej w innych lokalizacjach białaczki, mięsaki, guzy centralnego układu nerwowego, rak sutka rak tarczycy, pheochromocytoma
Onkogeny (transdukcja sygnałów)	polimorfizm <i>H-RAS</i>	częste: raki płuca, jelita grubego, pęcherza, (inne ?)
Geny „mutatory” (naprawa pomyłek w replikacji DNA)	zespół Lynch I i II (<i>H MSH 2</i> ; <i>H MLH 1</i> ; <i>H PMS 1</i> ; <i>H PMS 2</i>)	częste: rak jelita grubego, raki żołądka, trzonu macicy, układu moczowego, jajnika i inne

Podłożem umiarkowanie zwiększonego ryzyka zachorowania na różne nowotwory złośliwe może być również dziedziczny polimorfizm w niekodujących sekwencjach onkogenów. Dotychczas nie zidentyfikowano natomiast dziedzicznych defektów onkogenów, z mutacjami zlokalizowanymi w miejscach genowych, w których są one znajdowane w guzach nowotworowych. Być może wynika to stąd, że mutacje tego typu są już w życiu płodowym letalne.

Obiecującym kierunkiem dalszych badań mogą być poszukiwania dziedzicznych zaburzeń regulacji funkcji onkogenów — zwłaszcza przejawiających się uruchomieniem mechanizmów promocji nowotworowej.

W tabeli 2 umiejscowiono również predyspozycje dziedziczne uwarunkowane niedawno odkrytymi defektami genów „mutatorów”, których funkcja polega na naprawie „pomyłek” w replikacji DNA. Skutkiem defektów tych genów jest zwiększone tempo mutacji w różnych genach komórkowych, w tym onkogenach i antyonkogenach (JESSUP i współaut. 1994). Działanie „mutatorowe” może być także uwarunkowane defektami innych genów niż wymienione w tabeli 2 w tej grupie. Niedawne badania dowodzą, na przykład, że antyonkogen TP 53 reguluje nie tylko procesy apoptozy, lecz także ekspresję genów kontrolujących procesy naprawy uszkodzonego DNA (MARX 1994). Jednym ze skutków dziedzicznych defektów genu *TP 53* — a być może również niektórych innych antyonkogenów — jest więc zapewne przyspieszona akumulacja zmian mutacyjnych w komórkach somatycznych.

Wyodrębnienie trzeciej grupy dziedzicznych predyspozycji do rozwoju nowotworów złośliwych (tabela 3), nazwanych „promocyjnymi” (STEFFEN 1993), znajduje uzasadnienie w ich związku przyczynowym z mechanizmami warunkującymi namnażanie się komórek — w części różnymi w poszczególnych tkankach i narządach — które jednocześnie warunkują rozplem komórek przekształconych nowotworowo.

Tabela 3

Wpływ różnych grup genów na procesy karcynogenezy
III. Promocja nowotworów

Funkcja genów	Predyspozycje dziedziczne	Częstość w populacji — najczęstsze nowotwory
Onkogeny (czynniki wzrostu i ich receptory)	hiperkeratoza dłoni i stóp (ERBB3)	rzadka — rak przełyku
Synteza hormonów lub ich receptorów	dysgenезja gonad rodzinne nowotwory hormonozależne (?) (BRCA 1 ?)	bardzo częste (?): guzy gonad, nowotwory hormonozależne (?)
Synteza cytokin i ich receptorów	polimorfizm TNF β polimorfizm IL-1 α wrodzone niedobory immunologiczne z hipogammaglobulinemią	białaczki, chłoniaki (inne ?) białaczki, chłoniaki, rak żołądka

Jednym z warunków umożliwiających rozplem takich komórek jest ekspresja na ich powierzchni receptorów dla czynników wzrostowych. W przypadku defektów dziedzicznych, polegających na zaburzeniach negatywnej regulacji funkcji genów, które kontrolują syntezę receptorów dla czynników wzrostowych, komórki w niektórych tkankach i narządach są w stanie stałej gotowości do odpowiedzi na te czynniki. Jednym z nielicznych dotąd przykładów dziedzicznych predyspozycji promocyjnych uwarunkowanych w ten sposób jest zespół rodzinnego rogowacenia dłoni i podeszew stóp, którego nosicielstwo wiąże się niemal ze 100-procentowym prawdopodobieństwem rozwoju raka przełyku.

Alternatywnie, podłożem predyspozycji promocyjnych może być dziedzicznie uwarunkowana „nadmierna” synteza czynników wzrostowych, w tym hormonów i cytokin. Dotychczas poznano predyspozycje tego typu w niektórych genetycznie uwarunkowanych zespołach zaburzeń funkcji układu immunologicznego, w których występuje zwiększona synteza cytokin. Efektem takich predyspozycji może być zarówno uruchomienie mechanizmów w autokrynnej stymulacji nowotworu (jeżeli rozwija się on z komórek zdolnych zarówno do ekspresji receptora, jak i syntezy odpowiedniego czynnika wzrostowego), jak i stymulacja parakrynną (jeżeli komórki, z których rozwija się nowotwór, mogą ujawniać receptor powierzchniowy lecz nie syntetyzują czynnika wzrostowego).

Poszukiwanie dalszych dziedzicznych predyspozycji promocyjnych, poza nowotworami rozwijającymi się z komórek, których wzrost jest uwarunkowany przez cytokiny, wydaje się być szczególnie obiecujące w badaniach nad uwarunkowaniami rozwoju nowotworów hormonozależnych.

Przedstawiona wyżej charakterystyka mechanizmów ekspresji różnych predyspozycji dziedzicznych w powiązaniu z kolejnymi fazami karcynogenezy tłu-

maczy między innymi dlaczego rozwój jednego i tego samego typu nowotworu może być uwarunkowany dziedzicznymi defektami różnych genów:

- podłożem predyspozycji do rozwoju raka sutka może być, na przykład, zarówno heterozygotyczne nosicielstwo genu *ataxia-teleangiectasia*, dziedziczny defekt antyonkogenu TP 53, jak i — prawdopodobnie — defekty genów promocyjnych (STEFFEN 1994);
- silne dziedziczne predyspozycje do rozwoju raka jelita grubego mogą być uwarunkowane dziedzicznymi mutacjami antyonkogenu APC lub nosicielstwem genów „mutatorów”; równolegle — podłożem umiarkowanych predyspozycji do rozwoju tego nowotworu może być polimorfizm kilku genów metabolizujących lub neutralizujących niektóre karcynogeny (SMITH i współaut. 1994) a także — prawdopodobnie — upośledzona naprawa uszkodzeń chromatydowych (HSU i współaut. 1989).

POSTĘPY W LOKALIZOWANIU I MOLEKULARNYCH BADANIACH GENÓW SILNYCH PREDYSPOZYCJI DO ROZWOJU NOWOTWORÓW ZŁOŚLIWYCH

Silne predyspozycje dziedziczne jako cechy dominujące są według szacunków opartych głównie o badania częstości rodzinnych skupień zachorowań przyczyną 5%–10% nowotworów łącznie we wszystkich grupach wieku. Powyższe szacunki są jednak prawdopodobnie zaniżone. Wiek, w którym dochodzi do ekspresji poszczególnych predyspozycji tego typu, jest różny; większość z nich ujawnia się jednak zachorowaniami wcześniejszymi niż u ludzi nie obciążonych.

Natura większości silnych predyspozycji ujawniających się wysokim ryzykiem zachorowania na jeden lub kilka nowotworów u ludzi dorosłych nie jest jeszcze znana. Rozwój molekularnych metod lokalizowania dziedzicznych defektów genowych w chromosomach znacznie ułatwił odnajdywanie i odczytywanie sekwencji nukleotydowych genów silnych predyspozycji do rozwoju nowotworów złośliwych, poznanie ich produktów oraz lokalizowanie i charakteryzowanie mutacji wewnątrzgenowych w badaniach rodzin obciążonych. Postęp w tych badaniach otwiera możliwości rozpoznawania takich predyspozycji przed ich ekspresją. Ma to ogromne znaczenie dla praktyki onkologicznej; ustalenie wysokiego indywidualnego ryzyka zachorowania zwiększa bowiem szanse wcześniejszego rozpoznawania i skuteczniejszego leczenia nowotworów u nosicieli predyspozycji i otwiera dla nich opcję ewentualnej terapii prewencyjnej.

Do końca lat osiemdziesiątych praktycznie jedyną metodą lokalizowania niektórych dziedzicznych defektów genowych warunkujących zachorowalność na nowotwory złośliwe — ograniczoną tylko do genów supresji wzrostu nowotworowego (antyonkogenów) — była niezwykle pracochłonna analiza delecji chromosomalnych, to jest częściowych ubytków chromatyny występujących w normalnych komórkach niewielkiego odsetka nosicieli takich defektów i lokalizowanie — na podstawie badania wielu probantów — wspólnego minimalnego ubytku występującego we wszystkich delecjach (HEIM i MITTELMAN 1987). Dzięki takim analizom zlokalizowano kilka genów silnych predyspozycji do rozwoju nowotworów w wieku dziecięcym a także gen APC, którego defekt

warunkuje rozwój raka jelita grubego na podłożu polipowatości jelit u ludzi dorosłych.

Przełomowe znaczenie dla postępu w lokalizowaniu genów silnych predyspozycji nowotworowych miało umiejscowienie w chromosomach kilku setek polimorficznych sekwencji tak zwanego mikrosatelitarnego DNA. Polimorfizm tego DNA, przejawiający się różną liczbą następujących po sobie powtórzeń krótkich — zazwyczaj dwu nukleotydowych sekwencji, umożliwia ich wykorzystanie do pośredniego lokalizowania dziedzicznych mutacji w badaniach rodzinnych metodą analizy sprzężeń (linkage analysis) (WEBER i MAY 1989, WEISSENBACH i współaut. 1992). Powyższa metoda — w najkrótszym zarysie — polega na wykazaniu, że wszyscy lub przeważająca większość członków rodzin, u których rozwinął się nowotwór, dziedziczą konsekwentnie tylko jeden polimorficzny wariant (pochodzący od matki lub ojca) jednego z wielu markerów o znanej lokalizacji. Sprzężone dziedziczenie markera i cechy predyspozycji oznacza, że gen tej predyspozycji jest zlokalizowany w bliskim sąsiedztwie markera — ponieważ prawdopodobieństwo segregacji (niezależnego dziedziczenia) uwarunkowane wymianą fragmentów homologicznych chromosomów (crossing over) w przebiegu podziału mejozytycznego genów bardzo blisko zlokalizowanych jest znikome. Metoda analizy sprzężeń genów z markerowymi sekwencjami mikrosatelitarnego DNA — aczkolwiek bardzo pracochłonna — zwłaszcza przy całkowitym braku danych sugerujących prawdopodobną lokalizację poszukiwanego defektu genowego (w takim przypadku jest konieczna analiza sprzężeń z kilkoma setkami sekwencji markerowych) umożliwiła w ostatnich dwóch latach odkrycie i zlokalizowanie genów „mutatorów” warunkujących rodzinne zachorowania na raka jelita grubego bez polipowatości (PELTOMÄKI i współaut. 1993) oraz uściślenie lokalizacji dwóch genów warunkujących większość wczesnych rodzinnych zachorowań na raka sutka — *BRCA 1* (MIKI i współaut. 1994, FEIDMAN i współaut. 1994) i *BRCA 2* (WOOSTER i współaut. 1994).

Ostatnio rysują się możliwości dalszego postępu w lokalizowaniu dziedzicznych defektów genowych związane zwłaszcza z metodą „genomic mismatch scanning” umożliwiającą przesiew genomu w całości — mniej pracochłonną, wymagającą jednak dopracowania pewnych rozwiązań technicznych. Zaletą tej metody jest między innymi możliwość jej wykorzystania do lokalizacji genów predyspozycji dziedzicznych o niskiej penetracji, to jest ujawniających się u względnie niewielkiego odsetka nosicieli (ALDHOUS 1994).

Przedstawiony powyżej postęp metod lokalizowania genów pozwala przyjąć, że w bliskiej przyszłości uda się umiejscowić i scharakteryzować geny większości silnych predyspozycji do rozwoju nowotworów.

Najnowsze badania nad genami silnych predyspozycji do rozwoju nowotworów — zwłaszcza raków jelita grubego i sutka — wnoszą szereg istotnych informacji o współzależnościach pomiędzy typami dziedzicznych mutacji a cechami zachorowalności u nosicieli.

Większość dziedzicznych predyspozycji do zachorowań na raka jelita grubego rozwijające się na podłożu kilku klinicznie odrębnych odmian rodzinnej polipowatości jelit, jest uwarunkowana mutacjami w obrębie antyjonkogenu APC, zlokalizowanego w ramieniu długim chromosomu 5 (5q21). Zarówno liczba, lokalizacja, jak i czas rozwoju polipów, jak też i wiek oraz wielkość ryzyka

zachorowania na raka jelita grubego i na nowotwory w innych lokalizacjach a także występowanie lub nieobecność niezłośliwych zmian pozajelitowych (na przykład cyst epidermoidalnych, kostniaków i guzów desmoidalnych) jest uwarunkowana lokalizacją mutacji w różnych eksonach genu *APC* (BISHOP i HALL 1994, HERRERA i współaut. 1994).

Przeważająca większość przypadków rodzinnego raka jelita grubego bez polipowatości, które według różnych oszacowań stanowią 4% do 17% zachorowań na ten nowotwór jest uwarunkowana dziedzicznymi mutacjami szczególnej klasy genów *MMR* (mismatch repair), których normalna funkcja polega na naprawie pomyłek w replikacji DNA. Skutkiem dziedzicznych defektów tych genów jest szybka akumulacja „przypadkowych” mutacji w różnych genach komórkowych, w tym w onkogenach i antyonkogenach z toru mutacyjnego prowadzącego do rozwoju raka jelita grubego (JESSUP i współaut. 1994). Dziedziczne mutacje defektu dwóch genów *MMR* — *H MSH 2* (lokalizacja 2p16) i *H MLH 1* (lokalizacja 3p21) warunkują odpowiednio 60% i 30% zachorowań rodzinnych na raka jelita grubego bez polipowatości; dwa dalsze geny — *H PMS 1* (2q31-33) i *H PMS 2* (7p22) warunkują prawdopodobnie pozostałe 10% zachorowań. Na podstawie analiz rodzinnych wyodrębniono co najmniej dwa dziedziczne zespoły, w których występuje rak jelita grubego bez polipowatości. W zespole Lynch I wysokie ryzyko zachorowania wśród nosicieli ogranicza się do jelita grubego. W zespole Lynch II występuje równolegle zwiększone ryzyko zachorowania między innymi na raki trzonu macicy, żołądka, jelita cienkiego, górnego odcinka układu moczowego i jajników. W obu tych zespołach występują jednak dziedziczne mutacje tych samych genów (BISHOP i HALL 1994, JESSUP i współaut. 1994).

Niedawno zlokalizowano dwa geny — *BRCA 1* (MIKI i współaut. 1994, FEIDMAN i współaut. 1994) i *BRCA 2* (WOOSTER i współaut. 1994), których defekty warunkują przeważającą większość wczesnych rodzinnych zachorowań na raka sutka i dość znaczną część rodzinnych zachorowań na raki jajników (tabela 4). Analizy mutacji genu *BRCA 1* — aczkolwiek dotychczas przeprowadzone tylko w 5-ciu rodzinach — dostarczają szeregu istotnych informacji charakteryzujących związki pomiędzy ich lokalizacją i charakterem a wiekiem zachorowania i bilateralnością raków sutka a także współwystępowaniem ryzyka zachorowania na raka jajnika (tabela 4). Badania te udokumentowały również, że niektóre nosicielki mutacji *BRCA 1* — warunkujących u innych kobiet obciążonych z tych samych rodzin wczesny rozwój raka sutka — nie zachorowały na ten nowotwór pomimo przekroczenia 80-tego roku życia (MIKI i współaut. 1994).

Równie interesujące są dane dotyczące spektrum nowotworów wśród nosicieli genu *BRCA 2*, w tym współwystępowanie w kilku rodzinach raków sutka i jajnika u kobiet i raków sutka u mężczyzn (WOOSTER 1994).

Dotychczasowe badania molekularne na razie niewielkiej liczby genów silnych predyspozycji do rozwoju nowotworów złośliwych w wieku dojrzałym dowodzą więc, że współzależności pomiędzy predyspozycjami wyodrębnionymi na podstawie badań rodzinnych a warunkującymi je defektami genowymi są bardziej złożone niż wcześniej przypuszczano:

— dziedziczne mutacje w różnych loci jednego i tego samego genu mogą warunkować predyspozycje dotąd traktowane jako odrębne;

— z drugiej strony, jeden typ rodzinnej predyspozycji może być także uwarunkowany dziedzicznymi mutacjami różnych genów.

Tabela 4

Dziedziczne defekty genu *BRCA 1*: typy mutacji i cechy fenotypu (na podstawie danych Y. Miki i współaut. 1994)

Typ mutacji	Cechy fenotypu
Typ „nonsense” substytut C → T kodon 1313	zachorowania na raka jajnika równie częste jak zachorowania na raka sutka względnie późny wiek zachorowania na raka sutka
Przesunięcie ramki odczytu delecja 11 par zasad kodon 24	rzadkie zachorowania na raka jajnika* wczesne zachorowania na raka sutka (koniec 3-ciej i początek 4-tej dekady życia)
Przesunięcie ramki odczytu insercja C kodon 1756	rzadkie zachorowania na raka jajnika* wczesne zachorowania na raka sutka (koniec 3-ciej i początek 4-tej dekady życia) bardzo częsty bilateralny rak sutka
Mutacja punktowa substyt. T → G kodon 1771	rzadkie zachorowania na raka jajnika* około 40% zachorowań na raka sutka po 50 roku życia (rozkład dwumodalny ?)
Mutacja nie znana (regulacyjna ?) brak transkryptu	rzadkie zachorowania na raka jajnika* wczesne zachorowania na raka sutka (koniec 3-ciej i początek 4-tej dekady życia)

*Proporcja w zachorowaniach na raka sutka i raka jajnika — w przybliżeniu jak 10 : 1

PERSPEKTYWY I UWARUNKOWANIA APLIKACJI WIEDZY O GENACH SILNYCH PREDYSPOZYCJI DO ROZWOJU NOWOTWORÓW ZŁOŚLIWYCH W PRAKTYCE ONKOLOGICZNEJ

Lokalizowanie i analizy sekwencji nukleotydowych genów silnych predyspozycji do rozwoju nowotworów złośliwych otwiera możliwości badania nosicielstwa ich defektów, chociaż w przypadku dużych genów, w których mutacje są zlokalizowane w różnych ich częściach, niezbędne będzie jeszcze pokonanie nierozwiązanych dotąd problemów technicznych. Badanie nosicielstwa dziedzicznych defektów w większych grupach chorych powinno między innymi umożliwić określenie rzeczywistego udziału poszczególnych typów predyspozycji w ogólnej zachorowalności na dany typ nowotworu. W tym kontekście warto wspomnieć, że w serii badań 45 chorych na raka sutka, bez ewidentnego obciążenia rodzinnego, aż u 4 zidentyfikowano dziedziczne defekty genu *BRCA 1* — mogłoby to sugerować, że wcześniejsze szacunki częstości tej predyspozycji były 2–4 krotnie zaniżone (FUTREAL i współaut. 1994).

W przypadkach ewidentnego lub tylko domniemanego obciążenia silnymi predyspozycjami badanie członków rodzin chorych, czy też ewentualne badania populacyjne, otwierają możliwości ograniczenia umieralności wśród nosicieli wysokiego ryzyka zachorowania poprzez wdrożenie metod umożliwiających najwcześniejsze wykrycie rozwijającego się nowotworu. Na przykład zestawione w tabeli 5 wskaźniki ryzyka zachorowania na raka sutka w funkcji wieku wśród kobiet w całej populacji i wśród nosicielek genu *BRCA 1*, wskazują w sposób

oczywisty na konieczność poddawania tych ostatnich badaniom mammograficznym już w trzeciej dekadzie życia (KNIGHT i współaut. 1993). Wczesne wdrożenie diagnostycznych metod endoskopowych i terapia prewencyjna doprowadziły już obecnie u nosicieli wysokiego dziedzicznego ryzyka zachorowania na raka jelita grubego uwarunkowanego defektem anty-onkogenu APC do wydłużenia czasu ich życia (BISHOP i HALL 1994). Analogiczny program badań diagnostycznych może przynieść jeszcze lepsze efekty u nosicieli genów „mutatorów”, gdyż wyleczalność wcześniej wykrytych raków jelita grubego a także niektórych innych nowotworów szczególnie często występujących w zespole Lynch II jest względnie wysoka (LYNCH 1994). Nowe możliwości wczesnego rozpoznawania rozwoju nowotworów uwarunkowanych dziedzicznie wynikają także z perspektyw wykorzystania do tego celu czułych metod wykrywania defektów onkogenów i anty-onkogenów — pojawiających się sekwencyjnie w kolejnych stadiach karcynogenezy — na przykład w wydalinach lub popłuczynach (MARKHAM i współaut. 1994).

Tabela 5

Skumulowane ryzyko zachorowania na raka sutka u nosicieli genu *BRCA 1* w zestawieniu z ryzykiem całej populacji kobiet (wg M-C. KING i współaut, 1993)

Wiek (rok życia)	Współczynnik ryzyka	
	Cała populacja	Nosicielki <i>BRCA 2</i> *
40	0,005	0,16
50	0,02	0,59
60	0,04	0,77
70	0,07	0,82
80	0,10	0,86

*W świetle nowszych danych ryzyko nosicieli *BRCA 1* w grupach do 50 roku życia może być znacznie wyższe niż podane w tabeli.

Obok wczesnego wykrywania, u nosicieli niektórych typów defektów dziedzicznych jest możliwa też opcja chirurgii prewencyjnej — na przykład usunięcie tkanki gruczołowej sutka, usunięcie jajników przed osiągnięciem wieku, gdy dochodzi do ekspresji defektu (BIESECKER i współaut. 1993, KING i współaut. 1993) a nawet usunięcie jelita grubego (BISHOP i HALL 1994, LYNCH 1994). Potwierdzenie nosicielstwa będzie w przyszłości stanowiło niezbędną przesłankę do rozważenia takiej opcji. Powyższe uwagi, zwłaszcza dotyczące perspektyw wcześniejszego wykrywania, odnoszą się także do nosicieli genów predyspozycji do rozwoju nowotworów w innych narządach — dotychczas nie zlokalizowanych.

Ogromne znaczenie dla praktyki lekarskiej ma pytanie dotyczące ewentualnych perspektyw zapobiegania ekspresji silnych predyspozycji do rozwoju nowotworów złośliwych w postępowaniu zachowawczym.

Punktem wyjścia do odpowiedzi na to pytanie może być szereg fragmentarycznych dotąd obserwacji sugerujących, że zachorowania u nosicieli niektórych przynajmniej silnych predyspozycji do rozwoju nowotworów złośliwych są współuwarunkowane środowiskowo:

1. W innym miejscu wspomniano już, że niektóre nosicielki genu *BRCA 1*, i to z rodzin z wczesną ekspresją defektu, nie chorują nawet po przekroczeniu 80-tego roku życia (MIKI i współaut. 1994). Co więcej, przynajmniej w jednej dużej rodzinie wykazano obniżenie wieku zachorowań na dziedzicznie uwarunkowanego raka sutka wśród młodszych roczników kobiet; być może jest to uwarunkowane działaniem tego samego czynnika egzogenego, który powoduje, że w ostatnich dziesięcioleciach rośnie również zachorowalność na ten nowotwór w całej populacji kobiet. Znamienne, że w tych samych rodzinach nie zaobserwowano jednoczesnego obniżenia się wieku zachorowań na raka jajnika — uwarunkowanych tym samym defektem genowym (NAROD i współaut. 1993).

2. W spektrum nowotworów uwarunkowanych dziedzicznymi mutacjami genu *APC* obok raków jelita grubego występują także raki żołądka. Ryzyko zachorowania u nosicieli większości defektów tego genu na raki jelita grubego we wszystkich regionach świata sięga 100%; natomiast częstość zachorowania na raki żołądka jest proporcjonalna do zachorowalności na ten nowotwór w całej populacji danego regionu. Podobnie kształtuje się zachorowalność na raki żołądka u nosicieli w zespole Lynch II — jest ona bardzo wysoka w Japonii, pośrednia w niektórych krajach europejskich a niska w USA — odpowiada to częstości zachorowań na ten nowotwór w całej populacji w wymienionych krajach. Zwraca też uwagę zmiana spektrum zachorowań w pierwszej opisanej dużej rodzinie obciążonej zespołem Lynch II, w której zgromadzono dane dla 5-ciu kolejnych pokoleń. W pierwszym pokoleniu raki jelita grubego, żołądka i trzonu macicy występowały z jednakową częstością. W ostatnich dwóch pokoleniach przeważają raki jelita grubego; zachorowania na raki żołądka obniżyły się znacznie — zgodnie z tendencją spadkową w całej populacji — a zachorowań na raki trzonu macicy w ostatnim pokoleniu w ogóle nie obserwowano (UTSUNOMYA i współaut. 1994).

3. Na możliwości przynajmniej czasowego blokowania ekspresji genów silnych predyspozycji wskazują wyniki badań, w których postępowanie profilaktyczne ograniczające zachorowania „sporadyczne” na raka jelita grubego — w tym przypadku podawanie dużych ilości wapnia (strącającego czynniki rakotwórcze rozpuszczalne w tłuszczach) — hamowało wstępne fazy karcynogenezy — to jest zwiększoną proliferację i „odróżnicowanie” komórek w kryptach jelitowych — także u nosicieli rodzinnego wysokiego ryzyka zachorowania (LIPKIN i NEWMARK 1985, ROZEN i współaut. 1989).

Racjonalne podstawy ewentualnych metod postępowania zachowawczego, ograniczającego prawdopodobieństwo lub opóźniającego ekspresję silnych predyspozycji do rozwoju nowotworów, wynikną zapewne dopiero z badań funkcji poszczególnych genów takich predyspozycji — obecnie zaledwie zapoczątkowanych. Możliwości kontroli farmakologicznej wydają się rysować szczególnie obiecująco w przypadkach defektów uruchamiających mechanizmy promocyjne — na przykład terapia antyhormonalna — w nowotworach hormonozależnych, lub terapia przeciwpalna gdy skutkiem dziedzicznego defektu genowego jest zwiększona synteza cytokin uruchamiających para- lub autokrynne mechanizmy promocyjne.

HEREDITARY FACTORS IN HUMAN CANCER

Summary

Recent progress in studies on hereditary cancer predispositions and on cancer genes has been reviewed. In particular, the following problems were discussed: 1, Limitations in recognizing carriers of the cancer predisposing genes in current clinical practice; 2, Epidemiological assessment of the contribution of heredity to the incidence of common types of cancers; 3, Mechanisms and diversity of hereditary predispositions to cancer; relationships to carcinogenesis — genetic control of carcinogen sensitivity, hereditary defects of genes involved in mutational pathways at the cellular level, tumor promotion genes; 4, Recent progress in chromosomal localization and molecular analysis of genes of common familial tumors; 5, Modes of expression of different intragenic mutations in carriers of hereditary defects of the *APC* and *BRCA 1* genes; 6, Environmental modification of the expression of hereditary gene defects strongly predisposing to some common types of cancers; 7, Impact of the recent progress in studies on cancer genes on clinical practice — evaluation of individual hereditary risk, prospects for reducing cancer mortality in carriers through early detection and for the development of preventive pharmacological treatments.

LITERATURA

- ALDHOUS P., 1994. *Fast track to disease genes*. Science 265, 2008-2010.
- BIESECKER B. B., BOEHNKE M., CALZONE K. i współaut. 1993. *Genetic counseling for families with inherited susceptibility to breast and ovarian cancer*. JAMA 269, 1970-1974.
- BISHOP D. T., HALL N. R. 1994. *The genetics of colorectal cancer*. Eur. J. Cancer 30A, 1946-1956.
- CANNON-ALBRIGHT L. A., BISHOP D. T., GOLDGAR C., SKOLNICK M. H. 1991. *Genetic predisposition to cancer*. [W:] *Important Advances in Oncology*. DE VITA V., HELLMAN S., ROSENBERG S. A. (red), J. B. Lippincott Comp., str. 39-55.
- CANNON-ALBRIGHT L. A., THOMAS A., GOLDGAR D. E. i współaut., 1994. *Familiality of cancer in Utah*. Cancer Res. 54, 2378-2385.
- COX R. 1994. *Human cancer predisposition and the implications for radiological protection*. Int. J. Radiat. Biol. 66, 643-647.
- FRIEDMAN L. S., OSTERMEYER E. A., LYNCH E. D. i współaut., 1994. *The search for BRCA 1*. Cancer. Res. 54, 6374-6382.
- FUTREAL P. A., LIU Q., SHATTUCK-EIDENS D. i współaut., 1994. *BRCA 1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas*. 266, 120-122.
- GOLDGAR D. E., EASTON D. F., CANNON-ALBRIGHT L. A., SKOLNICK M. H. 1994. *Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands*. J. Natl. Cancer Inst. 86, 1600-1608.
- HEIM S., MITTELMAN F. 1987. *Cancer Cytogenetics*. 1987. Alan R. Liss, New York, 283-294.
- HERRERA L., O'RIORDAN B. G., CAMBRONERO E., 1994. *Familial adenomatous polyposis*. Surg. Oncol. Clin. N. Amer. 3, 419-434.
- HSU T. C., JOHNSTON D. A., CHERRY L. M. i współaut. 1989. *Sensitivity to genotoxic effects of bleomycin in humans: possible relationship to environmental carcinogenesis*. 1989. Int. J. Cancer 43, 403-409.
- JESSUP J. M., STEELE G., THOMAS P. T. i współaut., 1994. *Molecular biology of neoplastic transformation of the large bowel: Identification of two etiologic pathways*. Surg. Oncol. Clin. N. Amer. 3, 449-477.
- KING M. C., ROWELL S., LOVE S. M., 1993. *Inherited breast and ovarian cancer: What are the risks? What are the choices?* JAMA 269, 1975-1980.
- KINZLER K. W., VOGELSTEIN B., 1993. *A gene for neurofibromatosis 2*. (News and Views). Nature 363, 495-496.
- KNIGHT R. D., PARSHAD R., PRICE F. M. i współaut. 1993. *X-ray-induced chromatid damage in relation to DNA repair and cancer incidence in family members*. Int. J. Cancer 54, 589-593.
- KNUDSON A. G., 1993. *Antioncogenes and human cancer*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 10914-10921.
- LIPKIN M., NEWMARK H., 1985. *Effect of added dietary calcium on colon epithelial-cell proliferation in subjects at high risk for familial colon cancer*. N. Engl. J. Med. 313, 1381-1384.

- LYNCH P. M., 1994. *Surveillance in hereditary nonpolyposis colorectal cancer*. Surg. Oncol. Clin. N. Amer. 3, 479-499.
- MARKHAM A. F., COLETTA P. L., ROBINSON P. A. i współaut., 1994. *Screening for cancer predisposition*. Eur. J. Cancer 30A, 2015-2029.
- MARK J., 1994. *New link found between p53 and DNA repair (Research News)*. Science 266, 1321-1322.
- METTIN C., CROGHAN I., NATARAJAN N., LANE W., 1990. *The association of age and familial risk in a case-control study of breast cancer*. Amer. J. Epidemiol. 131, 973-983.
- MIKI Y., SWENSEN J., SHATTUCK-EIDENS D. i współaut., 1994. *A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA 1*. Science 266, 6671.
- NAROD S., LYNCH H., CONWAY T. i współaut., 1993. *Increasing incidence of breast cancer in family with BRCA 1 mutation*. Lancet 341, 1101-1102.
- PELTOMÄKI P., AALTONEN L. A., SISTONEN P. i współaut., 1993. *Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer*. Science 260, 810-812.
- ROZEN P., FIREMAN Z., FINE N. i współaut., 1989. *Oral calcium suppresses increased rectal epithelial proliferation of persons at risk of colorectal cancer*. Gut 30, 650-655.
- SMITH C. A. D., SMITH G., WOLF C. R., 1994. *Genetic polymorphisms in xenobiotic metabolism*. Eur. J. Cancer 30A, 1921-1935.
- SØRENSEN T. I., NIELSEN G. G., ANDERSEN P. K. i współaut., 1988. *Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees*. N. Engl. J. Med. 318, 727-732.
- STEFFEN J., 1983. *Elementy etiopatogenezy nowotworów. II. Rola predyspozycji genetycznych i mechanizmów immunologicznych*. Nowotwory 33, 185-201.
- STEFFEN J., 1993. *Postępy w badaniach nad dziedzicznymi predyspozycjami do rozwoju nowotworów złośliwych*. Nowotwory 43, 279-297.
- STEFFEN J., 1994. *Postęp i problemy w badaniach dziedzicznych predyspozycji do rozwoju raka sutka*. Nowotwory 44, supl. II, 17-23.
- SWIFT M., MORRELL D., MASSEY R. B., CHASE C. I., 1991. *Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-teleangiectasia*. N. Engl. J. Med. 325, 1831-1836.
- UTSUNOMIYA J., TAMURA K., SHIRAKABE M. i współaut., 1994. *Hereditary gastric cancer*. Surg. Oncol. Clin. N. Amer. 3, 545-562.
- WEBER J. L., MAY P. E., 1989. *Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction*. Am. J. Hum. Genet. 44, 388-396.
- WEISSENBAACH J., GYAPAY G., DIB C. i współaut., 1992. *A second-generation linkage map of the human genome*. Nature 359, 794-801.
- WOOSTER R., NEUHAUSE S. L., MANGION J. i współaut., 1994. *Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA 2, to chromosome 13q12-13*. Science 265, 2088-2090.

JANUSZ A. SIEDLECKI

*Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Curie-Skłodowskiej**Zakład Biologii Komórki i Terapii Doświadczalnej**Wawelska 15, 02-034 Warszawa*

MOLEKULARNE PODSTAWY CHOROÓB NOWOTWOROWYCH

Badania nad molekularnymi podstawami chorób nowotworowych absorbują naukowców od wielu lat. Powoli zaczyna się kształtować obraz zmian molekularnych, którym musi podlegać komórka na drodze do fenotypu nowotworowego. Większość współczesnych danych wskazuje na brak zasadniczych zmian różnicujących komórki normalne od nowotworowych (tab. 1). Najpoważniejsze wydają się zmiany prowadzące do częściowej lub całkowitej utraty inhibicji kontaktowej w tym inhibicji kontaktowej ruchu. Inne zmiany (na zmiany w poziomie lub aktywności niektórych enzymów) mają raczej charakter ilościowy. Czasami zmianom ilościowym towarzyszą pewne zmiany jakościowe, na przykład pojawianie się produktów zmienionych ale zachowujących właściwości produktu podstawowego lub zmiany w czasie ich trwania w komórce. O komórkach, które nabierają wyżej wspomnianych cech, mówi się, że nabyły fenotyp komórki nowotworowej, czyli uległy transformacji. Dwie cechy czynią komórki nowotworowe szczególnie niebezpiecznymi dla całego organizmu. Niepohamowany wzrost związany z dużą niestabilnością genetyczną oraz zdolność do inwazji i kolonizacji obszarów normalnie zajmowanych przez inne rodzaje komórek (ALBERTS i współaut. 1989).

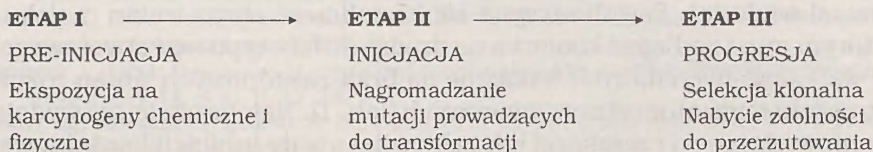
Tabela 1

Niektóre zmiany towarzyszące transformacji

Zmiany w błonach komórkowych	Zmiany adhezyjne	Zmiany we wzroście i podziałach komórek
Zwiększenie transportu metabolitów Zwiększenie tworzenia pęcherzyków błonowych Wzrost mobilności białek błonowych	Zmniejszenie adhezji powierzchniowej Przyjmowanie bardziej okrągłych kształtów Brak prawidłowej organizacji filamentów aktynowych Zanik zewnętrznych struktur fibronektynowych Nadprodukcja aktywatora plazminogenu	Wzrost do nienaturalnie wysokich gęstości Obniżenie wymagań dla czynników wzrostu Nabycie zdolności do nieograniczonej proliferacji Nabycie zdolności do wzrostu w zawiesinie DNA izolowane z tych komórek może powodować transformację

ETAPY KARCYNOGENEZY

Proces przekształcania się komórki normalnej w nowotworową można podzielić na trzy etapy (STEFFEN 1993) (ryc. 1). W pierwszym etapie, nazwanym pre-inicjacja, mamy przede wszystkim do czynienia z kontaktem komórek normalnych z pre-karcynogenem lub karcynogenem. W tym etapie istotną rolę odgrywają predyspozycje genetyczne. Są one przede wszystkim związane z polimorfizmem genów kodujących enzymy uczestniczące w metabolizowaniu i detoksyfikacji czynników rakotwórczych. Sprawność w metabolizowaniu karcynogenów oraz szybkość detoksykacji determinuje czas ekspozycji komórki na działanie czynników uszkodzających, w tym w szczególności uszkodzających jej DNA. Ponadto predyspozycje genetyczne są związane również z polimorfizmem genów kodujących enzymy systemu reperacyjnego. Polimorfizm w obszarze systemu reperacyjnego w zdecydowany sposób może wpłynąć na częstość mutacji, a co za tym idzie, sprzyjać procesowi karcynogenezy.



Ryc. 1. Etapy karcynogenezy

Drugi etap to proces właściwej inicjacji. Rozpoczyna się on wraz z pojawieniem się pierwszej mutacji. Gromadzenie się kolejnych mutacji w istotnych ze względu na funkcję komórki genach musi w konsekwencji doprowadzić do powstania komórki stransformowanej. Kolejne mutacje mogą wystąpić spontanicznie, ale też mogą być wywołane przez pewne związki chemiczne, czynniki fizyczne oraz mogą być wynikiem infekcji komórki przez tak zwane wirusy onkogenne. Mutacje niezbędne do przeprowadzenia komórki normalnej w nowotworową tworzą tak zwany szlak mutacyjny. Nie wszystkie mutacje w tym szlaku mają jednakową wagę, na przykład w raku jelita grubego mutacje w genie *p53* występują w prawie 80%, podczas gdy mutacje w genie *ras* jedynie w kilku procentach nowotworów. Wydaje się, że i na tym etapie predyspozycje genetyczne odgrywają istotną rolę. Jeśli jedna z mutacji szlaku jest odziedziczona to czas niezbędny do transformacji komórki w nowotworową jest skrócony o czas jednego wydarzenia mutacyjnego. Jest to szczególnie dobrze widoczne w nowotworach dziecięcych i w zespołach na przykład Li-Fraumeni czy Blooma.

Ostatnim etapem jest progresja nowotworu, czyli nabywanie przez komórki zdolności do nieograniczonego wzrostu, a w wypadku nowotworów złośliwych do tworzenia przerzutu. Na tym etapie zdecydowaną rolę wydają się odgrywać zjawiska związane ze zmianami w błonach komórkowych, a w szczególności z nabywaniem nowych cech przez białka adhezyjne błony. Ponadto zmianom ulegają też poziomy enzymów lizujących tak zwaną błonę podstawną w tym

w szczególności kolagenaz. Dotychczasowe dane dotyczące etapu progresji nie pozwalają w pełni uzasadnić roli predyspozycji genetycznych na tym etapie.

Przyczyny transformacji, jak z powyższego wynika, leżą w zmianach w materiale genetycznym komórki. Pierwszą osobą, która potwierdziła prawidłowość powyższych rozważań był uczony norweski, A. Knutson. Na podstawie badań epidemiologicznych nad siatkówczakiem wysunął hipotezę, że komórka może ulec transformacji, jeśli zajdą w jej genomie co najmniej dwie niezależne mutacje. W większości przypadków zmiany te są skutecznie usuwane albo na poziomie pojedynczej komórki przez system reperacyjny, albo na poziomie organizmu przez system immunologiczny. Istnieje jeszcze jedno dodatkowe zabezpieczenie. Komórka może zostać skierowana na drogę programowanej śmierci zwanej apoptozą (patrz dalej). Jeśli zawiodą wszystkie wspomniane powyżej zabezpieczenia powstaje komórka stransformowana.

GENY SZLAKU MUTACYJNEGO

Geny komórkowe związane z transformacją nowotworową mogą oddziaływać w różny sposób: po pierwsze mogą zmienić swoją normalną funkcję poprzez: a. mutacje, które powodują zmiany w funkcji białek, b. translokacje chromosomowe, które prowadzą do zmian w ekspresji genu lub do jego strukturalnych zmian, c. poprzez amplifikację, w wyniku której następuje selektywny wzrost liczby kopii określonego genu; po drugie poprzez całkowitą utratę komórkowych genów. Może to nastąpić poprzez: a. mutację, która inaktywuje prawidłową funkcję danego genu, i b. delecję z genomu.

Liczbę genów w genomie człowieka można ocenić na około 50 000. W przeciętnej komórce jedynie 15 000–20 000 genów jest aktywnych; z nich prawdopodobnie najwyżej kilkaset może oddziaływać znacząco, bezpośrednio lub pośrednio w procesie karcynogenezy. Geny aktywnie uczestniczące w szlaku mutacyjnym można podzielić na cztery główne grupy:

1. geny, których produkty białkowe uczestniczą w przekazywaniu informacji pomiędzy zewnętrzną częścią błony komórkowej a jej wnętrzem i pomiędzy wnętrzem a jądrem komórkowym — onkogeny;
2. geny, których produkty białkowe uczestniczą w procesach związanych z ekspresją innych genów czyli są czynnikami transkrypcyjnymi — onkogeny i antyonkogeny;
3. geny, których produkty białkowe mają wpływ na prawidłowy przebieg proliferacji komórek — antyonkogeny;
4. geny, których produkty białkowe wpływają na wierność replikacji/reparacji podnoszące częstość mutacji kilkadziesiąt do kilkuset razy — geny mutatorowe.

Z przedstawionego powyżej podziału widać, że geny te, z wyjątkiem ostatniej grupy, uczestniczą przede wszystkim w przekazywaniu informacji o stanie komórki na różnych szczeblach jej organizacji. Każda komórka jest w stanie odbierać cały szereg sygnałów z zewnątrz. Docierają one do jądra komórki poprzez zakotwiczone na powierzchni komórki białka, które nazywamy recepto-rami. Sygnały te to nie tylko tak zwane hormony wzrostu czy też czynniki

depolaryzujące błonę komórkową ale również zmiany w istotnych dla funkcjonowania komórki stężeniach kationów, takich jak sód czy wapń. Poprzez receptory oddziałują one na wnętrze komórki. Wiele z tych receptorów może przekazać dalej informację. Mówimy wówczas o uruchomieniu tak zwanych przekaźników drugiego rodzaju. One to pośrednio lub bezpośrednio przekazują informacje o warunkach zewnętrznych do jądra komórkowego. Informacja ta docierając do jądra zostaje przetłumaczana na język aktywatorów transkrypcji. O tym, które geny w danej komórce zostaną uaktywnione, decyduje przede wszystkim obecność tak zwanych czynników transkrypcyjnych. To one, łącząc się z promotorem genu, rozpoczynają proces jego uaktywnienia a w połączeniu z innymi białkami regulują również jego ekspresję. Jest to bardzo skomplikowany i subtelny system równowagi decydujący o prawidłowym przebiegu szlaków metabolicznych w komórce. Każde zaburzenie w tej regulacji może prowadzić do destabilizacji komórki, a co za tym idzie, mieć dla niej poważne konsekwencje (ALBERTS i współaut. 1989).

ONKOGENY I ANTYONKOGENY

Wirusy onkogenne mogą zawierać materiał genetyczny w postaci DNA tak jak normalne komórki, ale mogą też posiadać RNA zamiast DNA. Tego typu onkogenne wirusy noszą nazwę retrowirusów. Badania nad transformującymi mechanizmami wirusów onkogennych doprowadziły do wyodrębnienia fragmentów genomu, bez których wirus traci swoje własności onkogenne. Te fragmenty nazwano właśnie onkogenami. Wkrótce okazało się, że normalna komórka posiada bardzo wiele, choć nie wszystkie, odpowiedników onkogenów (tabela 2). Dla odróżnienia ich od onkogenów znalezionych w wirusach nazwano je proto-onkogenami lub komórkowymi onkogenami. W literaturze fachowej stosuje się określenia *v-onc* i *c-onc* na oznaczenie wirusowych i komórkowych onkogenów.

Tabela 2

Funkcja onkogenów i ich komórkowych odpowiedników

Funkcja produktu onkogenu	Nazwa onkogenu
Kinazy białkowe tyrozyny seryny/treoniny	<i>src, yes, fgr, abl, fps, erb-B, kit, sea, ros raf, mos</i>
Czynniki wzrostu i ich receptory PDGF EGF-Rec Tyroid horm-Rec M-CSF-Rec	<i>sis erb-B erb-A fms</i>
Białka wiążące GTP	<i>H-ras K-ras N-ras</i>
Czynniki transkrypcyjne	<i>myb, myc, fos, jun, ets, rel, ski</i>

Badania wirusowych onkogenów i ich komórkowych analogów pozwoliły na ustalenie roli tych genów w procesach transformacyjnych. Wiele znanych proto-onkogenów zalicza się do przekaźników zaangażowanych w przenoszenie

informacji dla komórki o jej podziale lub różnicowaniu. Inne kodują czynniki wzrostu, receptory dla czynników wzrostu, tak zwane białka G, cytoplazmatyczne kinazy białkowe oraz czynniki transkrypcyjne (tabela 2). Wirusowe onkogeny cechuje duże podobieństwo do ich komórkowych analogów. Ich homologia waha się w granicach od 20% do 80%. Są więc one odpowiednikami komórkowych przekaźników sygnałów, ale takimi, które uciekają spod normalnych komórkowych mechanizmów kontrolnych. Podobnie, mutacje proto-onkogenów powodują, że ich produkty białkowe upodabniają się w swoim działaniu do produktów onkogenów wirusowych.

W komórce normalnej produkt genu jest niewątpliwie włączony w zapewnienie jej prawidłowego rozwoju. Jeżeli utrata jakiegoś genu jest ściśle związana z transformacją komórki normalnej do nowotworowej, to taki gen nazywamy genem supresorowym transformacji nowotworowej, lub antyonkogenem (ang. tumor suppressor gene). Geny te pełnią w komórce bardzo wiele istotnych funkcji, ale przede wszystkim są zaangażowane w kontrolę procesu proliferacji komórkowej (tabela 3).

Tabela 3

Geny supresorowe transformacji nowotworowej

Gen supresorowy	Lokalizacja chromosomalna	Funkcja produktu genu
<i>p53</i>	17p13.1	czynnik transkrypcyjny, kontroler prawidłowego przebiegu proliferacji, strażnik genomu
<i>Rb1</i>	13q14	kontroler prawidłowego przebiegu proliferacji, czynnik transkrypcyjny
<i>APC</i>	5q21	?
<i>WT1</i>	11p13	? czynnik transkrypcyjny
<i>NF1</i>	17q11	cytoplazmatyczne białko aktywujące GTP
<i>NF2</i>	22q	białko cytoszkieletu
<i>VHL</i>	3p25	?
<i>MTS1</i>	9p21	inhibitor kinazy cdk4

GENY MUTATOROWE

Mniej więcej cztery lata temu grupa fińsko-amerykańska pod kierunkiem A. de la Chapelle z Uniwersytetu w Helsinkach i B. Vogelsteina z Uniwersytetu Johna Hopkina w Nowym Jorku rozpoczęła pracę mającą na celu ustalenie odziedziczanego defektu genowego w rodzinnym raku jelita grubego, w którym nie występuje polipowatość jelit. Wbrew oczekiwaniom, u członków badanych rodzin nie stwierdzono dziedzicznego defektu żadnego spośród przebadanych onkogenów, jak i genów supresorowych. Zespół De la Chapelle'a i Vogelstein'a podjął więc bardzo żmudne badania polegające na poszukiwaniu związku pomiędzy zachorowaniem a dziedziczeniem polimorficznych markerowych sekwencji DNA. Jako markery wykorzystano sekwencje tak zwanego mikrosatelitarnego DNA. W wyniku badań z zastosowaniem około 350 tego typu sond udało się ustalić taką korelację z dziedzicznym polimorfizmem sekwencji zlokalizowanym

w ramieniu krótkim chromosomu 2 w pozycji 2p15-16. W dalszych badaniach prowadzonych na komórkach nowotworowych pobranych od chorych zespół kierowany przez De la Chapelle'a i Vogelstein'a nie stwierdził utraty heterozygotyczności w analizowanym fragmencie co wskazuje, że w komórkach nowotworowych prawidłowy allel tego genu nie podlega delekcji, jak to ma miejsce w przypadku genów supresorowych transformacji nowotworowej (na przykład genu *p53*). W badaniach tych zaobserwowano również, że zmiana w prażku p15-16 chromosomu 2 towarzyszą ogromne zmiany w całym genomie. Autorzy postawili więc hipotezę, że fragment ten zawiera prawdopodobnie pojedynczy gen, który jest albo częścią aparatu replikującego DNA odpowiedzialnego za wierność kopiowania, albo też za tak zwaną reperację poreplikacyjną (MARX 1993a). W pół roku po odkryciu pierwszego genu mutatorowego ogromny zespół (pod publikacją podpisało się 35 osób z dwunastu ośrodków naukowych całego świata) ustalił, że gen ten koduje białko będące homologiem drożdżowego białka *msh2*. W drożdżach białko to jest elementem poreplikacyjnego systemu naprawy błędnie sparowanych zasad (ang. mismatch repair), a jego rola w tym systemie naprawczym polega na rozpoznaniu i związaniu się z błędnie sparowanymi zasadami. Produkt zdefektowanego genu nie rozpoznaje lub rozpoznaje w ograniczonym zakresie źle sparowane zasady, co prowadzi do narastania liczby mutacji rozproszonych w sposób przypadkowy po całym genomie. Do rozwoju nowotworu dochodziłoby wówczas, gdy takie mutacje wystąpiłyby w genach, których defekty są istotne z punktu widzenia procesu transformacji. W drożdżach, w systemie naprawy błędnie sparowanych zasad z produktem genu *msh2* współdziałają dodatkowo dwa inne białka. Ich poszukiwania u ludzi doprowadziły w maju tego roku do zlokalizowania na chromosomie 3p obu ludzkich homologów. Wstępne dane wydają się sugerować, że podobnie jak w przypadku genu *msh2*, mutacje w obu pozostałych genach są zasocjowane z rodzinnym rakiem jelita grubego (FISHEL i współaut. 1993, CLEAVER 1994, JIRICNY 1994).

TRANSFORMACJA NOWOTWOROWA A ZABURZENIA W PRZEBIEGU CYKLU KOMÓRKOWEGO

Prawidłowość przebiegu cyklu komórkowego jest gwarantowana przez istnienie dwóch tak zwanych punktów restrykcyjnych. Punkt pierwszy to granica faz G1 i S. Tu przede wszystkim odbywa się kontrola integralności materiału genetycznego. Wykrycie uszkodzenia w DNA powoduje zatrzymanie procesu replikacji i uruchomienie systemów naprawczych. Drugi punkt to granica faz G2 i M, gdzie odbywa się kontrola tworzenia się funkcjonalnego wrzeciona podziałowego przed mitozą. Obecnie dysponujemy już sporą liczbą danych na temat mechanizmów kontrolujących oba punkty restrykcyjne.

ROLA *rb1* I *p53*

Dwa antyonkogeny wydają się szczególnie istotne z punktu widzenia ich wpływu na przebieg cyklu komórkowego, a co za tym idzie proliferacji. Jeden z nich to produkt genu oznaczonego *rb1*, a drugi genu *p53*. Białkowe produkty tych genów odgrywają kluczową rolę w regulacji cyklu komórkowego. Produkt

genu *rb1* — białko p110 posiada zdolność do wiązania się z czynnikami transkrypcyjnymi, gdy jest w formie ufosforylowanej. Na przykład, gdy jego częściowo ufosforylowana postać jest związana z czynnikiem transkrypcyjnym E2F, to ten kompleks inaktywuje procesy transkrypcji pewnych genów. W fazie G1 następuje dysocjacja E2F od białka p110 i rozpoczyna się proces aktywnej transkrypcji. P110 zostaje przekształcone w białko p107, które po połączeniu się z cykliną A i p34 wyłącza produkt genu *rb1*. W fazie S białko p110 jest w postaci w pełni ufosforylowanej i przebywa w niej aż do końca fazy G2. Podczas fazy M następuje częściowa defosforylacja, która uaktywnia p110 do tworzenia kompleksu z E2F. Wyłączenie transkrypcji sprzyja wyprowadzeniu komórki do fazy G0. Wyjściu komórki z fazy G0 towarzyszy defosforylacja i dysocjacja E2F od p110 (NEVINS 1992).

Produkt genu *p53* — białko p53 jest jednym z najistotniejszych, jeśli nie najistotniejszy, regulatorem cyklu komórkowego. Jego rolę w cyklu determinuje przede wszystkim jego udział w kontroli integralności genomu. Stąd też białko p53 jest nazywane często strażnikiem molekularnym lub strażnikiem genomu (LANE 1992). Biologicznie aktywną formą białka jest odpowiednio ufosforylowany homotetramer. Rozpoznaje on ściśle określoną sekwencję DNA, czyli zachowuje się jak czynnik transkrypcyjny. Pod koniec fazy G1 ilość białka p53 rośnie. Z cytoplazmy przedostaje się do jądra. Jego wnikięcie do jądra powoduje zatrzymanie wzrostu komórek w fazie w G1. W przypadku stwierdzenia uszkodzeń w DNA jego ilość w jądrze rośnie powodując zatrzymanie cyklu komórkowego. Białko p53 jest również fosforylowane w zależności od cyklu komórkowego. Stopień fosforylacji może mieć wpływ na zdolność do tworzenia homotetrameru a zatem i na zdolność do aktywacji określonych genów. Maksymalny poziom fosforylacji jest osiągany w fazie M cyklu. Gen *p53* zawiera cztery obszary sekwencji o znacznej homologii międzygatunkowej. Większość mutacji w genie *p53* występuje właśnie w tych obszarach. Są to przeważnie delecje fragmentu lub całego genu oraz mutacje punktowe prowadzące do zmiany jednego aminokwasu na drugi. Zmutowane białko cechuje znacznie przedłużony czas „życia” w komórce. Normalne białko p53 ma okres półtrwania 10–20 min, podczas gdy jego zmutowany odpowiednik potrafi pozostawać w komórce nawet do 12 godzin. W większości przypadków zmutowane białko nie traci zdolności do tworzenia tetramerów z prawidłowym białkiem p53. Taki heteromer traci jednak zdolność do specyficznego wiązania się z DNA, przez co nie może pełnić funkcji regulatora transkrypcji. Podobnie jak zmutowane białko p53 zachowują się niektóre białka kodowane przez onkogeny wirusowe, na przykład antygen T wiurusa SV40, białko E6 wirusa HPV czy białko E1b adenowirusa. Wiążą się one z prawidłowym białkiem p53. Powstały heteromer białka p53 i białka wirusowego jest również nieaktywny jako regulator transkrypcji. Konsekwencją powstałego połączenia jest obniżenie ilości normalnego białka p53. Zmniejszenie poziomu prawidłowego p53 przez połączenie ze zmutowaną wersją białka czy też z białkiem wirusowym prowadzi do przedwczesnego zwolnienia bloku proliferacyjnego. Rozpoczyna się wówczas runda replikacji DNA, co może doprowadzić do utrwalenia zmiany mutacyjnej w przypadku, gdy nie został zakończony proces naprawy uszkodzonego DNA. Utrata kontroli nad proliferacją komórki prowadzi do gromadzenia się komórek genetycznie niestabilnych z różnymi mutacjami i aberra-

cjami chromosomalnymi. To z kolei do szybkiej selekcji komórek stransformowanych (CULOTTA i KOSHLAND Jr. 1993, SIEDLECKI 1993a).

Ze względu na dużą rolę białka p53 w procesach metabolicznych jego funkcja musi być precyzyjnie regulowana. Poszukiwania regulatorów funkcji białka p53 zakończyły się pomyślnie dwa lata temu z chwilą odkrycia genu nazwanego *mdm2*. Bliższa analiza tego genu zlokalizowanego na chromosomie 12q13-14 wskazuje, że dzięki alternatywnemu splicingowi (złożenie genu) powstają cztery różne transkrypty. Produkty białkowe trzech z nich łączą się bezpośrednio z prawidłowym białkiem p53, podczas gdy czwarty produkt, pozbawiony N-końcowej części białka, nie wykazuje zdolności do łączenia z p53. Sugeruje to jednocześnie, że ten region białka odpowiada za oddziaływanie z białkiem p53. Sekwencja aminokwasowa białek *mdm2* ujawnia, że białko to posiada miejsce wiążące się z metalem oraz tak zwane palce cynkowe, które są miejscem oddziaływania z DNA. Wydaje się więc, że białko *mdm2* spełnia również dodatkową funkcję czynnika transkrypcyjnego dla pewnych genów. Ze względu na te właściwości białko *mdm2* może być zaliczone do klasy onkogenów. Białko *mdm2* tworzy z cząsteczką p53 heterodimer analogiczny do tego, jaki tworzy z białkami wirusowymi lub zmutowanym białkiem p53. Dane białko *mdm2* poprzez połączenie z białkiem p53 moduluje aktywność transkrypcyjną p53 prawdopodobnie na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego. Jest również możliwe, że z punktu widzenia regulacji transkrypcji istotny jest ilościowy stosunek między obu białkami *mdm2*/p53. Wydaje się, że heterodimer p53-*mdm2* blokuje ekspresję genów dla których białko p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym. Ponadto powstanie kompleksu białkowego p53-*mdm2* prowadzi do zmniejszenia stężenia wolnego białka p53, i co za tym idzie do zwolnienia boku proliferacyjnego (HAINES i współaut. 1994). Tak więc konsekwencje nadekspresji genu *mdm2* są podobne do tych jakie wywołuje mutacja w genie *p53*. Ostatnio wykazano w niektórych nowotworach zwiększoną ekspresję genu *mdm2*. Takie przypadki obserwowano w mięsakach tkanek miękkich i kości oraz w glejakach i gwiąździakach (REINFERBERGER i współaut. 1993). W ciągu ostatnich kilku lat stało się jasne, że utrata aktywności supresorowej genu *p53* prawie zawsze jest etapem prowadzącym do transformacji nowotworowej.

≈ KINAZY CYKLIN I ICH INHIBITORY

Najnowsze badania prowadzone przez Kamba, Skolnicką i ich współpracowników, poszukujących w komórkach czerniaka genu szczególnie istotnego w szlaku mutacyjnym prowadzącym do transformacji nowotworowej (ang. susceptibility gene), ujawniły istnienie nowego antyonkogenu, którego udział w tym procesie może być nawet większy niż genów *p53* i *rb1* (MARX 1994). Ku swemu zdziwieniu badacze ci stwierdzili, że delecje i mutacje w tym genie towarzyszą nie tylko komórkom czerniaka, ale również komórkom wielu innych typów nowotworów. Z dotychczasowych danych doświadczalnych wynikało, że najczęściej spotykaną zmianą w większości nowotworów jest zmiana w genie *p53*. Dotyczy ona bowiem ponad 50% wszystkich typów nowotworów. Według wstępnych danych opublikowanych w jednym z ostatnich numerów *Science* KAMB i współautorzy (1994) stwierdzili zmiany w obrębie badanego genu w ponad 75%

przebadanych komórek nowotworowych. W 50% były to delecje całego lub części genu a w około 25% mutacje punktowe. Gen ten, nazwany *MTS1* (ang. multiple tumor supressor), zlokalizowano na chromosomie 9p21. Koduje on niskocząsteczkowe białko o ciężarze 16000 daltonów (p16). Jest ono inhibitorem tak zwanej cdk-4 kinazy, enzymu fosforylującego cyklinę D. Cykliny to grupa białek odgrywająca czołową rolę w cyklu komórkowym. Ich fosforylacja przez odpowiednią kinazę jest motorem wprawiającym w ruch mechanizmy cyklu komórkowego. Ufosforylowane cykliny tworzą kompleks białkowy zwany MPF I (ang. maturation promoting factor) z kinazą białkową zwaną p34. Brak fosforylacji cyklin uniemożliwia utworzenie kompleksu MPF I i rozpoczęcie syntezy DNA. Fosforylacja cyklin jest konieczna również w fazie podziałowej. Gen *MTS1* wykazuje 93% podobieństwa do drugiego genu znajdującego się w bezpośrednim sąsiedztwie, który nazwany został *MTS2*. Produkt tego genu jest o kilka aminokwasów krótszy niż p16. Funkcja *MTS2* nie jest znana, ale podobieństwo sekwencji do *MTS1* sugeruje, że może to być również inhibitor kinaz typu cdk. Nie można też wykluczyć, że jest to skrócony, nie funkcjonalny gen, w oparciu o który nie może powstać prawidłowy produkt (ang. truncated gene) (MARX 1994).

Białko p16 jest już kolejnym opisanym w ciągu ostatniego półrocza inhibitorem kinaz białkowych typu cdk. W połowie 1993 roku Vogelstein opisał regulowany przez białko p53 produkt genu *WAF 1* (EL-DEIRY i współaut. 1993). Białko to, zwane p21, również hamuje aktywność kinaz fosforylujących cykliny w szczególności kinazę cdk2 uczestniczącą w fosforylacji cykliny E. Zupełnie niedawno okazało się, że białko p21 może również bezpośrednio oddziaływać z innym białkiem, elementem składowym kompleksu replikacyjnego, zwanym PCNA (ang. proliferating cell nuclear antigen). Nawiasem mówiąc PCNA nazwany był przez pewien czas również cyklina. Wydaje się więc, że funkcja białka p21 nie ogranicza się jedynie do zablokowania wejścia w fazę S cyklu komórkowego przez inhibicję fosforylacji kinazy cdk 2 w przypadku stwierdzenia uszkodzeń w DNA przed replikacją. W przypadku bowiem gdy uszkodzenie wystąpiło podczas replikacji, p21 jest w stanie zatrzymać maszynę replikującą DNA wskutek połączenia się do PCNA. Uniemożliwia to utworzenie kompleksu białkowego PCNA/ polimeraza DNA, który jest głównym składnikiem kompleksu replikacyjnego zaangażowanego w syntezę DNA (PINES 1994).

Dla pełnego obrazu należy wspomnieć o co najmniej dwu innych inhibitorach kinaz cdk p24 i p27. O obu tych białkach niewiele jeszcze wiadomo. Białko p24 wykazuje homologię do kinaz białkowych. O białku p27 wiadomo, że blokuje cykl komórkowy w odpowiedzi na stymulację czynnikiem transformującym (HUNTER 1993, PINES 1994).

Niedawno opisano jeszcze jedno białko, nazwane p18, które okazało się być inhibitorem kinazy p34. Jak już wspomniano powyżej, kinaza p34 jest elementem składowym kompleksu MPF i odgrywa istotną rolę w przebiegu cyklu komórkowego.

Z przedstawionych danych wynika, że zaburzenie w procesie fosforylacji cyklin, białek zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego, jest jedną z najpoważniejszych przyczyn zaburzeń w jego przebiegu. W konsekwencji prowadzić to może do zaburzeń proliferacji a więc do transformacji nowotworowej.

APOPTOZA A TRANSFORMACJA NOWOTWOROWA

Dla wielu genów białko p53 jest bezpośrednim lub pośrednim aktywatorem bądź inhibitorem transkrypcji. Między innymi reguluje ono ekspresję rodziny genów *bcl* bezpośrednio zaangażowanych w proces apoptozy. W skład tej rodziny wchodzi geny *bcl2*, *bax* i *bcl-x*. Gen *bcl2* zwany jest też „genem przeżycia” (ang. survival gene) (MARX 1993b). Wysoki poziom ekspresji genu *bcl2* sprzyja przeżyciu komórki. Obniżenie poziomu białka *bcl2* jest równoznaczne ze skierowaniem komórki na drogę tak zwanej śmierci programowanej. W formie aktywnej produkt genu *bcl2* występuje jako dimer. Może też tworzyć dimery z pozostałymi członkami rodziny czyli z produktami genów *bax* i *bcl-x*. Odpowiednie heterodimery mają różny wpływ na przebieg apoptozy. Stanowi to obecnie przedmiot intensywnych badań. W niewątpliwym jednak sposób wykazano, że obniżenie zdolności uszkodzonej komórki do umierania (supresja apoptozy) prowadzi do gromadzenia się komórek, które w normalnych warunkach byłyby wyeliminowane na drodze apoptozy (CARSON i RIBEIRO 1993, SIEDLECKI 1993b). Gromadzenie się komórek z różnymi mutacjami i aberracjami chromosomalnymi prowadzi do szybkiej selekcji komórek o fenotypie nowotworowym.

Z apoptozą są związane też zmiany w ekspresji onkogenu *c-myc*. Jak wykazano, produkt genu *c-myc* bierze udział nie tylko w regulacji proliferacji ale i apoptozy.

PODSUMOWANIE

Z powyższych rozważań wynika, że jedną z głównych przyczyn przemiany komórki normalnej w nowotworową jest utrata kontroli nad jej proliferacją. Dotychczasowe badania wskazywały, że kluczową rolę w kontroli tego procesu odgrywają produkty kilku genów, w tym szczególnie produkty genów *p53* i *rb1*. W ciągu ostatnich lat stało się jasne, że utrata aktywności supresorowej prawie zawsze jest etapem prowadzącym do transformacji nowotworowej.

Badania zmian towarzyszących nabywaniu przez komórkę normalną fenotypu nowotworowego toczą się obecnie bardzo szerokim frontem. Niewątpliwie przyczynią się one do lepszego poznania mechanizmu/ów transformacji nowotworowej. Pozwolą też na skuteczniejsze diagnozowanie i prognozowanie przebiegu choroby. W niezbyt odległej przyszłości powinny też mieć wpływ na metody leczenia i skuteczność terapii.

MOLECULAR BASIS OF CANCER DISEASE

This article is an attempt to present carcinogenesis as a multi-step process. The growing number of evidences accumulated during the last few years shows that cancer is a consequence of genetic or epigenetic alterations in a variety of genes that are fundamental for growth, proliferation, differentiation and programmed cell death. These genes have been divided into four different groups each of which has been discussed. The role of some oncogenes and tumor suppressor genes in controlling the cell cycle is underlined.

LITERATURA

- ALBERTS B., BRAY D., LEVIS J., RAFF M., ROBERTS K., WATSON J. D., 1989. *Molecular Biology of the Cell*. Second edition, Garland Publishing Inc. New York, London.
- CARSON D. A., RIBEIRO J. M., 1993. *Apoptosis and disease*. Lancet 341, 1251-1254.
- CLEAVER J. E., 1994. *It was a very good year for DNA repair*. Cell, 76, 1-4.
- CULOTTA E., KOSHLAND JR. D. E., 1993. *p53 Sweeps through cancer research*. Science 262, 1958-1961.
- EL-DEIRY W. S., TOKINO T., VELCULESCU V. E., LEVY D.B., PARSON R., TRENT J. M., LIN D., MERCER E. W., KINZLER K. W., VOGELSTEIN B., 1993. *WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression*. Cell 75, 817-825.
- HAINES D. S., LANDERS J. E., ENGLE L. J., GEORGE D. L., 1994. *Physical and functional interaction between wild-type p53 and mdm2 proteins*. Molec. Cell. Biol. 14, 1171-1178.
- FISHEL, R., LESCOE, M. K., RAO, M. R. S., 1993. *Human mutator gene homolog msh2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer*. Cell 75, 1027-1038.
- HUNTER T., 1993. *Braking the cycle*. Cell 75, 839-841.
- JIRICNY J., 1994. *Colon cancer and DNA repair: have mismatches met their match?* TIG 10, 164-168.
- KAMB A., GRUIS N. E., WEOVER-FELDHAUS J., LIU Q., HORSHAMN K., TORTIGIAN S. V., STOCKERT E., DAY R. S., JOHNSON B. E., SKOLNICKA M. H., 1994. Science 264, 436-440.
- LANE D. P., 1992. *p53, Guardian of the genome*. Nature 358, 16-17.
- MARX J., 1993a. *New colon cancer gene discovered*. Science, 260, 751-752.
- MARX J., 1993b. *Cell death studies yield cancer clues*. Science 259, 760-761.
- MARX J., 1994. *New tumor suppressor may rival p53*. Science 264, 344-345.
- NEVINS J. R., 1992. *E2F: a link between the rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins*. Science 258, 424-429.
- PINES J., 1994. *p21 Inhibits cyclin shock*. Nature 369, 520-521.
- REINFERBERGER G., LIU L., ICHIMURA K., 1993. *Amplification and overexpression of mdm2 gene in subset of human malignant gliomas without p53 mutation*. Cancer Res. 2736-2739.
- SIEDLECKI J. A., 1993a. *p53 — strażnik genomu*. Nowotwory 43, 84-86.
- SIEDLECKI J. A., 1993b. *Geny śmierci kontra nowotwór*. Nowotwory 43, 177-179.
- STEFFEN J., 1993. *Postępy w badaniach nad dziedzicznymi predyspozycjami do rozwoju nowotworów złośliwych*. Nowotwory 43, 279-297.

BARBARA GRZELAKOWSKA-SZTABERT

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN

Pasteura 3, 02-093 Warszawa

*Praca dedykowana Pani Profesor Zofii Zielińskiej
w 80-tą rocznicę urodzin*

GENY SUPRESOROWE — MOLEKULARNE MECHANIZMY DZIAŁANIA I ICH ZNACZENIE W KONTROLI PROLIFERACJI KOMÓREK

WSTĘP

Powstanie nowotworu jest następstwem zaburzeń kontroli proliferacji komórek, ich interakcji pomiędzy sobą i otoczeniem. Skoordynowane działanie pozytywnych, jak i negatywnych, wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych czynników warunkuje prawidłowość przebiegu cyklu komórkowego. Zaburzenia tego działania leżą właśnie u podstaw niestabilności genomu komórek nowotworowych (HARTWELL 1992, WEINERT i LYDALL 1993) i prowadzą do nagromadzania się w nich błędów genetycznych (anomali) o charakterze dominującym lub recesywnym. Zmiany dominujące polegają przede wszystkim na aktywacji protoonkogenów w onkogeny. Zmiany recesywne zaś wynikają z braku syntezy lub syntezy nieaktywnych białek kodowanych przez geny, zwane genami supresorowymi nowotworów, recesywnymi onkogenami, czy wręcz anty-onkogenami (MARSHALL 1991, BISHOP 1991, WEINBERG 1991, BRYANT 1993). Określane są one również jako geny przeciwstawiające się rozwojowi nowotworu (KLEIN 1993).

Przez wiele lat zainteresowanie onkogenami zdominowało badania molekularnych podstaw nowotworzenia. Badania genów supresorowych mają krótszą historię i ich dynamiczny rozwój rozpoczął się w połowie lat osiemdziesiątych, kiedy to uświadomiono sobie, że do rozwoju nowotworów oprócz onkogenów muszą przyczyniać się jeszcze inne czynniki. Wskazówki o obecności w komórkach genów nie pozwalających na powstanie nowotworu uzyskano w różnego typu badaniach. Pierwsze dane otrzymano badając mieszańce (hybrydy), powstałe w wyniku fuzji komórek nowotworowych i prawidłowych. Hybrydy nie wykazywały cech komórek nowotworowych, wstrzyknięte zwierzętom nie wywoływały nowotworów, ale często obserwowano ich powrót do fenotypu nowotworowego. Następowo to po utracie, w czasie kolejnych podziałów, chromosomu(ów) pochodzącego z komórki prawidłowej (HARRIS 1993a, ANDERSON i STANBRIDGE 1993, NODA 1993). Wskazywało to na supresję w hybrydach fenotypu nowotworowego poprzez produkty genów obecnych tylko w komórkach prawidł-

lowych. Dalsze, bardzo istotne dane, świadczące o udziale genów supresorowych w genetycznym podłożu nowotworzenia, pochodziły z badań historii rodzin, w których występowały nowotwory, przede wszystkim siatkówczak (*retinoblastoma*). Wykazano, że do powstania nowotworu niezbędna jest utrata funkcjonowania dwóch alleli genu supresorowego, następująca zarówno na drodze predyspozycji genetycznej, jak też w efekcie licznych mutacji somatycznych (MARSHALL 1991, BISHOP 1991, EVANS i PROSSER 1992). Do wykrycia genów supresorowych przyczyniają się też badania stopnia utraty heterozygotyczności komórek nowotworowych (loss of heterozygosis, LOH), badania cytogenetyczne, jak również badania różnych mutacji (WEINBERG 1991, NOWELL 1994, HARRIS 1993b).

Przedmiotem artykułu jest omówienie sposobów działania niektórych z poznanych dotąd genów supresorowych, a także genów „podejrzanych” o takie właściwości (tabela 1). Jako „operacyjną” definicję genu supresorowego przyjęto propozycję WEINBERGA (1991), uznającą za gen supresorowy każdy genetyczny element, którego utrata lub inaktywacja powoduje w komórce pojawienie się różnorodnych zaburzeń wzrostu prowadzących do powstania nowotworu. Podana w tabeli 1 lista genów jest listą niepełną, ciągle bowiem są wykrywane geny, utracie funkcji których przypisuje się wywoływanie nowotworów. Produkty białkowe genów supresorowych mogą między innymi:

- występować w jądrze komórkowym i działać jako czynniki transkrypcyjne;
- w cytoplazmie i uczestniczyć w kaskadzie przekazywania sygnałów (aktywacja GTPazy);
- znajdować się w błonie komórkowej lub jej pobliżu, działając jako receptor sygnału zewnątrzkomórkowego, białko uczestniczące w adhezji komórkowej lub też w interakcji cytoszkieletu z błoną komórkową.

Tabela 1

Występowanie i właściwości białek kodowanych przez ludzkie geny supresorowe

Dziedziczony zespół	Nowotwór	Gen	Chromosom	Produkt genu i występowanie w komórce	Działanie produktu genu
Rodzinna brodawczakowatość jelita grubego (familial adenomatous polyposis coli)	gruczolakoraki jelita grubego	APC*	5q21	białko 310 kDa, cytoplazma	udział w adhezji komórek
Brak w rakach jelita grubego (deleted in colorectal carcinoma)	rak okrężnicy	DCC	18q21	białko 153–190 kDa, błona komórkowa	udział w adhezji komórek i w różnicowaniu; receptor błonowy
Rozsłany nowotwór komórek dokrewnych typ I (multiple endocrine neoplasia type I)	guzy przytarczyc, trzustki, ślinianek, piersi, kory nadnercza	MEN-1	11q13	?	?

Rozsiany nowotwór komórek dokrewnych typ II (multiple endocrine neoplasia type II)	guzy tarczycy, nerwiaki przyzwójowe	<i>MEN-2</i>	10	?	receptor o aktywności kinazy tyrozynowej ?
Nerwiakowłóknienkowatość typ I (neurofibromatosis type I)	obwodowa nerwiakowłóknienkowatość	<i>NF-1*</i>	17q11.2	białko 327 kDa, neurofibromina, cytoplazma	aktywator GTP-azy białka p21 ^{ras}
Nerwiakowłóknienkowatość typ II (neurofibromatosis type II)	osłoniaki nerwowe, oponiaki	<i>NF-2*</i>	22q12	białko 66 kDa, błona komórkowa od strony wewnętrznej	udział w wiązaniu błony komórkowej z cytoszkieletem
—	czerniaki, glejaki, leukemie, rak płuc	<i>MTS-1</i>	9p21	białko 16 kDa, jądro komórkowe	hamowanie aktywności kinazy białkowej cdk 4
Li-Fraumeni	większość ludzkich nowotworów	<i>p53*</i>	17p12-13.3	białko 53 kDa, jądro komórkowe	czynnik transkrypcyjny, regulator cyklu komórkowego, G1-S
Siatkówczak (retinoblastoma)	siatkówczak (zarodkowy guz gałki ocznej); mięsak kostry, rak piersi	<i>Rb-1*</i>	13q14	białko 105–110 kDa, jądro komórkowe	modulator transkrypcji, regulator cyklu komórkowego, G1-S
Choroba Von Hippel-Lindau	rak nerek	<i>VHC*</i>	3p25	białko 34 kDa, błona komórkowa?	udział w adhezji komórek? przekazywanie sygnałów ?
Guz nerki typu Wilms'a	nerczak płodowy	<i>WT-1*</i>	11p13	białko 52–54 kDa, jądro komórkowe	czynnik transkrypcyjny
Wcześnie pojawiający się rodzinny rak piersi (early onset familial breast cancer)	rak piersi	?	17q	?	?
Wrodzony niebrodawczakowaty rak jelita grubego (hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC)	raki okrężnicy i macicy	?	2p	?	wpływ na wierność replikacji genu(ów)

* Geny oznaczone gwiazdką zostały sklonowane.

Z danych: MARX 1993a, 1994, TRAVIS 1993, KINZLER i VOGELSTEIN 1993, BISHOP 1991, HEDRICK i współaut. 1994, KUNDSON 1993.

Tak więc różnorodność funkcji białkowych produktów poszczególnych genów supresorowych jest olbrzymia. Mówi się także o właściwościach supresorowych

interferonów (LENGYEL 1993) i czynnika TGF- β (KOFF i współaut. 1993), inhibitorów angiogenezy (LIOTTA i współaut. 1991, BISHOP 1991) oraz białek uczestniczących w adhezji komórek (HEDRICK i współaut. 1993, TSUKITA i współaut. 1993). Szczególnie istotny dla procesu nowotworzenia jest udział produktów genów supresorowych w regulacji proliferacji komórek, co przedstawię na przykładach genów *p53*, *Rb* i *MST1*.

GEN *p53*

Wśród poznanych genów supresorowych gen *p53* zajmuje miejsce szczególne, przede wszystkim ponieważ najczęstszym defektem genetycznym stwierdzanym w ludzkich nowotworach są właśnie mutacje w tym genie (SOUSSI i współaut. 1994, SCHLICHTHOLZ i SOUSSI 1994). Ponadto gen *p53* gra też w komórce rolę tak zwanego strażnika genomu (LANE 1992), warunkując podjęcie przez komórkę syntezy DNA, lub wyłączając ją z cyklu, poprzez skierowanie na drogę śmierci programowanej (LANE 1993, SIKORA 1994, 1995, LOWE i współaut. 1993).

Wyjaśnienie podstawowych mechanizmów działania białka *p53* sprawiły, że gen *p53* został uznany w 1993 roku za „cząsteczkę roku” (molecule of the year, CULLOTA i KOSHLAND 1993). O genie *p53* opublikowano bardzo wiele syntetycznych opracowań dotyczących jego struktury i działania w komórce (LEVINE i MOMAND 1990, LEVINE i współaut. 1991, OREN 1992, LEVINE 1993, PRIVES 1993, SELTER i MONTENARH 1994, DONEHOVER i BRADLEY 1993, ULLRICH i współaut. 1992, VOGELSTEIN i KINZLER 1992, BERBEĆ 1994). Omówię wobec tego szczegółowiej osiągnięcia z lat 1993–1994, które w znacznym stopniu wyjaśniają molekularny mechanizm jego działania.

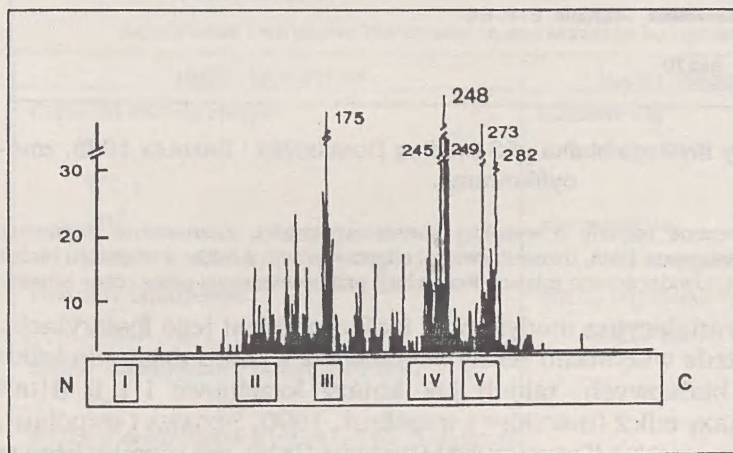
GEN *p53*, JEGO TRANSKRYPT I BIAŁKO *p53*

Gen *p53* składający się z około 20 kpz (tysięcy par zasad) zawiera 11 eksonów (sekwencji kodujących) i jest usytuowany w chromosomie 17 człowieka, a w 11 chromosomie myszy. Występuje również w chromosomach innych kręgowców. Jak dotąd nie znaleziono go w genomie bezkręgowców, chociaż przypuszcza się, że i u nich występuje gen spełniający podobne funkcje (DONEHOVER i BRADLEY 1993).

W obrębie genu *p53* stwierdzono 5 regionów o wysokiej konserwatywności, a geny *p53* różnych zwierząt odznaczają się dużą homologią. W genie *p53* zidentyfikowano też sekwencje nukleotydowe niewątpliwie uczestniczące w regulacji jego własnej transkrypcji. Obejmują one między innymi miejsce autoregulacji, miejsce podatne na stymulację przez surowicę oraz wiążące czynnik NF-1 i produkt genu *c-jun*. Ostatnio wykazano również wpływ protoonkogenu *c-myc* (REISMAN i współaut. 1993), a nawet samego białka *p53* (DEFFIE i współaut. 1993) na ekspresję genu *p53*. Dokładne omówienie zagadnień kontroli transkrypcji genu *p53* można znaleźć w artykułach przeglądowych (DONEHOVER i BRADLEY 1993, BERBEĆ 1994).

Mutacje w genie *p53* są bardzo częste. Najczęściej są to mutacje punktowe, spotykane są też insercje i delecje alleli w locus *p53*. Mutacje te występują głównie w części środkowej genu w regionach o wysokiej konserwatywności II–V

(ryc.1, HARRIS 1993b), przy czym różne nowotwory cechuje specyficzne na ogół spektrum mutacji (DONEHOVER i BRADLEY 1993, BERBEĆ 1994, SCHLICHTHOLZ i SOUSSI 1994). Tak na przykład w komórkach ludzi cierpiących na zespół Li-Fraumeni (charakteryzujący się dziedzicznymi skłonnościami do zapadania na choroby nowotworowe w młodym wieku), stwierdza się dziedziczenie mutacji w genie *p53* w jednym allelu oraz występowanie aż 13 mutacji w eksonie 7. Analiza charakteru mutacji genu *p53* w komórkach jest bardzo istotna, gdyż określony rodzaj mutacji może stanowić „molekularny dozymetr” ujawniający rodzaj wywołującego je karcynogenu i nawet ewentualnie czas trwania ekspozycji. Może też pozwalać na rozróżnienie, czy wywołujący mutacje czynnik jest pochodzenia egzo- czy endogennego (HARRIS 1993b). Przede wszystkim jednak mutacje w genie *p53*, w odróżnieniu od mutacji w innych genach supresorowych, powodują nie tylko utratę jego funkcji supresorowych, lecz również sprawiają, że zaczyna on działać jako onkogen.



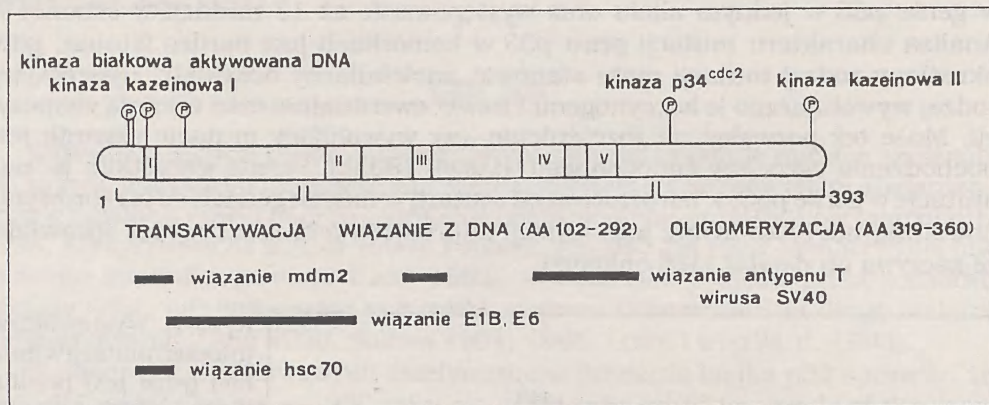
Ryc. 1. Występowanie (rozkład) mutacji w ludzkim genie *p53* (według HARRIS 1993, zmodyfikowane).

Na osi odciętych przedstawiono kolejne kodony *p53*, na osi rzędnych liczbę mutacji przypadających na poszczególne kodony (numer kodonu oznaczają liczby arabskie). Liczby rzymskie wyznaczają położenie regionów (fragmentów cząsteczki o wysokiej konserwatywności).

Wielkość transkryptu genu *p53*, zależnie od gatunku organizmu z którego pochodzi, waha się od 1.8–3.0 kbp. Białkowy produkt genu *p53* składa się z 393 aminokwasów, zawiera domeny konserwatywne (II–V) oraz szereg funkcjonalnych regionów. Uczestniczą one w wiązaniu z DNA, w oligomeryzacji cząsteczki białka *p53*, a także w wiązaniu z białkami komórkowymi (mdm 2, hsc 70) i wirusowymi (ryc. 2). N-końcowy fragment cząsteczki białka *p53* uczestniczy w procesach transaktywacji różnych genów. W C-końcu cząsteczki są zawarte natomiast sekwencje sygnałowe (NLS), odpowiedzialne za translokacje do jądra komórkowego zsintetyzowanego w cytoplazmie białka *p53*, w momencie rozpoczęcia cyklu komórkowego (faza G1). Należy podkreślić, że obecne w cytoplazmie białko *p53* nie przejawia swej funkcji biologicznej (ROTTER i współaut. 1993).

Aminokwasy występujące w centralnej części białka *p53* (AA 102–292) uczestniczą w wiązaniu go z DNA (BARGONETTI i współaut. 1993, CHO i współaut. 1994, PRIVES 1994). Bardzo często mutacje w tych właśnie pozycjach genu *p53*, powodujące kodowanie niewłaściwych aminokwasów, uniemożliwiają powstawanie kompleksów białka *p53* z DNA, a tym samym pełnienie przez nie funkcji biologicznej. Olbrzymim osiągnięciem w 1994 roku jest zbadanie trójwymiarowej

struktury białka p53, zarówno części centralnej jego cząsteczki (CHO i współaut. 1994), jak i C-końcowego fragmentu uczestniczącego w autooligomeryzacji (CLORE i współaut. 1994). Znajomość tych struktur może pozwolić na projektowanie leków, które po połączeniu ze zmutowanym białkiem p53 mogłyby przywracać jego prawidłową konformację.



Ryc. 2. Schemat budowy mysiego białka p53 (według DONEHOVER i BRADLEY 1993, zmodyfikowany).

Liczbami rzymskimi zaznaczono regiony o wysokiej konserwatywności. Zaznaczono fragmenty cząsteczki uczestniczące w wiązaniu DNA, transaktywacji i oligomeryzacji, a także w wiązaniu białek komórkowych i wirusowych. Uwidoczniono miejsca fosforylacji przeprowadzanej przez różne kinazy.

Najważniejszą potranslacyjną modyfikacją białka p53 jest jego fosforylacja. Są ufosforylowane przede wszystkim reszty serynowe w wyniku działania kilku specyficznych kinaz białkowych, takich jak kinazy kazeinowe I i II (HUPP i współaut. 1992), kinazy cdk2 (BISCHOFF i współaut. 1990, SEGAWA i współaut. 1993), kinaza aktywowana DNA (DONEHOVER i BRADLEY 1993), jak również kinaza C (BAUDIER i współaut. 1992, SKOUV i współaut. 1994). Fosforylacji ulegają także, występujące w N-końcu cząsteczki, reszty treoninowe działaniem kinazy MAP aktywowanej przez mitogeny (MILNE i współaut. 1994). Stopień ufosforylowania białka p53 wywołuje jego zmiany konformacyjne i zmiany właściwości, a w rezultacie zmiany działania w komórce (ULLRICH i współaut. 1992 i 1993). Tak na przykład dla jądrowej lokalizacji białka p53 szczególne znaczenie wydaje się mieć ufosforylowanie seryny znajdującej się w pozycji 315 cząsteczki (BISCHOFF i współaut. 1990, ADDINSON i współaut. 1990).

Prawidłowe białko p53 najprawdopodobniej funkcjonuje jako oligomer (tetrametr, STENGER i współaut. 1992). Jego różne formy konformacyjne są wykrywane specyficznymi przeciwciałami monoklonalnymi (MILNER 1991). Tworzy ono kompleksy z wieloma komórkowymi i wirusowymi białkami (patrz tabela 2), przy czym niewątpliwie skład kompleksów może być różny w różnych komórkach, a także w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Funkcjonalne znaczenie takich kompleksów zostanie omówione w dalszej części artykułu.

Zmutowane białka p53 charakteryzują się znacznie dłuższym okresem półtrwania (3–7 h, LEVINE i współaut. 1991, ZAMBETTI i LEVINE 1993) niż białko

prawidłowe (5–20 min). Wykazują też zmienioną termowrażliwość i w przeciwieństwie do formy prawidłowej występują jedynie w cytoplazmie. W zależności od rodzaju mutacji, białka zmutowane często przybierają odmienną konformację (tak zwaną promotorową) niż białko prawidłowe (o konfiguracji „supresorowej”) (MILNER 1991), mogą też one tracić zdolność do oligomeryzacji a także do wnikania do jądra komórkowego, zwłaszcza jeśli w wyniku mutacji uległy skróceniu od C-końca. Zmutowane białka nie tworzą też kompleksów, zwłaszcza z onkogennymi białkami wirusowymi, co ma olbrzymie znaczenie dla działania tych białek w komórce. Dokładniejsze porównanie właściwości prawidłowego białka p53 z właściwościami białek zmutowanych przedstawiono w pracy przeglądowej (ZAMBETTI i LEVINE 1993). W komórkach mogą też występować hetero-oligomery zmutowanego i prawidłowego białka p53, co więcej w takich kompleksach w białku prawidłowym może zostać „wymuszona” konformacja białka zmutowanego (DONEHOVER i BRADLEY 1993, MILNER i MEDCALF 1991).

Tabela 2

Komórkowe i wirusowe białka zdolne do tworzenia kompleksów z białkiem p53

Białka komórkowe	Białka onkogenne kodowane przez
Czynniki transkrypcyjne	adenowirusy
SP-1	białko E1-B
WT-1	
TBF	papowawirusy
CBF	duży antygen T wirusa SV40
Produkty onkogenów	wirusy Papilloma
mdm2	białko E6
Białko uczestniczące w replikacji DNA	
RPA	
Białko pośredniczące w interakcji p53 z białkiem wirusowym E6	
E6-AP	
Kinaza cdc 2	
Kinaza kazeinowa 2	

Z danych: DONEHOVER i BRADLEY 1993, DUTTA i współaut. 1993, HAINES i współaut. 1994, LEVINE 1993, MAHESWARA i współaut. 1993.

BIOLOGICZNE I MOLEKULARNE MECHANIZMY DZIAŁANIA BIAŁKA p53

Biologiczne efekty działania prawidłowego białka p53 w komórce przejawiają się przede wszystkim jako:

- zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 i zahamowanie wzrostu komórek,
- utrzymanie stabilności genomu,
- zahamowanie transformacji nowotworowej i wzrostu nowotworów,
- indukowanie programowanej śmierci komórek, zwłaszcza po uszkodzeniach DNA.

Produkty białkowe zmutowanego genu *p53*, przeciwnie, nie wywołują wymienionych wyżej efektów i w konsekwencji mogą powodować transformację nowotworową komórek.

Mechanizmy molekularne leżące u podstaw działania produktu genu *p53* przedstawia tabela 3.

Przyczynę bezpośredniej regulacji replikacji DNA przez białko *p53* upatrywano od dawna w jego interakcji z bliżej nieokreślonym, wówczas nie rozpoznanym, białkiem replikacyjnym, odpowiedzialnym za inicjację syntezy DNA, dzięki czemu mogłoby następować zahamowanie syntezy DNA. Wydaje się, że białkiem tym może być trójskładnikowy kompleks białkowy, nazwany RPA (replication protein A), niezbędny do odmaskowania miejsca startu w syntezie DNA. Aktywność białka RPA jest znoszona po skompleksowaniu z białkiem *p53* (DUTTA i współaut. 1993).

Tabela 3

Molekularne mechanizmy działania białka *p53*

- Wiązanie z określonymi sekwencjami DNA
- Aktywacja transkrypcji z promotorów w DNA nie zawierających miejsca wiązania *p53*
- Hamowanie transkrypcji z promotorów w DNA nie zawierających miejsca wiązania *p53*
- Stymulacja wiązania z jednoniciowym DNA
- Hamowanie aktywności helikazy
- Hamowanie replikacji DNA
- Indukcja syntezy białkowego inhibitora *p21* kinaz zależnych od cyklin

Z danych PIETENPOL i VOGELSTEIN 1993, 533–536, uzupełnione.

Jako pośredni wpływ białka *p53* na replikację DNA można traktować jego udział w transaktywacji transkrypcji genów (DONEHOVER i BRADLEY 1993, ZAMBETTI i LEVINE 1993). W różnych genach zidentyfikowano specyficzne sekwencje nukleotydowe wybiórczo wiążące dimeryczne lub tetrameryczne białko *p53* (HUPP i współaut. 1992, SHAULIAN i współaut. 1993, BUTCHER i współaut. 1994). Białko *p53* może modulować ekspresję wielu genów poprzez hamowanie lub stymulowanie aktywności ich promotorów. Mówiąc najogólniej, prawidłowe białko *p53* może wpływać stymulująco (pobudzająco) na aktywność transkrypcyjną genów przyczyniających się do hamowania wzrostu komórek (na przykład *GADD45*), lub do ich intensywniejszego różnicowania (na przykład gen kodujący mięśniową kinazę kreatynową, *MCK*). Może też być negatywnym regulatorem (wpływać hamująco) aktywności genów promujących proliferację komórek (na przykład *c-fos*, *c-jun*, *c-myb*, *PCNA*, β -aktyna, *R*; ZAMBETTI i LEVINE 1993, SHIHO i współaut. 1992, VOGELSTEIN i KINZLER 1992). Ostatnio w obrębie cząsteczki białka *p53* wyróżniono nawet odrębne regiony uczestniczące w aktywacji lub represji transkrypcji (SANG i współaut. 1994).

Efektywność wiązania białka *p53* z DNA może być modyfikowana przez wiele czynników oddziaływujących z C-końcem cząsteczki, wywołujących na przykład delecje aminokwasowe lub maskowanie końca (na przykład poprzez wiązanie przeciwciał monoklonalnych), a także przez czynniki zmieniające stopień ufosforylowania reszt serynowych w cząsteczce. Co więcej, niektóre związki o działaniu terapeutycznym, zwłaszcza różne leki przeciwnowotworowe i związki uszkadza-

jące DNA (TISHLER i współaut. 1993) oraz związki utleniające i chelatory (HAINAUT i MILNER 1993) mogą intensyfikować wiązanie białka p53 z DNA.

Aktywacja transkrypcji genów przez białko p53 w promotorach, które nie zawierają sekwencji nukleotydowej uczestniczącej w wiązaniu tego białka, zachodzi najprawdopodobniej za pośrednictwem innych białek, takich jak podstawowe czynniki transkrypcyjne (SP1), czy też białka CBF i TBF, wiążące się odpowiednio z występującymi w DNA sekwencjami CCAAT i TATA (SETO i współaut. 1992). Aktywacja promotora genu kodującego białko szoku cieplnego, HSP70, przez białko p53, przebiegająca z udziałem białka CBF (AGOFF i współaut. 1993), jest bardzo istotna ze względu na postulowany udział HSP70 w regulowaniu transkrypcji genu *p53* (LANE i współaut. 1993).

Białko p53 będące produktem zmutowanego genu *p53* (KERN i współaut. 1992, FARMER i współaut. 1992) oraz białkowe produkty onkogenów wirusowych (FARMER i współaut. 1992) hamują regulowaną przez prawidłowe białko p53 transkrypcję genów. Dlatego też o rzeczywistej efektywności transkrypcji decyduje wewnątrzkomórkowy poziom wolnego, prawidłowego białka p53.

REGULACJA WEWNĄTRZKOMÓRKOWEGO POZIOMU BIAŁKA p53

Białko mdm2

W komórce tylko wolne, prawidłowe białko p53 pełni funkcje supresorowe, zaś skompleksowanie go z innymi białkami unieczynnia je (tabela 2). Jednym z najważniejszych komórkowych białek „wyłączających” funkcjonowanie białka p53 jest produkt działania onkogenu *mdm2*, białko odznaczające się wysoką aktywnością transformacyjną (MOMAND i współaut. 1992). W stransformowanych komórkach mysich gen *mdm2* znaleziono w chromosomach minutowych (mouse double minute, FAKHARZADEH i współaut. 1991), w komórkach ludzkich zaś występuje on w chromosomie 12 (OLINER i współaut. 1992). W licznych komórkach nowotworowych (OLINER i współaut. 1992) gen *mdm2* ulega amplifikacji, co prowadzi do nagromadzenia się białka mdm2. Białko mdm2 występuje w kilku (co najmniej 5) formach molekularnych (OLSON i współaut. 1993), z których tylko formy z nieuszkodzonym N-końcem tworzą kompleksy z białkiem p53 (HAINES i współaut. 1994). W N-końcu białka mdm2 znajduje się bowiem domena uczestnicząca w interakcji z białkiem p53 (CHEN i współaut. 1993, BROWN i współaut. 1993). Dołączone do białka p53 białko mdm2 przesłania w nim domenę uczestniczącą w aktywacji transkrypcji i w efekcie kompleks mdm2-p53 nie wiąże się z DNA (ZAUBERMAN i współaut. 1993, OLINER i współaut. 1993). Dlatego też powstanie kompleksów tych białek ma duże znaczenie w przewyżczeniu supresorowego działania p53 na wzrost komórek (FINLAY 1993, OLINER 1993, OLINER i współaut. 1993). Ostatnio wysunięto hipotezę, że komórkowe poziomy białek mdm2 i p53 są regulowane na drodze sprzężenia zwrotnego (PICKSLEY i LANE 1993). Wydaje się to tym bardziej prawdopodobne, gdyż białko p53 indukuje w komórkach ekspresję genu *mdm2* (BARAK i współaut. 1993).

Onkogenne białka wirusowe

Szczególnie ważną rolę w „wyłączaniu” funkcjonowania białka p53, a także białka kodowanego przez inny gen supresorowy, retinoblastoma, (patrz rozdział

Gen p53), grają białka produkowane przez wirusy onkogenne, takie jak: adenowirusy (MORAN 1993), wirusy papilloma (VOUSDEN 1993) i papowawirusy (LUDLOW 1993). Pomimo, że w różny sposób eliminują działanie białka p53 to jednakże wszystkie zdolne są do wywoływania transformacji nowotworowej komórek.

Jedno z białek produkowanych przez adenowirusa Ad2, białko 55 kD E1B, wiąże się z N-końcowym fragmentem cząsteczki białka p53, niezbędnym dla jego funkcjonowania, jako transaktywatora transkrypcji. Rezultatem pojawienia się takiego kompleksu w komórce jest zahamowanie transkrypcji genów regulowanych bezpośrednio przez białko p53 (YEW i BERK 1992, YEW i współaut. 1994). Skompleksowanie białka p53 z dużym antygenem T wirusa SV40 także powoduje obniżenie efektywności regulowanej przez p53 transkrypcji genów (JIANG i współaut. 1993, SEGAWA i współaut. 1993, LUDLOW 1993, MIETZ i współaut. 1992), moduluje też niektóre funkcje antygeny T (aktywność ATP-azy, helikazy czy intensywności wiązania z DNA), które są niezbędne dla jego pełnej aktywności transformacyjnej (LUDLOW 1993, TACK i współaut. 1989).

Białko E6 produkowane przez wirusy papilloma typu 16 i 18, podobnie jak białka E1B i duży antygen T SV40, po skompleksowaniu z p53, znosi jego regulacyjne działanie w promowaniu lub hamowaniu transkrypcji genów (MIETZ i współaut. 1992, LECHNER i współaut. 1992). Jednakże główną funkcją białka E6 wydaje się być udział w usuwaniu z komórki białka p53, poprzez skierowanie go na drogę degradacji zachodzącej przy udziale systemu ubikwitynowego (SCHEFFNER i współaut. 1990, MEDCALF i MILNER 1993). W cząsteczce białka E6 wyróżnia się dwie podstawowe domeny uczestniczące w interakcji z p53: jedną związaną z hamowaniem aktywności transkrypcyjnej p53, drugą odpowiedzialną za degradację tego białka (CROOK i współaut. 1991). W wiązaniu p53 z tą ostatnią domeną białka E6 uczestniczy 100 kD białko E6-AP (E6-associated protein), będące najprawdopodobniej enzymem (ligazą) odpowiedzialnym za dołączanie cząsteczki ubikwityny do kompleksu p53-białko : E6 (HUIBREGTSE i współaut. 1993, SCHEFFNER i współaut. 1993). Obniżenie wewnątrzkomórkowego poziomu białka p53 w komórkach transformowanych wirusami onkogennymi z grupy *Papovirus* może mieć kluczowe znaczenie dla przebiegu wywołanej przez nie immortalizacji komórek (BAND i współaut. 1993), jak również powodować, że komórki takie nie „odpowiadają” zatrzymaniem wzrostu na uszkodzenia DNA (KESSIS i współaut. 1993).

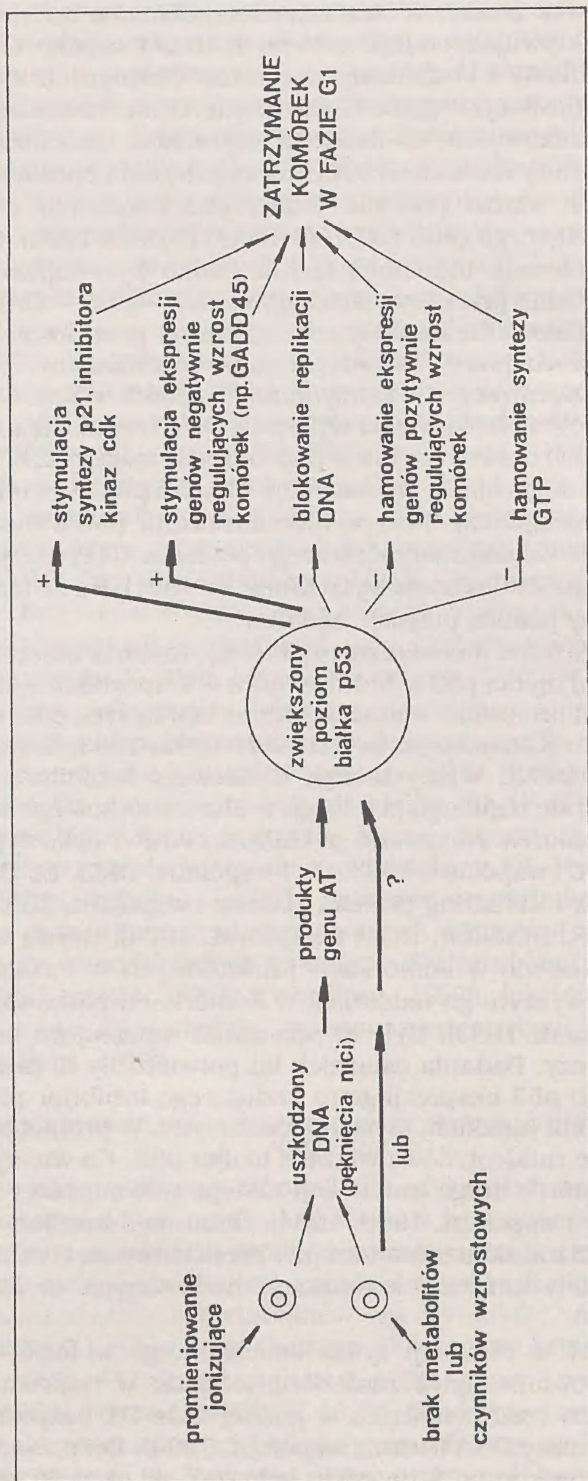
UDZIAŁ BIAŁKA p53 W REGULACJI PRZEJŚCIA KOMÓREK PRZEZ PUNKT RESTRYKCYJNY G1-S CYKLU KOMÓRKOWEGO

Pytanie, w jaki sposób prawidłowe białko p53 może hamować wzrost komórek intryguje badaczy od momentu udowodnienia jego supresorowych właściwości. Komórki bowiem, w których występuje nadekspresja genu *p53* — wywołana metodami transfekcji, działaniem czynników uszkodzających DNA, zbyt małą dostępnością niezbędnych metabolitów czy czynników wzrostowych — zatrzymują się w fazie G1 cyklu komórkowego (DNEHOVER i BRADLEY 1993, KUERBITZ i współaut. 1992, FRITSCHKE i współaut. 1993, ZHAN i współaut. 1993, MERLO i współaut. 1994, DOVER i współaut. 1994). Szlaki biochemiczne prowadzące do zwiększania ekspresji genu *p53* i ilości prawidłowego białka p53 nie są jeszcze w pełni poznane (ryc. 3). Przynajmniej w niektórych komórkach postuluje się

udział w nich produktów genów AT (*Ataksja-telangiektasia*), być może stabilizujących białko p53 i aktywujących jego syntezę (KASTAN i współaut. 1992, KHANA i LAVIN 1993). Fibroblasty i limfoblasty pacjentów cierpiących z powodu tego efektu genetycznego (mutacje w genie recesywnym AT na chromosomie 11q 22), odznaczają się nadwrażliwością na działanie czynników uszkodzających DNA, niezdolnością do naprawy uszkodzeń DNA i niestabilnością chromosomalną. Nie następuje też w nich wzrost poziomu białka p53 i indukcja pod wpływem promieniowania jonizującego genu GADD45 (KARP i BRODER 1994). Gen GADD45 (growth-arrest DNA-damage-inducible) koduje białko wywołujące zatrzymanie komórek w fazie G1. Szlak przekazywania sygnału AT — p53 — GADD, wzbudza coraz większe zainteresowanie badaczy ze względu na postulowany jego udział w powstaniu nowotworu piersi. Prawdopodobnie mechanizmy, poprzez które białko p53 mogłoby uczestniczyć w zatrzymaniu komórek w fazie G1, są podane na rycinie 3, niektóre z nich (wpływ na replikację DNA i regulację „pozytywnych” i „negatywnych” genów) omówiono już w poprzednich rozdziałach. Interesująca jest również hipoteza sugerująca, że prawidłowe białko p53, wywołujące obniżenie aktywności dehydrogenazy inozyno-monofosforanu (IMP), może pośrednio wpływać na obniżenie wewnątrzkomórkowego poziomu GTP, który uczestniczy w przekazywaniu sygnałów komórkowych (SHERLEY 1991). Na ile ten mechanizm okaże się uniwersalny pokażą przyszłe badania.

Uniwersalnym być może mechanizmem, którego historia zaczęła się w końcu 1993 roku, jest udział białka p53 w indukowaniu w komórkach syntezy niewielkiego białka (21 kDa), inhibitora większości kinaz białkowych cdk, o aktywności uzależnionej od cyklin (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1992, 1993, SHERR 1993, LEW i REED 1992, REED 1992). Wykrycie tego białkowego inhibitora jest zasługą badaczy zajmujących się regulacją przebiegu cyklu komórkowego oraz regulacją procesu starzenia komórek. Nazywano go białkiem WAF-1 (wild-type 53-activated fragment-1, XIONG i współaut. 1993, GU i współaut. 1993, EL-DEIRY i współaut. 1993), CIP1 (cdk-interacting protein, HARPER i współaut. 1993) czy też sdi (senescent cell derived inhibitor, NODA i współaut. 1994), używa się też nazwy PIC1. Białko to znaleziono w komórkach prawidłowych w formie kompleksu z kinazami cdk, nie wykryto go natomiast w komórkach pozbawionych białka p53 (HARPER i współaut. 1993). Były to przesłanki wskazujące na udział p53 w regulacji jego syntezy. Badania ostatnich lat potwierdziły to przypuszczenie. Indukcję przez białko p53 ekspresji genu kodującego inhibitor p21 wykazano w komórkach wielu linii ludzkich, mysich i szczurzych. W promotorze genu p21 znaleziono sekwencje nukleotydowe wiążące białko p53. Co więcej, białko p21 wprowadzone do komórek drogą transfekcji zastępowało supresorowe działanie białka p53 (EL-DEIRY i współaut. 1993, 1994). Ostatnio doniesiono także o niezależnej od białka p53 indukcji inhibitora p21 przez surowicę i niektóre czynniki wzrostowe w mysich i ludzkich komórkach hodowanych *in vitro* (MICIELI i współaut. 1994).

Udział białka p21 w regulacji cyklu komórkowego w fazie G1 wzbudza szczególne zainteresowanie, gdyż znaleziono je także w napromieniowanych ludzkich fibroblastach i zatrzymanych w późnej fazie G1 bezpośrednio przed rozpoczęciem fazy syntezy DNA (DULIĆ i współaut. 1994). Bezpośrednią przyczyną zatrzymania komórek w tej fazie cyklu było, jak się okazało, zahamowanie



Ryc. 3. Hipotetyczny model udziału białka p53 w zatrzymaniu komórek w fazie G1, wywołanym działaniem na nie promieniowania jonizującego lub czynników środowiskowych (według DONEHOVER i BRADLEY 1993 oraz DULIĆ 1992, zmodyfikowany). Skróót AT oznacza gen odpowiedzialny za wystąpienie choroby Ataksta-telangektasia.

przez inhibitor p21 aktywności dwóch kinaz cdk, aktywowanych przez dołączenie cykliny E i cykliny A. Ilość białka p21 znacząco wzrastała po napromieniowaniu komórek, ale tylko takich, które zawierały funkcjonalne białko p53. Komórki nie zawierające go nie „odpowiadały” zatrzymaniem na granicy faz G1/S na napromieniowanie, nie obserwowano w nich także zahamowania aktywności kinazy cdk2 aktywowanej przez cyklinę E (DULIĆ i współaut. 1994). Aktywowane przez cykliny kinazy cdk przeprowadzają fosforylację wielu istotnych, dla przebiegu cyklu, substratów, w tym także genu supresorowego *Rb*. Szczegółowiej zagadnienie to zostanie przedstawione w rozdziale o genie retinoblastoma, w którym zostanie również omówione współdziałanie dwóch genów supresorowych w regulacji cyklu.

JAKIE KORZYŚCI MAJĄ KOMÓRKI Z ZATRZYMANIA W FAZIE G1 CYKLU?

Jak już powiedziano, zatrzymanie to występuje najczęściej po uszkodzeniu w komórkach DNA. Zatrzymanie zaś komórek w fazie G1 przed rozpoczęciem syntezy DNA, daje czas na jego reperację i nie zezwala na kopiowanie błędów. Na tym właśnie polega rola genu *p53* jako „strażnika genomu” (LANE 1992). Jeśli naprawa DNA się nie powiedzie, na przykład z powodu zbyt dużych uszkodzeń DNA, komórki najczęściej kierują się na drogę programowanej śmierci, to jest apoptozy. Problem apoptozy komórek jest omawiany w szeregu artykułach przeglądowych (LANE 1993, YONISH-ROUACH i współaut. 1993, SIKORA 1994, 1995).

Komórki zawierające zmutowany gen *p53* nie zatrzymują się w fazie G1. Stają się genetycznie mniej stabilne, może się w nich nagromadzać uszkodzone DNA, jak również mogą pojawiać się w nich liczne anomalie chromosomalne. W efekcie może to prowadzić do szybkiej selekcji klonów komórek nowotworowych. Z brakiem funkcjonalnego, niezmutowanego białka *p53* wiąże się zapewne genetyczna niestabilność komórek u osób z zespołami Li-Fraumeni i ich większa wrażliwość na czynniki uszkadzające DNA.

Coraz lepiej rozumiała staje się rola prawidłowego białka *p53* w „ochronie” komórek przed wystąpieniem transformacji nowotworowej, a także jego udział w utrzymywaniu integralności genomu. Natomiast zagadnienie, na ile niezbędny jest jego udział w różnicowaniu komórek prawidłowych nie jest dotychczas w pełni wyjaśnione (ROTTER i współaut. 1993, DONEHOVER i współaut. 1992). Wydaje się, że przynajmniej w niektórych komórkach układu krwiotwórczego więcej prawidłowego białka *p53* występuje w komórkach krańcowo zróżnicowanych, niż w ich dzielących się komórkach macierzystych. *In vivo* podwyższony jego poziom wykazano w „partiach” zarodków ulegających wyraźnemu różnicowaniu a także w dojrzewających spermatocytach (ROTTER i współaut. 1993). Założywszy, że również w komórkach prawidłowych ekspresja genu *p53* podlega znaczącej regulacji, można sądzić, że obniżenie ekspresji (downregulation) sprzyjałoby procesom proliferacyjnym. Pomocne w zrozumieniu funkcjonowania białka *p53* okazały się zapewne rozpoczęte ostatnio badania myszy genetycznie pozbawionych genu *p53* (*p53*-null mice, knocked-out, DONEHOVER i współaut. 1992). Chociaż ich zarodki rozwijają się prawidłowo, to jednak dorosłe myszy pozbawione genu *p53* bywają bezpłodne, częste jest też wśród nich występowanie

nowotworów. Może to sugerować, że funkcję białka p53 w rozwoju embrionalnym myszy mogą pełnić produkty innych genów.

GEN RETINOBLASTOMA (*Rb*)

Retinoblastoma (siatkówczak), guz gałki ocznej rozwijający się u dzieci, powodowany przez mutację recesywną, był pierwszym ludzkim nowotworem, w którego etiologię udokumentowano. Na przykładzie genu retinoblastomy (*Rb*) wykazano, że w przypadku rodzinnej postaci tego nowotworu, przekazywanej jako cecha dominująca, dziedziczy się tylko jeden allel genu i dopiero następująca w czasie rozwoju utrata lub mutacja drugiego prawidłowego allelu powoduje chorobę (KNUDSON 1993, HAMEL i współaut. 1993). Zjawisko to, zwane utratą heterozygotyczności (loss of heterogeneity lub reduction to homozygosity), odgrywa olbrzymią rolę także w rozwoju i innych nowotworów. Drugą postacią retinoblastomy jest postać spontaniczna, bez przeszłości rodzinnej, pojawiająca się jako wynik mutacji obydwu alleli genu *Rb*.

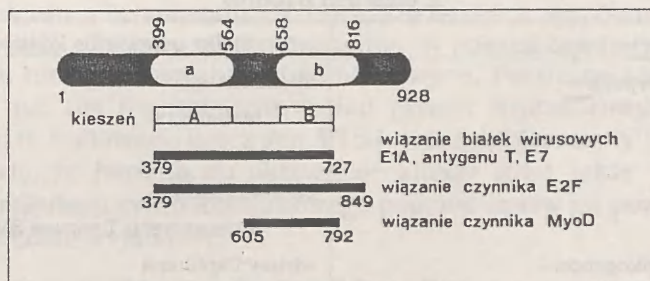
Mechanizmy działania genu *Rb* są równie złożone, jak mechanizmy działania omawianego już genu *p53*. Gra on bezpośrednią rolę w regulacji cyklu komórkowego i różnicowaniu komórek, uczestniczy w przekazywaniu wewnątrzkomórkowych sygnałów, a jego działanie pozostaje w ścisłym związku z działaniem genu *p53*. Genowi *Rb*, jego funkcjonowaniu w komórkach poświęcono liczne opracowania przeglądowe (WEINBERG 1992, 1993, MARSHALL 1991, LEWINE 1993, WIMAN 1993, LEVINE i MOMAND 1990).

GEN *Rb*, BIAŁKO p105 I JEGO FOSFORYLACJA, JAKO GŁÓWNA POTRANSLACYJNA MODYFIKACJA

Gen *Rb*, wyizolowany w 1986 roku, jest zbudowany z 200 kpz i zawiera 27 eksonów. W regionie 5' genu *Rb* występuje wiele reszt GC, co jest charakterystyczne dla genów metabolizmu podstawowego (house-keeping genes), nie ma zaś w nim promotorowych sekwencji TATA i CAAT. W eksonie 20 genu *Rb* znaleziono też sekwencje kodujące motywy strukturalne „zamka leucynowego” i „palców cynkowych”, typowych dla domen wiążących DNA (WEINBERG 1992). W obrębie eksonów 13-17 genu *Rb* występują często mutacje i delecje. Sprawia to, że zmutowane białko traci zdolność wiązania białkowych partnerów i ulegania fosorylacji (HIEBERT 1993, LEVINE 1993), co może wpływać na jego komórkową lokalizację (MITTNACHT i współaut. 1994). Aktywność promotora genu *Rb* wydaje się przynajmniej częściowo zależeć od stopnia metylacji występujących w nim reszt cytozyny (OHTANI-FUJITA i współaut. 1993). Sugeruje się też, że ekspresja genu *Rb* może być hamowana przez białko *Rb* na zasadzie autoregulacji przebiegającej z udziałem czynnika transkrypcyjnego E2F-1 (SHAN i współaut. 1994), jak również, że może być regulowana przez białko p53 (OSIFCHIN i współaut. 1994).

Obecność transkryptu genu *Rb* stwierdza się praktycznie we wszystkich komórkach, białkowym zaś produktem genu *Rb* jest polipeptyd złożony z 928 aminokwasów, o c. cz. 105–110 kDa (różnice ciężaru wynikają z obecności form o różnym stopniu ufosorylowania). Charakteryzuje się ono długim, bo 6–12 h okresem półtrwania (GOODRICH i współaut. 1993) i występowaniem w formach

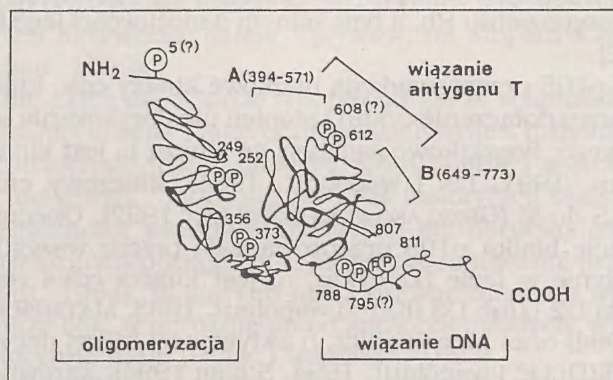
o różnym stopniu ufosforylowania. Na rycinie 4 przedstawiono schematycznie strukturę białka Rb zaznaczając regiony cząsteczki uczestniczące w wiązaniu z różnymi komórkowymi i wirusowymi białkami. Na rycinie 5 pokazano zaś przestrzenne usytuowanie w cząsteczce reszt aminokwasowych ulegających fosforylacji, zaznaczono też pozycje „kieszeni”.



Ryc. 4. Schemat budowy białka p105 (według KOUZARIDES 1993, zmodyfikowany).

Literami A i B oznaczono fragmenty cząsteczki tworzące w cząsteczce białka tak zwaną kieszeń. Zaznaczono też fragmenty cząsteczki uczestniczące w wiązaniu czynników transkrypcyjnych E2F i MyoD oraz onkogennych białek wirusowych E1A, E7 i dużego antygenu T wirusa SV40 a także miejsca sekwencji zbliżonych do sekwencji czynników TBP i TFIIB (a i b). Liczby oznaczają numery reszt aminokwasowych w łańcuchach polipeptydowych.

Szczególne znaczenie w wiązaniu białka Rb z innymi białkami mają domeny A i B, tworzące wraz z łączącym je peptydem tak zwaną kieszeń. W tym miejscu cząsteczki białka może następować dołączanie bądź to czynników transkrypcyjnych bądź też onkogennych białek wirusowych oraz cyklin, białek regulujących przebieg cyklu komórkowego (patrz tabela 4, DOWDY i współaut. 1993, KOUZARIDES 1993, GOODRICH i LEE 1993). Co więcej, sekwencje aminokwasowe w regionach A i B przejawiają istotne podobieństwo do sekwencji znajdujących w dwóch, tak zwanych podstawowych, czynnikach transkrypcyjnych TBF i TFIIB (KOUZARIDES 1993). To podobieństwo sekwencji może tłumaczyć zdolność wią-



Ryc. 5. Schemat budowy białka p105 (wg GOODRICH i LEE 1993). Zaznaczono usytuowanie aminokwasów ulegających fosforylacji, obszar „kieszeni” (A, B), jak również regiony uczestniczące w wiązaniu białka z DNA i w oligomeryzacji cząsteczki.

zania supresorowego białka Rb również z licznymi regulującymi czynnikami transkrypcyjnymi (tabela 4). Aminokwasy w obszarze kieszeni białka p105 uczestniczą także w wiązaniu go z DNA.

Tabela 4

Komórkowe i wirusowe białka zdolne do tworzenia kompleksów z białkiem p105Rb

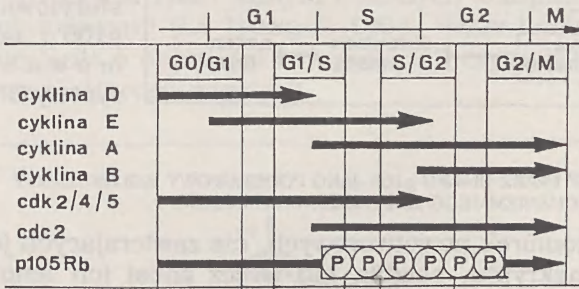
Białka komórkowe	Białka onkogenne kodowane przez
Czynniki transkrypcyjne	adenowirusy
E2F	białko E1A
MyoD	
ATF-2	papowawirusy
Ple-1	duży antygen T wirusa SV40
Produkty protoonkogenów	wirusy Papilloma
C-myc, N-myc	białko E7
C-abl	
Kinaza cdk	
Cykliny D	
Białko szoku cieplnego (hsc), 73 kDa	
Lamina C	

Z danych: KOUZARIDES 1993, GOODRICH i LEE 1993, DOWDY i współaut. 1993, RUSTGI i współaut. 1991, WELCH i WANG 1993, NIHEI i współaut. 1993.

W fazie G0/G1 cyklu komórkowego białko p105 nie jest lub jest jedynie słabo ufosforylowane; w kolejnych fazach cyklu coraz więcej jego reszt serynowych i treoninowych podlega fosforylacji (możliwość fosforylacji 15 reszt), osiągając maksimum w fazie G2 i M (WEINBERG 1992). Ta postranslacyjna modyfikacja białka Rb jest niezmiernie istotna, ponieważ stopień ufosforylowania wpływa na zdolność wiązania się białka p105 ze strukturami jądrowymi i decyduje o cytoplazmatycznym (białko hiperfosforylowane) lub jądrowym (białko nieufosforylowane) występowaniu Rb, a tym samym o możliwości jego funkcjonowania (WEINBERG 1992).

Fosforylację p105 przeprowadzają białkowe kinazy cdk, których aktywność regulowana poprzez dołączenie cyklin i stopień ufosforylowania oscyluje podczas cyklu komórkowego. Początkowo sądzono, że kinazą tą jest kinaza cdc2 (=cdk1) (LEES i współaut. 1991, LIN i współaut. 1991), kluczowy enzym regulujący przejście z fazy S do M (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1992). Obecnie uważa się, że *in vivo* fosforylację białka p105 przeprowadzają przede wszystkim kinazy cdk występujące jedynie w fazie G1 cyklu, to jest kinaza cdk4 regulowana przez dołączenie cyklin D2 i/lub D3 (KATO i współaut. 1993, MATSUSCHIME i współaut. 1992, SHERR 1994) oraz kinaza cdk2, o aktywności której decyduje dołączenie cykliny E (ryc. 6) (DULIĆ i współaut. 1994, SHERR 1994). Zarówno cykliny D, jak i cyklina E są cyklinami typowymi tylko dla fazy G1 (MOTOKURA i ARNOLD 1993) i można je traktować jako „wielofunkcyjne” białka regulujące aktywność różnych kinaz cdk i uczestniczące w wiązaniu ich z różnymi komórkowymi substratami, w tym z białkiem p105 (HINDS i współaut. 1992).

Aktywność kinaz cdk, a zwłaszcza kinazy cdk4, może być hamowana przez działanie endogennego białkowego inhibitora p21, którego syntezę stymuluje prawidłowe białko p53 (patrz rozdział: *Udział p53 w regulacji przejścia komórek przez punkt restrykcyjny G1-S cyklu komórkowego*) oraz białka p16, będącego produktem genu *MTS1* (multiple tumor suppressor 1) umiejscowionego na krótkim ramieniu chromosomu 9 (9p21) (SERRANO i współaut. 1993, KAMB i współaut. 1993). Zmiany chromosomalne w pozycji genu *MTS1* występują w komórkach bardzo licznych linii komórkowych. Postuluje się nawet, że gen *MTS1* może być nie rozpoznany dotąd genem supresorowym (MARX 1994a i b). Białko p16, kodowane przez gen *MTS1*, jest inhibitorem tylko kinazy cdk4. Jeśli okaże się, że hamuje on aktywność kinazy cdk4 także *in vivo*, to jego znaczenie w regulacji cyklu komórkowego poprzez wpływ na poziom ufosforylowania p105 będzie wyjątkowe.



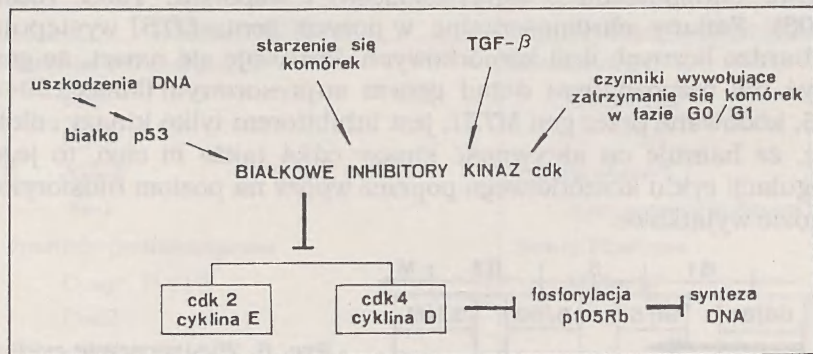
Ryc. 6. Występowanie cyklin, kinaz cdk 2/4 i cdc2 w różnych fazach cyklu komórkowego. Zaznaczono także występowanie zdefosforylowanego i ufosforylowanego białka p105.

Są odkrywane coraz to nowe endogenne inhibitory kinaz cdk pojawiające się w komórkach pod wpływem bardzo różnych czynników (ryc. 7) (HUNTER 1993, NASMYTH i HUNT 1993, GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1995). Tak na przykład w ludzkich komórkach epitelialnych, zahamowanych w fazie G1 po traktowaniu TGF- β , znaleziono ciepłostabilne białko p27^{KIP1}, hamujące aktywność kinaz cdk zależnych od cykliny E i A (SLINGERLAND i współaut. 1994, POLYAK i współaut. 1994). W kompleksach z kinazami cdk mogą też występować specyficzne fosfatazy, na przykład tyrozynowa fosfataza cdi1 (cyclin-dependent kinase interactor 1), regulujące ich aktywność dzięki wpływowi na stopień ich ufosforylowania (GYURIS i współaut. 1993).

Zahamowanie aktywności kinaz cdk powoduje, że w komórkach białko p105 pozostaje nieufosforylowane i jako takie oddziałuje z innymi białkami, w tym z czynnikami transkrypcyjnymi, blokując ich działanie i w efekcie syntezę DNA (patrz rozdział następny). Sądzi się, że brak fosforylacji białka Rb jest jednym z powodów niemożności wejścia starzejących się fibroblastów w fazę syntezy DNA, co w konsekwencji pociąga za sobą niepodjęcie przez nie podziałów (DIMRI i współaut. 1994). W starych ludzkich fibroblastach występują bowiem nieaktywne kinazy cdk, w odróżnieniu od komórek młodych, w których aktywne kinazy cdk fosforylują p105 (DULIĆ i współaut. 1993).

Defosforylacja p105 rozpoczyna się w anafazie, końcowym etapie mitozy. Najprawdopodobniej przeprowadzają ją serynowo-treoninowe fosfatazy — fosfataza typu 1 (PP1, LUDLOW i współaut. 1993, ALBERTS i współaut. 1993) i fosfataza typu 2 (PP2A, ALBERTS i współaut. 1993). Zahamowanie aktywności fosfatazy

PP1 przez kwas okadajowy (okadaic acid) doprowadza do hiperfosforylacji zarówno białka p105, jak i białka p53 (YATSUNAMI i współaut. 1993). Fakt ten — to znaczy unieczynnianie i zmiana subkomórkowej lokalizacji tych białek supresorowych — może mieć kapitalne znaczenie w promocji nowotworów wywołanej przez kwas okadajowy.



Ryc. 7. Udział białkowych inhibitorów kinaz cdk w regulacji ufosforylowania p105 i zahamowaniu syntezy DNA.

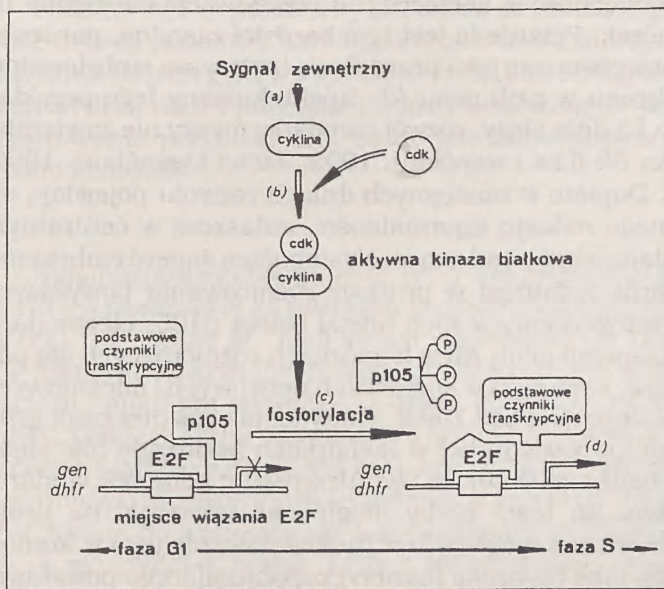
REGULACJA TRANSKRYPCJI GENÓW PRZEZ BIAŁKO p105 JAKO PODSTAWOWY MOLEKULARNY MECHANIZM JEGO DZIAŁANIA

Gen *Rb* wprowadzony do komórek nowotworowych, nie zawierających jego prawidłowego białkowego transkryptu, osłabia lub wręcz znosi ich fenotyp nowotworowy, a przede wszystkim hamuje intensywną proliferację komórek (FUNG i współaut. 1993, GOODRICH i współaut. 1991). Fakt ten, jak również jądrowa lokalizacja p105Rb w komórkach zatrzymanych w fazie G1 (MANCINI i współaut. 1994) i zdolność do tworzenia kompleksów z licznymi komórkowymi i wirusowymi białkami (tabela 4) silnie sugerowały, że białkowy produkt genu *Rb* może uczestniczyć w regulacji wzrostu komórek. To działanie p105 zachodzi przede wszystkim w komórkach będących w fazie G0/G1 cyklu dzięki jego wiązaniu się z czynnikami transkrypcyjnymi DRTF1/E2F (NEWINS 1992, LEES i współaut. 1993, La THANGUE 1994) i ATF-2 (KOUZARIDES 1993). Te heterogenne białka bezpośrednio uczestniczą w modulacji ekspresji genów związanych z odpowiedzią komórek na sygnały zewnątrzkomórkowe (*c-fos*, *c-myc*), jak też i genów, których produkty niezbędne są dla prawidłowego przebiegu licznych procesów metabolicznych związanych z podjęciem w komórkach syntezy DNA (FARNHAM i współaut. 1993). Mowa tu o genach kodujących, na przykład, reduktazie dihydrofolianowej, kinazie tymidynowej, syntazie tymidylanowej, polimerazie α , a także kinazie *cdc2* (NEWINS 1992) i cyklinie D (MULLER i współaut. 1994). Przy udziale czynnika transkrypcyjnego ATF-2 jest regulowana natomiast przez p105 aktywność transkrypcyjna genu *TGF- β* , którego produkt wpływa hamująco na wzrost komórek (NEWINS 1992).

Aktywność czynnika E2F, jako aktywatora transkrypcji, jest hamowana dzięki utworzeniu kompleksu z p105 lub także z pokrewnymi mu białkami p107 i p130 (FATTAEY i współaut. 1993, HOLLINGSWORTH i współaut. 1993, HAMEL i współaut. 1992, COBRINIK i współaut. 1992, HELIN i HARLOW 1993). W efekcie transkrypcja genów, w promotorach których występują sekwencje DNA specyfi-

cznie wiążące białka DRTF1/E2F, zostaje zahamowana. Tylko nieufosforylowane p105 wiąże się z białkiem E2F, formy ufosforylowane bądź zmutowane nie przejawiają tej właściwości. Fosforylacja p105, w wyniku działania kinaz cdk zmieniająca jego ładunek i konformację, powoduje oddysocjowanie ufosforylowanego białka Rb i umożliwia funkcjonowanie E2F, w tym jego skompleksowanie z podstawowymi czynnikami transkrypcyjnymi. Na rycinie 8 pokazano schematycznie udział białka Rb w regulacji ekspresji genów na przykładzie genu reduktazy dihydrofolianowej. Zablockowanie przez nieufosforylowane białko p105 funkcjonowania czynnika transkrypcyjnego E2F i aktywacji genu *dhfr* blokuje komórki w fazie G1.

Są jednak dane sugerujące, że białko p105 może w pewnych warunkach powodować zatrzymanie komórek także i w fazie G2, czyli po zakończeniu syntezy DNA (KARANTZA i współaut. 1993). Należy zaznaczyć, że kompleks E2F-p105 jest tylko jednym z licznych kompleksów czynnika E2F z białkami regulatorowymi (LA THANQUE 1994, HELIN i HARLOW 1993), pojawiają się też doniesienia o obecności w komórkach czynników E2F-podobnych, co stwarza dalsze możliwości regulacji.



Ryc. 8. Regulacja ekspresji genów przez p105 i czynnik E2F na przykładzie genu reduktazy dihydrofolianowej (*dhfr*) (według HOLLINGSWORTH i współaut. 1993, zmodyfikowane).

Etapy (a) i (b) to synteza cyklin fazy G1 i tworzenie ich aktywnego enzymatycznie kompleksu z kinazami cdk. Fosforylacja, etap (c), białka Rb wywołuje jego oddysocjowanie od kompleksu z czynnikiem transkrypcyjnym E2F, do którego z kolei mogą dołączać się podstawowe czynniki transkrypcyjne i aktywować ekspresję genu *DHFR*, etap (d).

Nie tylko ufosforylowanie p105 rozбивa jego połączenie z E2F. To samo działanie wywołuje skompleksowanie białka p105 z białkami produkowanymi przez wirusy onkogenne, jak białko E1A adenowirusów (MORAN 1993), duży antygen T wirusa SV40 (LUDLOW 1993) i białko E7 wirusa HPV16 (VOUSDEN 1993, tabela 4). Te same bowiem regiony cząsteczki p105 uczestniczą w wiązaniu z E2F, jak i z białkami wirusowymi (ryc. 4). Stabilność kompleksów białka Rb z białkami wirusowymi jest niższa w przypadku białek wirusowych o słabych właściwościach transformujących i wyższa w przypadku silnie transformujących białek. Białka wirusowe wiążą się przede wszystkim z nieufosforylowaną formą

p105 (GOODRICH i LEE 1993). Skompleksowanie to uniemożliwia białku Rb pełnienie „normalnych”, supresorowych funkcji. Zezwala ono zarazem na uaktywnienie transkrypcji zarówno wirusowych, jak i komórkowych genów, co może doprowadzić do transformacji komórek (HAMEL i współaut. 1993, MOTOKURA i ARNOLD 1993).

Regulacja ekspresji genów przez białko Rb może zachodzić nie tylko poprzez jego współdziałanie z czynnikami transkrypcyjnymi. Może również następować poprzez interakcję białka p105 z obecnymi w promotorach niektórych genów, tak zwanymi sekwencjami RCE (retinoblastoma controlling elements). Ten mechanizm regulacji zaobserwowano w przypadku genu *c-fos*, *c-myc* i insulinopodobnego czynnika wzrostu (KOUZARIDES 1993).

UDZIAŁ BIAŁKA p105 W RÓŻNICOWANIU KOMÓREK

Jak przedstawiono w poprzednim rozdziale, hamujące działanie białka p105 na efektywność transkrypcji różnych genów może zatrzymać komórki w fazie G1 cyklu komórkowego. Ta „negatywna” regulacja cyklu komórkowego dokonuje się dzięki interakcji białka p105 z bardzo różnymi, ważnymi dla przebiegu cyklu białkami. Czy jednak jego obecność w komórce jest rzeczywiście niezbędna do wystąpienia podziału komórek. Pytanie to jest tym bardziej zasadne, ponieważ liczne komórki, zarówno nowotworowe jak i prawidłowe (zwłaszcza embrionalne) mogą dzielić się pomimo braku w nich genu *Rb*. Spektakularny tego przykład stanowi prawidłowy, aż do 13 dnia ciąży, rozwój zarodków myszy nie zawierających funkcjonalnego białka Rb (LEE i współaut. 1992, JACKS i współaut. 1992, CLARKE i współaut. 1992). Dopiero w następnych dniach rozwoju pojawiają się w takich embrionach różnego rodzaju anormalności, zwłaszcza w centralnym układzie nerwowym i w układzie krwiotwórczym. Następująca śmierć embrionów jest konsekwencją powstania zaburzeń w procesie różnicowania powyższych tkanek i wskazuje na prawdopodobny w nich udział białka p105. Liczne dane dokumentują też wzrost ekspresji genu *Rb* w komórkach różnicujących się pod wpływem różnych czynników, zwłaszcza w komórkach nerwowych i mięśniowych (HAMEL i współaut. 1993, GOODRICH i LEE 1993). Fakty te, jak również brak genu *Rb* (lub jego strukturalnego odpowiednika) w komórkach bezkręgowców sugerują, że podstawową rolą białka p105 może być utrzymanie komórek w stanie spoczynkowym, niezbędnym do tego, ażeby mogły one wkroczyć na drogę różnicowania. Rolą dodatkową zaś mogłoby być funkcjonowanie jego w komórkach organizmów dorosłych jako czynnika (bariery) zapobiegającego powstawaniu nowotworu (transformacji nowotworowej). Postuluje się też, że białko p105 może „stanowić łącznik” pomiędzy licznymi czynnikami środowiska wpływającymi na przebieg cyklu komórkowego typu (na przykład hormonów czy też czynników wzrostowych) a podstawowym cyklem komórkowym (GOODRICH i LEE 1993).

Ostatnio zaproponowano nawet hipotezę omawiającą udział białka p105 w przekazywaniu komórkom sygnałów do różnicowania (HAMEL i współaut. 1993). Pod wpływem sygnału do różnicowania obecne w komórkach białko p105 pozostawiać ma nieufosforylowane, a zatem aktywne, regulujące aktywność, na przykład czynnika transkrypcyjnego E2F, co może wywoływać hamowanie eks-

presji genów, których produkty są niezbędne dla proliferacji komórek, stymulację zaś ekspresji genów, których produkty mogą być istotne w procesach różnicowania. Przy braku sygnału do różnicowania, białko p105 miałoby ulegać inaktywacji wskutek ufosforylowania, a komórka mogłaby podjąć syntezę DNA i wkroczyć w fazę S cyklu komórkowego. Tak więc obecność w komórce aktywnej lub nieaktywnej formy białka p105 decydowałaby o tym, czy komórka „wychodzi” z cyklu i staje się komórką spoczynkową i ewentualnie różnicującą się, czy też pozostaje w cyklu i dzieli się. Wydaje się więc, że białko p105 może w różnych komórkach mieć inne działanie, zależnie od rodzajów otrzymywanych przez nie sygnałów zewnętrznych. Należy podkreślić, że w działaniu białka p105, zwłaszcza w procesach różnicowania, olbrzymią rolę wydaje się odgrywać jego współdziałanie z białkowym produktem protoonkogeny *c-myc* (YEN i współaut. 1992, GOODRICH i LEE 1993), jednym z bardziej istotnych regulatorów proliferacji komórek.

INNE GENY SUPRESOROWE

Podstawowe mechanizmy działania produktów genów *p53* i *Rb* są obecnie dość dobrze poznane, natomiast stosunkowo mniej wiadomo o mechanizmach działania innych genów supresorowych. Sklonowanie w latach dziewięćdziesiątych wielu z nich i poznanie budowy kodowanych przez nie białek, pozwala na wysnuwanie przypuszczeń, co do ich funkcjonowania i znaczenia w metabolizmie komórek.

GEN WT-1

Najsilniejszą ekspresję genu *WT-1* wykrywa się w komórkach rozwijającej się nerki (co przemawia za udziałem produktu tego genu w procesach różnicowania nerek), a także w komórkach grzebienia płciowego, płodowej gonadzie i w komórkach krwiotwórczych. Inaktywacja genu *WT-1* wraz z innymi genetycznymi zmianami wywołuje u dzieci nowotwór nerek, guz Wilmsa (WEINBERG 1991, GERALD 1994, RUPPRECHT i współaut. 1994). Produktem genu *WT-1* jest jądrowe białko o c. cz. 52–54 kDa, zaliczane ze względu na swą budowę do grupy czynników transkrypcyjnych zawierających motyw palców cynkowych. Białko to jest zdolne do wiązania się z sekwencjami nukleotydowymi w DNA, z którymi łączą się również białka *EGR-1* (early growth response zinc-finger protein), pojawiające się bardzo szybko po zastymulowaniu komórek do podziałów, na przykład działaniem surowicy. Ze względu na kompetycję o te same miejsca wiązania w DNA, białko *WT-1* hamuje ekspresję genów stymulowaną przez białko *ERG-1*. Są to geny związane przede wszystkim z proliferacją komórek i kodujące między innymi także czynniki wzrostowe, jak insulino-podobny czynnik wzrostowy II i łańcuch A płytkowego czynnika wzrostu (GERALD 1994, RUPPRECHT i współaut. 1994). Co więcej, białko *WT-1* może również hamować ekspresję kodującego je genu (RUPPRECHT i współaut. 1994). Wykazane ostatnio współdziałanie zarówno „fizyczne”, jak i funkcjonalne białka *WT-1* z białkiem *p53* stanowi przykład wewnątrzkomórkowej regulacji funkcjonowania produktów różnych genów supresorowych (MAHESWARAN i współaut. 1993).

Omówione dotychczas geny *p53*, *Rb* i *WT-1* kodują białka jądrowe uczestniczące w regulacji transkrypcji. Produktami genów supresorowych mogą być także białka błonowe i cytoplazmatyczne, uczestniczące w adhezji komórek do podłoża (na przykład gen *APC*, *DDC*, *VHL*), w wiązaniu błony komórkowej z cytoszkieletem (gen *NF-2*), w percepcji przez komórkę różnego typu sygnałów komórkowych (na przykład *DDC*, *MEN-2*) a także ich modulacji (gen *NF-1*).

Szczególne znaczenie dla regulacji podziałów komórkowych ma produkt genu supresorowego *NF-1*, ze względu na wpływ na udział w regulacji funkcjonowania onkogeny *ras*.

GEN *NF-1*

Gen *NF-1* koduje cytoplazmatyczne białko o c.c. 330 kDa nazwane neurofibrominą. Brak lub inaktywacja genu *NF-1* prowadzi do powstawania łagodnych lub złośliwych nowotworów, przede wszystkim w obrębie układu nerwowego (WEINBERG 1991). Mechanizm działania neurofibrominy nie jest jeszcze poznany. Jednakże obecność w jej cząsteczce domen o sekwencjach aminokwasowych, homologicznych z występującymi w białkach GAP, aktywujących GTPazę będącą produktem onkogeny *ras*, pozwala przypuszczać, że również neurofibromina mogłaby działać podobnie jak białka GAP (REY i HALL 1993). Modulacja endogennej aktywności GTPazowej białka $p21^{ras}$ jest bardzo istotna, gdyż decyduje o tym, czy występuje ono w formie aktywnej (związanej z GTP), czy też nieaktywnej (związanej z GDP) (WEISMULLER i WITTINGHOFFER 1994). Aktywne białko $p21^{ras}$, zdolne do przekazywania sygnałów mitogennych i sygnałów do różnicowania, wydaje się być niezbędne przynajmniej dwukrotnie podczas przebiegu cyklu komórkowego a także niezbędne do „wyjścia” komórek z cyklu (MOODIE i WOLFMAN 1994). Wysunięto hipotezę, według której stymulacja przez neurofibrominę lub GAP GTPazy białka $p21^{ras}$ sprawia, że ilość jego aktywnej formy spada. Wydaje się, że konsekwencją braku w komórkach neurofibrominy może być zwiększenie poziomu formy aktywnej $p21^{ras}$, zdolnej do przekazywania sygnałów mitogennych i stymulowania podziałów komórkowych, a w końcu do nowotworzenia. Tak więc neurofibrominę można traktować jako jedno z białek o działaniu antyproliferacyjnym.

WSPÓŁDZIAŁANIE PRODUKTÓW ONKOGENÓW I GENÓW SUPRESOROWYCH W REGULACJI CYKLU

Znajomość podstawowych molekularnych mechanizmów działania w komórkach produktów kodowanych przez poszczególne onkogeny i geny supresorowe pozwala wysuwać przypuszczenia o możliwości skoordynowanego działania. Szczególnie ważne w regulacji cyklu jest współdziałanie białek supresorowych z białkami genów tak zwanej wczesnej odpowiedzi komórek na sygnały zewnętrzne, to jest z białkami *c-ras*, *c-myc*, *c-fos* i *c-jun* (MARSHALL 1991). Przynajmniej w niektórych komórkach przekazywanie sygnału do proliferacji poprzez białka kodowane przez onkogen *c-ras*, może pozostawać pod kontrolą genu supresorowego *NF-1*. Natomiast zmiany intensywności ekspresji genów *c-myc*, *c-jun* i *c-fos*, występujące po zadziałaniu białka *ras*, mogłyby wpływać, według ostatnio

zaproponowanej hipotezy, na aktywność kinaz cdk, enzymów fosforylujących produkty genów supresorowych *p53* i *Rb* (GEWIRTZ 1993). Z jednej strony wzrost poziomu i/lub aktywności tych białek supresorowych mogłyby na zasadzie sprzężenia zwrotnego regulować ekspresję, na przykład *c-myc* i *c-fos*, z drugiej zaś wywoływać — bezpośrednio (białko *p53*) lub też pośrednio — przy udziale czynnika E2F (białko *p105*) zatrzymanie komórek w fazie G1. W konsekwencji, komórki pozostając w tej fazie cyklu albo nie dzieliłyby się, albo też mogłyby ginąć przede wszystkim w procesie apoptozy. O intensywności apoptozy komórek decydowałby także poziom produktu onkogenu *bcl-2*, którego ekspresja podlega regulacji przez białko *p53*.

W tym szalenie uproszczonym opisie współdziałania produktów onkogenów i genów supresorowych mało uwagi poświęcono mechanizmom wywołującym zatrzymanie komórek na granicy faz G2 — M, bloku powodowanym przez wiele związków terapeutycznych. Ten etap również wydaje się pozostawać pod kontrolą produktów genów supresorowych, zwłaszcza genu *MTS1* i *p53*, poprzez ich wpływ na syntezę białkowych inhibitorów kinaz cdk, w tym kinazy *cdc2*, której aktywność jest niezbędna do rozpoczęcia podziałów mitotycznych.

UWAGI KOŃCOWE

W artykule przedstawiono podstawowe mechanizmy funkcjonowania niektórych genów supresorowych, istotnych dla przebiegu cyklu komórkowego. Szereg innych aspektów ich działania wymaga dalszych badań. Nie wyjaśnione jest w pełni, na przykład zagadnienie tak zwanej specyficzności tkankowej poszczególnych genów supresorowych, która sprawia, że brak ich powoduje powstanie nowotworów tylko w określonych narządach. Niewiele jest też informacji, poza informacjami o genach *p53* i *Rb*, o współdziałaniu w komórce innych genów supresorowych, a także o mechanizmach prowadzących do ich inaktywacji. Wymaga też dalszych badań problem udziału białka *p53* w przerzutowaniu komórek nowotworowych.

Zrozumienie mechanizmów działania przynajmniej niektórych genów supresorowych, chociaż z pewnością jeszcze nie pełne, stwarza też nowe możliwości terapeutyczne. Czynione są udane próby hamowania wzrostu komórek nowotworowych poprzez wprowadzanie do nich, metodami inżynierii genetycznej, genów *p53* i *Rb*. Myśli się też o syntezie związków, które mogłyby symulować działanie prawidłowych białek supresorowych w komórkach zawierających ich zmienione formy. Na ile tytuł jednego z artykułów *Geny supresorowe — nadzieja* okaże się prawdą, pokażą najbliższe lata.

SUPPRESSOR GENES — MOLECULAR MECHANISMS OF THEIR ACTION AND IMPORTANCE FOR CONTROL OF CELLULAR PROLIFERATION

Summary

It is generally accepted that loss of function of various genes whose products are needed for normal cell functioning contributes to cancer development. These genes are known as tumor suppressor genes, antioncogenes or genes antagonizing tumor development. The proteins coded by such genes play various roles in the cell functioning, e.g. they may be nuclear proteins acting as

transcription factors or membrane proteins involved in signal transduction, adhesion phenomena or interaction between cytoskeleton and membrane.

The two best characterized suppressor genes are *p53* and *Rb* and the functioning, at the molecular level, of the proteins coded by them became in the recent years fairly well understood. Our knowledge about other suppressor genes is less advanced, but for *WT-1*, *NF-1*, *MTS-1* and *APC* and *DCC* genes a general mode of action has already been discovered.

In the article a detailed description of actions of protein products of *p53* and *Rb* genes is given, with special emphasis on their interactions with various cellular and viral proteins. The special role of protein *p53* as the transcription factor in the regulation of expression of different genes is described and a hypothesis on its involvement in G1 cell cycle arrest is proposed. The action of *p105* as the regulator of transcription of genes, resulting from its interaction with the transcription factor *E21*, is also presented. The significance of *p105* phosphorylation for this interaction and participation of various endogenous protein inhibitors of cdk kinases in phosphorylation of this suppressor protein is described.

LITERATURA

- AGOFF S. N., HOU J., LINZER D. I. H., WU B., 1993. *Regulation of the human hsp 70 promoter by p53*. Science 259, 84-67.
- ADDINSON C., JENKINS J. R., STURZBECHER H. W., 1990. *The p53 nuclear localization signal is structurally linked to a p34 cdc2 kinase motif*. Oncogene 5, 423-26.
- ALBERTS A. S., THORBURN A. M., SHENOLIKAR S., MUMBY M. C., FERAMISCO J. R., 1993. *Regulation of cell cycle progression and nuclear affinity of the retinoblastoma protein by protein phosphatases*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 388-392.
- ANDERSON M. J., STANBRIDGE E. J., 1993. *Tumor suppressor genes studied by cell hybridization and chromosomal transfer*. FASEB J. 7, 826-833.
- BAND V., DALAL S., DELMOLINO L., ANDROPHY E. J., 1993. *Enhanced degradation of p53 protein in HPV-6 and BPV-1 E6-immortalized human mammary epithelial cells*. EMBO J., 12, 1847-1852.
- BARAK Y., JUVEN T., HAFNER R., OREN M., 1993. *Mdm2 expression is induced by wild type p53 activity*. EMBO J., 12, 461-468.
- BARGONETTI J., MANFREDI J. J., CHEN X., MARSHAK D. R., PRIVES C., 1993. *A proteolytic fragment from the central region of p53 has marked sequence-specific DNA-binding activity when generated from wild-type but not from oncogenic mutant p53 protein*. Gene & Develop. 7, 2565-2574.
- BAUDIER J., DELPHIN C., GRUNWALD D., KHOCHBIN S., LAWRENCE J. J., 1992. *Characterization of the tumor suppressor protein p53 as a protein kinase C substrate and a S 100b-binding protein*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 11627-11631.
- BERBEĆ H., 1994. *Gen p53 człowieka*. Post. Biochem. 40, 6-11.
- BISHOP J. M., 1991. *Molecular themes in oncogenesis*. Cell 64, 235-248.
- BISCHOFF J. R., FRIEDMAN P. N., MARSHAK D. R., PRIVES C., BEACH D., 1990. *Human p53 is phosphorylated by p60-cdc2 and cyclin B-cdc2*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4766-4770.
- BROWN D. R., DEB S., MUNÓZ R. M., SUBLER M. A., DEB S. P., 1993. *The tumor suppressor p53 and the oncoprotein simian virus 40T antigen bind to overlapping domains on the MDM2 protein*. Mol. Cell. Biol., 13, 6849-6857.
- BRYANT P. J., 1993. *Towards the cellular functions of tumour suppressors*. Trends in Cell Biol. 3, 31-35.
- BUTCHER S., HAINAUT P., MILNER J., 1994. *Increased salt concentration reversibly destabilizes p53 quaternary structure and sequence-specific DNA binding*. Biochem. J. 298, 513-516.
- CHEN J., MARECHAL V., LEVINE A. J., 1993. *Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains*. Mol. Cell. Biol., 13, 4107-4114.
- CHO Y., GORINA S., JEFFREY P. D., PAVLETICH N. P., 1994. *Crystal structure a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations*. Science 265, 346-355.
- CLARKE A. R., MAANDAG E. R., VAN ROON M., VAN DER LUGT N. M. T., VAN DER VALK M., HOOPER M. L., BERNIS A., TE RIELE H., 1992. *Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development*. Nature 359, 328-330.
- CLORE G. M., OMICHINSKI J. G., SAKAGUCHI K., ZAMBRANO M., SAKAMOTO H., APPELLA E., GRONENBORN A. M., 1994. *High-resolution structure of the oligomerisation domain of p53 by multidimensional NMR*. Science 265, 386-391.

- COBRINIK D., DOWDY S. F., HINDS P. W., MITTNACHT S., WEINBERG R. A., 1992. *The retinoblastoma protein and the regulation of cell cycling*. TIBS 17, 312-315.
- CROOK T., TIDY J. A., VOUDSEN K. H., 1991. Degradation of p53 can be targeted by HPV6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. Cell 67, 547-556.
- CULOTTA E., KOSHLAND D. E. Jr., 1993. *p53 Sweeps through cancer research*. Science 262, 1958-1961.
- DEFFIE A., WU H., REINKE V., LOZANO G., 1993. *The tumor suppressor p53 regulates its own transcription*. Mol. Cell. Biol., 13, 3415-3423.
- DIMRI G. P., HARA E., CAMPISI J., 1994. *Regulation of two E2F-related genes in presenscent and senescent human fibroblasts*. J. Biol. Chem. 269, 16180-16186.
- DONEHOVER L. A., HARVEY M., SLAGLE B. L., MCARTHUR M. J., MONTGOMERY C. A., BUTEL J. S., BRADLEY A., 1992. *Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors*. Nature 356, 215-221.
- DONEHOVER L. A., BRADLEY A., 1993. *The tumour suppressor p53*. Biochim. Biophys. Acta 1155, 181-205.
- DOVER R., JAYARAM Y., PATEL K., CHINERY R., 1994. *p53 Expression in cultured cells following radioisotope labelling*. J. Cell Sci., 107, 1181-1184.
- DOWDY S. F., HINDS P. W., LOUIE K., REED S. I., ARNOLD A., WEINBERG R. A., 1993. *Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins*. Cell 73, 499-511.
- DULIĆ V., DRULLINGER L. E., LEES E., REED S. I., STEIN G. H., 1993. *Altered regulation of G1 cyclins in senescent human diploid fibroblasts: accumulation of inactive cyclin E-Cdk2 and cyclin D1-Cdk complexes*. Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 11034-11038.
- DULIĆ V., KAUFMANN W. K., WILSON S., TLSTY T. D., LEES E., HARPER J. W., ELLEDGE S. J., REED S. I., 1994. *p53-Dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest*. Cell 76, 1013-1023.
- DUTTA A., RUPPERT J. M., ASTER J. C., WINCHESTER E., 1993. *Inhibition of DNA replication factor RPA by p53*. Nature 365, 79-82.
- EL-DEIRY W. S., TOKINO T., VELCULESCU V. E., LEVY D. B., PARSONS R., TRENT J. M., LIN D., MERCER E., KINZLER K. W., VOGELSTEIN B., 1993. *WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression*. Cell 75, 817-825.
- EL-DEIRY W. S., HARPER J. W., O'CONNOR P. M., VELCULESCU V. E., CANMAN C. E., JACKMAN J., PIETENPOL J. A., BURRELL M., HILL D. E., WANG Y., WIMAN K. G., MERCER W. E., KASTAN M. B., KOHN K. W., ELLEDGE S. J., KINZLER K. W., VOGELSTEIN B., 1994. *WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis*. Cancer Res. 54, 1169-1174.
- EVANS H. J., PROSSER J., 1992. *Tumor-suppressor genes: cardinal factors in inherited predisposition to human cancer*. Environmental Health Perspect. 98, 25-37.
- FAKHARZADEH S. S., TRUSKO S. P., GEORGE D. L., 1991. *Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumour cell line*. EMBO J., 10, 1565-1569.
- FARMER G., BARGONETTI J., ZHU H., FRIEDMAN P., PRYWES R., PRIVES C., 1992. *Wild-type p53 activates transcription in vitro*. Nature 358, 83-86.
- FARNHAM P. J., SLANSKY J. E., KOLLMAR R., 1993. *The role of E2F in the mammalian cell cycle*. Biochim. Biophys. Acta 1155, 125-131.
- FATTAEY A., HELIN K., HARLOW E., 1993. *Transcriptional inhibition by the retinoblastoma protein*. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 340, 333-336.
- FINLAY C. A. *The mdm-2 oncogene can overcome wild-type p53 suppression of transformed cell growth*. Mol. Cell. Biol., 13, 301-306.
- FRITSCHÉ M., HAESSLER C., BRANDNER G., 1993. *Induction in nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents*. Oncogene 8, 307-318.
- FUNG Y. K. T., T'ANG A., MURPHREE A. L., ZHANG F. H., QIU W. R., WANG S. W., SHI X. H., LEE L., DRISCOLL B., WU K. J., 1993. *The Rb gene suppresses the growth of normal cells*. Oncogene 8, 2659-2672.
- GERALD W. L., 1994. *The molecular genetics of Wilms tumor: a paradigm of heterogeneity in tumor development*. Cancer Invest., 12, 350-359.
- GEWIRTZ D. A., 1993. *DNA damage, gene expression, growth arrest and cell death*. Oncol. Res. 5, 397-408.
- GOODRICH D. W., WANG N. P., QIAN Y. W., LEE E. Y. -H. P., LEE W. -H., 1991. *The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle*. Cell 67, 293-302.
- GOODRICH D. W., LEE W. H., 1993. *Molecular characterization of the retinoblastoma susceptibility gene*. Biochim. Biophys. Acta 1155, 43-61.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 1992. *Regulacja cyklu komórkowego — historii i komplikacji ciąg dalszy*. Post. Biochem. 38, 98-107.

- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 1993. *Degradacja cyklin jako niezbędny element regulacyjny cyklu komórkowego*. Post. Biochem. 39, 16-25.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 1995. *Regulacja cyklu komórkowego — udział białkowych inhibitorów, kinaz cyklino-zależnych*. Post. Biochem. 41, 80-93.
- GU Y., TURCK C. W., MORGAN D. O., 1993. *Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit*. Nature 366, 707-710.
- GYURIS J., GOLEMIS E., CHERTKOV H., BRENT R., 1993. *Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2*. Cell 75, 791-803.
- HAINAUT P., MILNER J., 1993. *Redox modulation of p53 conformation and sequence-specific DNA binding in vitro*. Cancer Res. 53, 4469-4473.
- HAINES D. S., LANDERS J. E., ENGLE L. J., GEORGE D. L., 1994. *Physical and functional interaction between wild-type p53 and mdm2 proteins*. Mol. Cell. Biol., 14, 1171-1178.
- HAMEL P. A., GALLIE B. L., PHOLLIPS R. A., 1992. *The retinoblastoma protein and cell cycle regulation*. TIG 8, 180-185.
- HAMEL P. A., PHILLIPS R. A., MUNCASTER M., GALLIE B. L., 1993. *Speculations on the roles of RB1 in tissue specific differentiation, tumor initiation, and tumor progression*. FASEB J. 7, 846-854.
- HARPER J. W., ADAMI G. R., WEI N., KEYOMARSI K., ELLEDGE S. J., 1993. *The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases*. Cell 75, 805-816.
- HARRIS C. C., 1993a. *How tumor suppressor genes were discovered*. FASEB J. 7, 978-979.
- HARRIS C. C., 1993b. *p53: At the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment*. Science 262, 1098-1099.
- HARTWELL L., 1992. *Defects in a cell cycle, checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells*. Cell 71, 543-546.
- HEDRICK L., CHO K. R., VOGELSTEIN B., 1993. *Cell adhesion molecules as tumour suppressors*. Trends in Cell Biol. 3, 36-39.
- HEDRICK L., CHO K. R., FEARON E. R., WU T. C., KINZLER K. W., VOGELSTEIN B., 1994. *The DDC gene product in cellular differentiation and colorectal tumorigenesis*. Gene. Develop. 8, 1174-1183.
- HELIN K., HARLOW E., 1993. *The retinoblastoma protein as a transcriptional repressor*. Trends Cell Biol. 3, 43-46.
- HIEBERT S. W., 1993. *Regions of the retinoblastoma gene product required for its interaction with the E2F transcription factor are necessary for E2 promoter repression and pRb-mediated growth suppression*. Mol. Cell. Biol., 13, 3384-3391.
- HINDS P. W., MITTNACHT S., DULIC V., ARNOLD A., REED S. I., WEINBERG R. A., 1992. *Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins*. Cell 70, 993-1006.
- HOLLINGSWORTH R. E., CHEN P. L., LEE W. -H., 1993. *Integration of cell cycle control with transcriptional regulation by the retinoblastoma protein*. Curr. Op. Cell Biol. 5, 194-200.
- HUIBREGTSE J. M., SCHEFFNER M., HOWLEY P. M., 1993. *Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interactions of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53*. Mol. Cell. Biol., 13, 775-784.
- HUNTER T., 1993. *Braking the cycle*. Cell 75, 839-841.
- HUPP T. R., MEEK D. W., MIDGLEY C. A., LANE D. P., 1992. *Regulation of the specific DNA binding function of p53*. Cell 71, 875-886.
- JACKS T., FAZELI A., SCHMITT E. M., BRONSON R. T., GOODELL M. A., WEINBERG R. A., 1992. *Effects of an Rb mutation in the mouse*. Nature 359, 295-300.
- JIANG D., SRINIVASAN A., LOZANO G., ROBBINS P. D., 1993. *SV40 T antigen abrogates p53-mediated transcriptional activity*. Oncogene 8, 2805-2812.
- KAMB A., GRUIS J., LIU Q., HARSHMAN K., TAVTGIAN S. V., STOCKERT E., DAY III R. S., JOHNSON B. E., SKOLNICK M. H., 1993. *A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types*. Science 264, 436-440.
- KARANTZA V., MAROO A., FAY D., SEDIVY J. M., 1993. *Overproduction of Rb protein after G1/S boundary causes G2 arrest*. Mol. Cell Biol., 13, 6640-6652.
- KARP J. E., BRODER S., 1994. *New directions in molecular medicine*. Cancer Res. 54, 653-665.
- KASTAN M. B., ZHAN Q., EL-DEIRY W. S., CARRIER F., JACKS T., WALSH W. V., PLUNKETT B. S., VOGELSTEIN B., FORNACEA J. Jr., 1992. *A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia telangiectasia*. Cell 71, 587-597.
- KATO J., MATSUSCHIME H., HIEBERT S. W., EWEN M. E., SHERR C. J., 1993. *Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4*. Gene & Develop. 7, 331-342.

- KERN S. E., PIETENPOL J. A., THIAGALINGAM S., SEYMOUR A., KINZLER K. W., VOGELSTEIN B., 1992. *Oncogenic forms of p53-regulated gene expression*. Science 256, 827-830.
- KESSIS T. D., SLEBOS R. J., NELSON W. G., KASTAN M. B., PLUNKETT B. S., HAN S. M., LORINCZ A. T., HEDRICK L., CHO K. R., 1993. *Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 3988-3992.
- KHANA K. K., LAVIN M. F., 1993. *Ionizing radiation and UV induction of p53 protein by different pathways in ataxia-telangiectasia cells*. Oncogene 8, 3307-3312.
- KINZLER K. W., VOGELSTEIN B., 1993. *A gene for neurofibromatosis 2*. Nature 363, 495-496.
- KLEIN G., 1993. *Genes that can antagonize tumor development*. FASEB J. 7, 821-825.
- KNUDSON A. G., 1993. *Antioncogenes and human cancer*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 10914-10921.
- KOFF A., OHTSUKI M., POLYAK K., ROBERTS J. M., MASSAGUE J., 1993. *Negative regulation of G1 in mammalian cells: inhibition of cyclin E-dependent kinase by TGF- β* . Science 260, 536-539.
- KOUZARIDES T., 1993. *Transcriptional regulation by the retinoblastoma protein*. Trends Cell Biol. 3, 211-213.
- KUERBITZ S. J., PLUNKETT B. S., WALSH W. V., KASTAN M. B., 1992. *Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 7491-7495.
- LANE D. P., 1992. *p53, Guardian of the genome*. Nature 358, 15-16.
- LANE D. P., 1993. *A death in the life of p53*. Nature 362, 786-787.
- LANE D. P., MIDGLEY C., HUPP T., 1993. *Tumour suppressor genes and molecular chaperones*. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 339, 369-373.
- LA THANGUE N. B., 1994. *DP and E2F proteins: components of a heterodimeric transcription factor implicated in cell cycle control*. Cell Biol. 6, 443-450.
- LECHNER M. S., MACK D. H., FINIDE A. B., CROOK T., VOUSDEN K. H., LAIMINIS L. A., 1992. *Human papillomavirus E6 proteins bind p53 in vivo and abrogate p53 mediated repression of transcription*. EMBO J., 11, 3045-3052.
- LEE E. Y., -H. P., CHANG C. -Y., HU N., WANG Y. -C. J., HERRUP K., LEE W. -H., BRADLEY A., 1992. *Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis*. Nature 359, 288-294.
- LEES J. A., BUCHKOVICH K. J., MARSHAK D. R., ANDERSON C. W., HARLOW E., 1991. *The retinoblastoma protein is phosphorylated on multiple sites by human cdc2*. EMBO J., 10, 4279-4290.
- LEES J. A., SAITO M., VIDAL M., VALENTINE M., LOOK T., HARLOW E., DYSON N., HELIN K., 1993. *The retinoblastoma protein binds to a family of E2F transcription factors*. Mol. Cell. Biol., 13, 7813-7825.
- LENGYEL P., 1993. *Tumor suppressor genes: news about the interferon connections*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5893-5895.
- LEVINE A. J., MOMAND J., 1990. *Tumor suppressor genes: the p53 and retinoblastoma sensitivity genes and genes products*. Biochim. Biophys. Acta 1032, 119-136.
- LEVINE A. J., MOMAND J., FINLAY C. A., 1991. *The p53 tumor suppressor gene*. Nature 351, 453-456.
- LEVINE A. J., 1993. *The tumor suppressor genes*. Annu. Rev. Biochem. 62, 623-651.
- LEW D. J., REED S. I., 1992. *A proliferation of cyclins*. Trends in Cell Biol. 2, 77-81.
- LIN B. T. Y., GRUENWALD S., MORLA A. O., LEE W. H., WANG J. Y. J., 1991. *Retinoblastoma cancer suppressor gene product is a substrate of the cell cycle regulator cdc2 kinase*. EMBO J., 10, 857-864.
- LIOTTA L. A., STEEG P. S., STETLER-STEVENSON W. G., 1991. *Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation*. Cell 64, 327-336.
- LOWE S. W., RULEY H. E., JACKS T., HOUSMAN D. E., 1993. *p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents*. Cell 74, 957-967.
- LUDLOW J. W., 1993. *Interactions between SV40 large-tumor antigen and the growth suppressor protein-pRB and protein-p53*. FASEB J. 7, 866-871.
- LUDLOW J. W., GLENDENING C. L., LIVINGSTON D. M., DECAPRIO J. A., 1993. *Specific enzymatic dephosphorylation of the retinoblastoma protein*. Mol. Cell. Biol. 13, 367-372.
- MAHESWARAN S., PARK S., BERNARD A., MORRIS J. F., RAUSCHER III F. J., HILL D. E., HABER D. A., 1993. *Physical and functional interaction between WT1 and p53 proteins*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5100-5104.
- MANCINI M. A., SHAN B., NICKERSON J. A., PENMAN S., LEE W. -H., 1994. *The retinoblastoma gene product is a cell cycle-dependent, nuclear matrix-associated protein*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 418-422.
- MARSHALL C. J., 1991. *Tumor suppressor genes*. Cell 64, 313-326.
- MARX J., 1993a. *Learning how to suppress cancer*. Science 261, 1385-1387.

- MARX J., 1993b. *How p53 suppresses cell growth*. Science 262, 1644-1645.
- MARX J., 1994a. *A challenge to p16 gene as a major tumor suppressor*. Science 264, 1846.
- MARX J., 1994b. *New tumor suppressor may rival p53*. Science 264, 344-345.
- MATSUSCHIME H., EWEN M. E., STROM D. K., KATO J. Y., HANKS S. K., ROUSSEL M. F., SHERR C. J., 1992. *Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34^{PSK-J3}/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins*. Cell 71, 323-334.
- MEDCALF E. A., MILNER J., 1993. *Targeting and degradation of p53 by E6 of human papillomavirus type 16 is preferential for the 1620⁺ p53 conformation*. Oncogene 8, 2847-2851.
- MERLO G. R., VENESIO T., TAVERNA D., MARTE B. M., CALLAHAN R., HYNES N. E., 1994. *Growth suppression of normal mammary epithelial cells by wild-type p53*. Oncogene 9, 443-453.
- MICHELI P., CHEDID M., LIN D., PIERCE J. H., MERCER W. E., GIVOL D., 1994. *Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway*. Cancer Res. 54, 3391-3395.
- MIETZ J. A., UNGER T., HUIBREGTSE J. M., HOWLEY P. M., 1992. *The transcriptional transactivation function of wild-type p53 is inhibited by SV40 large T-antigen and by HPV-16 E6 oncoprotein*. EMBO J., 11, 5013-5020.
- MILNE D. M., CAMPBELL D. G., CAUDWELL F. B., MEEK D. W., 1994. *Phosphorylation of the tumor suppressor protein p53 by mitogen-activated protein kinases*. J. Biol. Chem. 269, 9253-9260.
- MILNER J., 1991. *A conformation hypothesis for the suppressor and promoter functions of p53 in cell growth control and in cancer*. Proc. R. Soc. Lond. B 245, 139-145.
- MILNER J., MEDCALF E. A., 1991. *Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation*. Cell 65, 765-774.
- MITTNACHT S., LEES J. A., DESAI D., HARLOW E., MORGAN D. O., WEINBERG R. A., 1994. *Distinct sub-populations of the retinoblastoma protein show a distinct pattern of phosphorylation*. EMBO J., 13, 118-127.
- MOMAND J., ZAMBETTI G. P., OLSON D. C., GEORGE D., LEVINE A. J., 1992. *The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation*. Cell 69, 1237-1245.
- MOODIE S. A., WOLFMAN A., 1994. *The 3Rs of life: Ras, Raf and growth regulation*. Trends in Genetics 10, 44-48.
- MORAN E., 1993. *Interaction of adenoviral proteins with pRB and p53*. FASEB J. 7, 880-885.
- MOTOKURA T., ARNOLD A., 1993. *Cyclins and oncogenesis*. Biochim. Biophys. Acta 1155, 63-78.
- MULLER H., LUKAS J., SCHNEIDER A., WARTHOF P., BARTEK J., EILERS M., STRAUSS M., 1994. *Cyclin D1 expression is regulated by the retinoblastoma protein*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2945-2949.
- NASMYTH K., HUNT T., 1993. *Dams and sluices*. Nature 366, 634-635.
- NEVINS J. R., 1992. *E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins*. Science 258, 4244-429.
- NIHEI T., TAKAHASHI S., SAGAE S., SATO N., KIKUCHI K., 1993. *Protein interaction of retinoblastoma gene product pRb110 with M_r73,000 heat shock cognate protein*.
- NOWELL P. C., 1994. *Cytogenic approaches to human cancer genes*. FASEB J. 8, 408-413.
- NODA M., 1993. *Mechanism of reversion*. FASEB J. 7, 834-840.
- NODA A., NING Y., VENABLE S. F., PEREIRA-SMITH O. M., SMITH J. R., 1994. *Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen*. Exp. Cell Res. 211, 90-98.
- OHTANI-FUJITA N., FUJITA T., AOIKE A., OSIFCHIN N. E., ROBBINS P. D., SAKAI T., 1993. *CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene*. Oncogene 8, 1063-1067.
- OLINER J. D., KINZLER K. W., MELTZER P. S., GEORGE D. L., VOGELSTEIN B., 1992. *Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas*. Nature 358, 80-83.
- OLINER J. D., 1993. *Discerning the function of p53 by examining its molecular interactions*. BioEssays 15, 703-707.
- OLINER J. D., PIETENPOL J. A., THIAGALINGAM S., GYURIS J., KINZLER K. W., VOGELSTEIN B., 1993. *Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53*. Nature 362, 857-860.
- OLSON D. C., MARECHAI V., MOMAND J., CHEN J., ROMOCKI C., LEVINE A. J., 1993. *Identification and characterization of multiple mdm2 proteins and mdm-2-p53 protein complexes*. Oncogene 8, 2353-2360.
- OREN M., 1992. *p53: the ultimate suppressor gene?* FASEB J. 6, 3169-3176.
- OSIFCHIN N. E., JIANG D., OHTANI-FUJITA N., FUJITA T., CARROZA M., KIM S. J., SAKAI T., ROBBINS P. D., 1994. *Identification of a p53 binding site in the human retinoblastoma susceptibility gene promoter*. J. Biol. Chem. 269, 6383-6389.

- PICKSLEY S. M., LANE D. P., 1993. *The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop: a paradigm for the regulation of growth control by p53?* *BioEssays* 15, 689-690.
- PIETENPOL J. A., VOGELSTEIN B., 1993. *No room at the p53 inn.* *Nature* 365, 17-18.
- POLYAK K., KATO Y. J., SOLOMON C. J., SHERR J., MASSAGUE J., ROBERTS J. M., KOFF A., 1994. *p27^{kip1}, a cyclin-cdk inhibitor links transforming growth factor β and contact inhibition to cell cycle arrest.* *Genes* 8, 9-22.
- PRIVES C., 1993. *Doing the right thing: feedback control and p53.* *Curr. Op. Cell Biol.* 5, 214-218.
- PRIVES C., 1994. *How loops, β -sheets, and a helices help us to understand p53.* *Cell* 78, 543-546.
- REED S. I., 1992. *The role of p34 kinases in the G1 to S-phase transition.* *Annu. Rev. Cell Biol.* 8, 529-561.
- REISMAN D., ELKIND N. B., ROY B., BEAMON J., ROFTER V., 1993. *c-Myc trans-activates the p53 promoter through a required downstream CACGTG motif.* *Cell Growth & Differ.* 4, 57-65.
- REY I., HALL A., 1993. *Tumor suppressors and the regulation of GTP binding protein activity.* *Trends in Cell Biol.* 3, 39-42.
- ROTTER V., FOORD O., NAWOT N., 1993. *In search of the functions of normal p53 protein.* *Trends in Cell Biol.* 3, 46-49.
- RUPPRECHT H. D., DRUMMOND I. A., MADDEN S. L., RAUSCHER III F. J., SUKHAMATE V. P., 1994. *The Wilms' tumor suppressor gene WT1 is negatively autoregulated.* *J. Biol. Chem.* 269, 6198-6206.
- RUSTGI A. K., DYSON N., BERNARDS R., 1991. *Amino-terminal of c-myc and N-myc proteins mediate binding to the retinoblastoma gene product.* *Nature* 352, 541-544.
- SANG B. C., CHEN J. Y., MINNA J., BARBOSA M. S., 1994. *Distinct regions of p53 have a differential role in transcriptional activation and repression functions.* *Oncogene* 9, 853-859.
- SCHEFFNER M., WERNES B. A., HUIBREGTSE J. M., LEVINE A. J., HOWLEY P. M., 1990. *The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53.* *Cell* 63, 1129-1136.
- SCHEFFNER M., HUIBREGTSE J. M., VIERSTRA R. D., HOWLEY P. M., 1993. *The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53.* *Cell* 75, 495-505.
- SCHLICHTHOLZ B., SOUSSI T., 1994. *Perspektywy praktycznego zastosowania badań nad genem p53.* *Post. Biochem.* 40, 211-221.
- SEGAWA K., HOKUTO I., MINOWA A., OHYAMA K., TAKANO T., 1993. *Cyclin E enhances p-53-mediated transactivation.* *FEBS Lett.* 3, 283-286.
- SEGAWA K., MINOWA A., SUGASAWA K., TAKANO T., HANAOKA F., 1993. *Abrogation of p53-mediated transactivation by SV 40 large T antigen.* *Oncogene* 8, 543-548.
- SELTHER H., MONTENARH M., 1994. *The emerging picture of p53.* *Int. J. Biochem.* 26, 145-154.
- SERRANO M., HANNON G. J., BEACH D., 1993. *A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4.* *Nature* 366, 704-707.
- SETO E., USHEVA A., ZAMBETTI G. P., MOMAND J., HOROKOSHI N., WEINMANN R., LEVINE A. J., SHENK T., 1992. *Wild-type p53 binds to the TATA-binding protein and represses transcription.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 12028-12032.
- SHAN B., CHANG C. Y., JONES D., LEE W. H., 1994. *The transcription factor E2F-1 mediates the autoregulation of RB gene expression.* *Mol. Cell. Biol.* 14, 299-309.
- SHAULIAN E., ZAUBERMAN A., MILNER J., DAVIES E. A., OREN M., 1993. *Tight DNA binding and oligomerization are dispensable for the ability of p53 to transactivate target genes and suppressor transformation.* *EMBO J.* 12, 2789-2797.
- SHERLEY J. L., 1991. *Guanine nucleotide biosynthesis is regulated by the cellular p53 concentration.* *J. Biol. Chem.* 266, 24815-24828.
- SHERR C. J., 1993. *Mammalian G1 cyclins.* *Cell* 73, 1059-1065.
- SHERR C. J., 1994. *The ins and outs of RB: coupling gene expression to the cell cycle clock.* *Trends Cell Biol.* 4, 15-18.
- SHIIO Y., YAMAMOTO T., YAMAGUCHI N., 1992. *Negative regulation of Rb expression by the p53 gene product.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5206-5210.
- SIKORA E., 1994. *Mechanizmy programowanej śmierci komórek (apoptozy).* *Post. Biochem.* 40, 150-160.
- SIKORA E., 1995. *Apoptoza komórek nowotworowych.* *Kosmos* 44, 353-363.
- SKOUV J., JENSEN P. O., FORCHHAMMER J., LARSEN J. K., LUND L. R., 1994. *Tumor-promoting phorbol ester transiently down-modulates the p53 level and blocks the cell cycle.* *Cell Growth & Differ.* 5, 329-340.

- SLINGERLAND J. M., HENGST L., PAN C. H., ALEXANDER D., STAMPFER M. S., REED S. I., 1994. A novel inhibitor of cyclin-Cdk activity detected in transforming growth factor β -arrested epithelial cells. *Mol. Cell. Biol.*, 14, 3683-3694.
- SOUSSE T., LEGROS Y., LUBIN R., DRY K., SCHICHTHOLZ B., 1994. Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review. *Int. J. Cancer* 57, 1-9.
- STENGER J. E., MAYR G. A., MANN K., TEGTMEYER P., 1992. Formation of stable homotetramers and multiples of tetramers. *Mol. Carcinog.* 5, 102-106.
- TACK L. C., WRIGHT J. H., DEB S. P., TEGTMEYER P., 1989. The p53 complex from monkey cells modulates the biochemical activities of simian virus 40 large T antigen. *J. Virol.* 63, 1310-1317.
- TISHLER R. B., CALDERWOOD S. K., COLEMAN C. N., PRICE B. D., 1993. Increases in sequence specific DNA binding by p53 following treatment with chemotherapeutic and DNA damaging agents. *Cancer Res.* 53, 2212-2216.
- TRAVIS J., 1993. New tumor suppressor gene captured. *Science* 260, 1235.
- TSUKITA S., ITOH M., NAGAFUCHI A., YONEMURA S., TSUKITA S., 1993. Submembranous junctional plaque proteins include potential tumor suppressor molecules. *J. Cell Biol.*, 123, 1049-1053.
- ULLRICH S. J., ANDERSON C. W., MERCER W. E., APPELLA E., 1992. The p53 tumor suppressor protein, a modulator of cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 267, 15259-15262.
- ULLRICH S. J., SAKAGUCHI K., LEESMILLER S. P., FISCELLA M., MERCER W. E., ANDERSON C. W., APPELLA E., 1993. Phosphorylation at ser-315 and ser-392 in mutant p53 molecules from human tumors is altered compared to wild-type p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5954-5958.
- VOGELSTEIN B., KINZLER K. W. (1992). p53 Function and dysfunction. *Cell* 70, 523-528.
- VOUSDEN K., 1993. Interactions of human papillomavirus transforming proteins with the products of tumor suppressor genes. *FASEB J.* 7, 872-879.
- WEINBERG R., 1991. Tumor suppressor genes. *Science* 254, 1138-1146.
- WEINBERG R. A., 1992. The retinoblastoma gene and gene product. *Cancer Surveys* 12, 43-57.
- WEINBERG R., 1993. Tumor suppressor genes. *Neuron* 11, 191-196.
- WEINERT T., LYDALL D., 1993. Cell cycle checkpoints, genetic instability and cancer. *Cancer Biol.* 4, 129-140.
- WEISMULLER L., WITTINGHOFFER F., 1994. Signal transduction pathways involving Ras. *Cellular Signaling* 6, 247-267.
- WELCH P. J., WANG J. Y. J., 1993. A C-terminal protein-binding domain in the retinoblastoma protein regulates nuclear c-Abl tyrosine kinase in the cell cycle. *Cell* 75, 779-790.
- WIMAN K. G., 1994. The retinoblastoma gene: role in cell cycle control and cell differentiation. *FASEB J.* 7, 841-845.
- XIONG Y., HANNON G. J., ZHANG H., CASSO D., KOBAYASHI R., BEACH D., 1993. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366, 701-704.
- YATSUNAMI J., KOMORI A., OHTA T., SUGANUMA M., FUJIKI H., 1993. Hyperphosphorylation of retinoblastoma protein and p53 by okadaic acid, a tumor promoter. *Cancer Res.* 53, 239-241.
- YEN A., CHANDLER S., FORBES M. E., FUNG Y. K., T'ANG A., PEARSON R., 1992. Coupled down-regulation of the RB retinoblastoma and c-myc genes antecedes cell differentiation: possible role of RB as a „status quo” gene. *Europ. J. Cell Biol.* 57, 210-221.
- YEW P. R., BERK A. J., 1992. Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early region E1B protein. *Nature* 357, 82-85.
- YEW P. R., LIU X., BERK A. J., 1994. Adenovirus E1B oncoprotein tethers a transcriptional repression domain to p53. *Genes & Develop.* 8, 190-202.
- YONISH-ROUACH E., GRUNWALD D., WILDER S., KIMCHI A., MAY E., LAWRENCE J. J., MAY P., OREN M., 1993. p53-Mediated cell death: relationship to cell cycle control. *Mol. Cell. Biol.*, 13, 1415-1423.
- ZAMBETTI G. P., LEVINE A. J., 1993. A comparison of the biological activity of wild-type and mutant p53. *FASEB J.* 7, 855-865.
- ZAUBERMAN A., BARAK Y., RAGIMOW N., LEVY N., OREN M., 1993. Sequence-specific DNA binding by p53: identification of target sites and lack of binding to p53-MDM2 complexes. *EMBO J.*, 12, 2799-2808.
- ZHAN Q., CARRIER F., FORNACE A. J. jr., 1993. Induction of cellular p53 activity by DNA-damaging agents and growth arrest. *Mol. Cell. Biol.*, 13, 4242-4250.

EWA SIKORA

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M.Nenckiego
Pasteura, 3, 02-093 Warszawa

Praca dedykowana Pani Profesor Zofii Zielińskiej
w 80-tą rocznicę urodzin

APOPTOZA A ONKOGENEZA

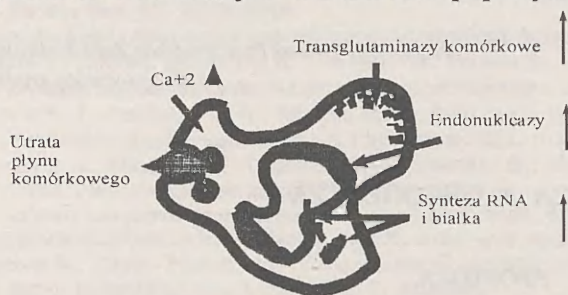
APOPTOZA

Komórki nowotworowe postrzegane są jako takie, które wymknęły się spod kontroli podziałów. Hodowane *in vitro* w warunkach zapewniających im przestrzeń i środowisko, dostarczające wszystkie niezbędne do życia składniki, mogą dzielić się nieustannie zapewniając sobie, jako pula komórek, nieśmiertelność. Wzrostu ich nie ogranicza proces starzenia zakończony śmiercią, tak charakterystyczny dla komórek prawidłowych (SIKORA 1993a). Nie oznacza to, że komórki nowotworowe nie umierają w ogóle. Spontaniczną, jak też i indukowaną wieloma lekami przeciwnowotworowymi, śmierć komórek nowotworowych obserwuje się zarówno *in vitro*, jak i w organizmie (WYLLIE 1992). Warto jednak zastanowić się, czy zdolność komórek nowotworowych do nieograniczonych podziałów wynika tylko z utraty kontroli tych podziałów, czy też może zawiodła w nich kontrola mechanizmów śmierci.

Zainteresowanie badaczy mechanizmami śmierci komórek ostatnio dramatycznie wzrosło. Lepsze poznanie ich budzi nadzieję na bardziej racjonalne wykorzystanie stosowanych dotychczas leków przeciwnowotworowych, a także być może na zupełnie nowe podejście do problemu nowotworu.

Śmierć komórek, podobnie jak ich podziały może być procesem aktywnym, podlegającym kontroli genetycznej. Nazywana wtedy bywa apoptozą (z greckiego opadanie płatków kwiatowych) lub śmiercią programowaną, w odróżnieniu od nekrozy (z łaciny martwica), która jest śmiercią przypadkową (WYLLIE i współaut. 1980). Śmierć komórek poprzez apoptozę jest poprzedzona zwykle wzrostem syntezy białka i RNA (MARTIN 1993). Charakterystyczny dla komórek apoptotycznych jest również wzrost stężenia jonów wapnia, a także aktywacja niektórych enzymów, w tym transglutaminaz komórkowych i endonukleaz (NICOTERA i współaut. 1992, MANTEUFFEL-CYMBOROWSKA 1993, PEITSCH i współaut. 1994). Również morfologia komórek umierających w sposób aktywny zmienia się bardzo charakterystycznie. Ulegają one obkurczeniu na skutek utraty wody i rozpadowi na tak zwane ciała apoptotyczne, w których znajdują się morfolo-

gicznie niezmienione organella, oraz fragmenty DNA. Za tworzenie usieciowań niezbędnych do powstania ciałek apoptotycznych są odpowiedzialne transglutaminazy komórkowe, a endonukleazy katalizują rozpad DNA na fragmenty wielkości 180–200 par zasad i ich wielokrotności. Komórki nekrotyczne, w odróżnieniu od apoptotycznych, pęcznieją i ulegają rozpadowi na skutek rozerwania błon komórkowych. Natomiast ciała apoptotyczne są trawione przez makrofagi lub komórki sąsiadujące nie wywołując stanu zapalnego, który towarzyszy nekrozie (COHEN 1993, WILLIAMS i współaut. 1992, WYLLIE i współaut. 1980). Schemat wydarzeń zachodzących w komórce apoptotycznej przedstawia rysunek 1.



Rys. 1. Schemat typowych procesów zachodzących w komórce apoptotycznej. Pionowe strzałki oznaczają nasilenie przedstawianych schematycznie aktywności enzymów i procesów.

Programowana śmierć komórek, na równi z ich podziałami, jest odpowiedzialna za kształtowanie organizmów przechodzących morfogenezę, prawidłowy przebieg embriogenezy, a także utrzymanie prawidłowej liczby komórek w organizmie dorosłym (WYLLIE 1992). Obydwa te procesy (podziały i śmierć komórek) „czuwają” nad prawidłowym przebiegiem różnicowania komórek nabłonkowych i krwiotwórczych, a także dojrzewania limfocytów T, które odbywa się w grasicy. Uważa się, że apoptoza jest jednym z mechanizmów obronnych, polegającym na usuwaniu komórek zbędnych, uszkodzonych i zmutowanych (RAFF 1992). Prawdopodobnie poprzez apoptozę umierają komórki stare, chociaż nie ma na to wyraźnych dowodów. Co więcej, FRANCESCHI i współautorzy (1992) uważają, że apoptoza właśnie, jako jeden z mechanizmów obronnych, zawodzi wraz z wiekiem. Śmierć programowana może być też zjawiskiem patologicznym. Tak jest w przypadku śmierci limfocytów CD^{+4} osób chorych na AIDS (AMEISEN 1992), jak również w chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera (BARR i TOMEI 1994). Nic nie wiemy, jak dotychczas, na temat sposobu umierania komórek organizmu podlegającego wyniszczeniu z powodu choroby nowotworowej. Można się jednakże spodziewać, że również w tym przypadku mamy do czynienia z apoptozą. We krwi wielu ludzi z różnymi nowotworami, a także u ludzi chorych na AIDS obserwuje się podwyższony poziom czynnika martwicy nowotworu, tak zwanej kachetyny lub inaczej $TNF-\alpha$ (tumor necrosis factor). Jak wykazano w doświadczeniach *in vitro* $TNF-\alpha$ może nie tylko zgodnie ze swoją nazwą powodować nekrozę, ale również w wielu komórkach wywoływać apoptozę (SIKORA 1994).

MECHANIZMY APOPTOZY

Przekazywanie sygnału komórkowego do apoptozy odbywa się bardzo różnymi drogami, które zależą od czynnika indukującego śmierć (EVANS 1993).

Czasami jednak te same czynniki mogą wywołać apoptozę lub podziały komórek, bądź też pozostać bez wpływu na obydwie procesy, w zależności od typu czy też stopnia dojrzałości komórek, na które działają. Tak jest, na przykład, w przypadku limfocytów. Aktywacja receptora komórek T (tak zwanego TCR) limfocytów dojrzałych prowadzi do ich proliferacji, natomiast w tymocytach, czyli limfocytach niedojrzałych, aktywacja tego receptora indukuje apoptozę. Glukokortykoidy natomiast zabijają tymocyty i komórki białaczkowe pozostając bez wpływu na dojrzałe limfocyty (SCHWARTZ i OSBORNE 1993).

Lista czynników indukujących apoptozę jest bardzo długa i rozszerza się niemal z każdym dniem. Apoptozę może wywołać niedobór czynników wzrostowych, niedobór hormonów, szok cieplny i zimny, stres oksydacyjny oraz inne czynniki uszkodzające DNA, takie jak promieniowanie jonizujące i leki przeciwnowotworowe. Do czynników indukujących apoptozę zaliczamy także antymetabolity, wspomniany wyżej czynnik nekrozy nowotworu, glukokortykoidy i jonofory wapniowe. Do apoptozy komórek prowadzić może również aktywacja takich receptorów, jak TCR oraz tak zwany Apo-1/Fas (SEN 1992). Apo-1/Fas jest transmembranowym białkiem i należy do rodziny receptorów, w skład której wchodzi między innymi receptory czynników nekrozy nowotworów. Wykazano, że pobudzenie Apo-1/Fas przeciwciałami monoklonalnymi wywołuje apoptozę w limfocytach (CORY 1994).

Proces apoptozy pozostaje pod ścisłą kontrolą genetyczną (OREN 1992). O tym, czy komórka uruchomi program śmierci, często decydują nie tylko czynniki zewnętrzne, ale również jej zdolność do ekspresji genów zarówno aktywujących, jak i hamujących apoptozę (WILLIAMS i SMITH 1993). Znamy już kilkanaście genów i ich produktów białkowych, które biorą udział w regulacji śmierci komórek (SIKORA 1994).

W komórkach ssaków występuje gen *bcl-2*, którego produkt białkowy hamuje apoptozę wywoływaną różnymi czynnikami. Gen ten wykazuje strukturalną i funkcjonalną homologię z genem *ced-9* występującym w komórkach nicienia *Caenorhabditis elegans* (REED 1994). Gen *bcl-2* jest protoonkogenem, którego wzrost ekspresji zaobserwowano po raz pierwszy w komórkach ziarnicy złośliwej, nowotworu limfocytów B. Rola *bcl-2* jest związana jednakże z utrzymaniem przeżywalności komórek a nie stymulowaniem ich do proliferacji, jak to ma miejsce w przypadku innych protoonkogenów. Wykazano, że wprowadzenie protoonkogenu *bcl-2* do takich komórek, jak fibroblasty, limfocyty T, czy też komórki nerwowe, zapobiegało ich śmierci indukowanej różnymi czynnikami (REED 1994). Białko Bcl-2 współdziała w regulacji apoptozy z innym białkiem, tak zwanym Bax. Obydwa białka wykazują duże podobieństwo w sekwencji aminokwasów i tworzą ze sobą kompleksy. Mogą to być zarówno homo- jak i heterodimery. Przewaga w komórce homodimerów Bax-Bax przechyla szalę w stronę śmierci, natomiast nadmiar dimerów Bcl-2-Bcl-2 decyduje o jej przeżyciu (BARINAGA 1994). Wydaje się, że za podobny mechanizm regulacji apoptozy odpowiada białko zwane Bcl-x, które występuje w dwóch różnych formach charakteryzujących się przeciwstawnym działaniem (BOISE i współaut. 1993). W komórkach *C. elegans*, umierających w czasie morfogenezy, wykazano wysoką aktywność genów *ced-3* i *ced-4*. Gen *ced-3* ma swój strukturalny i funkcjonalny odpowiednik występujący w genomie ssaków. Jest to gen, którego białkowy

produkt wykazuje aktywność tak zwanej interleukiny 1- β converting enzyme (ICE), czyli proteazy katalizującej reakcję konwersji prekursora interleukiny do jej aktywnej formy. Wykazano, że nadekspresja ICE indukuje apoptozę w szczurzych fibroblastach, którą można zahamować zarówno wprowadzeniem do komórek genu *bcl-2*, jak również genu wirusa ospy bydłowej, którego produkt białkowy jest inhibitorem ICE (GAGLIARDINI i współaut. 1994). Niestety, nie wiemy jeszcze na czym miałyby polegać mechanizm regulacji apoptozy przez te właśnie geny i ich produkty białkowe. Interleukina 1- β , jako taka, nie indukuje bowiem apoptozy, lecz bierze udział w procesach związanych ze stanem zapalnym (SCHWARTZ i OSBORNE 1994).

ONKOGENEZA A APOPTOZA

Podział komórki na dwie potomne, czyli tak zwany cykl komórkowy dzieli się zwyczajowo na cztery fazy (spoczynkową G1, syntezy DNA S, spoczynkową G2, mitozy M). Fazę bezpodziałową komórek określa się mianem G0. Komórki prawidłowe w odróżnieniu od nowotworowych mogą być zatrzymane w fazie G1, bądź G0. Komórki nowotworowe dzielą się nieustannie. Prawidłowy podział komórek zależy od aktywności protoonkogenów, genów supresorów nowotworu, a także aktywatorów i inhibitorów kinaz białkowych (serynowo-treoninowych) tak zwanych kinaz typu Cdk (cyclin dependent kinase). Aktywatorami kinaz typu Cdk są tak zwane cykliny, białka, które w różnych fazach podziału komórek włączają, bądź wyłączają odpowiednie kinazy regulujące procesy charakterystyczne dla tych faz (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1992). Bardzo niedawno wykryto i opisano kilka białkowych inhibitorów tych enzymów (PINES 1994, GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1995).

Transformacja nowotworowa jest procesem wieloetapowym. Aby doszło do przekształcenia komórki prawidłowej w nowotworową niezbędna jest stopniowa aktywacja wielu onkogenów (których prekursorami są protoonkogeny), a także zahamowanie aktywności genów supresorów nowotworu (FEARON i VOGELSTEIN 1990). Do niedawna badania regulacji cyklu komórkowego poprzez cykliny szły zupełnie niezależnym torem od badań związanych z udziałem w tym procesie białkowych produktów protoonkogenów i genów supresorów nowotworu. Obecnie coraz wyraźniej w regulacji cyklu komórkowego zarysowuje się związek pomiędzy tymi trzema kategoriami białek (MARX 1994a). Co więcej, coraz bardziej oczywista staje się nie tylko korelacja pomiędzy tymi białkami a transformacją nowotworową ale również, paradoksalnie, śmiercią komórki.

Otóż, bardzo niedawno okazało się, że jedna z cyklin, tak zwana D1, jest typowym protoonkogenem. Przypuszcza się, że być może wszystkie osiem cyklin, jakie dzisiaj znamy, są również protoonkogenami, to znaczy że ich mutacje, bądź wzmożona ekspresja, przyczyniają się do transformacji nowotworowej (MARX 1994a). Ponadto, jeden z niedawno odkrytych inhibitorów kinaz typu Cdk, tak zwane białko p16, okazało się być produktem typowego genu supresora nowotworu (MARX 1994b).

UDZIAŁ PROTOONKOGENÓW I ONKOGENÓW W APOPTOZIE

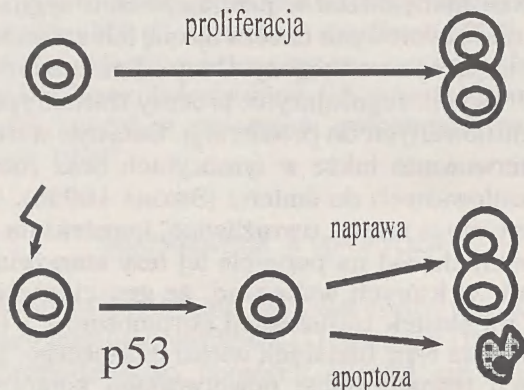
Z każdym niemal dniem coraz wyraźniej zarysowuje się intrygujący związek pomiędzy onkogenezą a apoptozą komórek. Protoonkogeny są to geny, które w prawidłowej komórce biorą udział w przekazywaniu sygnału z zewnątrz do jądra. W komórkach nowotworowych obserwuje się ich wzmoczoną ekspresję lub też mutacje przekształcające je w onkogeny. Geny *c-jun*, *c-fos* i *c-myc* są typowymi protoonkogenami jądrowymi, regulującymi procesy transkrypcji i indukowanymi w komórkach stymulowanych do proliferacji. Ostatnio wzrost ekspresji tych protoonkogenów obserwowano także w tymocytach oraz różnych komórkach nowotworowych stymulowanych do śmierci (SIKORA 1993b). Co więcej, uważa się nawet, że onkogeny mogą wręcz „uwrażliwiać” komórki na apoptozę (SIKORA 1994). Bardzo efektowny dowód na poparcie tej tezy stanowią ostatnio opublikowane wyniki badań, w których wykazano, że gen chimeryczny, tak zwany *E2A-PBX1*, powstały na skutek translokacji chromosomu 1 i 19 limfocytów B charakteryzującej niektóre typy białaczek wieku dziecięcego, powodował w myszach transgenicznym transformację nowotworową komórek limfoidalnych. Transformacja ta była jednakże poprzedzona masowym wymieraniem macierzystych komórek, zarówno limfocytów B, jak i T (DEDERA i współaut. 1993). Podobnie, transformacja nowotworowa wirusami onkogennymi, zawierającymi DNA przebiega „poprzez apoptozę”. Do transformacji nowotworowej komórek adenowirusem niezbędne jest współdziałanie dwóch onkogenów: *E1A* i *E1B*. Przy czym, sam onkogen *E1A* wywołuje apoptozę w komórkach nerki szczura, podczas gdy jedno z dwóch białek onkogenu *E1B* (19-kDa) hamuje śmierć tych komórek, podobnie jak ludzki protoonkogen *bcl-2* (WHITE i współaut. 1992).

UDZIAŁ GENÓW SUPRESORÓW NOWOTWORU W APOPTOZIE

Geny supresory nowotworu biorą udział w regulacji podziałów komórkowych, hamując je w fazie G1 cyklu komórkowego. W komórkach nowotworowych, na skutek zahamowania aktywności genów supresorów poprzez ich mutacje lub delecje, dochodzi do utraty kontroli podziałów. Funkcje tych genów bardzo szczegółowo opisano w artykule B. GRZELAKOWSKIEJ-SZTABERT (w tym tomie *Kosmosu* 323–352). Szczególną rolę w apoptozie odgrywają przede wszystkim dwa z nich, tak zwane *p53* i *Rb*.

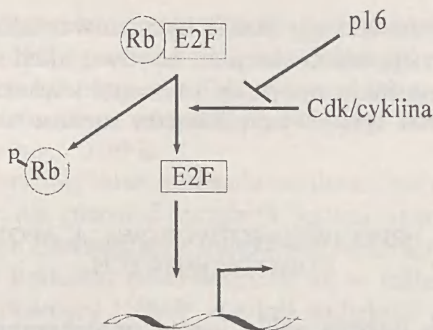
Gen *p53* w normalnych, proliferujących komórkach wykazuje niewielką aktywność. Podwyższona jego ekspresja występuje natomiast w komórkach z uszkodzonym DNA. Gen *p53* zatrzymuje komórki w fazie G1 dając im czas na naprawę DNA. Jeśli uszkodzenia nie są zbyt rozległe, to po dokonaniu napraw komórka podejmuje normalną proliferację. Jeśli jednak przekraczają one możliwości naprawcze komórki to „popęlnia ona samobójstwo” w „ucieczce” przed transformacją nowotworową, do której prowadziłyby powstałe mutacje (rys. 2). Sam gen *p53* bardzo często ulega mutacjom, które z genu supresorowego nowotworu zmieniają go w protoonkogen przyczyniający się do transformacji nowotworowej (LANE 1992, 1993). Mechanizm regulacji apoptozy z udziałem *p53* nie jest jednak uniwersalny, występuje bowiem przede wszystkim w komórkach, w których indukowano apoptozę czynnikami uszkadzającymi DNA. Na przykład,

w tymocytach myszy pozbawionych genu *p53* (tak zwany „knock out”) promieniowanie jonizujące, powodujące uszkodzenia DNA, nie indukowało apoptozy. Natomiast deksametazon, który jest syntetycznym glukokortykoidem wywoływał w tych komórkach śmierć poprzez apoptozę (LANE 1993).



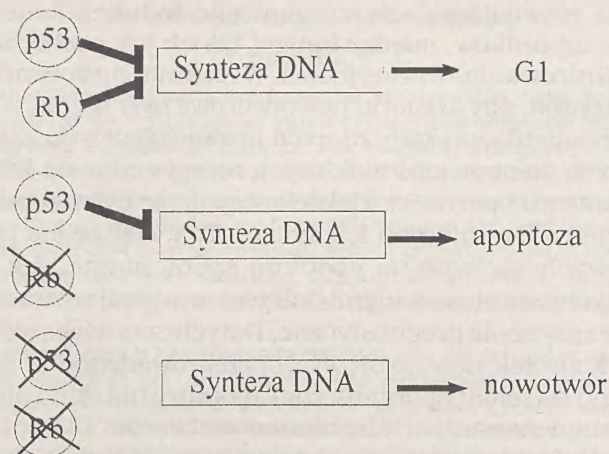
Rys. 2. Schemat obrazujący udział genu supresoru nowotworu *p53* w proliferacji i apoptozie komórek. W prawidłowych proliferujących komórkach (górna część rysunku) występuje niewielka ekspresja genu *p53*. Podwyższoną jego aktywność obserwuje się w komórkach z uszkodzonym DNA (na przykład po zadziałaniu promieniowania jonizującego — dolna część rysunku). Jeżeli uszkodzenia są niewielkie komórka po ich naprawie podejmuje proliferację. W wyniku poważniejszych uszkodzeń natomiast uruchamia program samobójstwa.

Delecje genu *Rb* wykryto po raz pierwszy u dzieci chorych na siatkówczaka. W komórkach prawidłowych aktywna nieufosforylowana forma białka *Rb* występuje w fazie G1 podziału komórkowego. Białko to tworzy kompleksy z czynnikami transkrypcyjnymi, należącymi do rodziny białek E2F uniemożliwiając im związaną z promotorami genów docelowych (LEES i współaut. 1993). Nie związany z białkiem *Rb* czynnik transkrypcyjny E2F aktywuje geny, których produkty białkowe są niezbędne do podziałów komórki (na przykład reduktaza dihydrofolianowa, kinaza tymidylanowa, polimeraza α , białka *Myc* i *Myb*). Związanie białka E2F przez białko *Rb* powoduje zahamowanie aktywności tego czynnika transkrypcyjnego i zatrzymanie komórki w fazie G1. Za fosforylację białka *Rb*, a tym samym uwolnienie z kompleksu czynnika transkrypcyjnego E2F jest odpowiedzialna kinaza *Cdk4*. Specyficznym inhibitorem tej kinazy jest białko *p16*, którego inaktywacja może doprowadzić do niekontrolowanych podziałów komórkowych (rys. 3). Ten skomplikowany mechanizm regulacji podziałów komórek odgrywa istotną rolę w transformacji nowotworowej, jak też w starzeniu się komórek *in vitro*, charakteryzującym się utratą ich zdolności do podziałów. A jaką rolę odgrywa *Rb* w apoptozie komórek? Otóż okazało się, że myszy pozbawione obydwu alleli genu *Rb* charakteryzują się przedwczesną umieralnością spowodowaną prawdopodobnie apoptozą komórek nerwowych i krwiotwórczych (HARLOW 1992). Ponadto ten sam czynnik transkrypcyjny E2F, który aktywuje ekspresje genów, niezbędnych do przejścia komórek z fazy G1 do S, może indukować apoptozę. Uważa się, że apoptoza wywołana inaktywacją *Rb*



Rys. 3. Schemat przedstawiający mechanizm działania genu supresoru nowotworu, *Rb*. W fazie G1 cyklu komórkowego białko *Rb* występuje w kompleksie z białkiem E2F, które w tej postaci nie jest aktywne jako czynnik transkrypcyjny, działający w miejscu regulatorowym genów niezbędnych w podziałach komórkowych. Po fosforylacji białka *Rb*, katalizowanej przez kinazę typu Cdk, następuje uwolnienie z kompleksu czynnika transkrypcyjnego E2F. Inhibitor kinazy, białko p16, hamuje fosforylację białka *Rb* i zatrzymuje komórki w fazie G1. Inaktywacja tego inhibitora może doprowadzić do uwolnienia E2F i niekontrolowanych podziałów komórkowych.

zachodzi prawdopodobnie z udziałem p53 (WHITE 1994). Mianowicie, jeśli w komórce nie ma aktywnego białka *Rb*, a jest aktywne białko p53, to wtedy to ostatnie indukuje apoptozę. Natomiast aktywne białko *Rb* hamuje apoptozę. Bardzo wiele nowotworów charakteryzuje się brakiem obydwu aktywnych genów, a tym samym ich produktów białkowych, co może objawiać się zahamowaniem apoptozy i niekontrolowaną proliferacją komórek. W zrozumieniu tego skomplikowanego mechanizmu pomoże czytelnikowi rysunek 4. Należy jednak



Rys. 4. Schemat przedstawiający mechanizm współdziałania genów *p53* i *Rb* w indukcji apoptozy i transformacji nowotworowej. W prawidłowej komórce geny supresory nowotworu, *p53* i *Rb*, hamują syntezę DNA zatrzymując komórkę w fazie G1 (górna część rysunku). Inaktywacja genu *Rb* może w niektórych typach komórek prowadzić do ujawnienia „apoptotycznej roli” genu *p53* (środkowa część rysunku). Inaktywacja obydwu genów prowadzi do zahamowania apoptozy i niekontrolowanych podziałów komórki (dolna część rysunku).

pamiętać, że mechanizm ten nie musi być uniwersalny, gdyż nie wszystkie nowotwory charakteryzują się mutacjami obydwu alleli zarówno genu *p53*, jak i genu *Rb*. Ponadto, regulacja apoptozy nie musi zachodzić poprzez białko *p53*. Na szczęście też w wielu typach nowotworów można indukować apoptozę, co omówiono poniżej.

CHEMIOTERAPIA PRZECIWNOWOTWOROWA A APOPTOZA KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

Apoptozę wywołuje bardzo wiele leków przeciwnowotworowych o bardzo różnorodnej chemicznej strukturze i różnych mechanizmach działania (HICKMAN 1992, SEN i DINCALCI 1992). Na długą listę chemioterapeutyków indukujących apoptozę możemy wpisać: a) czynniki indukujące uszkodzenia DNA powodujące powstawanie wiązań zarówno wewnątrz- jak i zewnątrznicziowych, a także krzyżowych wiązań białko-DNA; b) inhibitory topoizomerazy I i II; c) inhibitory syntezy DNA; d) czynniki uszkadzające aparat mitotyczny; e) antymetabolity; f) hormony lub ich niedobór. Ponadto, apoptozę w komórkach nowotworowych może indukować szok cieplny oraz promieniowanie jonizujące.

W tej chwili bardzo trudno jest odpowiedzieć na pytanie, w jaki sposób sygnał wywołany tak różnorodnymi czynnikami prowadzi do tego samego efektu, a mianowicie podobnej pod względem morfologicznym i biochemicznym śmierci komórki. Z pewnością jednak w którymś momencie musi nastąpić interakcja dróg przekazywania tych tak różnych początkowo sygnałów. Ponieważ do tej pory poznano już niejeden mechanizm genetycznej kontroli zarówno indukcji, jak i hamowania śmierci komórki, można spodziewać się, że również w komórkach nowotworowych, rozwijających się w organizmie, indukcja śmierci zależeć będzie od bardzo wielu czynników, między innymi takich jak pochodzenie nowotworu, stopień jego zróżnicowania i inwazyjności. W leczeniu nowotworów bardzo ważny jest taki dobór terapii, aby komórki nowotworowe były na nią podatne, to znaczy zdolne do uruchomienia kaskady zdarzeń prowadzących do ich aktywnej śmierci. Niewykluczone, że oporność niektórych nowotworów na leki, poza indukcją znanego mechanizmu oporności wielolekowej, może być związana z występowaniem mechanizmów hamujących ich śmierć. Tak więc ocena podatności komórek nowotworowych zarówno na apoptozę spontaniczną, jak też indukowaną czynnikami dotychczas stosowanymi (lub testowanymi) w leczeniu nowotworów, może mieć duże znaczenie prognostyczne. Dotychczas większość badań dotyczących apoptozy komórek nowotworowych przeprowadzono *in vitro*. Stosunkowo niewiele wiadomo na temat spontanicznej apoptozy ludzkich nowotworów *in vivo* i jej związku z prognozowaniem w leczeniu nowotworów. Ciągłe też mało wiadomo na temat kinetyki śmierci komórek nowotworowych podczas terapii przeciwnowotworowej i związku fazy podziałowej komórek z podatnością ich na apoptozę. Ostatnio opracowano kilka metod z zastosowaniem cytofluorymetrii przepływowej, które pozwalają na wykrycie pojedynczych komórek apoptotycznych (DARZYŃKIEWICZ i współaut. 1992). Dzięki tym metodom możliwe jest wykrywanie umierających komórek w materiale klinicznym. Stosując niektóre z nich, prze-testowano komórki białaczkowe u ponad 100 pacjentów przed i w trakcie

chemioterapii przeciwnowotworowej. Wyniki tych badań wskazują na występowanie populacji komórek spontanicznie umierających (od 0,1% do 16% całej populacji) oraz indukcji apoptozy (średnio w ponad 80% przebadanych komórek) przez inhibitory topoizomeraz, antymetabolity, jak też czynniki uszkodzające mikrotubule (Li i współaut. 1994).

Cytofluorymetria przepływowa pozwala na ilościowe oznaczenie komórek nie tylko apoptotycznych, ale również komórek będących w poszczególnych fazach podziału komórkowego. Powszechnie uważa się, że terapia przeciwnowotworowa jest skuteczna, kiedy komórki nowotworowe są w fazie syntezy DNA i mitozy. GORCZYCA i współpracownicy (1993) zbadali indukcję apoptozy w komórkach białaczkowych HL-60 *in vitro* wieloma różnymi czynnikami stosowanymi w chemioterapii przeciwnowotworowej. Wyniki ich badań wskazują na występowanie różnic w indukcji apoptozy przez różne czynniki w zależności od fazy cyklu komórkowego. I tak, takie leki jak CAM (inhibitor topoizomerazy I), TN i AMSA (inhibitory topoizomerazy II) najbardziej efektywnie indukują apoptozę w komórkach będących w fazie syntezy DNA (S). Inne czynniki, takie jak FTS (inhibitor topoizomerazy II), AZT (azacytydyna — analog purynowy), gaz musztardowy i hipertermia preferencyjnie zabijają komórki nie dzielące się. Różnice w podatności na apoptozę komórek w zależności od fazy cyklu komórkowego stanowią prawdopodobnie odbicie stopnia uszkodzenia z jednej strony oraz zdolności naprawczych komórek z drugiej. Wiedza na temat skuteczności indukcji śmierci komórkowej przez różne czynniki w zależności od fazy podziałowej komórek powinna przyczynić się do znacznie bardziej racjonalnego stosowania terapii kombinowanej w leczeniu nowotworów.

APOPTOSIS AND ONCOGENESIS

Summary

It is believed that neoplastic cells are immortal because they have acquired an unlimited capability to proliferate. In the light of recent studies concerning apoptosis we should ask whether this is caused only by their increased proliferation rate, or also by a decrease in the rate of cell death. Apoptosis is a defense mechanism against mutations as well as a means for controlled deletion of cells from dense tissue structures during development and subsequent homeostasis. Morphological and physiological features of apoptosis have been well documented, and the early signals capable of inducing apoptosis have also been well defined. Several genes involved in controlling the process (activation and inhibition) have been identified, although we are still far from understanding the molecular mechanisms whereby apoptotic signals are transduced, or integrated to set in motion the cell death machinery.

Over the past several years it has gradually emerged that the control of apoptosis is intimately connected with the control of cell proliferation. The mechanisms controlling proliferation are becoming increasingly well understood and appear to involve cyclins, oncogenes and tumor suppressor genes. It seems that the link between tumor suppressors such as *p53* and *Rb* and activators (cyclins) as well as inhibitors of cycline-dependent kinases is now firmly established.

It is evident that apoptosis can be induced by a variety of antineoplastic drugs with diverse chemical structure and different mechanism of action. Nevertheless, the data concerning the kinetics of the process *in vivo*, which probably depends on the cancer type and the drug used, is scant. In future, better characterization of this process should lead to improvement of the rationale of cancer treatment.

LITERATURA

- AMEISEN J. C., 1992. *Programmed cell death and AIDS: from hypothesis to experiment*. Immunol. Today 13, 388-391.
- BARINAGA M., 1994. *Cell suicide: by ICE, not fire*. Science. 263, 754-756.
- BARR P. J., TOMEI L. D., 1994. *Apoptosis and its role in human disease*. Bio/Technology, 12, 487-493.
- BOISE L. H., GONZALEZ-GARCIA M., POSTEMA CH. E., DING E., LINDSTEN T., TURKA L. A., MAO X., NUNEZ G., THOMPSON C. B. 1993. *bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death*. Cell 74, 597-608.
- COHEN J.J. 1993. *Apoptosis*. Immunol.Today, 14, 126-130.
- CORY S. 1994. *Fascinating death factor*. Nature, 367, 317-318.
- DARZYNKIEWICZ Z., BRUNO S., DEL BINO G., GORCZYCA W., HOTZ M. A., LASSOTA P., TRAGANOS S., 1992. *Features of apoptotic cells measured by flow cytometry*. Cytometry, 13, 795-808.
- DEDERA D. A., WALTER E. K., LEBRUN D. P., SEN-MAJUMDAR A., STEVENS M. E., BARSH G. S., CLEARY M. L., 1993. *Chimeric homeobox gene E2A-PBX1 induces proliferation, apoptosis, and malignant lymphomas in transgenic mice*. Cell 74, 833-843.
- EVANS V. G., 1993. *Multiple pathways to apoptosis*. Cell Biol. Int. 17, 461-476.
- FEARON E. R., VOGELSTEIN B., 1990. *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell 61, 759-767.
- FRANCESCHI C., MONTI D., ROSARIO M., ZENI P., TEMPERANI P., EMILIA G., SANSONI P., LIOLI M. B., TROIANO L., AGNESI C., SALVIOLI S., COSSARIZZA A., 1992. *Genomic instability and aging: studies on centenarians (successful aging) and in patients with Down's syndrome (accelerated aging)*. Ann. New. York Acad. Sci. 663, 4-16.
- GAGLIARDINI V., FERNANDEZ P. A., LEE R. K. K., DREXLER C. C. A., ROTELLO R. J., FISHMAN M. C., YUAN J., 1994. *Prevention of vertebrate neuronal death by the crmA gene*. Science 263, 826-828.
- GORCZYCA W., GONG J., ARDELT B., TRAGANOS F., DARZYNKIEWICZ Z., 1993. *The cell cycle related differences in susceptibility of HL-60 cells to apoptosis induced by various antitumor agents*. Cancer Res. 53, 3186-3192.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 1992. *Regulacja cyklu komórkowego-historii i komplikacji ciąg dalszy*. Post. Biochem. 38, 3, 98-107.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 1995. *Regulacja cyklu komórkowego udział białkowych inhibitorów kinaz cyklicznych*. Post. Biochem. 41, 80-93.
- HARLOW E., 1992. *For our eyes only*. Nature 359, 270-271.
- HICKMAN J. A., 1992. *Apoptosis induced by anticancer drugs*. Cancer Metast. Rev. 11, 121-139.
- KONDO E., YOSHINO T., NOMURA S., NAKAMURA S., TAKAHASHI K., TERAMOTO N., HAYASHI K., AKAGI T., 1994. *bcl-2 Regulation in normal resting lymphocytes and lymphoblasts*. Jpn. J. Cancer Res. 85, 260-265.
- LANE D. P., 1992. *p53, guardian of the genom*. Nature 358, 15-16.
- LANE D. P., 1993. *A death in the life of p53*. Nature 362, 786-787.
- LEES J. A., SAITO M., VIDAL M., VALENTINE M., LOOK T., HARLOW E., DYSON N., HELIN K., 1993. *The retinoblastoma protein binds to a family of E2F transcription factors*. Mol. Cell. Biol. 13, 7813-7825.
- LI X., GONG J., FELDMAN E., SEITER K., TRAGANOS F., DARZYNKIEWICZ Z., 1994. *Apoptotic cell death during treatment of leukemias*. Leukemia and Lymphoma 13, 65-70.
- MANTEUFFEL-CYMBOROWSKA M., 1993. *Nowy aspekt metabolizmu poliamin-posttranslacyjny, zależne od transglutaminaz, modyfikacje białek przez poliaminy*. Post. Biochem. 39, 118-126.
- MARTIN S. J., 1993. *Apoptosis: suicide, execution or murder?* Trends Cell Biol. 3, 141-144.
- MARX J., 1994a. *How cells cycle toward cancer*. Science, 263, 319-321.
- MARX J., 1994b. *New tumor suppressor may rival p53*. Science, 264, 344-345.
- NICOTERA P., BELLOMO G., ORRENIUS S. 1992. *Calcium-mediated mechanism in chemically induced cell death*. Annu. Rev Pharmacol. Toxicol. 32, 449-470.
- OREN M., 1992. *The involvement of oncogenes and tumour suppressor genes in the control of apoptosis*. Cancer Metast. Rev. 11, 141-148.
- PEITSCH M. C., MANNHERZ H. G., TSCHOPP J., 1994. *The apoptosis endonucleases: cleaning up after cell death?* Trends Cell Biol. 4, 37-41.
- PINES J., 1994. *p21 inhibits cyclin shock*. Nature, 369, 520-521.
- RAFF M. C., 1992. *Social controls on cell survival and cell death*. Nature 356, 397-399.

- RAFF M. C., BARRES B. A., BURNE J. F., COLES H. C., ISHIZAKI Y., JACOBSON M. D., 1993. *Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system*. Science 262, 695-700.
- REED J. C., 1994. *Bcl-2 and the regulation of programmed cell death*. J. Cell Biol. 124, 1-6.
- SCHWARTZ L. M., OSBORNE B. A., 1993. *Programmed cell death, apoptosis and killer genes*. Immunol. Today 14, 582-590.
- SCHWARTZ L. M., OSBORNE B. A., 1994. *Ced-3/ICE: Evolutionarily conserved regulation of cell death*. BioEssays 16, 387-389.
- SEN S., 1992. *Programmed cell death: concept, mechanism and control*. Biol. Rev. 67, 287-319.
- SEN S., D'INCALCI M., 1992. *Biochemical events and relevance to cancer chemotherapy*. FEBS Lett. 307, 122-127.
- SIKORA E., 1993a. *Nieśmiertelność, starzenie i śmierć komórek*. Post. Biochem. 39, 212-220.
- SIKORA E., 1993b. *Transcription factors in cellular senescence and death*. Acta Biochim. Polon. 40, 389-394.
- SIKORA E., 1994. *Mechanizmy śmierci programowanej komórek (apoptozy)*. Post. Biochem. 40, 150-160.
- WHITE E., SABBATINI P., DEBBAS M., WOLD W. S. M., KUSHER D. I., GOODING L., 1992. *The 19-kilodalton adenovirus E1B transforming protein inhibits programmed cell death and prevents cytolysis by tumor necrosis factor*. Mol. Cell. Biol. 12, 2570-2580.
- WHITE E., 1994. *p53, guardian of Rb*. Nature, 371, 21-22.
- WILLIAMS G. T., SMITH C. A., 1993. *Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death*. Cell 74, 777-779.
- WILLIAMS G. T., SMITH C. A., MCCARTHY N. J., GRIMES E. A., 1992. *Apoptosis: final control point in cell biology*. Trends Cell Biol. 2, 263-267.
- WYLLIE A. H., 1992. *Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview*. Cancer Metast. Rev. 11, 95-103.
- WYLLIE A. H., KERR J. F. R., CURRIE A. R., 1980. *Cell death: the significance of apoptosis*. Int. Rev. Cytol. 68, 251-307.

MAŁGORZATA BALIŃSKA, DOROTA JACEWICZ,
KATARZYNA KACZOROWSKA

Zakład Biochemii Komórki

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN

Pasteura 3, 02-093 Warszawa

*Praca dedykowana Pani Profesor Zofii Zielińskiej
w 80-tą rocznicę urodzin*

BIOCHEMICZNE PODSTAWY CHEMIOTERAPII NOWOTWORÓW*

Obecny stan wiedzy pozwala na zwalczanie chorób nowotworowych w oparciu o trzy główne metody lecznicze — operacyjną, radioterapię i chemioterapię. Dwie pierwsze metody mają w pewien sposób ograniczony zasięg stosowania i nie mogą być stosowane w zwalczaniu niektórych nowotworów, jak na przykład białaczek. Chemioterapia może być stosowana w leczeniu większości nowotworów jako metoda samodzielna lub w połączeniu z innymi, szczególnie w połączeniu z metodami chirurgicznymi (HILL 1978).

Nowe, rozwijane w kilku ostatnich latach metody, takie jak molekularna immunoterapia (DIETRICH i współaut. 1993) czy terapia genowa (ENG i PONDER 1993, McCABE 1993, ZAGOŹDŻON i GOŁĄB 1994) budzą ogromne zainteresowanie, jednak dotychczas ich zastosowanie ogranicza się do sporadycznych klinicznych doświadczeń. Żywiłowo rozwijająca się genetyka molekularna stara się zbadać i zrozumieć kaskadę zjawisk prowadzących do takich zmian regulacji procesów podziałowych komórki, w których prawidłowa komórka staje się komórką nowotworową, dzielącą się w sposób szybki i niepohamowany (SAGER 1989, HOLLINGSWORTH i LEE 1991). Dzisiejszy stan wiedzy w tej dziedzinie pozwala ustalić ryzyko zapadania na choroby nowotworowe i możliwość zapobiegania tym chorobom (MARX 1989, STEFFEN 1993), ale lepsze zrozumienie procesów prowadzących do powstania nowotworu zapewne pozwoli na znalezienie w ciągu kilku następnych lat nowych, bardziej skutecznych od dotychczas stosowanych metod terapeutycznych. Do tego czasu chemioterapia będzie metodą powszechnie stosowaną w leczeniu nowotworów, a współcześni badacze, lepiej rozumiejąc mechanizmy działania cytostatyków, będą syntetyzować skuteczniejsze leki.

*Praca finansowana przez Komitet Badań Naukowych. Numer projektu badawczego 6P20301807.

Podstawowym problemem w rozwoju współczesnej chemioterapii nowotworów jest niemożność znalezienia istotnej, wyraźnej różnicy w procesach biochemicznych pomiędzy komórką prawidłową, a powstającą z niej komórką nowotworową (HARTWELL i KASTAN 1994). Poszukuje się więc leków, które hamowałyby podstawowe procesy komórkowe, takie jak synteza DNA i białek, a także wpływały na regulację tych procesów. Proces poszukiwania, a w zasadzie projektowania (drug design) nowych tego typu leków, jest wysiłkiem zespołowym badaczy z kilku dziedzin: chemii medycznej, farmakologii biochemicznej, chemioterapii eksperymentalnej i klinicznej (MONTGOMERY 1983, PREJEAN i MONTGOMERY 1984).

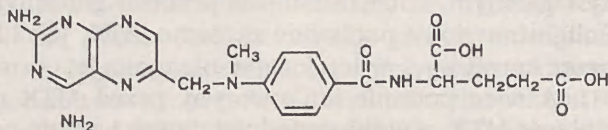
Stosowane w klinice leki przeciwnowotworowe wpływają w różny sposób na podziały komórkowe. Wszystkie leki cytostatyczne oddziałują na różne stadia procesu podziałowego komórki, i to zarówno komórki prawidłowej, jak i nowotworowej. Brak wybiórczego działania cytostatyków stanowi największy problem współczesnej chemioterapii. Rodzi się więc podstawowe pytanie, w jaki sposób zaplanować chemioterapię, aby cytostatyki działały głównie na komórki nowotworowe, a nie komórki prawidłowe (BERTINO 1979). Stąd też we współczesnej chemioterapii stosuje się różnego rodzaju modulacje biochemicznego działania cytostatyków, prowadzące do zwiększenia ich cytotoksycznego efektu w stosunku do komórek nowotworowych i ochronę komórek prawidłowych. Jest to jedno z głównych zadań eksperymentalnej chemioterapii, ponieważ tego typu modulacje danego cytostatyku zależą nie tylko od rodzaju nowotworu, ale jak się wydaje, także od indywidualnego stanu metabolizmu pacjenta. Przedstawienie tego zagadnienia będzie jednym z głównych zadań naszego artykułu. Przy projektowaniu i stosowaniu różnego rodzaju cytostatyków należy pamiętać, że mogą one powodować oporność wielolekową (HARRAP i JACKSON 1978, BECK 1987, RONINSON 1991, GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1995) i efekty uboczne, na przykład efekty wolnorodnikowe i karcynogenne (MALEC 1989). Trzeba również mieć na uwadze sposoby usuwania nadmiaru cytostatyku (REILLY i WORKMAN 1994) i pory jego podawania (chronofarmakologia) (BELANGER 1993).

Racjonalność w projektowaniu leków związanych z hamowaniem podziałów komórki najprościej można osiągnąć wykorzystując odpowiednie inhibitory enzymów biorących udział w tym procesie. W chwili obecnej jest znanych około 90 reakcji enzymatycznych zaangażowanych w syntezę *de novo* nukleotydów purynowych i pirymidynowych, ich interkonwersję i polimeryzację do kwasów nukleinowych, a także w reakcje tak zwanej drogi ratunkowej (salvage pathway). Z tej grupy enzymów tylko około 16 może być hamowanych przez metaboliczne analogi ich substratów albo produkty reakcji, uznane za związki o działaniu przeciwnowotworowym (anticancer activity) (MONTGOMERY 1983). Z wyjątkiem wczesnych etapów biosyntezy urydylanu, reakcje enzymatyczne prowadzące do powstania RNA lub DNA przebiegają przez kolejne etapy fosforylacji nukleozydów (HEIDELBERGER i wpółaut. 1983, SHUGAR 1991). Reszta fosforanowa tych związków odgrywa bardzo ważną rolę w ich wiązaniu do miejsc aktywnych enzymów i zmiana strukturalna w tej części cząsteczki powoduje często zahamowanie reakcji syntezy rybo- i dezoksyrybonukleotydów. Stąd też odpowiednie mono-, di- i trifosforany nukleozydów są najbardziej znanymi inhibitorami biosyntezy RNA i DNA. Jednakże związki te w warunkach *in vivo*, w obecności różnych

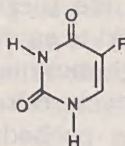
fosfataz, są nietrwałe (ulegają defosforylacji) (WEBER i współaut. 1994), a ponadto nie przechodzą przez błonę komórkową (MONTGOMERY 1983). Z tego też powodu antymetabolity purynowe i pirymidynowe muszą być podawane jako wolne zasady lub też nukleozydy i w większości przypadków są wewnątrzkomórkowo przekształcane do nukleotydów (SHUGAR 1992). Stąd też niezwykle jest istotna modyfikacja w strukturze chemicznej antymetabolitów, która powoduje zmiany w wewnątrzkomórkowym metabolizmie leku. Takie podejście do chemioterapii jest możliwe wyłącznie wtedy, gdy są znane podstawowe prawidłowości metabolizmu nukleotydów i mechanizm działania ich antymetabolitów. Do antymetabolitów, o których wiadomo, że hamują biosyntezę kwasów nukleinowych na wczesnych etapach jej przebiegu należą: 5-fluorouracyl (5FU), ametopteryna (MTX, metotreksat), 6-merkaptopuryna (6MP) i 1-β-D-arabinofuranozylocytozyna (araC).

ANTYFOLIANY

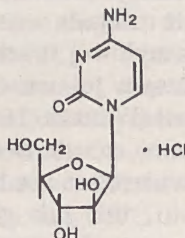
MTX (4-amino-10-*N*-metylofolian), najbardziej znany metaboliczny analog folianu (ryc. 1), lek, którego wielokierunkowy mechanizm działania został dokładnie poznany w zasadzie w ostatnich latach, jest stosowany w klinice od prawie 45 lat, szczególnie przy leczeniu wielu typów białaczek i niektórych innych nowotworów (JOLIVET i współaut. 1983). Jest to inhibitor reduktazy dihydrofolianowej (E.C.1.5.1.3) (MATHERLY i współaut. 1983), a jego metabolity powstające wewnątrzkomórkowo (γ-glutamylowe pochodne MTX) (BALIŃSKA i współaut. 1981), są inhibitorami syntazy tymidylanowej (E.C.2.1.1.45) (synteza tymidylanu) (ALLEGRA, CHABNER i współaut. 1985) i transformylaz rybonukleotydów glicynamidu i aminoimidazolokarboksyamidu (E.C. 2.1.1.21 i E.C. 2.1.1.22) (synteza puryn) (ALLEGRA, DRAKE i współaut. 1985) (ryc. 2). To wielokierunkowe działanie MTX powoduje, że jest to niezwykle silnie działający cytostatyk, hamujący podziały nie tylko szybko dzielących się komórek nowotworowych, ale również dzielących się komórek prawidłowych. Dlatego też od



METHOTREKSAT

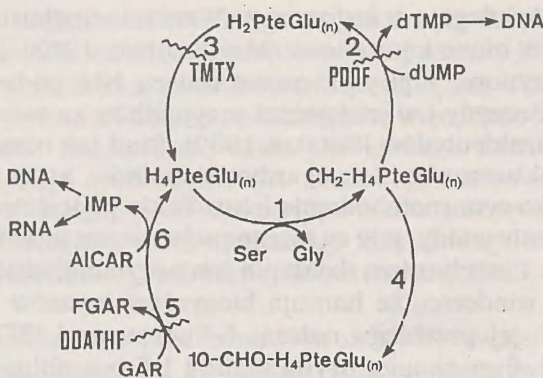


5-FLUOROURACYL



ARABINOZID CYTOZYNY

Ryc. 1. Wzory strukturalne wybranych antymetabolitów.



Ryc. 2. Hamowanie przez antyfoliany aktywności cyklu metabolicznego prowadzącego do syntezy puryn i pirymidyn.

Enzymy: 1. hydrosymetylotransferaza serynowa; 2. syntaza tymidylanowa; 3. reduktaza dihydrofolianowa; 4. wielofunkcyjny enzym o właściwościach dehydrogenazy 5,10-metylenotetrahydrofolianu, cyklohydrolazy 5,10-metylenotetrahydrofolianu, syntetazy 10-formyloitetrahydrofolianu; 5. formylotransferaza rybonukleotydu glicynamidu; 6. formylotransferaza rybonukleotydu aminoimidazolokarboksyamidu. Substraty i produkty reakcji: $H_2PteGlu_n$, dihydrofolian; $H_4PteGlu_n$, tetrahydrofolian; $CH_2H_4PteGlu_n$, 5,10-metylenotetrahydrofolian; $10-CHO-H_4PteGlu_n$, 10-formyloitetrahydrofolian; GAR, rybonukleotyd glicynamidu; AICAR, rybonukleotyd aminoimidazolokarboksyamidu; IMP, inozynomonofosforan; dUMP, dezoksyuridyndomonofosforan; dTMP, dezoksytymidynomonofosforan. f — Oznacza pochodną formylową; glu_n — oznacza ilość reszt glutamylowych w cząsteczce folianu. Inhibitory: TMTX, trimetreksat; PDDF, 10-propargylo-5,8-di-deazafolian; DDATHF, 5,10-dideazatetrahydrofolian.

wielu lat szuka się sposobów zmniejszenia jego cytotoksycznego działania. Jednym ze sposobów stosowanych od lat w klinice jest podawanie w odpowiednim czasie po MTX — leukoworyny — 5-formyloitetrahydrofolianu, zredukowanej formy kwasu foliowego (MATHERLY i współaut. 1983, BOARMAN i współaut. 1990). Związek ten jest transportowany do komórki tą samą drogą co MTX, ulega też glutamylacji (HENDERSON i współaut. 1986), tak jak MTX, przy czym leukoworyna jest lepszym fizjologicznym substratem dla procesu glutamylacji (CICHOWICZ i SHANE 1987). Poliglutamylowe pochodne zarówno MTX, jak i leukoworyny są zatrzymywane przez komórkę i w tej formie nie mogą jej opuszczać (BALIŃSKA i współaut. 1981). A więc podanie leukoworyny przed MTX może zniwieczyć cytostatyczne działanie MTX, a w odpowiedniej dawce i czasie po podaniu może zmniejszyć jego cytotoksyczność. Drugim sposobem jest taka modyfikacja cząsteczki MTX, aby nie ulegała ona glutamylacji. Taką modyfikacją może być zablokowanie γ -glutamylowej reszty (na przykład fluoroMTX) (GALIVAN i współaut. 1985) lub zamiana jej na cząsteczkę nie ulegającą γ -glutamylacji (na przykład trimetreksat) (WERBEL 1984). Związki te są dużo słabszymi cytostatykami ze względu na to, że nie tworząc poliglutaminianów nie pozostają długo w komórce, a co najważniejsze nie hamują innych reakcji enzymatycznych o tak kluczowym znaczeniu, tak jak glutamylowe pochodne MTX. Ponadto, przy stosowaniu związków nieulegających glutamylacji, a więc hamujących tylko reduktazę dihydrofolianu, można stosować terapię kilku leków w stężeniach mniej toksycznych niż przy stosowaniu tych leków osobno (BALIŃSKA 1993). I tak

podanie trimetrexatu, hamującego reduktazę dihydrofolianową (ryc. 2), powoduje zmniejszenie wewnątrzkomórkowego stężenia metylenotetrahydrofolianu, substratu syntazy tymidylanowej (ryc. 2) (RHEE i współaut. 1990); a następnie podanie inhibitora syntazy tymidylanowej, takiego jak pochodna chinazolinowa (PDDF, 10-propargylo-5,8-dideazafolian), wymaga już tylko 6–8-krotnie niższego stężenia niż stosowane, gdy lek jest podany pojedynczo (GALIVAN i współaut. 1987). Efekt ten, nazywany synergizmem działania cytostatyków, jest ostatnio intensywnie badany. Wydaje się, że synergistyczne działanie antymetabolitów powoduje silniejsze działanie leków na szybko dzielące się komórki nowotworowe niż na dzielące się prawidłowe komórki organizmu. Lekami o synergistycznym działaniu są pochodne dideazafolianowe: inhibitor syntazy tymidylanowej — 10-propargylo-5,8-dideazafolian (PDDF) (JONES i współaut. 1981, JACKSON i współaut. 1983) oraz inhibitor transformylaz rybitydów glicynamidu i aminoimidazolokarboksyamid — 5,10-dideazatetrahydrofolian (DDATHF), które przechodzą pierwsze próby kliniczne (BEARDSLEY i współaut. 1988, BOSCHELLI i współaut. 1988). Głównym więc zadaniem współczesnej eksperymentalnej chemioterapii jest ustalenie właściwej kolejności podawania leków, aby w niższych stężeniach działając synergistycznie powodowały wielokrotnie silniejszy efekt cytostatyczny dla szybko dzielących się komórek nowotworowych niż działając osobno.

FLUOROURACYL

Innym antymetabolitem stosowanym powszechnie w chemioterapii nowotworów jest fluorouracyl (rys. 1), który musi zostać przekształcony wewnątrzkomórkowo w odpowiedni trifosforan, aby osiągnąć swój efekt działania — włączenie do nukleotydu (HEIDELBERGER i współaut. 1983). FUTP może być włączany do RNA (PINEDO i PETERS 1988) — zmieniając jego strukturę wpływa na jego właściwości, między innymi na proces splicing'u (DOONG i DOLNICK 1988). Jako FdUMP jest inhibitorem syntazy tymidylanowej (DANENBERG 1977) i w konsekwencji również inhibitorem syntezy DNA (CANMAN i współaut. 1992, CANMAN i współaut. 1993). Ponadto wydaje się, że stosowanie fluorouracylu pojedynczo jest o wiele mniej korzystne niż w przypadku stosowania kilku leków. Jak było to wspomniane w rozdziale o antyfolianach, jednym z kandydatów do współdziałania z FU jest MTX lub inny inhibitor reduktazy dihydrofolianowej. Bardzo ważną rzeczą jest odpowiednia kolejność stosowania leków. Podanie FU przed MTX powoduje działanie antagonistyczne (BOWEN i współaut. 1978, ULLMAN i współaut. 1978), a podanie najpierw MTX a potem FU wywołuje efekt synergistyczny (CADMAN i współaut. 1981, CADMAN i współaut. 1979). Podobny efekt może wywołać *cis*-platyna (*cis*-diaminodichloroplatin), która zmienia wewnątrzkomórkowy poziom zredukowanych folianów, a więc i jednego z substratów enzymu docelowego — syntazy tymidylanowej (SCANLON i współaut. 1986). Podobne synergistyczne efekty uzyskano stosując FU i cyklofosfamid (silny czynnik alkilujący), choć mechanizm współdziałania jest zupełnie inny i polega prawdopodobnie na zwiększeniu inhibicji syntezy *de novo* lub syntezy reparycyjnej DNA powodując prawdopodobnie szybszą śmierć komórki niż leki stoso-

wane pojedynczo (FERNANDES i KLUBES 1979). Ponadto wydaje się, że podobnie jak przy stosowaniu MTX, działanie FU może być modulowane przez podanie leukoworyny (KEYOMARSI i MORAN 1988, GREM i współaut. 1987, WRIGHT i współaut. 1989). Jednakże mechanizm jest tu inny, ponieważ nadmiar zredukowanych pochodnych folianowych (w tym substratu syntazy tymidylanowej), pochodzący z leukoworyny, tworzy w obecności FdUMP (pochodnej FU) stabilny kompleks trójcząsteczkowy z syntazą tymidylanową — enzym-substrat-inhibitor — powodując zwiększenie inhibicji enzymu o około 30%. Stąd też leukoworynę podaje się jednocześnie z FU, lub też natychmiast po podaniu FU.

AraC (9- β -ARABINOFURANOSYLCYTOZYNA)

AraC jest to analog pirymidyny (rys. 1), który, występując w komórce w formie aktywnej jako araCTP, powoduje inhibicję reduktazy dwufosfonukleozydów i jest włączany do DNA. Na tym, jak wydaje się, polega jego główne działanie (WHITE i współaut. 1987). Ponadto może on być w komórce dezaminowany do araU, co powoduje inaktywację jego własności cytostatycznych (CHOU i współaut., 1975). Stąd też poszukuje się odpowiednich modyfikacji cząsteczki araC, tak, aby nie ulegała ona dezaminacji. Najbardziej obiecującym jest 2'2'-dwufluorodezoksy-cytydyna (gemcibina) — związek stabilny i mający już swoje kliniczne zastosowanie (HERTEL i współaut. 1990).

6-MERKAPTOPURYNA (6MP)

6-Merkaptopuryna jest związkiem stosowanym w klinice od 1953 roku. Mechanizm jego działania polega na blokowaniu biosyntezy rybonukleotydów i włączaniu się do DNA (LENNARD 1992). Związek ten jest stosowany ostatnio z 6-tioguanidyną, która nie tylko włącza się do DNA (hamując proces replikacji), ale prawdopodobnie blokuje też syntezę tRNA (MORGAN i współaut. 1994). Związek ten stosowany wraz z MTX daje efekt synergistyczny poprzez zwielokrotniony efekt zahamowania syntezy puryn (BÖKKERINK i współaut. 1986). Stosuje się również pochodne adenozyiny, których działanie jest oparte na inhibicji reduktazy nukleotydów, polimerazy DNA lub też włączaniu do DNA (CHESON 1992). W aktywacji proleku wewnątrz komórki bierze także udział kinaza dezoksyfityliny.

Opisane powyżej antymetabolity nie mają prawdopodobnie efektów karcynogennych w przeciwieństwie do związków alkilujących. Dlatego związki te i ich biochemicznie zmodyfikowane analogi budzą szerokie zainteresowanie.

Oprócz dotychczas omówionych związków stosuje się również interferon w połączeniu z FU i MTX. Przypuszczalnie może on działać jako związek wzmacniający inhibicję syntazy tymidylanowej lub też, co jest bardziej prawdopodobne, jako inhibitor dehydrogenazy dihydropirymidynowej w jednojądrowych komórkach krwi obwodowej hamując w ten sposób uwalnianie FU z komórek (YEE i współaut. 1992). Innym związkiem jest dwupyridamol, który hamuje transport nukleozydów i ich inhibitorów, powodując w wielu przypad-

kach (MTX, FU, araC) (NELSON i DRAKE 1984, GREM i FISHER 1989, CHAN 1989) zahamowanie transportu nukleotydów potrzebnych do uruchomienia drogi ratunkowej.

Poszukuje się nowych antymetabolitów, które poprzez specjalne podawanie z różnymi związkami, w różnym reżimie terapeutycznym, mogą powodować efekty synergistyczne. Wydaje się, że to działanie będzie główną strategią chemioterapii w przyszłości. Klinicyści muszą jednak pamiętać, że dawki leków należy podawać pacjentom w sposób indywidualny w zależności od rodzaju nowotworu, poziomu określonego metabolitu w tkankach pacjenta i efektów ubocznych spowodowanych stosowaniem tych cytostatyków.

EXPERIMENTAL BASIS OF CANCER CHEMOTHERAPY

Summary

The use of anticancer drugs interacting with synthesis of RNA, DNA and protein precursors is briefly discussed. The selectivity of these drugs can be enhanced by biochemical modulations involving pharmacological manipulation of intracellular drug metabolism pathways. This rational approach to cancer chemotherapy has been made possible thanks to the knowledge of normal nucleotide metabolism and mechanisms of action of anticancer drugs, including: 5-fluorouracil, methotrexate, 6-mercaptopurine and 1 β -arabinofuranosylcytosine.

LITERATURA

- ALLEGRA C. J., CHABNER B. A., DRAKE J. C., LUTZ R., ROBBARD D., JOLIVET J., 1985. *Enhanced inhibition of thymidylate synthase by methotrexate polyglutamates*. J. Biol. Chem. 260, 9720-9726.
- ALLEGRA C. J., DRAKE J. C., JOLIVET J., CHABNER B. A., 1985. *Inhibition of phosphoribosyl-aminoimidazole-carboxamide transformylase by methotrexate and dihydrofolic acid polyglutamates*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 4881-4885.
- BALIŃSKA M., 1993. *Synergistic cell growth inhibition by combination of antifolates*. Acta Biochim. Polon. 40, 369-373.
- BALIŃSKA M., GALIVAN J., COWARD J. K., 1981. *Efflux of methotrexate and its polyglutamates from hepatic cells in vitro*. Cancer Res. 41, 2751-2756.
- BEARDSLEY G. P., MOROSON B. A., TAYLOR E. C., MORAN R. G., 1988. *A new folate antimetabolite 5,10-dideaza-5,6,7,8-tetrahydrofolate is a potent inhibitor of de novo purine biosynthesis*. J. Biol. Chem. 264, 328-333.
- BECK W. T., 1987. *The Biology of multiple drug resistance*. Biochem. Pharmacol. 36, 2879-2887.
- BELANGER P. M., 1993. *Chronopharmacology in drug research and therapy*. Adv. Drug Res. 24, 1-80.
- BERTINO J. R., 1979. *Toward improved selectivity in cancer chemotherapy: The Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture*. Cancer Res. 39, 293-304.
- BOARMAN D. M., BARAM J., ALLEGRA C. J., 1990. *Mechanism of leucovorin reversal of methotrexate cytotoxicity in human MCF-7 breast cancer cells*. Biochem. Pharmacol. 40, 2651-2660.
- BÖKKERINK J. P. M., BAKKER M. A. H., HULSCHER T. W., INNI, 1986. *Sequence-, time and dose-dependent synergism of methotrexate and 6-mercaptopurine in malignant human T-lymphoblasts*. Biochem. Pharmacol. 35, 3549-3555.
- BOSCHELLI D. H., WEBBER S., WHITELEY J. M., ORONSKY A. L., KERWAR S. S., 1988. *Synthesis and biological properties of 5,10-dideaza-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid*. Arch. Biochem. Biophys. 265, 43-49.
- BOWEN D., WHITE C. J., GOLDMAN J. D., 1978. *A Basis of fluoropyrimidine induced antagonism to methotrexate in Ehrlich ascites tumor cells in vitro*. Cancer Res. 38, 219-222.
- CADMAN E., BENZ C., HEIMER R., O'SHAUGHNESSY J., 1981. *Effect of de novo purine synthesis inhibitors on 5-fluorouracil metabolism and cytotoxicity*. 30, 2469-2472.
- CADMAN E., HEIMER R., DAVIS L., 1979. *Enhanced 5-fluorouracil nucleotide formation after methotrexate administration: explanation for drug synergism*. Science 205, 1135-1137.

- CANMAN C. E., LAWRENCE T. S., SHEWACH D. S., TANG H. -Y., MAYBAUM J., 1993. Resistance to fluorodeoxyuridine-induced DNA damage and cytotoxicity correlates with an elevation of deoxyuridine triphosphatase activity and failure to accumulate deoxyuridine triphosphate. *Cancer Res.* 53, 5219-5224.
- CANMAN C. E., TANG H. -Y., NORMOLLE D. P., LAWRENCE T. S., MAYBAUM J., 1992. Variation in patterns of DNA damage induced in human colorectal tumor cells by 5-fluorodeoxyuridine — implications for mechanisms of resistance and cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 10474-10478.
- CHAN T. C. K., 1989. Augmentation of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine cytotoxicity in human tumor cells by inhibiting drug efflux. *Cancer Res.* 49, 2656-2660.
- CHESON B. D., 1992. The purine analogs — a therapeutic beauty contest. *J. Clin. Oncol.* 10, 352-355.
- CHOU T. C., HUTCHINSON D. J., SCHMID F. A., 1975. Metabolism and selective effects of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine in L1210 and host tissues in vitro. *Cancer Res.* 35, 225-236.
- CICHOWICZ D. J., SHANE B., 1987. Mammalian folylpoly- γ -glutamate synthetase. Substrate specificity and kinetic properties. *Biochemistry* 26, 513-521.
- DANENBERG P. V., 1977. Thymidylate synthetase — a target enzyme in cancer chemotherapy. *Biochim. Biophys. Acta* 473, 73-93.
- DIETRICH P. Y., FARACE F., CAIGNARD A., ESCUDIER B., TRIEBEL F., 1993. Immunotherapy of cancer — current developments and future strategies. *Bull. Cancer* 80, 584-600.
- DOONG S. -L., DOLNICK B. J., 1988. 5-Fluorouracil substitution alters pre-mRNA splicing in vitro. *J. Biol. Chem.* 263, 4467-4473.
- ENG C., PONDER B. A. J., 1993. The role of gene mutation in the genesis of familial cancers. *FASEB J.* 7, 910-919.
- FERNANDES D. J., KLUBES P., 1979. A Biochemical and pharmacological study of therapeutic synergism with 5-fluorouracil plus cyclophosphamide in murine L1210 leukemia. *Cancer Res.* 39, 1396-1404.
- GALIVAN J., INGLESE J., MCGUIRE J. J., NIMEC Z., COWARD J. K., 1985. γ -Fluoromethotrexate: synthesis and biological activity of a potent inhibitor of dihydrofolate reductase with greatly diminished ability to form poly- γ -glutamates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 2598-2602.
- GALIVAN J., NIMEC Z., RHEE M., 1987. Synergistic growth inhibition of rat hepatoma cells exposed in vitro to N10-propargyl-5,8-dideazafolate with methotrexate and the lipophilic antifolates trimetrexate or meloprin. *Cancer Res.* 47, 5256-5260.
- GREM J. L., FISHER P. H., 1989. Enhancement of 5-fluorouracil anticancer activity by dipyrindamole. *Pharmacol. Therapeut.* 40, 349-371.
- GREM J. L., HOTH O. F., HAMILTON J. M., KING S. A., LEYLAND-JONES B., 1987. Overview of current status and future direction of clinical trials with 5-fluorouracil with combination with folinic acid. *Cancer Treat. Rep.* 71, 1249-1264.
- HARRAP K. R., JACKSON R. C., 1978. *Biochemical mechanisms of resistance to antimetabolites.* [W:] *Antibiotics and Chemotherapy*, (red.) SCHÖNFELD, H., KRAGEN S., Basel, 228-237.
- HARTWELL L. H., KASTAN M. B., 1994. Cell cycle control and cancer. *Science*, 260, 1821-1827.
- HEILDELBERGER C., DANENBERG P. V., MORAN R. G., 1983. Fluorinated pyrimidines and their nucleosides. *Adv. Enzymol.*, 54, 57-119.
- HENDERSON G. B., SURESH M. R., VITOLS K. S., HUNNEKENS F. M., 1986. Transport of folate compounds in L1210: kinetic evidence that folate influx proceeds via high-affinity transport system for 5-methyltetrahydrofolate and methotrexate. *Cancer Res.* 46, 1639-1643.
- HERTEL L. W., BODER G. B., KROIN J. S., RINZEL S. M., POORE G. A., TODD G. C., GRINDEY G. B., 1990. Evaluation of the antitumor activity of gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine). *Cancer Res.* 50, 4417-4422.
- HILL B. T., 1978. The relevance of certain concepts of cell cycle kinetics. *Biochim. Biophys. Acta* 516, 389-417.
- HOLLINGSWORTH R. E., LEE W. H., 1991. Tumor suppressor genes: new prospects for cancer research. *J. Natl. Cancer Inst.* 83, 91-96.
- JACKSON R. C., JACKMAN A. L., CALVERT A. H., 1983. Biochemical effects of quinazoline inhibitor of thymidylate synthase, N-(4(N-((2-amino-4-hydroxy-6-quinazolinyl)methyl)prop-2-ynylamino)benzoyl)-L-glutamic acid (CB37-17) on human lymphoblastoid cells. *Biochem. Pharmacol.* 24, 3783-3790.
- JOLIVET J., COWAN K. H., CURT G. A., CLENDENINN N. J., CHABNER B. A., 1983. The pharmacology and clinical use of methotrexate. *N. Engl. J. Med.* 292, 1094-1104.

- JONES T. R., CALVERT A. H., JACKMAN A. L., BROWN S. J., HARRAP K. R., 1981. A potent antitumor quinazoline inhibitor of thymidylate synthase: synthesis, biological properties and therapeutic results in mice. *Eur. J. Cancer* 17, 11-19.
- KEYOMARSI K., MORAN R. G., 1988. Mechanism of the cytotoxic synergism of fluoropyrimidines and folinic acid in mouse leukemic cells. *J. Biol. Chem.* 263, 14402-14409.
- LENNARD L., 1992. The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 43, 329-339.
- MALEC J., 1989. Role rodników tlenowych i antyoksydantów w ubocznej toksyczności chemioterapii nowotworowej oraz próby jej zapobiegania. *Wiad. Lekarskie* 42, 19-21.
- MARX J., 1989. Many gene changes found in cancer. *Science* 246, 1386-1388.
- MATHERLY L. H., TRY D. G., GOLDMAN I. D., 1983. Role of MTX polyglutamation and cellular metabolism in inhibition of methotrexate binding to dihydrofolate reductase by 5-formyltetrahydrofolate in Ehrlich ascites tumor cells in vitro. *Cancer Res.* 43, 2694-2699.
- MCCABE E. R. B., 1993. Clinical application of gene therapy: emerging opportunities and current limitation. *Biochem. Med. Metabol. Biol.* 50, 241-253.
- MONTGOMERY J. A., 1983. Introduction: cancer chemotherapy and the medicinal chemist. [W:] *Development of Target-Oriented Anticancer Drugs*, (red.) CHENG Y. -C. i inni, Raven Press, New York.
- MORGAN C. J., CHAWDRY R. N., SMITH A. R., SIRAVO-SAGRAVES G., TREWYN R. W., 1994. 6-Thioguanine-induced growth arrest in 6-mercaptopurine-resistant human leukemia cells. *Cancer Res.* 54, 5387-5393.
- NELSON J. A., DRAKE S., 1984. Potentiation of methotrexate toxicity by dipyridamole. *Cancer Res.* 44, 2493-2496.
- PINEDO H. M., PETERS G. J., 1988. 5-Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *J. Clin. Oncol.* 6, 1653-1664.
- PREJEAN J. D., MONTGOMERY J. A., 1984. Structure-activity relationships in the carcinogenicity of anticancer agents. *Drug Metabolism Rev.* 15, 619-646.
- REILLY J. J., WORKMAN P., 1994. Is body composition an important variable in the pharmacokinetics of anticancer drug? *Cancer Chemother. Pharmacol.* 34, 3-13.
- RHEE M. S., BALIŃSKA M., BUNNI M., PRIEST D. G., MALEY G. F., MALEY F., GALIVAN J., 1990. Role of substrate depletion in the inhibition of thymidylate biosynthesis by dihydrofolate reductase inhibitor trimetrexate in cultured hepatoma cells. *Cancer Res.* 50, 3979-3984.
- RONINSON I. B., 1991. P-Glycoprotein-mediated drug resistance: puzzles and perspectives. [W:] *Molecular and Cellular Biology of Multidrug Resistance in Tumor Cells*, (red.) RONINSON I. B., Plenum Publ. Co, New York, 395-402.
- SAGER R., 1989. Tumor suppressor genes: the puzzle and the promise. *Science* 246, 1406-1412.
- SCANLON K. J., NEWMAN E. M., LU Y., PRIEST D. G., 1986. Biochemical basis for cisplatin and 5-fluorouracil synergism in human ovarian carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 8923-8925.
- SHUGAR D., 1992. Phosphorylating enzymes involved in activation of chemotherapeutic nucleosides and nucleotides. [W:] *Molecular Aspects of Chemotherapy, Proceedings of the Third International Symposium on Molecular Aspects of Chemotherapy*, (red.) D. SHUGAR, W. RODE, E. BOROWSKI, Springer-Verlag-PWN, 239-270.
- STEFFEN J., 1993. Postępy w badaniach nad dziedzicznymi predyspozycjami do rozwoju nowotworów złośliwych. *Nowotwory* 43, 279-297.
- ULLMAN B., LEE M., MARTIN D. W., SANTI D. V., 1978. Cytotoxicity of 5-fluoro-2-deoxyuridine: requirement for reduced folate cofactors and antagonism by methotrexate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 980-983.
- WEBER G., HATA Y., PRAJDAN., 1994. Role of differentiation induction in action of purine antimetabolites. *Pharmacology World Sci.* 16, 77-87.
- WERBEL L., 1984. Design and synthesis of lipophilic antifols as cancer agents. W: *Folate Antagonists as Therapeutic Agents*, (red.) SIROTNIAK F. M., BURCHALL J. J., ENSMINGER W. B., MONTGOMERY J. A., tom 1, Academic Press, Orlando, Florida, 261-290.
- WHITE J. C., RATHMELL J. M., CAPIZZI R. L., 1987. Membrane transport influences of rate of accumulation of cytosine arabinoside in human leukemia cells. *J. Clin. Invest.* 79, 380-387.
- WRIGHT J. E., DREYFUSS A., EL-MAGHARBEL I., TRITES D., JONES S. M., HOLDEN S. A., ROSOWSKY A., FREI III E., 1989. Selective expansion of 5,10-methylenetetrahydrofolate pools and modulation of 5-fluorouracil antitumor activity by leucovorin in vivo. *Cancer Res.* 49, 2592-2596.

- YEE L. K., ALLEGRA C. J., STEINBERG S. M., GREM J. L., 1992. *Decreased catabolism of fluorouracil in peripheral blood mononuclear cells during combination therapy with fluorouracil, leukovorin, and interferon alpha-2a*. J. Natl. Cancer Inst. 84, 1820-1825.
- ZAGOŹDŻON R., GOŁĄB J., 1994. *Terapia genowa w leczeniu nowotworów*. Post. Biochem. Kom. 21, 409-429.

Barbara GRZELAKOWSKA-SZTABERT

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN

Pasteura 3, 02-093 Warszawa

*Praca dedykowana Pani Profesor Zofii Zielińskiej
w 80-tą rocznicę urodzin*

MECHANIZMY OPORNOŚCI KOMÓREK NA LEKI PRZECIWNOWOTWOROWE

WSTĘP

Chemioterapia, stosowana od lat jako jeden z niezbędnych elementów w leczeniu chorób nowotworowych, ma na celu zniszczenie komórek nowotworowych przy jak najmniejszych uszkodzeniach komórek nosiciela nowotworu. Jak dotąd nie ma jednak związków, które by wybiórczo niszczyły komórki nowotworowe. Obecnie stosowane strategie chemioterapeutyczne są ukierunkowane, na ogół, na zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych poprzez upośledzenie procesów metabolicznych, niezbędnych dla prawidłowego przebiegu podziałów komórkowych. Stosuje się też procedury prowadzące do upośledzenia procesów biochemicznych charakterystycznych wyłącznie dla określonego typu nowotworu (RIMINGTON i RILEY 1993, DIETEL 1991). Mówi się wówczas o biochemicznej kontroli proliferacji przez leki, które stanowią bądź naturalne, bądź też syntetyczne analogi podstawowych metabolitów i kofaktorów. Szerokie zastosowanie jako leki przeciwnowotworowe znalazły:

- związki hamujące syntezę prekursorów kwasów nukleinowych — puryn i pirymidyn,
- związki oddziaływujące z DNA i zakłócające dzięki temu przebieg replikacji i translacji,
- związki hamujące syntezę białek czy też lipidowych składników błon komórkowych,
- ostatnio także związki przeciwdziałające stymulacji komórek do podziałów przez czynniki egzogenne.

Skuteczność działania takich leków ogranicza jednak pojawiająca się oporność, to jest brak wrażliwości komórek na podawany lek. Oporność stwierdzaną już po pierwszym podaniu leku określa się jako oporność wrodzoną. Częściej jednak oporność pojawia się jako niekorzystny efekt wielokrotnego podawania leku — mówimy wówczas o oporności nabytej. Wytworzona oporność bywa nietrwała lub trwała, występująca również w komórkach po usunięciu leku.

Oporność komórek może także wynikać z różnej wrażliwości na lek komórek będących w różnych fazach cyklu komórkowego.

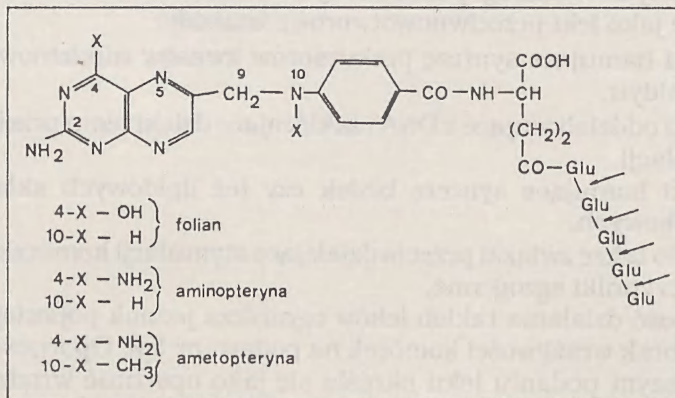
Najczęściej populacje komórek opornych otrzymuje się jako wynik selekcji komórek opornych, obecnych pierwotnie w badanej populacji. Mogą też pojawiać się one w rezultacie zmian ekspresji pewnych genów pod wpływem różnych czynników środowiskowych. Niestabilność genomu komórek nowotworowych sprawia, że właśnie w ich populacjach często pojawiają się komórki odporne. Mechanizmy prowadzące do powstawania oporności są różnorodne i wydaje się, że podobne mechanizmy mogą powodować zarówno oporność wrodzoną komórek, jak i nabytą. Mechanizmy te mogą polegać przede wszystkim na zmianach ilości i właściwości wewnątrzkomórkowych składników, przeciw którym podany lek został zastosowany. Mogą dotyczyć zmian charakterystyki transportu leków do komórek, jak i ich usuwania. Mogą też być związane ze zmienioną wewnątrzkomórkową aktywacją lub dezaktywacją leku. Często też polegają na zwiększeniu wydolności szlaków zastępczych. Mechanizmy warunkujące oporność komórek na leki przedstawię omawiając oporność na: antymetabolity, a w szczególności na analogi folianu i fluoropirymidyny, związki alkilujące — na przykładzie cis-platyny oraz związki heterocykliczne odpowiedzialne za wystąpienie tak zwanej oporności wielolekowej.

OPORNOŚĆ NA ANTYMETABOLITY

ANALOGI FOLIANU

Budowa i działanie

Analogi folianu stanowią ważną grupę związków o działaniu terapeutycznym, stosuje się je jako leki przeciwnowotworowe, przeciwbakteryjne i antyzapalne. W odróżnieniu od analogów puryn, pirymidyn i ich nukleozydów, antyfoliany nie są włączane do kwasów nukleinowych i w związku z tym nie przejawiają własności karcynogennych. Jako antyfoliany traktuje się różne pochodne kwasu foliowego, w tym analogi aminowe (aminopteryna, ametoptyeryna, ryc. 1), chi-

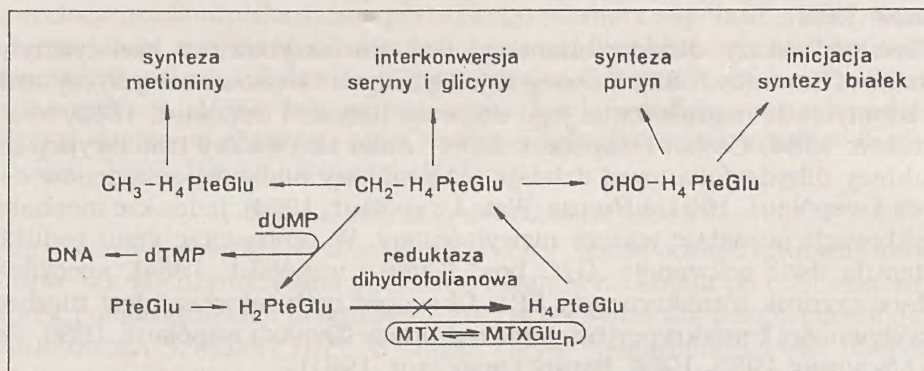


Ryc. 1. Struktura folianów i aminofolianów — aminopteryny i ametoptyeryny.

Strzałką oznaczono wiązania rozkładane przez γ -glutamylhydrolazę.

nazolinowe (na przykład metaskwin, CB 3717), pirymidynowe (trimetoprim, DDMP), trójazynowe (analog Bakera-T2T) i homofoliany (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1983a i b). Niemalże wszystkie stosowane dotychczas analogi folianu są inhibitorami reduktazy dihydrofolianowej, enzymu kluczowego w powstawaniu tetrahydrofolianu i koenzymatycznych form folianu, a w efekcie w biosyntezie tymidylanu i syntezie DNA. Niektóre tylko antyfoliany (antyfoliany chinazolinowe) są inhibitorami bezpośrednio syntazy tymidylanowej.

Konsekwencje metaboliczne zahamowania przez antyfoliany powstawania tetrahydrofolianu nie ograniczają się jedynie do zahamowania syntezy DNA (ryc. 2). Obniżenie wewnątrzkomórkowej puli uwodorowanych pochodnych folianowych pociąga też za sobą zaburzenia biosyntezy szeregu aminokwasów i puryn, co w efekcie może prowadzić do śmierci komórek (MANTEUFFEL-CYMBOROWSKA 1978, ZIELIŃSKA 1981, GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1977, 1983a i b, BALIŃSKA 1988). Aminowe analogi folianu, aminopteryna i ametoptyeryna, zsyntetyzowane już w połowie lat czterdziestych, są jednymi z najczęściej stosowanych do chwili obecnej leków przeciwnowotworowych w leczeniu przede wszystkim limfomy Burkitta, kosmówczaka i ostrej białaczki limfocytarnej, a także nowotworów piersi, głowy i pęcherza (SCHWEITZER i współaut. 1990, BERTINO 1993). Stosowanie antyfolianów jako cytostatyków w dużym stopniu ogranicza jednak ich toksyczność. Jest to przede wszystkim mielosupresja i zaburzenia funkcjonowania przewodu pokarmowego. Ponadto pojawia się oporność zarówno wrodzona, jak i nabywana w czasie trwania terapii.



Ryc. 2. Udział koenzymatycznych pochodnych folianowych w procesach metabolicznych.

Przekreślona strzałka oznacza hamowanie aktywności reduktazy dihydrofolianowej przez ametoptyerynę (MTX) i jej poliglutamylowe pochodne. Skróty: PteGlu — folian; H₂PteGlu — dihydrofolian; H₄PteGlu — tetrahydrofolian; CH₃-H₄PteGlu, CH₂-H₄PteGlu, CHO-H₄PteGlu — odpowiednio metylo-, metyleno- i formylo-tetrahydrofoliany; dUMP — deoksyuridylnomonofosforan; dTMP — deoksytymidylmonofosforan.

Oporność komórek na działanie antyfolianów może wynikać z upośledzenia ich transportu do komórek, zaburzeń ich wewnątrzkomórkowego metabolizmu, a zwłaszcza zmian ilości i właściwości enzymu docelowego, reduktazy dihydrofolianowej i/lub syntazy tymidylanowej. Poziom oporności komórek może też

zależać od wielkości wewnątrzkomórkowej puli folianu oraz puli metabolitów, puryn i tymidylanu, których biosyntezę upośledzają antyfoliany.

Oporność wynikająca ze wzrostu ilości i zmian właściwości reduktazy dihydrofolianowej

Wzmocnienie syntezy reduktazy dihydrofolianowej, a w konsekwencji wzrost jej zawartości w hodowanych *in vitro* mysich komórkach po traktowaniu antyfolianami wykryto już na początku lat sześćdziesiątych. Podobny wzrost syntezy tego enzymu znaleziono następnie w wielu komórkach nowotworowych poddanych działaniu antyfolianów (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1983a i b, HAUS 1990a). Ilość reduktazy dihydrofolianowej w komórkach opornych na antyfoliany może sięgać nawet od kilku do kilkunastu procent rozpuszczalnych białek komórkowych. Wzrost ilości reduktazy dihydrofolianowej jest często wynikiem zwielokrotnienia w komórkach liczby kopii genu kodującego ten enzym (SCHIMKE 1986). Amplifikację genu reduktazy dihydrofolianowej znaleziono również w nowotworach pacjentów leczonych ametoptyryną (SCHWEITZER i współaut. 1990). Należy zaznaczyć, że zwielokrotnienie liczby kopii genu prowadzące do wzrostu syntezy enzymów docelowych może zachodzić także pod wpływem innych niż antyfoliany leków i związków, takich jak na przykład hydroksymocznik, pALA, 6-azaurydyna, DFMO i inne (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1983b). Umieszczenie zwielokrotnionego genu reduktazy dihydrofolianowej bądź to w chromosomach (w homogenie barwiących się fragmentach), bądź też w elementach pozachromosomalnych, tak zwanych chromosomach minutowych, decyduje o trwałości bądź też nietrwałości pojawiającej się oporności (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1983a i b, BIEDLER 1994).

Gen reduktazy dihydrofolianowej jest transkrybowany konstytutywnie (FARNHAM i SCHIMKE 1985), a szereg fizjologicznych i środowiskowych czynników jest zdolnych do modulowania jego ekspresji (LEVINE i współaut. 1985, MARIANI i SCHIMKE 1984, COWAN i współaut. 1986). Jako aktywatory transkrypcji genu reduktazy dihydrofolianowej działają też produkty białkowe onkogenów *c-myc* (DENIS i współaut. 1991) i *Ha-ras* (WANI i współaut. 1994), jednakże mechanizm tej aktywacji pozostaje jeszcze niewyjaśniony. W promotorze genu reduktazy występują dwie sekwencje „G/C box” (CHEN i współaut. 1984), specyficznie wiążące czynnik transkrypcyjny SP1. Obecność tych sekwencji jest niezbędna dla aktywności transkrypcyjnej genu reduktazy (DYNAN i współaut. 1986, FARNHAM i SCHIMKE 1985, 1986, BLUME i współaut. 1991).

Transkrypcją genu reduktazy dihydrofolianowej jest na ogół kilka różniących się wielkością (± 1600 nukleotydów) cytoplazmatycznych mRNA, których translacja prowadzi do syntezy dwóch form reduktazy różniących się nieco ciężarem cząsteczkowym (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1983a i b, SCHWEITZER i współaut. 1990). W większości komórek opornych na antyfoliany, charakteryzujących się obecnością zwiększonych ilości reduktazy dihydrofolianowej, nie obserwuje się na ogół zmian właściwości tego enzymu. W niektórych jednak komórkach może dojść do zintensyfikowania syntezy reduktazy dihydrofolianowej o zmienionych właściwościach (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1983a, SCHWEITZER i współaut. 1990), opisywano również komórki, w których wykrywa się jednocześnie prawidłową i zmienioną formę tego enzymu (MELERA i współaut. 1984). „Zmienione” reduktazy dihydrofolianowe charakteryzuje przede wszystkim zna-

czący wzrost wartości stałej inhibicji K_i dla ametoptyryny, a więc obniżenie powinowactwa enzymu do inhibitora i niewielki spadek powinowactwa do substratów — dihydrofolianu i NADPH (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1983a i b). W ostatnich latach wyjaśniono, że za obniżenie powinowactwa reduktazy dihydrofolianowej wobec antyfolianów są odpowiedzialne mutacje prowadzące do zastąpienia leżących w centrum aktywnym enzymu fenyloalanin (SCHWEITZER i współaut. 1989, MORRIS i McIVOR 1994), leucyny (MELERA i współaut. 1984, MORRIS i McIVOR 1994) bądź asparaginianu (YU i MELERA 1993) przez inne aminokwasy. Doniesiono też o wystąpieniu oporności na antyfoliany *in vivo* będącej efektem mutacji i zmian aminokwasowych poza centrum aktywnym reduktazy dihydrofolianowej (DICKER i współaut. 1993).

Oporność wynikająca ze zmian w charakterystyce transportu leków

Za pojawienie się oporności na antyfoliany mogą być również odpowiedzialne zmiany właściwości i ilości białek błonowych uczestniczących w ich transporcie do komórek. W transporcie antyfolianów do komórek uczestniczy błonowy nośnik, który w warunkach fizjologicznych przenosi przede wszystkim uwodowane koenzymatyczne pochodne folianowe (HUENNEKENS i współaut. 1978). Transportowi tych związków towarzyszy przemieszczanie przez błonę anionów (HENDERSON 1986). Szereg komórek, zwłaszcza adaptowanych do wzrostu w obecności bardzo niskich stężeń folianu, posiada również odrębny błonowy nośnik transportujący zarówno niewodowane, jak i uwodowane pochodne folianowe (ELWOOD 1989). Internalizacja liganda następuje w tych komórkach w wyniku endocytozy kompleksu transportującego (KAMEN i współaut. 1988). Komórki odporne może cechować obniżenie powinowactwa błonowych nośników do transportowanych antyfolianów (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1983a i b, SCHWEITZER i współaut. 1990) lub zmniejszenie ilości nośników, prawdopodobnie w wyniku obniżonej ekspresji genu kodującego białko transportujące (SAIKAWA i współaut. 1993, HSUEH i DOLNICK 1994).

Oporność związana z metabolizmem leków

Antyfoliany zawierające w swej cząsteczce resztę kwasu glutaminowego, podobnie jak koenzymatyczne pochodne folianowe, ulegają po dostaniu się do komórek poliglutamylacji przeprowadzanej przez syntetazę poliglutaminianową (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1977, BALIŃSKA 1988). Poliglutaminianowe pochodne antyfolianów są znacznie lepiej zatrzymywane w komórkach niż związki zawierające tylko jedną resztę kwasu glutaminowego. Zwiększona retencja poliglutaminianów antyfolianowych przyczynia się do zwiększenia wywoływanych przez nie efektów cytotoksycznych (CHABNER i współaut. 1985). Co więcej, poliglutaminiany folianowe są na ogół efektywniejszymi inhibitorami enzymów docelowych niż formy monoglutaminowe (ALLEGRA i współaut. 1985a, SIKORA i współaut. 1988). Mogą one także stać się inhibitorami enzymów nie hamowanych przez pochodne monoglutaminianowe (ALLEGRA i współaut. 1985b). W ostatnich latach wykazano, że obniżenie wewnątrzkomórkowego poziomu poliglutaminianów antyfolianowych może być odpowiedzialne za wystąpienie oporności. Może być ono wynikiem drastycznego obniżenia aktywności syntetazy poliglutaminianowej (McCLOSKEY i współaut. 1991, SCHWEITZER i współaut. 1990), bądź też zwiększenie aktywności glutamylhydrolazy, enzymu odszczepiającego od poli-

glutaminianów reszty kwasu glutaminowego (RHEE i współaut. 1993). Należy podkreślić, że komórki odporne „uruchamiają” najczęściej jednocześnie różne mechanizmy unieczynnijające lek lub uniemożliwiające jego działanie. Coraz więcej danych świadczy o tym, że zastosowany przez eksperymentatora sposób selekcji komórek opornych może decydować, który z mechanizmów ulegnie aktywacji (VAN DER LAAN i współaut. 1991). Komórki odporne, w których upośledzenie poliglutamylacji antyfolianu jest główną przyczyną ich niewrażliwości na ametoptyerynę, uzyskano w wyniku traktowania ich przez krótki czas antyfolianem w dużych dawkach (PIZZORNO i współaut. 1988), a więc w sposób analogiczny do postępowania klinicznego. Fakt ten, jak również wykazanie, że za wrodzoną oporność na ametoptyerynę ludzkich komórek fibrosarkomy może być odpowiedzialny także brak poliglutamylacji leku (LI i współaut. 1992), wydaje się mieć duże implikacje kliniczne.

Przewycięzanie oporności na antyfoliany

Procedury stosowane do przewycięzania oporności na antyfoliany są równie liczne jak mechanizmy odpowiedzialne za jej wystąpienie. Jeśli główną przyczyną oporności jest podwyższony poziom reduktazy dihydrofolianowej, to można by stosować lek, który po uwodorowaniu przeprowadzonym przez reduktazę, hamowałby efektywnie inny ważny metabolicznie enzym, na przykład syntazę tymidylanową. Jak dotąd nie znaleziono jednakże takiego związku, a próby z zastosowaniem homofolianu nie powiodły się. Myśli się też o stosowaniu inhibitorów specyficznym hamujących wyłącznie „zmienioną” reduktazę, a coraz lepsze poznanie struktury zmienionych reduktaz dihydrofolianowych może doprowadzić do zaprojektowania syntezy takich inhibitorów (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1983a i b).

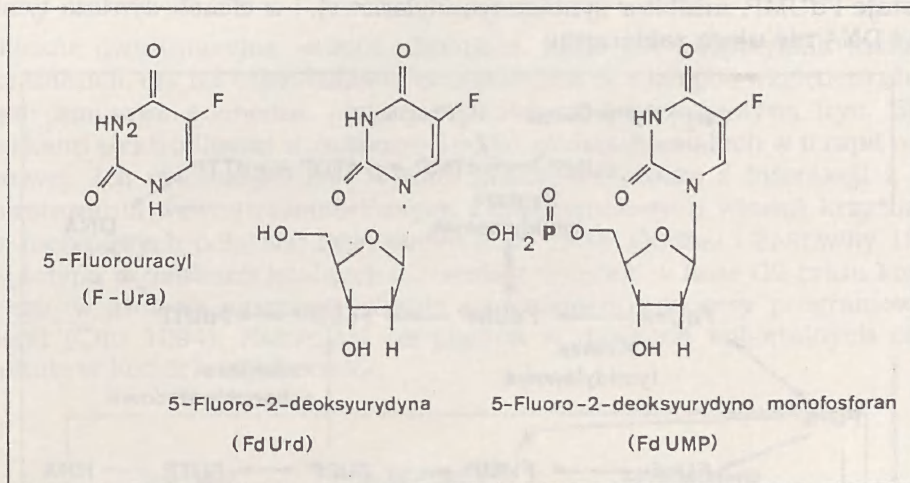
W przypadku, gdy główną przyczyną wystąpienia oporności są zaburzenia pobierania folianu, to celem jej przewycięzania można próbować zwiększać stężenie stosowanego antyfolianu, stosować kompleksy leku z polimerem o dużej zdolności penetracji przez błonę lub stosować lek umieszczony w liposomach. Bardziej jednak efektywne wydaje się stosowanie innych leków, które dostają się do komórek przy udziale innych mechanizmów niż lek, na który wytworzono oporność. Coraz większe zastosowanie znajdują lipofilne antyfoliany, na przykład trimetrexat, lek o szerszym niż ametoptyeryna spektrum działania, nie ulegający poliglutamylacji (KAMEN i współaut. 1984).

FLUOROPYRIMIDYNY

Budowa i działanie

Fluoropirymidyny — 5-fluorouracyl (FUra) i 5-fluorodeoksyurydyna (FdUrd) (ryc. 3), są od ponad trzydziestu lat stosowane w terapii wielu nowotworów, zwłaszcza nowotworów przewodu pokarmowego (HEIDELBERGER i współaut. 1983, GREM i COLLINS 1990). W odróżnieniu od antyfolianów, które działają cytostatycznie bez aktywacji (poza polyglutamylacją), pobierane przez komórki fluoropirymidyny wymagają w komórce licznych przekształceń metabolicznych zanim przejawia się ich działanie hamujące podziały komórkowe. Związkami efektywnymi są bowiem bądź to mononukleotyd (FdUMP) bądź też trójnukleotyd fluoropirymidyn (FUTP i FdUTP). W przekształceniu fluoropirymidyn

w „aktywne inhibitorowo” pochodne uczestniczą liczne enzymy, metabolity i ko-faktory (ryc. 4), jest więc oczywiste, że odpowiedź komórki na działanie fluoropirymidyn, jak i mechanizmy leżące u podstaw oporności (zarówno wrodzonej jak i nabytej) zależą od wielu czynników i są bardzo złożone (ZHANG i współaut. 1992, Fox i współaut. 1991).



Ryc. 3. Struktura fluoropirymidyn

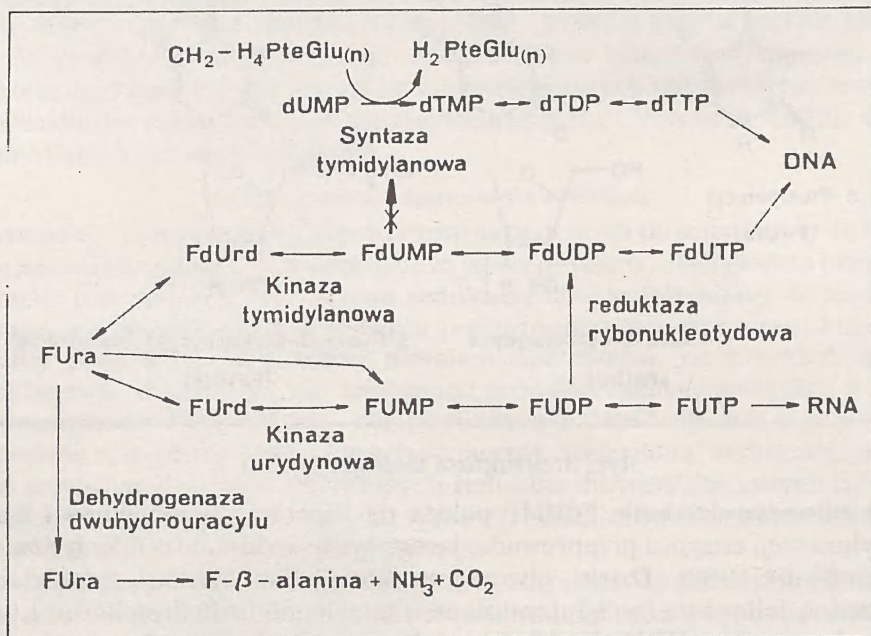
Inhibitorowe działanie FdUMP polega na hamowaniu aktywności syntazy tymidylanowej, enzymu przeprowadzającego syntezę *de novo* nukleotydów tyminowych (RODE 1986). Dzięki utworzeniu kompleksu syntazy tymidylanowej z pochodną folianową (poliglutaminianem metylenotetrahydrofolianu) i inhibitorem nie powstaje dTMP, w efekcie zaś dalszym następują zaburzenia syntezy DNA i jego transkrypcji oraz zakłócenia podziałów komórkowych. Natomiast trójnukleotydy fluorodeoksyurydyny (FdUTP) i fluorourydyny (FUTP) mogą być inkorporowane do DNA i RNA zamiast dTTP i UTP oraz powodować różnego typu uszkodzenia w cząsteczkach kwasów nukleinowych, między innymi pęknięcia nici DNA (CANMAN i współaut. 1992, 1993).

Oporność wynikająca ze wzrostu ilości i właściwości syntazy tymidylanowej

Najlepiej, jak dotąd, zbadanym i często występującym mechanizmem oporności na fluoropirymidyny jest wzrost poziomu syntazy tymidylanowej (WAHSTEIN 1984, JASTREBOFF i współaut. 1983, BERGER i współaut. 1985), lub/i zmiany jej właściwości, jak na przykład obniżenie powinowactwa enzymu do FdUMP (MULKINS i HEIDELBERGER 1982, BAPAT i współaut. 1983, JASTREBOFF i współaut. 1983). Wzrost poziomu syntazy tymidylanowej, wynikający z amplifikacji genu, nie jest na ogół tak duży, jak w przypadku reduktazy dihydrofolianowej. Nie mniej jednak komórki zawierające więcej syntazy tymidylanowej niż komórki macierzyste uzyskują oporność wystarczającą do przeżywania w obecności FdUMP w stężeniach nawet 10^{-5} M (ROSSANA i współaut. 1982).

Inne mechanizmy oporności na fluoropirymidyny i próby ich przezwycięzania

Brak cytotoksyczności fluoropirymidyn w stosunku do niektórych komórek opornych może również wiązać się z obniżeniem w nich poziomu aktywności enzymu fosforylującego FdUrd, a mianowicie kinazy tymidylanowej (ROSSANA i współaut. 1982, JASTREBOFF i współaut. 1983). W rezultacie w komórkach nie powstaje FdUMP, inhibitor syntazy tymidylanowej, i w efekcie synteza tymidylanu i DNA nie ulega zakłóceniu.



Ryc. 4. Metaboliczne przekształcenia i miejsca działania fluoropirymidyn.

Przekreślona strzałka oznacza hamowanie syntazy tymidylanowej przez FdUMP. Skróty: dTMP, dTDP i dTTP — odpowiednio mono-, di- i trifosforany deoksytymidyny; FdUrd — 5-fluoro-2-deoksyurydyna; FdUMP, FdUDP, FdUTP — fluorowe pochodne mono-, di- i trifosforanów deoksyurydyny; FUrda — fluorouracyl; FUrda — fluorouracyl; FUMP, FUDP i FUTP — fluorowe pochodne mono-, di- i trifosforanów urydyny; F-β-alanina — fluoro-β alanina. P ozostale skróty wyjaśniono pod ryc. 2.

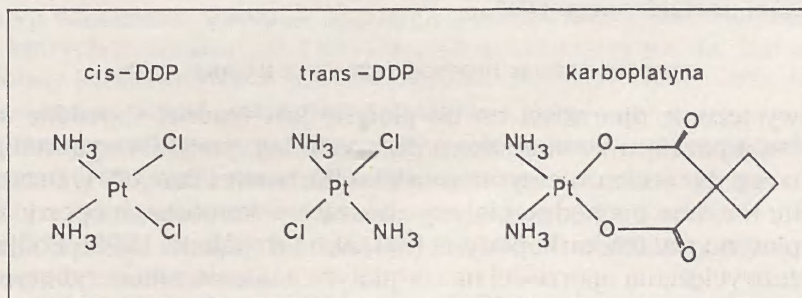
Ostatnio doniesiono, że do oporności komórek na fluoropirymidyny może przyczyniać się także wzrost aktywności trójfosfatazy deoksyurydynowej pociągający za sobą spadek wewnątrzkomórkowej akumulacji dUTP (CANMAN i współaut. 1993). Jako nowy mechanizm oporności na fluorouracyl można też traktować obniżoną zdolność komórek do tworzenia właściwego folianowego substratu syntazy tymidylanowej, na skutek obniżenia ekspresji genu syntetazy poliglutamianowej przeprowadzającej poliglutamylację metylenotetrahydrofolianu (WANG i współaut. 1993)

Przeciwdziałanie oporności na fluoropirymidyny najczęściej polega na próbach zwiększenia ich cytotoksyczności. Dokonuje się to przede wszystkim poprzez podwyższenie wewnątrzkomórkowej puli zredukowanych folianów, będących jednymi z substratów w reakcji katalizowanej przez syntazę tymidylanową.

wą (na przykład SPEARS i współaut. 1988). Ułatwia to powstanie trójskładnikowego kompleksu syntazy tymidylanowej z pochodną folianową i inhibitorem i „wyłączenie” funkcjonowania enzymu.

OPORNOŚĆ NA ZWIĄZKI ALKILUJĄCE NA PRZYKŁADZIE CIS-PLATYNY

Liczne dwufunkcyjne związki alkilujące, takie jak na przykład melfalan, chlorambucil, czy też cyklofosfamid oraz podobne do nich pod względem chemicznym aminowe pochodne platyny, cis-platyna i karboplatyna (ryc. 5), są związkami elektrofilnymi stosowanymi od lat siedemdziesiątych w terapii nowotworowej. Ich cytotoksyczność wynika przede wszystkim z interakcji z DNA i powstawania wewnątrzkomórkowych i międzyniciowych wiązań krzyżowych oraz nietypowych połączeń DNA-białko (CHU 1994, OLIŃSKI i ZASTAWNY 1991). Cis-platyna w dawkach letalnych zatrzymuje komórki w fazie G2 cyklu komórkowego, w których następnie ulegają uruchomieniu procesy programowanej śmierci (CHU 1994). Natomiast cis-platyna w dawkach subletalnych często indukuje w komórkach oporność.



Ryc. 5. Struktura cis-platyny (cis-DDP), trans-platyny (trans-DDP) oraz karboplatyny (cis-diamino-1,1-cyklobutano-dikarboksyplatyny II).

Jako podstawowe przyczyny odpowiedzialne za wystąpienie oporności na cis-platynę traktuje się: zwiększoną zdolność komórek do naprawy DNA, intensyfikację procesów unieczynnających lek, niekiedy obniżoną wewnątrzkomórkową akumulację leku (CHU 1994, OLDENGURG i współaut. 1994). Niektóre komórki odporne mogą też tolerować obecność większej ilości uszkodzonego DNA niż komórki wrażliwe.

Komórki o wysokim stopniu oporności cechuje przede wszystkim intensywniejsza reperacja DNA, polegająca na szybszym enzymatycznym usuwaniu (wycinaniu) adduktów cis-platyny z DNA, a także podwyższona ekspresja genów kodujących polimerazy DNA i ligazy (DIETEL 1991) oraz syntazę tymidylanową (SCANLON i KASHANI-SABET 1988). Może w nich również zachodzić indukcja specyficznego białka jądrowego XPE-BF (CHU 1994).

Natomiast komórki o niskim stopniu oporności na cis-platynę, charakteryzuje zwykle niższa wewnątrzkomórkowa akumulacja leku (OLDENGURG i współaut. 1994, JEKUNEN i współaut. 1994). Jak dotąd nie jest znany specyficzny nośnik uczestniczący w transporcie cis-platyny do komórek lub w jej usuwaniu. Wydaje

się, że w procesach tych mogą uczestniczyć dwa białka błonowe — 48 kDa (BERNAL i współaut. 1990) i 200 kDa (KAWAI i współaut. 1990). To ostatnie białko nie jest identyczne z glikoproteiną P (170 kDa) uczestniczącą w usuwaniu leków wywołujących oporność wielolekową (patrz rozdział *Oporność na związki heterocykliczne, czyli tak zwana oporność wielolekowa*). Jaki jest jego udział w usuwaniu cis-platyny z komórek pozostaje jeszcze nie wyjaśnione.

Wiele linii komórek opornych na cis-platynę charakteryzuje się też podwyższoną zdolnością do znoszenia jej toksyczności, poprzez tworzenie kompleksów z glutationem (OGUCHI i współaut. 1994) lub też z metalotioneiną (MT), małym białkiem (61-62 AA) zawierającym aż 20 reszt cysteinowych (KUZMICH i TEW 1991, KELLEY i współaut. 1988). Związanie cis-platyny z metalotioneiną powoduje odszczepienie od cząsteczki leku ligandów aminowych, co powoduje znaczne obniżenie jego aktywności.

Badania ostatnich lat wskazują także na udział w wytwarzaniu oporności na cis-platynę białkowych produktów onkogenów *c-ras* (SKLAR 1988) i *c-fos* (KASHANI-SABET i współaut. 1990) oraz genu supresorowego *p53* (BROWN i współaut. 1993). Na czym polega działanie tych białek jeszcze nie wiadomo. Być może ich zwiększone ilości przyczyniają się do tolerowania przez komórki odporne większych ilości uszkodzonego DNA.

PRZEWYCIĘŻANIE OPORNOŚCI KOMÓREK NA CIS-PLATYNĘ

Przewyciężenie oporności na cis-platynę jest trudne. Czynione są próby modulowania poziomu wewnątrzkomórkowych tioli, przede wszystkim glutationu, w celu zapobieżenia unieczynniania leku (KUZMICH i TEW 1991, DIETEL 1993). Stosuje się też inne pochodne platyny znoszące w komórkach oporność wywołaną cis-platyną czy też karboplatiną (KELLAND i współaut. 1992). Podjęto także próby przewyciężenia oporności na cis-platynę zastosowaniem rybozemu antyfos, RNA o właściwościach enzymatycznych, które degraduje mRNA będący transkryptem genu *c-fos* (FUNATO i współaut. 1992). Zaburzało to powstanie czynnika transkrypcyjnego AP-1, który reguluje ekspresję wielu genów. Efektem transfekcji komórek opornych rybozymem antyfos było przywrócenie im wrażliwości na cis-platynę i powrót morfologii komórek do stanu charakteryzującego komórki wrażliwe. Co więcej, znaleziono w nich obniżoną ekspresję genów syntazy tymidylanowej, polimerazy β i topoizomerazy I, a więc tych genów, które ulegały nadekspresji w komórkach opornych. Nie wiadomo jednak czy zastosowanie tego typu strategii znajdzie zastosowanie kliniczne.

OPORNOŚĆ NA ZWIĄZKI HETEROCYKLICZNE CZYLI TAK ZWANA OPORNOŚĆ WIELOLEKOWA

Wśród komórek opornych na działanie cytostatyków często pojawia się subpopulacja komórek wykazujących krzyżową oporność w stosunku do cytotoksycznych związków o bardzo różnej budowie i mechanizmie działania. Oporność ta, zwana opornością wielolekową (MDR od multidrug resistance), powstaje na ogół na drodze selekcji komórek w środowisku zawierającym tylko jeden z leków z grupy wywołujących MDR i jest zwykle najsilniej wyrażona w stosunku

do leku indukującego. Wywołują ją przede wszystkim leki należące do grupy antracyklin (doksorubicyna, daunorubicyna), alkaloidy izolowane z roślin rodzaju *Vinca* (winkrystyna, winblastyna), czy też antybiotyki (aktynomycyna D) (ryc. 6). Oporność taka może pojawiać się również po traktowaniu komórek kolchicyną, pochodnymi epipodofylotoksyn (etopozyd — VM26, tenipozyd — VP16), inhibitorami enzymu topoizomeraazy II (amsakryna) i wieloma innymi lekami.

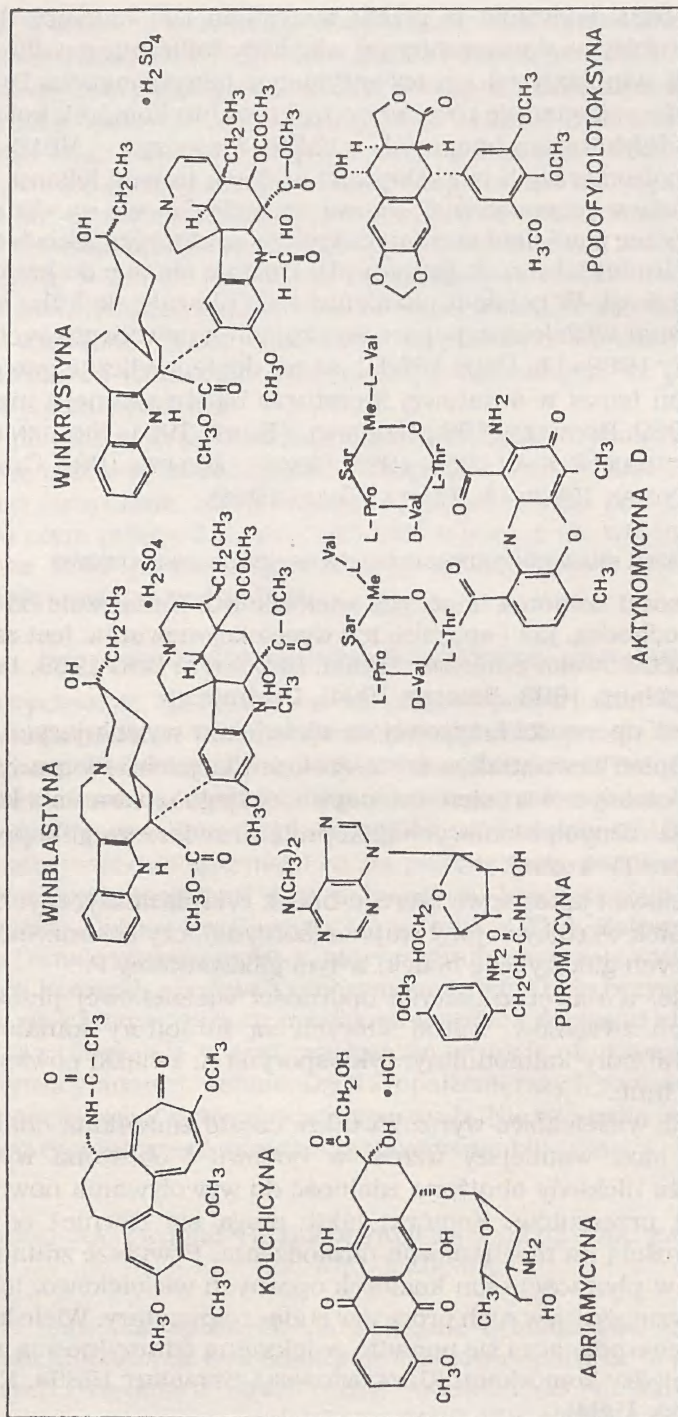
Związki wywołujące oporność wielolekową są hydrofobowe na skutek obecności w ich cząsteczce pierścieni aromatycznych; charakteryzują się też ładunkiem dodatnim w środowisku o obojętnym pH. Dostają się one do komórek na drodze pasywnej dyfuzji. W polskim piśmiennictwie ukazały się kilka lat temu opracowania na temat wielolekowej oporności komórek nowotworowych (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1989a i b, HAUS 1990b); są też dostępne liczne przeglądowe opracowania na ten temat w światowej literaturze biochemicznej i medycznej (ENDICOTT i LING 1989, RONINSON 199,; SCHINKEL i BORST 1991, NIELSEN i SKOVSGAARD 1992, GOTTESMAN i PASTAN 1988, 1993, DEVINE i MELERA 1994, GOTTESMAN 1993, GROS i BUSCHMAN 1993a i b, RUETZ i GROS 1994).

FENOTYPOWA CHARAKTERYSTYKA KOMÓREK OPORNYCH WIELOLEKOWO

Fenotyp większości komórek opornych wielolekowo, niezależnie od rodzaju tkanki z których pochodzą, jak i sposobu ich wyselekcjonowania, jest zadziwiająco podobny (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1989a, ENDICOTT i LING 1989, RONINSON 1992, BASHIR i współaut. 1993, BIEDLER 1994). Cechuje go:

- zbliżony profil oporności krzyżowej na wiele leków wywołujących MDR,
- obniżony stopień wewnątrzkomórkowej akumulacji leku związany najczęściej z jednoczesnym wzrostem intensywności jego usuwania z komórek,
- nadekspresja różnych błonowych glikoprotein, zwłaszcza glikoproteiny P o aktywności ATP-azowej,
- zmiany ilościowe i jakościowe szeregu białek cytoplazmatycznych, w tym pewnych białek wiążących jony wapnia (sorcylna), czy też enzymów przeprowadzających glikozylację białek, w tym glikoproteiny P,
- modulowanie, a nawet znoszenie oporności wielolekowej przez szereg różnorodnych związków, wśród których są inhibitory kanałów wapniowych, inhibitory kalmoduliny, cyklosporyna A, związki powierzchniowo czynne i inne.

Komórki odporne wielolekowo wyróżnia także często zmieniona charakterystyka wzrostu *in vivo*, wolniejszy wzrost w hodowli i obniżona wydajność klonowania, a także niekiedy obniżona zdolność do wywoływania nowotworów *in vivo* i dawania przerzutów. Komórki takie mogą się również odznaczać wzmoczoną wrażliwością na mechaniczne uszkodzenia. Powyższe zmiany mogą wynikać ze zmian w płynności błon komórek opornych wielolekowo, ich ultrastruktury oraz ze wzmocnienia w nich procesów endo- i egzocytozy. Wiele komórek opornych wielolekowo odznacza się ponadto zwiększoną adhezyjnością zarówno od podłoża, jak i między komórkami (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1989a, ENDICOTT i LING 1989, BIEDLER 1994).



Ryc. 6. Struktura niektórych heterocyklicznych leków wywołujących oporność wielolekową.

GLIKOPROTEINA P

Geny *mdr* kodujące glikoproteinę P, regulacja ich ekspresji

Glikoproteina P, której zwiększone ilości występują w błonach większości opornych wielolekowo komórek, jest kodowana przez kilka genów tworzących grupę tak zwaną genów *mdr*. W komórkach ludzkich występują 2 geny *mdr* umiejscowione na chromosomie 7, u gryzoni zaś 3 geny na chromosomie 5 (GROS i BUSCHMAN 1993, RONINSON 1992). W komórkach gryzoni tylko geny *mdr1* i *mdr2* a w komórkach ludzkich jedynie gen *MDR1* są bezpośrednio związane z opornością. Geny *mdr* wykazują znaczny stopień homologii i kodują 4,5 kb mRNA. Podwyższony poziom mRNA często koreluje ze stopniem oporności komórek i może być skutkiem zamplifikowania genu *mdr*, jak i zintensyfikowania jego ekspresji (ENDICOTT i LING 1989, GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1989a, HAUS 1990b). Najczęściej zwielokrotnione geny *mdr* występują w elementach pozachromosomalnych, tak zwanych chromosomach minutowych oraz w homogenie barwiących się regionach (HSR) jednego lub kilku chromosomów (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1989a, HAUS 1990b).

W ostatnich latach sklonowano i zsekwencjonowano ludzkie, mysie (GROS i współaut. 1988, DEVAULT i GROS 1990, HSU i współaut. 1990) i chemiczne (NG i współaut. 1989) geny *mdr*. Poznano też strukturę promotora mysiego genu *mdr1* (UEDA i współaut. 1987), co pozwala na precyzyjne badania regulacji jego ekspresji. Badania te są tym bardziej ważne, że w niektórych komórkach opornych wielolekowo stwierdza się znaczne zwiększenie transkrypcji genu *mdr1* bez jego amplifikacji (SCOTTO i współaut. 1986, SHEN i współaut. 1986). Jak dotąd nie wykazano w genie *mdr1* obecności takich typowych sekwencji regulatorowych jak CAAT czy TATA. Niemniej jednak stwierdzono w ostatnich latach, że sekwencje nukleotydowe promotora, zarówno poniżej jak i powyżej miejsca inicjacji transkrypcji, są istotne dla regulacji transkrypcji genu (KOHNO 1990). Są nimi miejsca rozpoznawane przez czynnik transkrypcyjny AP1 (TEETER i współaut. 1991, YU i współaut. 1993), czynnik SP1 (CORNWELL i SMITH 1993a) oraz dwa inne niezidentyfikowane dotąd białka jądrowe (YU i współaut. 1993).

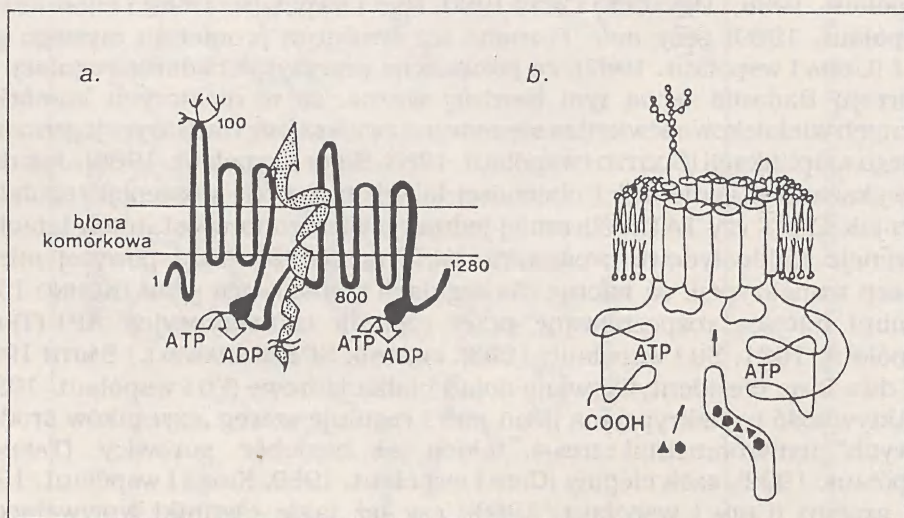
Aktywność transkrypcyjna genu *mdr1* reguluje szereg „czynników środowiskowych” (environmental stress), takich jak niedobór surowicy (TANIMURA i współaut. 1992), szok cieplny (CHIN i współaut. 1989, KIOKA i współaut. 1992), jony arsenu (CHIN i współaut. 1989), czy też takie czynniki wpływające na różnicowanie się komórek, jak na przykład kwas retinowy czy maślan sodu (BATES i współaut. 1989). Ponadto, ekspresję genu *mdr1* mogą stymulować różne hormony sterydowe (ALTUVIA i współaut. 1993, PIEKARZ i współaut. 1993, FARDEL i współaut. 1993, ARCECI i współaut. 1990). Aktywację genu *mdr* mogą również powodować leki przeciwnowotworowe, na przykład antracykliny, czy alkaloidy usuwane z komórek przez glikoproteinę P (KOHNO i współaut. 1989, ASAKUNO i współaut. 1994), jak też leki nie transportowane przy jej udziale (cis-platyna, cytoarabina, ametopteryna, 5-fluorouracyl; CHAUDHARY i RONINSON 1993). Modulację aktywności promotora ludzkiego genu *mdr1* wywołują także onkogeny *raf* i *ras* oraz gen supresorowy *p53* (CORNWELL i SMITH 1993b, CHIN i współaut. 1992). Wskazuje to na możliwości zmian stopnia oporności komórek podczas

progresji nowotworu. Doniesiono również o regulacyjnym wpływie składu i struktury przestrzennej macierzy pozakomórkowej (extracellular matrix) na poziom ekspresji genu *mdr* w hodowanych *in vitro* szczurzych hepatocytach (SCHUETZ i SCHUETZ 1993).

Występowanie i budowa glikoproteiny P

Produkt ekspresji genu *mdr1*, czyli glikoproteina P, jest nie tylko w błonach komórek nowotworowych. Występuje ona także w błonach powierzchniowych prawidłowych komórek, które przylegają do kompartmentów wydzielniczych („excretory compartments”), na przykład w kanalikach żółciowych, nerkowych oraz w nabłonkach w przewodzie pokarmowym; w niektórych naczyniach krwionośnych, kanalikach jąder, znajduje się ona także po wewnętrznej stronie błon aparatu Golgiego. Spolaryzowane usytuowanie glikoproteiny P w komórkach wyraźnie przemawia za jej udziałem także w sekrecji naturalnych metabolitów i toksyn (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1989a, GOTTESMAN i PASTAN 1993, GROS i BUSCHMAN 1993).

„Prototypowa” glikoproteina P, kodowana przez myszy gen *mdr1*, przedstawiona jest na rycinie 7 (GOTTESMAN i PASTAN 1988). Polipeptyd ten, zbudowany z 1276 aminokwasów, odznacza się bardzo dużą metaboliczną stabilnością



Ryc. 7. Struktura glikoproteiny P.

a) Łańcuch polipeptydowy ludzkiej glikoproteiny P, przedstawiony jako wytyluszczona linia ciągła, cyfry oznaczają pozycje aminokwasów. Zaznaczono miejsca wiązania ATP po cytoplazmatycznej stronie błony oraz fragmenty łańcuchów węglowodanowych (cienką linią) dołączonych do pierwszej pętli polipeptydu na zewnątrz błony komórkowej. Zakropkowana strzałka oznacza drogę przejścia usuwanego związku przez hipotetyczny kanał błonowy (wg DIETEL 1991); b) model glikoproteiny P jako energozależnej pompy tworzącej kanał w błonie komórkowej. Zaznaczono w postaci cylindrów 12 transbłonowych domen, fragment węglowodanowy dołączony do peptydu (—) oraz dwa miejsca wiązania ATP. Związki (pełne wielokąty), które dostały się do komórki mogą być usuwane przez otwór kanału bądź bezpośrednio, bądź po związaniu z hipotetycznym białkiem nośnikowym (—) (wg Bradley i współaut. 1988, zmodyf.).

(okres półtrwania 348 h; RICHERT i współaut. 1988, YOSHIMURA i współaut. 1989). Można w nim wyróżnić dwa obszary o bardzo dużej homologii. Każdy z nich zawiera duży cytoplazmatyczny fragment hydrofilowy oraz domenę hydrofobową. W każdym fragmencie hydrofilowym znajduje się miejsce wiązania ATP, a każda domena hydrofobowa zawiera sześć segmentów tworzących trzy pętle przebijające błonę komórki. Aminokwasy tworzące zewnątrz błonową część pierwszej pętli od N-końca peptydu są glikozylovane. Sekwencje aminokwasowe homologiczne z miejscem wiążącym ATP w glikoproteinie P znajdują się także w wielu permeazach, to jest białkach periplazmatycznych, transportujących drobnocząsteczkowe związki, a występujących także w nabłonkowych komórkach pacjentów z mukowiscydozą (AMES i współaut. 1992, TREZISE i współaut. 1992).

Przypuszczalne mechanizmy działania glikoproteiny P

Zastosowano różnorodne genetyczne, biochemiczne i fizjologiczne podejścia do badań mechanizmu działania glikoproteiny P, traktowanej jako „pompa” wytransportowująca lek na zewnątrz komórek (ryc. 7). Postuluje się, że 12 transbłonowych fragmentów, przedstawionych jako cylindry zanurzone w dwuwarstwie lipidowej, tworzy w błonie kanał. Zakłada się, że związki, które dostały się do komórek na drodze dyfuzji są usuwane przez kanał bezpośrednio bądź też pośrednio, w kompleksach z cytoplazmatycznymi białkami nośnikowymi na koszt energii uwalnianej w czasie hydrolizy ATP. W czasie usuwania leku mają zachodzić zmiany allosteryczne w glikoproteinie P. Obecnie nie ma już wątpliwości, że glikoproteina P jest ATP-azą (HAMADA i TSURUO 1988a i b, DOIGE i współaut. 1992, GROS i BUSCHMAN 1993), która może ulegać inaktywacji w wyniku określonych mutacji, nawet tylko w jednym miejscu wiązania ATP (AZZARIA i współaut. 1989). Ten ostatni wynik wskazuje na niezbędność dwóch nienaruszonych miejsc wiązania nukleotydu do prawidłowego funkcjonowania tej ATPazy. Czy inne trinukleotydy mogą zastąpić ATP jako źródło energii jest, jak dotąd, niejasne (LELONG i współaut. 1992). Dokonana w ostatnich latach rekonstytucja glikoproteiny P w komórkach drożdży (UEDA i współaut. 1993) i w pęcherzykach błonowych (SHAROM i współaut. 1993, SHAPIRO i LING 1994) oraz opisane funkcjonowanie tego układu jako pompy usuwającej lek z pęcherzyków na koszt hydrolizy ATP ostatecznie dokumentuje słuszność hipotezy o takiej funkcji glikoproteiny P.

W hipotezie tej zakłada się, że usuwany lek przedostaje się przez kanał glikoproteiny P od strony cytoplazmy, a więc ze środowiska hydrofilnego. Zараzеm wiadomo, że związki wywołujące oporność wielolekową są bardzo lipofilne i znaczna ich część może nie przedostawać się przez błonę komórkową do wnętrza komórki. Można więc przypuszczać, że wchodzą one w kontakt z kanałem transporterów pozostając w obrębie błony. Wysiunięto również atrakcyjne przypuszczenie, że leki te w ogóle nie przedostają się do cytoplazmy, a do ich efektywnego usuwania z błony dochodzi wskutek działania glikoproteiny P jako flipazy odpowiedzialnej za przemieszczenia lipidów z wewnętrznej do zewnętrznej warstwy lipidowej błony komórkowej (HIGGINS i GOTTESMAN 1992).

Trudna do wytłumaczenia, jak dotąd, jest bardzo mała specyficzność substratowa glikoproteiny P. W związku z tym była wysuwana hipoteza postulująca, że substraty usuwane z komórek przy udziale glikoproteiny P miały być we-

wnątrzkomórkowo „znakowane”, na przykład przez dołączanie do nich glutationu dzięki aktywności transferaz glutationowych (ISHIKAWA 1990, WEST 1990). Za hipotezę tą przemawia udział nośnika błonowego w usuwaniu z komórek związków skoniugowanych z glutationem i to także w procesie zależnym od ATP. Dyskutowano nawet możliwość, że powyższy nośnik i glikoproteina P są identyczne. Jednakże wydaje się, że są to odrębne błonowe jednostki transportujące, wykazujące specyficzność w stosunku do kationowych substratów w przypadku glikoproteiny P i anionowych kompleksów z glutationem usuwanych przy udziale odrębnego nośnika.

Nasuwa się pytanie, czy w cząsteczce glikoproteiny P można wyróżnić określone regiony uczestniczące w wiązaniu substratów. Wydaje się, że w wiązaniu substratów mogą uczestniczyć aminokwasy znajdujące się w pierwszym hydrofobowym fragmencie glikoproteiny P, a mianowicie aminokwas znajdujący się w pozycji 185 (CHOI i współaut. 1988). Są też inne dane wskazujące na udział w wiązaniu i usuwaniu leków także aminokwasów znajdujących się przede wszystkim w szóstym (DEVINE i współaut. 1992) a także jedenastym (KAJLI i współaut. 1993) transbłonowym fragmencie glikoproteiny P.

Regulacja funkcjonowania glikoproteiny P

Funkcjonowanie glikoproteiny P regulują w znacznym stopniu modyfikacje posttranslacyjne, takie jak fosforylacja i glikozylacja. Szczególnie istotna wydaje się fosforylacja. Stwierdzono, że glikoproteina P podlega cyklom fosforylacji i defosforylacji przy udziale kinazy A, jak i kinazy C, przy czym fosforylowane są przede wszystkim reszty serynowe obecne w peptydzie łączącym obie części glikoproteiny (FINE i współaut. 1988, MA i współaut. 1991, ORR i współaut. 1993, CHAMBERS i współaut. 1992, 1994). Zagadnienie związku stopnia ufosforylowania glikoproteiny P z jej funkcjonowaniem, ocenianym na podstawie akumulacji leków w komórkach opornych, jest przedmiotem bardzo licznych badań i równie licznych kontrowersji. W przypadku szeregu komórek dokumentowano, że hyperfosforylacja glikoproteiny P zdaje się pociągać za sobą spadek jej aktywności (SATO i współaut. 1990, EPAND i STAFFORD 1993). Jednak szereg nowych danych przemawia za tym, że zwiększeniu stopnia fosforylacji glikoproteiny P towarzyszy wzmożenie jej aktywności.

W 1992 roku wysunięto hipotezę, że podwyższona aktywność glikoproteiny P, wykazywana po zwiększeniu stopnia jej ufosforylowania, może mieć związek z aktywacją przez szereg leków błonowej fosfolipazy C, katalizującej rozpad fosfatydyloinozytolu do IP₃ i diacyloglicerolu (DAG) (HAIT i AFTAB 1992). Wzrost stężenia w błonie DAG miałby wywoływać z kolei translokację kinazy C w pobliże glikoproteiny P, gdzie następowałaby fosforylacja transportera i jego uaktywnienie. Usunięcie leku z komórki inaktywowałoby fosfolipazę C, a specyficzne fosfatazy (aktywowane jonami wapnia uwalnianymi z endoplazmatycznego retikulum pod wpływem IP₃) miałyby przeprowadzać defosforylację glikoproteiny P. Szereg obserwacji wskazuje, że być może w przypadku niektórych leków i pewnych komórek proponowany mechanizm przekazywania wewnątrzkomórkowego sygnału, prowadzący do aktywacji glikoproteiny P, może być prawdziwy. Świadczy o tym między innymi zwiększenie poziomu DAG w błonach komórek pod wpływem doksorubicyny (TRITTON i współaut. 1991), aktywacja kinazy C

przez estry forbolu lub doksorubicynę (FINE i współaut. 1988, CHAMBERS i współaut. 1992, OHKAWA i współaut. 1994) i jednocześnie pojawianie się oporności wielolekowej, a także aktywacja ekspresji genu *mdr* przez agonistów kinazy C (CHAUDHARY i RONINSON 1990, 1993).

Postuluje się także, że związanie EGF z receptorami na błonie komórek opornych wielolekowo może modulować stopień ich oporności na niektóre leki (KWOK i SUTHERLAND 1991). Jednakże, jak dotąd, brak jest spójnej hipotezy wyjaśniającej powiązania pomiędzy związaniem EGF, liczbą jego powierzchniowych receptorów i poziomem oporności. Postulowana jest zarówno aktywacja przez EGF fosfolipazy C i kinazy białkowej C, wywołującą następczą fosforylację glikoproteiny P, jak również wpływ EGF na intensywność internalizacji fragmentów błon (membrane-recycling) i przebieg endocytozy (KWOK i SUTHERLAND 1991, MEYERS i współaut. 1993).

Czy tylko działanie glikoproteiny P odpowiada za niski poziom leków w komórkach opornych?

Niewątpliwie ogólnie jest przyjęty pogląd, że komórki odporne wielolekowo, hodowane w środowisku zawierającym leki, odznaczają się niższym wewnątrzkomórkowym poziomem leków niż komórki wrażliwe. Występują natomiast kontrowersje co do tego, czy fakt ten wynika jedynie z aktywnego usuwania leków z komórek przy udziale glikoproteiny P i/lub innych błonowych glikoprotein. Szereg danych wskazuje bowiem, że i inne mechanizmy mogą przyczyniać się do obniżonej akumulacji leków w tych komórkach. Rozpatruje się tu obserwowany nierzadko w procesie pasywnej dyfuzji lub transportu nośnikowego obniżony transport leków do komórek. Rozważa się też nagromadzanie się leków w różnego typu pęcherzykach cytoplazmatycznych o kwaśnym pH — takich jak lizosomy, endozomy, pęcherzyk aparatu Golgiego, które nie są miejscami „docelowymi” działania leku, a następnie usuwanie ich z komórek podczas egzocytozy (BECK 1987). Ostatnio ponownie jest podnoszone zagadnienie znaczenia zmian pH w różnych kompartmentach komórki jako czynnika uczestniczącego w kontroli oporności wielolekowej komórek, jednakże wnioski nie są jednoznaczne (ALTENBERG i współaut. 1993, SIMON i współaut. 1994).

„ATYPOWA” OPORNOŚĆ WIELOLEKOWA

Nie zawsze oporność wielolekową komórek można wytłumaczyć nadekspresją genu *mdr1* i zwiększonym poziomem aktywności błonowej glikoproteiny P (BECK i współaut. 1987, GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1989a). W przypadkach takich mówi się o „atypowej” oporności wielolekowej. Termin ten jest równie nieprecyzyjny, jak „typowa” oporność wielolekowa, ponieważ nie ma jej uniwersalnego wzorca. Stosunkowo najlepiej zostały scharakteryzowane dwa mechanizmy atypowej oporności wielolekowej:

- mechanizm „detoksyfikacyjny”, w którym znoszenie cytotoksyczności leku ma związek ze zmianami w ekspresji i aktywności transferaz glutationowych i ze zmianami wewnątrzkomórkowego poziomu glutationu,
- mechanizm „enzymatyczny” polegający na zmianach właściwości i poziomu topoizomerazy II.

Zwiększenie aktywności transferaz glutationowych, enzymów katalizujących powstawanie połączeń leków ze zredukowanym glutationem, wydaje się być

szczególnie istotne w przypadku leków generujących wolne rodniki, na przykład antracyklin. Powiązania wewnątrzkomórkowego poziomu zredukowanego glutationu ze stopniem oporności komórek są nadal przedmiotem intensywnych badań i kontrowersji, gdyż zahamowanie syntezy glutationu nie zawsze prowadzi do uwrażliwienia komórek na podawane leki (COLE i współaut. 1990, KRAMER i współaut. 1988, ROMINE i KESSEL 1986).

Aktywność topoizomerazy II, enzymu niezbędnego do prawidłowej replikacji DNA (SZMIGIERO 1988), hamuje szereg leków przeciwnowotworowych, w tym doksorubicyna, etopozyd, tenipozyd czy amsakryna. Liczne komórki odporne wielolekowo charakteryzuje bądź to obniżony poziom tego enzymu, bądź też obecność enzymu o obniżonym powinowactwie do stosowanych leków (GLISSON i współaut. 1987, DANKS i współaut. 1988). W komórkach takich nie stwierdza się na ogół zmian w stopniu akumulacji leków i ekspresji glikoproteiny P (GLISSON i współaut. 1987, POTMESIL i współaut. 1987). Wykrywa się w nich natomiast mniejszą niż w komórkach wrażliwych liczbę uszkodzeń DNA, w tym także maskowanych przez białka pęknięć nici DNA (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1989a, ZIJLSTRA i współaut. 1987) oraz szybszy niekiedy przebieg naprawy uszkodzonego DNA (SUPINO i współaut. 1988). Opisywano także komórki odporne wielolekowo, które cechuje zarówno zmiana poziomu i właściwości topoizomerazy II, jak i wzrost poziomu glikoproteiny P i zaburzenia cyklu glutationowego (ZIJLSTRA i współaut. 1987, SPIRIDONIDIS i współaut. 1989).

Ostatnio doniesiono, że ludzkie komórki nowotworowe prostaty (PC3R), wykazujące wrodzoną oporność na liczne leki przeciwnowotworowe, charakteryzuje także zwiększona ekspresja protoonkogenów *c-jun*, *c-myc* i *H-ras* (YAMAZAKI i współaut. 1994). Natomiast nie wykryto w tych komórkach zmian ekspresji ani genu *mdr1*, ani też topoizomerazy II. Nie wiadomo, jak dotąd, na czym polega rola produktów tych genów we wrodzonej oporności komórek.

INNE ZMIANY BIOCHEMICZNE W KOMÓRKACH OPORNYCH WIELOLEKOWO

Szereg innych biochemicznych zmian może odróżniać komórki odporne wielolekowo od komórek wrażliwych. Może to być przede wszystkim pojawianie się innych, niż glikoproteina P, glikoprotein błonowych (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1989a), w tym wykrytej ostatnio błonowej glikoproteiny MRP (MDR-related-protein), wiążącej ATP (GRANT i współaut. 1994, ZAMAN i współaut. 1993) przypuszczalnie uczestniczącej, jako transbłonowy transporter, w usuwaniu leków z opornych komórek płucnych. Ewentualny związek z opornością podwyższonego poziomu białka p110, towarzyszącego wewnątrzkomórkowym pęcherzykowym zmianom komórek nabłonkowych tkanek chronicznie poddawanych działaniu czynników toksycznych, jest nadal badany (SCHEPER i współaut. 1993). Wykazywane są również pewne zmiany składu i metabolizmu lipidów błonowych w komórkach opornych (RAMU i współaut. 1984). Duże zainteresowanie wzbudza obecność innych białek cytosolowych, takich jak na przykład sorcyna, małe (19–22 kDa), kwaśne białko wiążące wapń (HAMADA i współaut. 1988c, MEYERS i współaut. 1987, GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1989a). W niektórych komórkach opornych wielolekowo sorcyna może nawet stanowić główne białko wiążące wapń i wpływać znacząco na metabolizm wapniowy komórek. Nadprodukcja sorcyny

jednak nie jest ani wystarczającym, ani niezbędnym warunkiem do wystąpienia oporności i jest najprawdopodobniej przypadkowa, wynikająca z usytuowania genu *sorcyny* w pobliżu genu *mdr*. Może natomiast mieć znaczenie dla modulowania i utrzymywania fenotypu komórek opornych.

Z dokonanego przeglądu wynika, że badania komórek opornych wielolekowo pozwalają na wykrycie wielu mechanizmów, dzięki którym komórki bronią się przed szkodliwym działaniem leków. Z klinicznego punktu widzenia jest ważne nie tylko poznanie ich, lecz także stwierdzenie kolejności ich pojawiania się po ekspozycji komórek na lek. Jeśli bowiem udałooby się wykryć różnice w kolejności i intensywności ich pojawiania się w komórkach opornych i wrażliwych, mogłoby to stanowić „miejsce docelowe” działania innych leków stosowanych do zapobiegania pojawianiu się oporności.

MODULOWANIE OPORNOŚCI WIELOLEKOWEJ KOMÓREK

Pierwsze doniesienie o farmakologicznej modulacji stopnia oporności wielolekowej ukazało się w 1981 roku (TSURUO i współaut. 1981). Wykazano wówczas, że werapamil, inhibitor kanałów wapniowych oraz trifluoroperazyna, antagonistą kalmoduliny, potęgują antyproliferacyjne działanie winkrystyny na mysie komórki leukemiczne i zwiększają w nich wewnątrzkomórkowe stężenie (akumulację) leku. Od tego czasu datuje się olbrzymie zainteresowanie opracowywaniem strategii modulowania oporności, przede wszystkim wynikającej z nadprodukcji glikoproteiny P (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1989b, KAYE 1993, KELLEN 1993, LING 1989, BECK 1990). Badania koncentrują się na związkach chemicznych, tak zwanych „uczulaczach” (chemosensitizers), czy też „modulatorach oporności” (resistance modifiers), które wpływają na poziom akumulacji leków w komórkach opornych nie potęgując natomiast ich cytotoksyczności w stosunku do komórek wrażliwych (FORD i HAIT 1990, BELLAMY i współaut. 1990).

Poznane do dziś modulatory oporności można zaliczyć do kilku podstawowych klas: nietoksycznych analogów leków cytotoksycznych — antracyklin i alkaloidów, inhibitorów kanałów wapniowych, antagonistów kalmoduliny, analogów hormonów, czy też różnego typu hydrofobowych, kationowych związków (w tym szeregu amin i jonoforów). Jako modulatory oporności wielolekowej można traktować też związki obniżające wewnątrzkomórkowy poziom ATP (CITRO i współaut. 1991) oraz związki wpływające na biofizyczne właściwości błon (CALLAGHAN i współaut. 1993). Strukturalnie modulatory oporności nie są do siebie podobne, jednakże są to na ogół związki lipofilne, heterocykliczne, amfipatyczne o bardzo różnym działaniu farmakologicznym (ZAMORA i współaut. 1988).

Równie liczne, jak rodzaje modulatorów oporności, są mechanizmy ich działania na komórki odporne wielolekowo. Jako podstawowe mechanizmy działania modulatorów oporności wymienić trzeba:

- interakcję z glikoproteiną P i hamowanie jej działania,
- hamowanie procesów metabolicznych, których przebieg zależny jest od jonów wapnia,
- zmiany struktury i płynności błon,
- hamowanie aktywności kinazy białkowej C,

- hamowanie funkcji lizosomów,
- zmiany wewnątrzkomórkowej kompartmentacji leków.

Najbardziej obiecującym obecnie podejściem do przewycięzania oporności wydają się być, przynajmniej teoretycznie, ingerencje na drodze inżynierii genetycznej w strukturę i aktywność transkrypcyjną genu *mdr*, prowadzące do obniżenia syntezy glikoproteiny P. Są próby wprowadzenia do genu *mdr* antysensownych nukleotydów (THIERRY i współaut. 1993), stosowania rybozymu specyficznego unieczynnającego mRNA i hamującego syntezę glikoproteiny P (KOBAYASHI i współaut. 1994, KIEHNTOPF i współaut. 1994), myśli się też o specyficznym blokowaniu w genie *mdr* miejsc inicjacji transkrypcji (KELLEN 1993). Wysuwane są też sugestie, że istotne dla przewycięzania oporności mogą być zaburzenia w tworzeniu czynnika transkrypcyjnego AP1 działaniem rybozymu antyfos (DIETEL 1993). Należy jednak zdawać sobie sprawę, że większość badań mechanizmów działania modulatorów oporności jest prowadzona *in vitro*. Nie można zatem przenosić bezpośrednio wyników uzyskanych w tego typu badaniach na sytuację *in vivo*. Trzeba się liczyć z wystąpieniem ogólnej toksyczności stosowanych związków, gdyż wpływają one na bardzo różne funkcje metaboliczne komórek, jak również z pojawianiem się szkodliwych objawów ubocznych, wynikających, na przykład, z zahamowania funkcjonowania glikoproteiny P w komórkach prawidłowych.

Są też czynione próby modulowania oporności przez podawanie przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko powierzchniowym epitopom cząsteczki glikoproteiny P. Szereg doniesień dokumentuje bowiem pozytywny wpływ takich przeciwciał, wolnych lub skoniugowanych z toksynami, na przeżywalność zwierząt z różnymi nowotworami (na przykład BROXTERMAN i współaut. 1988, BECK 1991). Nie wiadomo jednak jeszcze, czy przeciwciała skierowane przeciwko glikoproteinie P znajdują zastosowanie w terapii nowotworów ludzkich. Nie rozpoznają one selektywnie glikoproteiny P obecnej w błonach komórek nowotworowych, a trudno jest w obecnej chwili przewidzieć jakie konsekwencje dla pacjentów będzie miało unieczynnienie przez przeciwciała funkcjonowania glikoproteiny P obecnej w błonach komórek prawidłowych.

Stwierdzenie, że wiele czynników przeciwdziała oporności wywołanej nadprodukcją glikoproteiny P, stwarza jednak nadzieję na możliwość modulacji tej oporności u pacjentów z nowotworami.

Znaczne ilości glikoproteiny P wykrywa się bowiem w niewrażliwych na chemioterapię nowotworach nerek, nadnerczy, jelita grubego i płuc, a więc w narządach, które charakteryzują się także i w normalnym stanie podwyższonym poziomem glikoproteiny P (LING 1989, KAYE 1993). Zwiększone jej ilości są znajduwane także w pobieranych od pacjentów różnego typu komórkach białaczkowych (GOLDSTEIN i współaut. 1989). Pomimo intensywnych badań klinicznych (GOLDSTEIN i współaut. 1989, ARCECI 1993) nie ma jednak jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, na ile obecność zwiększonych ilości glikoproteiny P w błonach komórek nowotworowych może przesądzać o skuteczności chemioterapii (ARCECI 1993, KAYE 1993, LING 1989, POUPON 1994). Rozwój technik stosowanych do wykrywania niewielkich nawet zmian w ekspresji genu *mdr1*, w tym technik PCR, a także metod umożliwiających szybkie badania funkcjono-

wania glikoproteiny P w komórkach opornych, niewątpliwie stają się coraz bardziej pomocne do monitorowania oporności komórek.

UWAGI KOŃCOWE

W artykule omówiono różnorodność biochemicznych mechanizmów uczestniczących w powstawaniu oporności na liczne leki nowotworowe. Przedstawiono przykłady upośledzonego pobierania lub zwiększonego wydalania leków, zwiększonego poziomu i zmian właściwości enzymów docelowych, jak również zmienionych aktywności enzymów aktywujących lub inaktywujących leki. Zrozumienie tych mechanizmów, jak też i próby ich przewycięzania stały się możliwe dzięki rozwojowi i zastosowaniu technik biologii molekularnej, w szczególności ukierunkowanej mutagenezy i metod badania struktury i regulacji ekspresji genów. Szczególnie dużo uwagi poświęcono omówieniu funkcjonowania glikoproteiny P, której nie wszystkie funkcje w komórce z pewnością zostały jeszcze poznane. Ostatnio ukazały się bowiem doniesienia o powiązaniach między pojawianiem się glikoproteiny P i ujawnianiem się w błonach komórek aktywności kanału chlorkowego (GILL i współaut. 1992, VALVERDE i współaut. 1992, RASOLA i współaut. 1994), coraz częściej też sugeruje się udział glikoproteiny P w procesach metastazy (WEINSTEIN i współaut. 1991, FERRANDIS i współaut. 1994). Ten intrygujący związek glikoproteiny P z inwazyjnością, chociażby tylko niektórych komórek nowotworowych, stanowi wyzwanie i wytycza nowy kierunek badań tego wielofunkcyjnego niezwykłego białka.

MECHANISMS OF CELLULAR RESISTANCE TO ANTICANCER DRUGS

Summary

Mechanisms of cellular resistance to anticancer drugs are outlined. They may be manifested as changes in the concentrations and properties of intracellular "targets", changes in the drug transport characteristics, or be connected with drug activation or inactivation. The detailed description of these mechanisms is given, taking as examples the resistance to antimetabolites (antifolates and fluoropyrimidines), to alkylating drugs (cis-platinum) and to different heterocyclic compounds responsible for the occurrence of the so-called multidrug resistance. The strategies used for overcoming drug resistance have also been discussed.

LITERATURA

- ALLEGRA C. J., CHABNER B. A., DRAKE J. C., LUTZ R., RODBOARD D., JOLIVET J., 1985a. *Enhanced inhibition of thymidylate synthase by methotrexate polyglutamates*. J. Biol. Chem. 260, 9720-9726.
- ALLEGRA C. J., DRAKE J. C., JOLIVET J., CHABNER B. A., 1985b. *Inhibition of phosphoribosyl-aminimidazole-carboxamide transformylase by methotrexate and dihydrofolic acid polyglutamates*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4882-4885.
- ALTENBERG G. A., YOUNG G., HORTON J. K., GLASS D., BELLI J. A., REUSS, D. L., 1993. *Changes in intracellular or extracellular pH do not mediate P-glycoprotein-dependent multidrug resistance*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90, 9735-9738.
- ALTUVIA S., STEIN W. D., GOLDENBERG S., KANE S. E., PASTAN I., GOTTESMAN M. M., 1993. *Targeted disruption of the mouse *mdr1b* gene reveals that steroid hormones enhance *mdr* gene expression*. J. Biol. Chem. 268, 27127-27132.

- AMES G. F. L., 1992. *Bacterial periplasmic permeases as model systems for the superfamily of traffic ATPases which includes MDR and CFTR*. Int. Rev. Cytol., 137a, 1-35.
- ARCECI R. J., 1993. *Clinical significance of P-glycoprotein in multidrug resistance malignancies*. Blood 81, 2215-2222.
- ARCECI R. J., BOLAS F., RAPONI R., HORWITZ S. B., HAUSMAN D., CROOP J. M., 1990. *Multidrug resistance gene expression is controlled by steroid hormones in the secretory epithelium of the uterus*. Mol. Reprod. & Develop. 25, 101-109.
- ASAKUNO K., KOHNO K., UCHUMI T., KUBO T., SATO S., ISONO M., KUWANO M., 1994. *Involvement of a DNA binding protein, MDR-NF1/YB-1, in human MDR1 gene expression by actinomycin D*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 199, 1428-1435.
- AZZARIA M., SCHURR E., GROS P., 1989. *Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide — binding sites of the mdr1 gene abolish its ability to confer multidrug resistance*. Mol. Cell Biol. 9, 5289-5297.
- BALIŃSKA M., 1988. *Metabolizm ametoptyryny w komórkach ssaków*. Post. Biochem. 34, 417-427, 1988.
- BAPAT A. R., ZAROW C., DANENBERG P. V., 1983. *Human leukemic cells resistant to 5-fluoro-2'-deoxyuridine contain a thymidylate synthetase with lower affinity for nucleotides*. J. Biol. Chem. 258, 4130-4136.
- BASHIR I., SIKORA K., FOSTER C. S., 1993. *Multidrug resistance and behavioural phenotype of cancer cells*. Cell Biol. Intern., 17, 907-917.
- BATES S. E., MICKLEY L. A., CHEN Y., RICHERT N., RUDICK J., BIEDLER J. L., FOJO A. T., 1989. *Expression of a drug resistance gene in human neuroblastoma cell lines: modulation by retinoic acid-induced differentiation*. Mol. Cell Biol. 9, 4337-4344.
- BECK W. T., 1987. *The cell biology of multiple drug resistance*. Biochem. Pharmacol. 36, 2879-2887.
- BECK W. T., 1990. *Strategies to circumvent multidrug resistance due to P-glycoprotein or to altered DNA topoisomerase II*. Bull. Cancer 77, 1131-1141.
- BECK W. T., 1991. *Do anti-P-glycoprotein antibodies have a future in the circumvention of multidrug resistance?* J. Nat. Cancer Inst. 83, 1364-1366.
- BECK W. T., CIRTAIN M. C., DANKS M. K., FELSTED R. L., SAFA A. R., WOLVERTON J. S., SUTTLE D. P., TRENT J. M., 1987. *Pharmacological molecular and cytogenetic analysis of „atypical” multidrug-resistant human leukemic cells*. Cancer Res. 47, 5455-5460.
- BELLAMY W. T., DALTON W. S., DORR R. T., 1990. *The clinical relevance of multidrug resistance*. Cancer Invest. 8, 545-560.
- BERGER S. H., JENH C. H., JOHNSON L. F., BERGER F. G., 1985. *Thymidylate synthase overproduction and gene amplification in fluorodeoxyuridine-resistant human cells*. Mol. Pharmacol. 28, 461-467.
- BERNAL S. D., SPEAK J. A., BOEHEIM K., DREYFUSS A. I., TEICHER B. A., ROSOWSKY A., TSAO S. W., WONG Y. C., 1990. *Reduced membrane protein associated with resistance of human squamous carcinoma cells to methotrexate and cis-platinum*. Mol. Cell. Biochem. 95, 61-70.
- BERTINO J., 1993. *Ode to methotrexate*. J. Clin. Oncol., 11, 5-14.
- BIEDLER J. L., 1994. *Drug resistance: genotype versus phenotype: thirty second G. H. A. Clowes memorial award lecture*. Cancer Res. 54, 666-678.
- BLUME S. W., SNYDER R. C., RAY R., THOMAS S., KOLLER C. A., MILLER D. M., 1991. *Mithramycin inhibits SP1 binding and selectively inhibits transcriptional activity of the dihydrofolate reductase gene in vitro and in vivo*. J. Clin. Invest. 88, 1613-1621.
- BRADLEY G., JURANKA P. F., LING V., 1988. *Mechanism of multidrug resistance*. Biochim. Biophys. Acta 948, 87-128.
- BROWN R., CLUGSTON C., BURNS P., EDLIN A., VASEY P., VOJTESEK B., KAYE S. B., 1993. *Increased accumulation of p53 protein in cisplatin-resistant ovarian cell lines*. Int. J. Cancer 55, 678-684.
- BROXTERMAN H. J., KUIPER C. M., SCHUURHUIS G. J., TSURUO T., PINEDO H. M., LANKELMA J., 1988. *Increase of daunorubicin and vincristine accumulation in multidrug resistant human ovarian carcinoma cells by a monoclonal antibody reacting with P-glycoprotein*. Biochem. Pharmacol. 37, 2389-2393.
- CALLAGHAN R., STAFFORD A., EPAND R. M., 1993. *Increased accumulation of drugs in a multidrug resistant cell line by alteration of membrane biophysical properties*. Biochim. Biophys. Acta 1175, 277-282.
- CANMAN C. E., TANG H. Y., NORMALE D. P., LAWRENCE T. S., MAYBAUM J., 1992. *Variations in patterns of DNA damage induced in human colorectal tumor cells by 5-fluorodeoxyuridine — implications for mechanisms of resistance and cytotoxicity*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10474-10478.
- CANMAN C. E., LAWRENCE T. S., SHEWACH D. S., TANG H. Y., MAYBAUM J., 1993. *Resistance to fluorodeoxyuridine-induced DNA damage and cytotoxicity correlates with an elevation of deoxyu-*

- ridine triphosphatase activity and failure to accumulate deoxyuridine triphosphate. *Cancer Res.* 53, 5219-5224.
- CHABNER B. A., ALLEGRA C. J., CURT G. A., CLENDENIN N. J., BARAN J., KOIZUMI S., DRAKE J. C., JOLIVET J., 1985. Polyglutamation of methotrexate: is methotrexate a prodrug? *J. Clin. Invest.* 76, 907-912.
- CHAMBERS T. C., ZHENG B., KUO J. F., 1992. Regulation by phorbol ester and protein kinase C inhibitors, and by a protein phosphate inhibitor (okadaic acid), of P-glycoprotein phosphorylation and relationship to drug accumulation in multidrug-resistant human KB cells. *Mol. Pharmacol.* 41, 1008-1015.
- CHAMBERS T. C., POHL J., GLASS D. B., KUO J. F., 1994. Phosphorylation by protein kinase C and cyclic AMP-dependent protein kinase of synthetic peptides derived from the linker region of human P-glycoprotein. *Biochem. J.* 299, 309-315.
- CHAUDHARY P. M., RONINSON I. B., 1990. Activation of MDR1 (P-glycoprotein) gene expression in human cells by protein kinase C agonists. *Oncol. Res.* 4, 281-290.
- CHAUDHARY P. M., RONINSON I. B., 1993. Induction of multidrug resistance in human cells by transient exposure to different chemotherapeutic drugs. *J. Nat. Cancer Inst.* 85, 632-639.
- CHEN M., SHIMADA T., MOULTON A. D., CLINE A., HUMPHRIES R. K., MAIZEL J., NIENHUIS A. W., 1984. The functional human dihydrofolate reductase gene. *J. Biol. Chem.* 259, 3933-3943.
- CHIN K. V., TANAKA S., DARLINGTON G., PASTAN I., GOTTESMAN M. M., 1989. Heat shock and arsenite increase expression of the multidrug resistance (MDR1) gene in human renal carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 265, 221-226.
- CHIN K. V., UEDA K., PASTAN I., GOTTESMAN M. M., 1992. Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. *Science* 255, 459-462.
- CHOI K., CHEN C. J., KRIEGLER M., RONINSON I. B., 1988. An altered pattern of cross-resistance in multidrug resistance human cells results from spontaneous mutations in the MDR1 (P-glycoprotein) gene. *Cell* 53, 519-529.
- CHU G., 1994. Cellular responses to cisplatin. *J. Biol. Chem.* 269, 787-790.
- CITRO G., CUCCO C., VERDINA A., ZUPI G., 1991. Reversal of adriamycin resistance by lonidamine in a human breast cancer cell line. *Br. J. Cancer* 64, 534-536.
- COLE S. P. C., DOWNES H. F., MIRSKI S. E. L., CLEMENTS D. J., 1990. Alterations in glutathione and glutathione-related enzymes in a multidrug resistant small cell lung cancer cell line. *Mol. Pharmacol.* 37, 192-197.
- CORNWELL M. M., SMITH D. E., 1993a. SP1 activates the MDR1 promoter through one of two distinct G-rich regions that modulate promoter activity. *J. Biol. Chem.* 268, 19505-19511.
- CORNWELL M. M., SMITH D. E., 1993b. A signal transduction pathway for activation of the *mdr 1* promoter involves the proto-oncogene *c-ras* kinase. *J. Biol. Chem.* 268, 15347-15350.
- COWAN K. H., GOLDSMITH M. E., RICCIARDONE M. D., LEVINE R., RUBALCABA E., JOLIVET J., 1986. Regulation of dihydrofolate reductase in human breast cancer cells and in mutant hamster cells transfected with a human dihydrofolate reductase minigene. *Mol. Pharmacol.* 30, 69-76.
- DANKS M. K., SCHMIDT C. A., CERTAIN M. C., SUTTLE D. P., BECK WT., 1988. Altered catalytic activity and DNA cleavage by DNA topoisomerase II from human leukemic cells selected for resistance to VM-26. *Biochemistry* 27, 8861-8869.
- DENIS N., KITZIS A., KNUH J., DANTRY F., CORCAS D., 1991. Stimulation of methotrexate resistance and dihydrofolate reductase gene amplification by *c-myc*. *Oncogene* 6, 1453-1457.
- DEVAULT A., GROS P., 1990. Two members of the mouse *mdr* gene family confer multidrug resistance with overlapping but distinct drug specificities. *Mol. Cell. Biol.* 10, 1652-1663.
- DEVINE S. E., LING V., MELERA P. W., 1992. Amino acid substitutions in the sixth transmembrane domain of P-glycoprotein alter multidrug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4564-4568.
- DEVINE S. E., MELERA P. W., 1994. Diversity of multidrug resistance in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 269, 6133-6139.
- DICKER A. P., WALTHAM M. C., VOLKENANDT M., SCHWEITZER B. I., OTTER G. M., SCHMID F. A., SIROTNAK F. M., BERTINO J. R., 1993. Methotrexate resistance in an *in vivo* mouse tumor due to a non-active-site dihydrofolate reductase mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11797-11801.
- DIETEL M., 1991. What's new in cytostatic drug resistance and pathology. *Path. Res. Pract.* 187, 892-905.
- DIETEL M., 1993. Second international symposium on cytostatic drug resistance. *Cancer Res.* 53, 2683-2688.
- DOIGE C. A., YU X., SHAROM F. J., 1992. ATP-ase activity of partially purified P-glycoprotein from multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1109, 149-160.

- DYNAN W. S., SAZAR S., TJIAN R., SCHIMKE T., 1986. *Transcription factor SP1 recognizes a DNA sequence in the mouse dihydrofolate reductase promoter*. Nature 319, 246-248.
- ELWOOD P. C., 1989. *Molecular cloning and characterization of the human folate-binding protein cDNA from placenta and malignant tissue culture (KB) cells*. J. Biol. Chem. 264, 14893-14901.
- ENDICOTT J. E., LING V., 1989. *The biochemistry of P-glycoprotein mediated multidrug resistance*. Ann. Rev. Biochem. 58, 137-171.
- EPAND R. M., STAFFORD A. R., 1993. *Protein kinases and multidrug resistance*. Cancer J. 6, 154-158.
- FARDEL O., LECUREUR V., GUILLOUZO A., 1993. *Regulation by dexamethasone of P-glycoprotein expression in cultured rat hepatocytes*. FEBS Lett. 327, 189-193.
- FARNHAM P. J., SCHIMKE R. T., 1985. *Transcriptional regulation of mouse dihydrofolate reductase in the cell cycle*. J. Biol. Chem. 260, 7675-7680.
- FARNHAM P. J., SCHIMKE T., 1986. *In vitro transcription and delimitation of promoter elements of murine dihydrofolate reductase gene*. Mol. Cell. Biol. 6, 2392-2401.
- FERRANDIS E., DA SILVA J., RIOU G., BENARD I., 1994. *Coactivation of the MDR1 and MYCN genes in human neuroblastoma cells during the metastatic process in the nude mice*. Cancer Res. 54, 2256-2261.
- FINE R. L., PATEL J., CHABNER B. A., 1988. *Phorbol esters induce multidrug resistance in human breast cancer cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 582-586.
- FORD J. M., HAIT W. N., 1990. *Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer*. Pharmacol. Rev. 42, 155-199.
- FUNATO T., YOSHIDA E., JIAO L., TONE T., KASHANI-SABET M., SCANLON K. J., 1992. *The utility of an antisense ribozyme in reversing cisplatin resistance in human carcinomas*. Adv. Enzyme Regul. 32, 195-209.
- FOX M., BOYLE J. M., KINSELLA A. R., 1991. *Nucleoside salvage and resistance to antimetabolite anticancer agents*. Br. J. Cancer 64, 428-436.
- GILL D. R., HYDE S. C., HIGGINS C. F., VALVERDE M. A., MINTERIG G. M., SEPULVEDA F. V., 1992. *Separation of drug transport and chloride channel functions of the human multidrug resistance P-glycoprotein*. Cell 71, 23-32.
- GLISSON B. S., SULLIVAN D. M., GUPTA R., ROSS W. E., 1987. *Mediation of multi-drug resistance in a Chinese hamster ovary cell line by a mutant type II topoisomerase*. NCI Monographs 4, 89-93.
- GOLDSTEIN L. J., GALSHI H., FOJO A., WILLINGHAM M., LAI S. L., GAZDAR A., PIRKER R., GREEN A., CRIST W., BRODEUR G. M., LIEBER M., COSSMAN J., GOTTESMAN M. M., PASTAN I., 1989. *Expression of a multidrug resistance gene in human cancer*. J. Nat. Cancer Inst. 81, 116-124.
- GOTTESMAN M. M., PASTAN I., 1988. *The multidrug transporter, a double-edged sword*. J. Biol. Chem. 263, 12163-12166.
- GOTTESMAN M. M., 1993. *How cancer cells evade chemotherapy: sixteenth Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award lecture*. Cancer Res. 53, 747-754.
- GOTTESMAN M. M., PASTAN I., 1993. *Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter*. Annu. Rev. Biochem. 62, 385-427.
- GRANT C. E., VALDIMARSSON G., HIFNER D. R., ALMQUIST K. C., COLE S. P. C., DEELY R. G., 1994. *Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs*. Cancer Res. 54, 357-361.
- GREM J. L., COLLINS J. M., 1990. *Fluorinated pyrimidines: w Cancer Chemotherapy: principles and practise* (red. B. A. CHABNER, J. M. COLLINS), 180-224, Philadelphia, J. B. Lippincott.
- GROS P., RAYMOND M., BELL J., HOUSMAN D. E., 1988. *Cloning and characterization of a second member of the mouse mdr gene family*. Mol. Cell Biol. 8, 2770-2778.
- GROS P., BUSCHMAN E., 1993. *The mouse multidrug resistance gene family: structural and functional analysis*. Int. Rev. Cytol. 137C, 169-197.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 1977. *Metabolizm aminopreparatów folianu*. Post. Biochem. 23, 559-578.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 1983a. *Molecular mechanisms of cellular resistance to folate analogs*. Biology of Cancer 72, 213-222.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 1983b. *Molekularne mechanizmy oporności komórek na antyfoliany*. Post. Biochem. 29, 167-190.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 1989a. *Oporność wielolekowa komórek nowotworowych — fakty i hipotezy*. Post. Biochem. 35, 513-541.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 1989b. *Modulatory oporności wielolekowej komórek nowotworowych*. Post. Biochem. 35, 543-561.
- HAIT W. N., AFTAB D. T., 1992. *Rational design and pre-clinical pharmacology of drugs for reversing multidrug resistance*. Biochem. Pharmacol. 43, 103-107.

- HAMADA H., TSURUO T., 1988a. Purification of the 170- to 180-kilodalton membrane glycoprotein associated with multidrug resistance. 170- to 180-kilodalton glycoprotein is an ATPase. *J. Biol. Chem.* 263, 1454-1458.
- HAMADA H., TSURUO T., 1988b. Characterization of the ATPase activity of the M_r 170,000 to 180,000 membrane glycoprotein (P-glycoprotein) associated with multidrug resistance in k562/ADM cells. *Cancer Res.* 48, 4926-4932.
- HAMADA H., OKOCHI E., OHARA T., TSURUO T., 1988c. Purification of the M_r 22,000 calcium binding protein (sorcini) associated with multidrug resistance and its detection with monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 48, 3173-3178.
- HAUS O., 1990a. Genetyczne aspekty oporności komórek nowotworowych na cytostatyki. I. Mechanizmy oporności na pojedyncze cytostatyki. *Post. Biol. Komórki* 17, 113-128.
- HAUS O., 1990b. Genetyczne aspekty oporności komórek nowotworowych na cytostatyki. II. Oporność wielolekowa. *Post. Biol. Komórki*, 17, 129-146.
- HENDERSON G. B., 1986. Transport of folate compounds into cells. [W:] *Folates and Pterins* 3, 207-250.
- HEIDELBERGER C., DANENBERG P. V., MORAN R. G., 1983. Fluorinated pyrimidines and their nucleotides. *Adv. Enzymol.* 54, 58-119.
- HIGGINS C. F., GOTTESMAN M. M., 1992. Is the multidrug transporter a flippase? *TIBS* 17, 18-21.
- HSU S. J., COHEN D., KIRSCHNER L. S., 1990. Structural analysis of the mouse *mdr1* a (P-glycoprotein) promoter reveals the basis for differential transcript heterogeneity in multidrug-resistant J774.2 cells. *Mol. Cell Biol.* 10, 3596-3606.
- HSUEH C. T., DOLNICK B. J., 1994. Regulation of folate binding protein gene expression by DNA methylation in methotrexate-resistant KB cells. *Biochem. Pharmacol.* 47, 1019-1027.
- HUENNEKENS F. M., VITOLS K. S., HENDERSON G. B., 1978. Transport of folate compounds in bacterial and mammalian cells. *Adv. Enzymol.* 47, 313-346.
- ISHIKAWA T., 1990. Is the glutathione S-conjugate carrier an *mdr1* gene product? *TIBS* 15, 219-220.
- JASTREBOFF M. M., KEDZIERKA B., RODE W., 1983. Altered thymidylate synthetase in 5-fluorodeoxyuridine — resistant Ehrlich ascites carcinoma cells. *Biochem. Pharmacol.* 32, 2259-2267.
- JEKUNEN A. P., HOM D. K., ALCARAZ J. E., EASTMAN A., HOWELL S. B., 1994. Cellular pharmacology of dichloro(ethylenediamine)platinum (II) in cisplatin-sensitive and resistant human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* 54, 2680-2687.
- KAJIJI S., TALBOT F., GRIZZUTI K., VAN DYKE-PHILLIPS V., AGRETI M., SAFA A. R., GROS P., 1993. Functional analysis of P-glycoprotein mutants identifies predicted transmembrane domain 11 as a putative drug binding site. *Biochemistry* 32, 4185-4194.
- KAMEN B. A., EIBL B., CASHMORE A. R., BERTINO J. R., 1984. Uptake and efficacy of trimetrexate, a non-classical antifolate in methotrexate-resistant leukemia cells in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 33, 1697-1699.
- KAMEN B. A., WANG M. T., STRECKFUSS A. J., PERVEY X., ANDERSON R. G. W., 1988. Delivery of folates to the cytoplasm of MA 104 cells is mediated by a surface membrane receptor that recycles. *J. Biol. Chem.* 263, 13602-13609.
- KASHANI-SABET M., LU Y., LEONG L., HAEDICKE K., SCANLON K. J., 1990. Differential oncogene amplification in tumor cells from a patient treated with cisplatin and 5-fluorouracil. *Eur. J. Cancer* 26, 383-390.
- KAWAI K., KAMATANI N., GEORGES E., LING V., 1990. Identification of a membrane glycoprotein overexpressed in murine lymphoma sublines resistant to cis-diamminedichloroplatinum (II). *J. Biol. Chem.* 265, 13137-13142.
- KAYE S. B., 1993. P glycoprotein (P-gp) and drug resistance — time for reappraisal? *Br. J. Cancer* 67, 641-643.
- KELLAND L. R., MISTRY P., ABEL G., LOH S. Y., O'NEILL C. F., MURRER B. A., HARRAP K. R., 1992. Mechanism-related circumvention of acquired cis-diamminedichloroplatinum (II) resistance using two pairs of human ovarian carcinoma cell lines by ammine/amine platinum (IV) dicarboxylates. *Cancer Res.* 52, 3857-3864.
- KELLEN J. A., 1993. The reversal of multidrug resistance in cancer (review). *Anticancer Res.*, 13, 959-961.
- KELLEY S. L., BASU A., TEICHER B. A., HACKER M. P., HAMER D. H., LAZO J. S., 1988. Overexpression of metallothionein confers resistance to anticancer drugs. *Science* 241, 1813-1815.
- KIEHNTOFF M., BRACH M. A., LICHT T., PETSCHAUER S., KARAWAJEW L., KIRSCHNING C., HERRMANN F., 1994. Ribozyme-mediated cleavage of the MDR-1 transcript restores chemosensitivity in previously resistant cancer cells. *The EMBO J.*, 13, 4645-4652.
- KIOKA N., YAMANO Y., KONANO T., UEDA K., 1992. Heat-shock response elements in the induction of the multidrug resistance gene (MDR1). *FEBS Lett.* 301, 37-40.

- KOBAYASHI H., DORAI T., HOLLAND J. F., OHNUMA T., 1994. *Reversal of drug sensitivity in multidrug-resistant tumor cells by an MDR1 (PGY1) ribozyme*. *Cancer Res.* 54, 1271-1275.
- KOHNO K., SATO S., TAKANO H., MATSUI K., KUWANO M., 1989. *The direct activation of human multidrug resistance gene (MDR1) by anticancer agents*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 165, 1415-1421.
- KOHNO K., SATO S., UCHIUMI T., TAKANO H., KATO S., KUWANO M., 1990. *Tissue-specific enhancer of the human multidrug-resistance (MDR1) gene*. *J. Biol. Chem.* 265, 19690-19696.
- KRAMER R. A., ZAKHER J., KIM G., 1988. *Role of the glutathione redox cycle in acquired and de novo multidrug resistance*. *Science* 241, 694-697.
- KUZMICH S., TEW K. D., 1991. *Detoxification mechanisms and tumor cell resistance to anticancer drugs*. *Med. Research Reviews* 11, 185-217.
- KWOK T. T., SUTHERLAND R. M., 1991. *Epidermal growth factor reduces resistance to doxorubicin*. *Int. J. Cancer* 49, 73-76.
- VAN DER LAAN B. F. A. M., JANSEN G., KATHMANN I., SCHORNAGEL J. H., HORDIJK G. J., 1991. *Mechanism of acquired resistance to methotrexate in a human squamous carcinoma different treatment schedules*. *Eur. J. Cancer* 27, 1274-1277.
- LELONG I. H., PADMANABHAN R., LOVELACE E., PASTAN I., GOTTESMAN M. M., 1992. *ATP and GTP as alternative energy sources for vinblastine transport by P-170 in KB-V1 plasma membrane vesicles*. *FEBS Lett.* 304, 256-260.
- LEVINE R. M., RUBALCABA E., LIPPMAN M. E., COWAN K. H., 1985. *Effects of estrogen and tamoxifen on the regulation of dihydrofolate reductase gene expression in a human breast cancer cell line*. *Cancer Res.* 45, 1644-1650.
- LI W. W., LIN J. T., SCHWEITZER B. I., TONG W. P., NIEDZWIECKI D., BERTINO J. R., 1992. *Intrinsic resistance to methotrexate in human soft tissue sarcoma cell lines*. *Cancer Res.* 52, 3908-3913.
- LING V., 1989. *Does P-glycoprotein predict response to chemotherapy?* *J. Nat. Cancer Inst.* 81, 84-85.
- MA L. D., MARQUARDT L., TAKEMOTO L., CENTER M. S., 1991. *Analysis of P-glycoprotein phosphorylation in HL60 cells isolated for resistance to vincristine*. *J. Biol. Chem.* 266, 5593-5599.
- MANTEUFFEL-CYMBOROWSKA M., 1978. *Biochemiczne podstawy cytotoksycznego działania ametopteryny*. *Post. Biochem.* 24, 93-115.
- MARIANI B. D., SCHIMKE R. T., 1984. *Gene amplification in a single cell cycle in Chinese hamster ovary cells*. *J. Biol. Chem.* 259, 1901-1910.
- MCCLOSKEY D. E., MCGUIRE J. J., RUSSEL C. A., ROWAN B. G., BERTINO J. R., PIZZORNO G., MINI E., 1991. *Decreased folylglutamate synthetase activity as a mechanism of methotrexate resistance in CCRF-CEM human leukemia sublines*. *J. Biol. Chem.* 266, 6181-6187.
- MELERA P. W., DAVIDE J. P., HESSON P. A., SCOTTO K. W., 1984. *Phenotypic expression in Escherichia coli and nucleotide sequence of two Chinese hamster lung cell cDNAs encoding different dihydrofolate reductases*. *Mol. Cell. Biol.* 4, 38-48.
- MEYERS M. B., SCHNEIDER K. A., SPENGLER B. A., CHANG T. D., BIEDLER J. L., 1987. *SORCIN (V19) a soluble acidic calcium-binding protein overproducer in multidrug-resistant cells. Identification of the protein by anti-sorcine antibody*. *Biochem. Pharmacol.* 36, 2373-2380.
- MEYERS M. B., YU P., MENDELSON J., 1993. *Crosstalk between epidermal growth factor receptor and P-glycoprotein in actinomycin D-resistant chinese hamster lung cells*. *Biochem. Pharmacol.* 46, 1841-1848.
- MORRIS J. A., MCIVOR R. S., 1994. *Saturation mutagenesis at dihydrofolate reductase codons 22 and 31. A variety of amino acid substitutions conferring methotrexate resistance*. *Biochem. Pharmacol.* 47, 1207-1220.
- MULKINS M. A., HEIDELBERGER C., 1982. *Isolation of fluoropyrimidine — resistant murine leukemic cell lines by one-step mutation and selection*. *Cancer Res.* 42, 956-964.
- NG W. F., SARANGI F., ZASTAWNY R. L., VEINOT-DREBOT L., LING L., 1989. *Identification of members of the P-glycoprotein multigene family*. *Mol. Cell Biol.* 9, 1224-1232.
- NIELSEN D., SKOVGAARD T., 1992. *P-glycoprotein as multidrug transporter: a critical review of current multidrug resistant cell lines*. *Biochim. Biophys. Acta* 1139, 169-183.
- OGUCHI H., KIKKAWA F., KOJIMA M., MAEDA O., MIZUNO K., SUGANUMA N., KAWAI M., TOMODA Y., 1994. *Glutathione related enzymes in cis-diamminedichloroplatinum (II) — sensitive and — resistant human ovarian carcinoma cells*. *Anticancer Res.* 14, 193-200.
- OHKAWA K., HATANO T., ISONISHI S., TAKADA K., JOH K., MATSUDA M., 1994. *Doxorubicin enhances transient expression of P-glycoprotein and modulates activity and isoform expression of protein kinase C in AH66 rat hepatoma cells*. *Int. J. Oncol.* 4, 655-659.

- OLDENGURG J., BEGG A. C., VAN VUGT M. J. H., RUEVEKAMP M., SCHORNAGEL J. H., PINEDO H. M., LOS G., 1994. *Characterization of resistance mechanisms to cis-diamminedichloroplatinum (II) in three sublines of the CC531 colon adenocarcinoma cell line in vitro*. *Cancer Res.* 54, 487-493.
- OLIŃSKI R., ZASTAWNY T. H., 1991. *Reakcje leku przeciwnowotworowego: cis-diaminodichloroplatyny (II) z DNA*. *Post. Biochem.* 37, 40-47.
- ORR G. A., HAN E. K. -H., BROWNE P. C., NIEVES E., O'CONNOR B. M., YANG C. -P. H., HOROWITZ S. B., 1993. *Identification of the major phosphorylation domain of murine mdr1b P-glycoprotein*. *J. Biol. Chem.* 268, 25054-25062.
- PIEKARZ R. L., COHEN D., HORWITZ S. B., 1993. *Progesterone regulates the murine multidrug resistance mdr1b gene*. *J. Biol. Chem.* 268, 7613-7616.
- PIZZORNO G., MINI E., CORONELLO M., MCGUIRE J. J., MOROSON B. A., CASHMORE A. R., DREYER R. N., LIN J. T., MAZZEI T., PERITI P., BERTINO J. R., 1988. *Impaired polyglutamation of methotrexate as a cause of resistance in CCRF-CEM cells after short-term, high-dose treatment with this drug*. *Cancer Res.* 48, 2149-2155.
- POTMESIL M., HSIANG Y. H., LIU L. F., WU H. Y., TRAGANOS F., BANK B., SILBER R., 1987. *DNA topoisomerase II as a potential factor in drug resistance of human malignancies*. *NCI Monographs* 4, 105-109.
- POUPON M. F., MARIE J. P., CHEVILLARD S., 1994. *Rapport du symposium international: „Resistance against anticancer drugs: molecular mechanisms and clinical opportunities”*. *Bull. Cancer* 81, 145-156.
- RAMU A., GLAUBIGER D., WEINTRAUB H., 1984. *Differences in lipid composition of doxorubicin-sensitive and-resistant P388 cells*. *Cancer Treat. Rep.* 68, 637-641.
- RASOLA A., GALIETTA L. J. V., GRUENERT D. C., ROMEO G., 1994. *Volume-sensitive chloride currents in 4 epithelial cell lines are not directly correlated to the expression of the MDR-1 gene*. *J. Biol. Chem.* 269, 1432-1436.
- RHEE M. S., WANG Y., NAIR M. G., GALIVAN J., 1993. *Acquisition of resistance to antifolates caused by enhanced γ -glutamyl hydrolase activity*. *Cancer Res.* 53, 2227-2230.
- RICHERT N. D., ALDWIN L., NITECKI D., GOTTESMAN M. M., PASTAN I., 1988. *Stability and covalent modification of P-glycoprotein in multidrug-resistant KB cells*. *Biochemistry* 27, 7607-7613.
- RIMINGTON C., RILEY P. A., 1993. *The biochemical approach to cancer therapy: a short essay*. *Int. J. Biochem.* 25, 1385-1393.
- RODE W., 1986. *Biosynteza tymidylanu: rola biologiczna i regulacja w komórkach zwierzęcych*. *Post. Biochem.* 32, 401-420.
- ROMINE M. T., KESSEL D., 1986. *Intracellular glutathione as a determinant of responsiveness to antitumor drugs*. *Biochem. Pharmacol.* 35, 3323-3326.
- RONINSON I. B., 1992. *The role of the MDR1 (P-glycoprotein) gene in multidrug resistance in vitro and in vivo*. *Biochem. Pharmacol.* 43, 95-102.
- ROSSANA C., RAO L. G., JOHNSON L. F., 1982. *Thymidylate synthetase overproduction in 5-fluorodeoxyuridine-resistant mouse fibroblasts*. *Mol. Cell. Biol.* 2, 1118-1125.
- RUETZ S., GROS P., 1994. *A mechanism for P-glycoprotein action in multidrug resistance: are we there yet?* *Trends in Pharm. Sci.*, 15, 260-263.
- SAIKAWA Y., KNIGHT C. B., SAIKAWA T., PAGE S. T., CHABNER B. A., ELWOOD P. C., 1993. *Decreased expression of the human folate receptor mediates transport-defective methotrexate resistance in KB cells*. *J. Biol. Chem.* 268, 5293-5301.
- SATO W., YUSA K., NAITO M., TSURUO T., 1990. *Staurosporine, a potent inhibitor of C-kinase, enhances drug accumulation in multidrug resistant cells*. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 173, 1252-1257.
- SCANLON K. J., KASHANI-SABET M., 1988. *Elevated expression of thymidylate synthase cycle genes in cisplatin-resistant human ovarian carcinoma A2780 cells*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 650-653.
- SCHIMKE R. T., 1986. *Methotrexate resistance and gene amplification*. *Cancer (Phila.)* 57, 1912-1917.
- SCOTTO K. W., BIEDLER J. L., MELERA P. W., 1986. *Amplification and expression of genes associated with multidrug resistance in mammalian cells*. *Science* 232, 751-755.
- SCHEPER R. J., BROXTERMAN H. J., SCHEFFER G. L., KAAJIK P., DALTON W. S., VAN HEIJNINGEN T. H. M., VAN KALKEN C. K., SLOVAK M. L., DE VRIES E. G. E., VAN DER VALK P., MEIJER CH. J. L. M., PINEDO H. M., 1993. *Overexpression of a Mr 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance*. *Cancer Res.* 53, 1475-1479.
- SCHINKEL A. H., BORST P., 1991. *Multidrug resistance mediated by P-glycoproteins*. *Cancer Biol.* 2, 213-226.
- SCHUETZ J. D., SCHUETZ E. G., 1993. *Extracellular matrix regulation of multidrug resistance in primary monolayer cultures of adult rat hepatocytes*. *Cell Growth & Differ.* 4, 31-40.

- SCHWEITZER B. L., SRIMATKANDADA S., GRITSMAN H., SHERIDAN R., VENKATARAGHAVAN R. B., BERTINO J. R., 1989. *Probing the role of two hydrophobic active-site residues in the human dihydrofolate reductase by site directed mutagenesis*. J. Biol. Chem. 264, 20786-20795.
- SCHWEITZER B. J., DICKER A. P., BERTINO J. R., 1990. *Dihydrofolate reductase as a therapeutic target*. FASEB J. 4, 2441-2452.
- SHAPIRO A. B., LING W., 1994. *ATPase activity of purified and reconstituted P-glycoprotein from Chinese hamster ovary cells*. J. Biol. Chem. 269, 3745-3754.
- SHAROM F. J., YU X., DOIGE C. A., 1993. *Functional reconstitution of drug transport and ATPase activity in proteoliposomes containing partially purified P-glycoprotein*. J. Biol. Chem. 268, 24197-24202.
- SHEN D., CARDARELLI C., HWANG J., CORNWELL M., RICHERT N., ISHII S., PASTAN I., GOTTESMAN M. M., 1986. *Multiple drug-resistant human KB carcinoma cells independently selected for high-level resistance to colchicine, adriamycin, or vinblastine show changes in expression of specific proteins*. J. Biol. Chem. 261, 7762-7770.
- SIKORA E., JACKMAN A. L., NEWELL D. R., CALVERT A. H., 1988. *Formation and retention and biological activity of N¹⁰-propargyl-5,8-dideazaazafolic acid (CB 3717) polyglutamates in L1210 cells in vitro*. Biochem. Pharmacol. 37, 4047-4054.
- SIMON S., ROY D., SCHINDLER M., 1994. *Intracellular pH and the control of multidrug resistance*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 1128-1132.
- SKLAR M. D., 1988. *Increased resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) in NIH 3T3 cells transformed by ras oncogenes*. Cancer Res. 48, 793-797.
- SPEARS C. P., GUSTAVSSON B. G., FROESING R., BERNSTEIN L., HAYES A. A., 1988. *Mechanisms of innate resistance to thymidylate synthase inhibition after 5-fluorouracil*. Cancer Res. 48, 5894-5900.
- SPRIDONIDIS Ch. A., CHATTERJEE S., PETZOLD S. J., BERGER N. A., 1989. *Topoisomerase II-dependent and -independent mechanisms of etoposide resistance in Chinese hamster cell lines*. Cancer Res. 49, 644-650.
- SUPINO K., MARIANI M., CAPRANICO G., COLOMBO A., PARMIANI G., 1988. *Doxorubicin cellular pharmacokinetics and DNA breakage in a multidrug resistant B16 melanoma cell line*. Br. J. Cancer 57, 142-146.
- SZMIGIERO L., 1988. *Topoizomeraza II jako komórkowy receptor niektórych leków przeciwnowotworowych*. Post. Biochem. 34, 147-152.
- TANIMURA H., KOHNO K., SATO S., UCHIUMI T., MIYAZAKI M., KOBAYASHI M., KUWANO M., 1992. *The human multidrug resistance 1 promoter has an element that responds to serum starvation*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 183, 917-924.
- TEETER L. D., ECKERSBERG T., TSAI Y., KUO M. T., 1991. *Analysis of the Chinese hamster P-glycoprotein/multidrug resistance gene pgp1 reveals that the AP-1 site is essential for full promotor activity*. Cell Growth Differ. 2, 429-437.
- THIERRY A. R., RAHMAN A., DRITSCHLO A., 1993. *Overcoming multidrug resistance in human tumor cells using free and liposomally encapsulated antisense oligodeoxynucleotides*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 190, 952-960.
- TREZISE A. E. O., ROMANO P. R., GILL D. R., HYDE S. C., SEPULVEDA F. V., BUCHWALD M., HIGGINS C. F., 1992. *The multidrug resistance and cystic fibrosis genes have complementary patterns of epithelial expression*. EMBO J., 11, 4291-4303.
- TRITTON T. R., 1991. *Cell surface actions of adriamycin*. Pharmacol. Ther. 49, 293-309.
- TSURUO T., IIDA H., TSUKAGOSHI S., SAKURAI Y., 1981. *Overcoming vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine*. Cancer Res. 41, 1967-1972.
- UEDA K., PASTAN I., GOTTESMAN M. M., 1987. *Isolation and sequence of the promoter region of the human multidrug resistance (P-glycoprotein) gene*. J. Biol. Chem. 262, 17432-17436.
- UEDA K., SHIMABUKU A. M., KONISHI H., FUJII Y., TAKEBE S., NISHI K., YOSHIDA M., BEPPU T., KOMANO T., 1993. *Functional expression of human P-glycoprotein in Schizosaccharomyces pombe*. FEBS Lett. 3, 279-282.
- VALVERDE M. A., DIAZ M., SEVULPEDA F. V., GILL D. R., HYDE S. C., HIGGINS C. F., 1992. *Volume regulated chloride channels associated with the human multidrug resistance P-glycoprotein*. Nature 355, 830-833.
- WAHSTEN W. L., 1984. *Increased levels of thymidylate synthetase in cells exposed to 5-fluorouracil*. Mol. Pharmacol. 25, 171-177.
- WANI M. A., XU X., STAMBROOK P. J., 1994. *Increased methotrexate resistance and dhfr gene amplification as a consequence of induced Ha-ras expression in NIH 3T3 cells*. Cancer Res. 54, 2504-2508.

- WANG F. S., ASCHELE C., SOBRERO A., CHANG Y. M., BERTINO J. R., 1993. *Decreased folylpolyglutamate synthetase expression: a novel mechanism of fluorouracil resistance*. Cancer Res. 53, 3677-3680.
- WEINSTEIN R. S., JAKATE S. M., DOMINGUEZ J. M., LEOVITZ M. D., KOUKOULIS G. K., KUSZAK J. R., KLUSENS L. E., GROGAN T. M., SACLARIDES T. J., RONINSON I. B., COON J. S., 1991. *Relationship of the expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human colon carcinoma to local tumor aggressiveness and lymph node metastasis*. Cancer Res. 51, 2720-2726.
- WEST I. C., 1990. *What determines the substrate specificity of the multi-drug-resistance pump?* TIBS 15, 42-46.
- YAMAZAKI H., SCHNEIDER E., MYERS E., SINHA B. K., 1994. *Oncogene overexpression and de novo drug-resistance in human prostate cancer cells*. Biochim. Biophys. Acta 1226, 89-96.
- YOSHIMURA A., KUWAZURU Y., SUMIZAWA T., IKYEDA S. I., ICHIKAWA M., USAGAWA T., AKIYAMA S. I., 1989. *Biosynthesis, processing and half-life of P-glycoprotein in a human multidrug-resistant KB cell*. Biochim. Biophys. Acta 992, 307-314.
- YU L., COHEN D., PIEKARZ R. L., HOROWITZ S. B., 1993. *Three distinct nuclear protein binding sites in the promoter of the murine multidrug resistance mdr1b gene*. J. Biol. Chem. 268, 7520-7526.
- YU M., MELERA P. W., 1993. *Allelic variation in the dihydrofolate reductase gene at amino acid position 95 contributes to antifolate resistance in Chinese hamster cells*. Cancer Res. 53, 6031-6035.
- ZAMAN G. J. R., VERSANTVOORT C. H. M., SMIT J. J. M., ELJDEMS W. H. M., DE HAAS M., SMITH A. J., BROXTERMAN H. J., MULDER N. H., DE VRIES E. G. E., BAAS F., BORST P., 1993. *Analysis of the expression of MRP, the gene for a new putative transmembrane drug transporter, in human multidrug resistant lung cancer cell lines*. Cancer Res. 53, 1747-1750.
- ZAMORA J. M., PEARCE H. L., BECK W. T., 1988. *Physical-chemical properties shared by compounds that modulate multidrug resistance in human leukemic cells*. Mol. Pharmacol. 33, 454-462.
- ZHANG Z. G., HARSTRICK A., RUSTUM Y. M., 1992. *Mechanism of resistance to fluoropyrimidines*. Seminars in Oncology 19, 4-9.
- ZIELIŃSKA Z. M., 1981. *Interferencja antymetabolitów z metabolizmem komórkowym jako podstawa chemioterapii*. Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Jagiellońskiego DCXLVI, Prace z biologii molekularnej 8, 207-223.
- ZIJLSTRA J. G., DE VRIES E. G. E., MULDER N. H., 1987. *Multifactorial drug resistance in an adriamycin-resistant human small lung carcinoma cell line*. Cancer Res. 47, 1780-1784.

LUCYNA GREBECKA

*Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckeigo PAN**Zakład Biochemii Komórki**Pasteura 3, 02-093 Warszawa**Praca dedykowana Pani Profesor Zofii Zielińskiej
w 80-tą rocznicę urodzin*

MIGRACJA KOMÓREK NOWOTWOROWYCH W ORGANIZMIE

Zdolność do samodzielnej migracji jest jedną z cech stanowiących o inwazyjnym fenotypie komórek wielu nowotworów złośliwych (MAREEL i współaut. 1993). Komórki takie, wywędrowując z litego guza pierwotnego poruszają się ruchem ameboidalnym (ENTERLINE i COMAN 1950). Ruch ameboidalny polega na tworzeniu się i zanikaniu pseudopodiów —przejściowych struktur lokomotorycznych. Komórki w trakcie migracji stale nawiązują i zrywają kontakty z podłożem (RAZ i współaut. 1986). Stosunek między siłą adhezji do podłoża a siłami generującymi dynamikę nibynózek decyduje o tym, czy i z jaką prędkością porusza się komórka (DiMILLA i współaut. 1993). O kierunku migracji decyduje morfologiczna polaryzacja komórki. To, że komórki nowotworowe nie wytwarzają stałych struktur lokomotorycznych, wydaje się zrozumiałe. Komórki te bowiem pochodzą

Słownik skrótów: α_2 -antyplazmina — inhibitor plazminy; CD44 — błonowy proteoglikan należący do hialadheryn (receptorów wiążących się z HA); ChIMP — inhibitor metaloproteaz (TIMP-3) produkowany przez fibroblasty zarodka kurzego; ECM — macierz zewnątrzkomórkowa albo substancja lub istota międzykomórkowa; EGF — naskórkowy czynnik wzrostowy; FGFb — zasadowy, fibroblastowy czynnik wzrostowy; FN — fibronektyna; GAG — glikozaminoglikany; GP — glikoproteiny; GPI — glikozylofosfatydyloinozitol; HA — kwas hialuronowy (wolny albo sole); LN — laminina; MMP — metaloproteazy; MMP1 — kolagenaza interstycjalna; MMP2 — żelatynaza A (kolagenaza IV, 72 kD); MMP3 — stromelizyna 1 (ST1); MMP5 — kolagenaza neutrofilowa (czasem oznaczana MMP8); MMP7 — matrylizyna (PUMP1); MMP9 — żelatynaza B (kolagenaza IV, 92 kD); MMP10 — stromelizyna 2 (ST2); MT MMP — metaloproteaza macierzy typu błonowego; PA1-1, PA1-2 — szybkie inhibitory metaloproteaz; PDGF — czynnik wzrostowy z płytek krwi; PG — proteoglikany; PKC — białkowa kinaza C; pl — plazmina; plg — plazminogen; PUMP1 — matrylizyna (MMP7); RHAMM — receptor HA zawartego w ECM ważny dla ruchliwości komórek; ST3 — stromelizyna 3; TGF α — transformujący czynnik wzrostowy; TIMP1 — tkankowy inhibitor metaloproteaz 1; TIMP2 — tkankowy inhibitor metaloproteaz 2; TIMP3 — ChIMP; TN — tenascyna; tPA — tkankowy aktywator plazminogenu; TSP — trombospondyna; uPA — urokinaza, aktywator plazminogenu; uPAR — receptor urokinazy.

z różnych tkanek, w których ich funkcje nie wymagają zdolności do ruchu. Ruchem ameboidalnym poruszają się jednak również takie komórki prawidłowe, jak białe ciała krwi, których funkcje w organizmie wiążą się bezpośrednio ze zdolnością do samodzielnej migracji. Fakt, że i te komórki nie wykształciły stałych struktur lokomotorycznych pozwala przypuszczać, że ruch ameboidalny jest nie tylko formą ruchu dostępną, przejściowo lub na stałe, nieomal dla wszystkich komórek tkankowych (STOKER i GHERARDI 1991). Prawdopodobnie jest on również formą ruchu najlepiej dostosowaną do warunków środowiska, w którym komórki migrują. W obu przypadkach — komórek prawidłowych i nowotworowych — mamy do czynienia z takimi samymi, a często nawet tymi samymi (PAWELEC i BOXBERGER 1994) szlakami wędrówek oraz z dwoma podstawowymi rodzajami środowisk: środowiskiem płynnym i macierzą zewnątrzkomórkową (istotą międzykomórkową).¹

ŚRODOWISKO PŁYNNE

Środowisko płynne stanowią płyny ustrojowe; krew i limfa. Krążące w nich komórki prawidłowe i nowotworowe, kuliste, o nieregularnie pofałdowanej powierzchni (ryc. 1 D) są unoszone biernie z prędkością w przybliżeniu równą prędkości przepływu cieczy w naczyniu o danym przekroju. Duże komórki i agregaty komórek płyną środkiem naczynia, komórki mniejsze zbliżają się do jego ścian i mogą nawiązać z nimi kontakt. Umożliwia to komórce opuszczenie naczynia, czyli ekstrawazację (ryc. 1 E) i dalszą wędrówkę już w innym środowisku. Podczas transportu w układzie krwionośnym i limfatycznym komórki ruchliwe zachowują się podobnie, jak nieruchliwe erytrocyty czy trombocyty. Zarówno więc obecność w komórce stałych lub przejściowych struktur lokomotorycznych, jak i wynikająca stąd zdolność komórki do samodzielnego ruchu nie wydają się mieć żadnego znaczenia w toku biernego transportu.

ECM (EXTRACELLULAR MATRIX)²

ECM wypełnia przestrzeń między komórkami. Jest ona rusztowaniem organizującym i podtrzymującym komórki, tkanki i narządy (LIN i BISSELL 1993), a zwłaszcza stanowi zrąb tkanek łącznych. ECM występuje zarówno w organizmach roślinnych, jak i w zwierzęcych, u kręgowców i bezkręgowców. Uważa się, że ECM powstała w trakcie łączenia się organizmów jednokomórkowych w kolonie, nie wyklucza się jednak i możliwości wyodrębnienia się ECM podczas podziału wielojądrowych syncytiów na domeny komórkowe i pozakomórkowe (HAR-EL i TANZER 1993).

¹

Patrz ECM w słowniku skrótów.

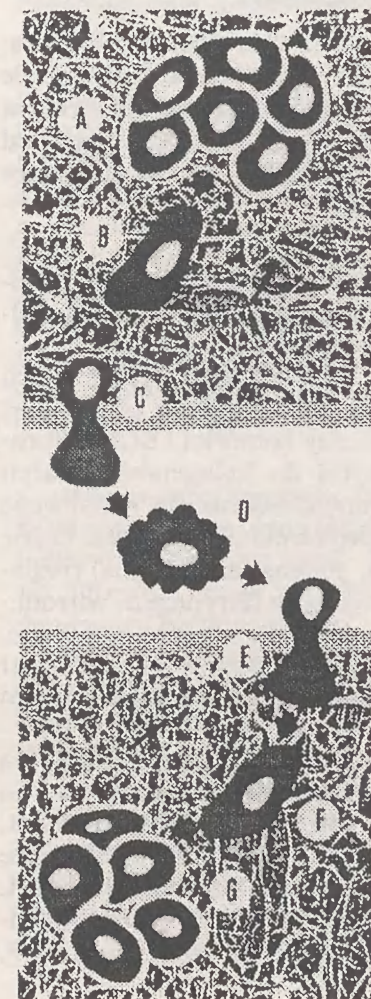
²

Macierz zewnątrzkomórkowa albo istota lub substancja międzykomórkowa (porównaj OSTROWSKI i KAWIAK 1990).

Szczególną formę ECM stanowi błona podstawna (basement membrane, BM), przede wszystkim jednak termin ECM jest wiązany z interstycjalną stromą (LIOTTA i współaut. 1991). W tym środowisku komórki przemieszczają się czynnie (ryc. 1 B, F). Ameboidalny ruch komórek migrujących przez ECM, dający w przypadku komórek nowotworowych lokalne inwazje i odległe przerzuty, zachodzi w wyniku ciągłych interakcji pomiędzy komórką a otaczającym ją środowiskiem, czyli składnikami ECM (BUCK i współaut. 1985, LIOTTA i współaut. 1986, BUCK i HORWITZ 1987, JULIANO 1987, HART i współaut. 1989, AKIYAMA i współaut. 1990, MONSKY i CHEN 1993, MONTGOMERY i współaut. 1993, STETLER-STEVENSON i współaut. 1993 a, b). Dlatego środowisko to wymaga znacznie dokładniejszej charakterystyki niż krążące w naczyniach płyny ustrojowe.

ZNACZENIE STRUKTURY ECM DLA MIGRACJI KOMÓRKOWEJ

W skład ECM wchodzi różne makro- i mikrocząsteczki w ilościach charakterystycznych dla danej tkanki i narządu (RAGHOW 1994). Część składników



ECM pochodzi z krwi i limfy, a część jest wytwarzana przez: a) komórki parenchymy, b) komórki stanowiące stały element samej ECM, jak fibroblasty, c) komórki przebywające w ECM przejściowo — makrofagi, granulocyty, komórki nowotworowe i inne. Wymienione komórki nie tylko syntetyzują i wydzielają składniki ECM. Mogą one również modyfikować istniejące już elementy ECM (SHIRASUNA i współaut. 1993), powodując, na przykład, ich rozpad czy polimeryzację.

Komórki nowotworowe i prawidłowe mogą oddziaływać na elementy ECM bezpośrednio, mogą jednak także pobudzać do takiego działania inne komórki. Przykładem tego może być między innymi wzmożenie pod wpływem komórek raka piersi produkcji fibronektyny i kolagenów I, III i IV przez fibroblasty (NOEL i współaut. 1992), tenascyny pod wpływem neoplastycznych komórek nabłonkowych (ERICKSON i BOURDON 1989) czy stymulacja fibroblastów do syntezy kwasu hialuronowego w wyniku kontaktu z komórkami czerniaka lub raka płuc (KNUDSON i współaut. 1984). Warto tu

Ryc. 1. Etapy tworzenia przerzutu: A — kolonia pierwotna, B — utrata połączeń międzykomórkowych, odrywanie się komórek i ich migracja w ECM, C — przedostawanie się komórek do wnętrza naczyń, D — bierny transport komórek w naczyniach, E — wydostawanie się komórek z naczyń, F — migracja w ECM, G — utworzenie przerzutu. Tło stanowi zdjęcie ECM, w które wrysowano w tej samej skali komórki nowotworowe, zaznaczone na czarno z białymi jądrami.

wspomnieć również, że wydzielaniu przez komórki nowotworowe licznych enzymów modulujących ECM, o których będzie mowa dalej, towarzyszy równie często pobudzanie wydzielania takich enzymów przez inne komórki (STETLER-STEVENSON i współaut. 1993a, MATRISIAN 1992, MIGNATTI i RIFKIN 1993, BORCHERS i współaut. 1994). Komórki nowotworowe mogą to powodować wydzielając specyficzne dla danego enzymu czynniki stymulujące, jak w przypadku stromelizyny 3, kolagenazy interstycjalnej czy żelatynazy A (STETLER-STEVENSON i współaut. 1993a, BASSET i współaut. 1990, MULLER i współaut. 1993). Stymulacja może też jednak wynikać z wydzielania przez komórki prawidłowe i nowotworowe czynników wzrostowych, TGF α , PDGF, FGF, EGF, a także innych niespecyficznych czynników modulujących między innymi biosyntetyczną aktywność sąsiadujących komórek ECM (KOVACS 1991, WOESSNER 1991, MAUVIEL 1993).

Uważa się, że dla istnienia ECM jest konieczna dynamiczna równowaga pomiędzy syntezą i rozpadem jej składników (MATRISIAN 1992).

SKŁADNIKI ECM ISTOTNE DLA MIGRACJI KOMÓRKOWEJ

Ważne z punktu widzenia migracji komórek strukturalne elementy ECM to: a) glikoproteiny wpływające na adhezję komórek, b) kolageny i elastyna tworzące włókniste rusztowanie ECM, c) proteoglikany ułatwiające migrację komórkową przez tworzenie w ECM uwodnionych domen. Oczywiście zdarzają się wyjątki od tej ogólnej klasyfikacji, na przykład nie wszystkie kolageny tworzą struktury fibrylarne, mogą je zaś tworzyć niektóre glikoproteiny.

Glikoproteiny (GP)

Glikoproteiny są zbudowane z krótkich rozgałęzionych łańcuchów oligosacharydowych połączonych kowalencyjnie z rdzeniem białkowym. Do ważniejszych glikoprotein wpływających na adhezję komórek należą:

a) Fibronektyna (FN). Jest wielofunkcyjną glikoproteiną występującą w osoczu oraz w ECM, szczególnie w jej warstwie bezpośrednio otaczającej komórkę, pełniącą kluczową rolę w interakcjach między komórką i ECM. Fibronektyna ułatwia wiązanie komórek między innymi do kolagenów, żelatyn i fibryny, a także umożliwia rozplaszczanie komórek; stymuluje ruchliwość działając na komórki chemotaktycznie i haptotaktycznie. FN zawiera liczne funkcjonalne domeny, z sekwencją RGD (arginina, glicyna, asparagina) rozpoznawane przez integryny: $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha 3 \beta 1$, $\alpha v \beta 1$, $\alpha \text{wp} \beta 3$, $\alpha v \beta 6$ oraz fibrynogen, witronektynę i czynnik von Willebrandta. Posiada również domeny wiążące heparynę, kolagen, fibrynę a także proteoglikany, CD44 i syndekan (VENSTROM i REICHARDT 1993). FN jest dimerem o ciężarze 250 kD. Podjednostki są połączone mostkiem siarkowym w zakończeniach karboksylowych.

b) Trombospondyna (TSP). Podobnie jak fibronektyna jest glikoproteiną wielofunkcyjną i składnikiem ECM. Posiada domeny wiążące się między innymi z integrynami powierzchni komórek nabłonkowych, mięśni gładkich i czerniaka. Wiąże się z fibrynogenem, FN, kolagenami, heparyną i lamininą. TSP może wiązać i aktywować plazminogen i jego tkankowy aktywator (VISCHER i współaut. 1988, SAGE i BORNSTEIN 1991, VENSTROM i REICHARDT 1993). TSP jest homotrimerem o ciężarze 450 kD. Występują w niej sekwencje homologiczne do EGF,

do których przylegają domeny antyadhezywne (SCOTT-BURDEN 1994). Ma też trzy domeny wiążące się z powierzchnią komórkową (YAMADA i KLEINMAN 1992).

c) Laminina (LN). Jest przede wszystkim stałym składnikiem błony podstawnej. Większość komórek ruchliwych, zarówno prawidłowych, jak i nowotworowych ma receptory lamininowe. Częsteczki lamininy mogą łączyć się ze sobą tworząc sieć. Normalna błona podstawna składa się z połączonych sieci lamininy i kolagenu IV (YURCHENCO i SCHITTNY 1990). Istnieją jednak również błony podstawne, w których kolagen IV nie występuje, a podstawę strukturalną stanowi tylko sieć lamininowa (YURCHENCO i współaut. 1992, MOSHER i współaut. 1992). TRYGGVASON (1993) uważa, że podczas morfogenezy LN tworzy rusztowanie błony podstawnej, które później zostaje uzupełnione siecią kolagenu IV i innymi stałymi składnikami BM. Laminina jest zbudowana z trzech łańcuchów peptydowych (850 kD), kodowanych przez osobne geny.

d) Tenascyna (TN). Tenascyna ma co najmniej dwie domeny adhezywne z sekwencją RGD i dwie domeny antyadhezywne przylegające do sekwencji homologicznej do EGF (PRIETO i współaut. 1992). Komórki wiążą się najsilniej, gdy kontaktują się tylko z domenami adhezywnymi całej cząsteczki lub z fragmentem, który zawiera tylko taką domenę. Natomiast, gdy komórka kontaktuje się tylko z antyadhezywnymi domenami tenascyny, pozostaje okrągła i nie przylega do podłoża (VENSTROM i REICHARDT 1993). Wielu autorów wskazuje na funkcjonalny antagonizm pomiędzy tenascyną i fibronektyną (m.in. CHIGUET-EHRISMANN 1990). W przeciwieństwie do FN, która wzmacnia adhezję i powoduje rozplaszczanie komórek, TN wywołuje ich zaokrąglenie i oderwanie od podłoża. Postuluje się więc, że rola TN w migracji komórek nowotworowych mogłaby polegać na ułatwianiu ich odrywania się od fibronektyny w zrębie guza (ERICKSON i BOURDON 1989, SAGE i BORNSTEIN 1991). ERICKSON (1993) proponuje przestrzeny mechanizm utrudniania adhezji przez TN; ta rozgałęziona sześcioramienna cząsteczka wiążąc się z podłożem zarówno odsuwałaby cząsteczki FN, jak też maskowała miejsca ich wiązania z powierzchnią komórki.

Kolageny i elastyna

Powszechnie przyjęta definicja określa kolageny jako strukturalne białka ECM zawierające jedną lub więcej domen o charakterystycznej budowie potrójnej helisy (LINSENMAYER 1981). Prawie wszystkie kolageny tworzą wielkocząsteczkowe agregaty, które częściowo są stabilizowane przez oddziaływania między domenami helikoidalnymi.

Dotychczas zidentyfikowano 19 typów kolagenów. Tworzą one różne układy przestrzenne: a) włókienka (fibryle) znajdujące przede wszystkim w tkance łącznej; tworzą je kolageny fibrylarne typów I, II, III, V, XI. b) warstwy znajdujące między innymi w błonie podstawnej, a także w kutikuli i w organicznym szkielecie zewnętrznym gąbek; tworzą je kolageny typów IV, VIII, X. c) kolageny z nieciągłą potrójną helisą łączące włókienka z innymi elementami ECM; są to kolageny typów IX, XII, XIV. d) kolagen VII, wiążący włókienka błony podstawnej nabłonka z włókienkami kolagenowymi przylegającej ECM, e) kolagen VI tworzący cienkie paciorkowate włókienka, które wiążą się z innymi włókienkami oraz z powierzchnią komórek (VAN DEN REST i GARRONE 1991). Funkcje i rozmiesz-

czenie w tkankach kolagenów XV–XIX (MAYNE i BREWTON 1993) nie zostały jeszcze szczegółowo opisane.

Struktury kolagenowe, zarówno fibrylarne, jak i niefibrylarne składają się z cząsteczek połączonych wiązaniami kowalencyjnymi. Zapewnia to mechaniczną stabilność tkanek (HAR-EL i TANZER 1993). W ECM występują przede wszystkim fibrylarne kolageny tworzące jej podstawę strukturalną. W utworzoną przez nie sieć mogą być wbudowywane inne elementy ECM w zależności od tego, jakimi właściwościami cechuje się dana tkanka.

W przypadku tkanek sprężystych budujących między innymi ściany dużych naczyń tętniczych, pęcherzyków płucnych czy niektórych wiązań istotnym składnikiem ECM jest elastyna. Elastyna jest glikoproteiną o ciężarze 72 kD. Rozpuszczalny prekursor elastyny, tropoelastyna, jest produkowana przez fibroblasty i komórki mięśni gładkich. Po przedostaniu się do przestrzeni okołokomórkowej tropoelastyna wraz z innymi cząsteczkami, jak na przykład fibryliną, tworzą elastyczne włókienka (FRANZBLAU i FARIS 1981, MCGOWAN 1992).

Zarówno kolageny jak glikoproteiny wiążą się z wieloanionowymi polisacharydami — proteoglikanami.

Proteoglikany (PG), glikozaminoglikany (GAG), sole kwasu hialuronowego (HA)

Proteoglikany są podklasą glikoprotein, białkami glikozyłowymi. Są składnikami zarówno okołokomórkowej, jak i zewnątrzkomórkowej macierzy. Wiążą się one z prawie wszystkimi elementami ECM. Wiele z nich jest związanych również z błoną komórkową i występuje jako receptory, między innymi dla czynników wzrostowych (RUOSLAHTI 1989, RUOSLAHTI i YAMAGUCHI 1991) oraz innych cytokin i składników ECM. Niektóre proteoglikany mogą pełnić funkcję modulatorów czynników wzrostowych tworząc z nimi kompleksy i chroniąc je przed degradacją (RUOSLAHTI i YAMAGUCHI 1991), inne kontrolują aktywność proteaz. Proteoglikany są zbudowane z rdzenia białkowego, z dołączonym kowalencyjnie jednym lub wieloma łańcuchami glikozaminoglikanów — polisacharydów zawierających aminocukry.

Glikozaminoglikany są liniowymi polimerami, zbudowanymi z powtarzających się disacharydowych jednostek, które składają się z heksozaminy naprzemiennie z kwasem uronowym lub cukrem obojętnym (słownictwo według GAMIAN 1992). Taka budowa powoduje liniowe uporządkowanie grup anionowych, a więc i ładunków ujemnych w cząsteczkach (HASCALL i HASCALL 1981). Glikozaminoglikany ECM to przede wszystkim: siarczany heparanu, chondroityny, dermatanu i keratanu oraz sole kwasu hialuronowego (HA). Z wyjątkiem HA łańcuchy GAG nie występują w tkankach osobno, lecz są związane z rdzeniem białkowym przez oligosacharyd o strukturze odmiennej od jednostek powtarzających się w łańcuchu (RUOSLAHTI 1988). Własności i funkcje proteoglikanów zależą od proporcji ich białkowych i węglowodanowych składników (RUOSLAHTI i YAMAGUCHI 1991, HARDINGHAM i FOSANG 1992, WIGHT i współaut. 1992, HAR-EL i TANZER 1993).

Agrekan i inne proteoglikany o dużej zawartości GAG tworzą uwodnione domeny ECM. Wynika to z przyciągania jonów dodatnich przez ujemnie naładowane cząsteczki PG; takie przesunięcie równowagi osmotycznej powoduje napływ cząsteczek wody z sąsiadujących obszarów. Wokół powstałych w ten sposób domen uwodnionych tworzą się więc równocześnie domeny o wysokim stężeniu

znajdujących się w nich makrocząsteczek, co zwiększa możliwość ich wzajemnych oddziaływań (HARDINGHAM i FOSANG 1992).

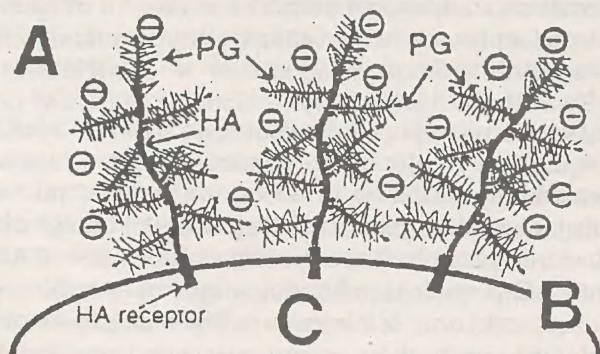
W przeciwieństwie do gęstych, włóknistych obszarów ECM, które stabilizują komórki, uwodnione luźne mikrośrodowiska tworzone przez proteoglikany ułatwiają migrację komórkom ruchliwym. Szczególnie ważną rolę pełnią tu sole kwasu hialuronowego (WIGHT i współaut. 1992, LAURENT i FRASER 1992). Wzrost stężenia soli HA wiąże się ze wzrostem ruchliwości komórek w danym miejscu, natomiast rozpad cząsteczek HA pod wpływem hialuronidazy stopuje lokomocję.

Interesującą hipotezę dotyczącą udziału proteoglikanów w powiększaniu przestrzeni zawartej pomiędzy komórkami i włóknistymi elementami ECM podaje TOOLE (1981). Przedstawia się ona następująco: uwodnione sole HA wywierają ciśnienie na przylegające komórki i strukturalne elementy ECM. Przeciwdziałają temu, zapobiegając pęcznieniu, takie czynniki ograniczające, jak: a) mechaniczne połączenia utrzymujące sąsiadujące struktury w stałej odległości; b) redukcja, bądź całkowite zniesienie przez kationy ujemnych ładunków GAG; c) interakcje między łańcuchami GAG powodujące kondensację i uporządkowanie materiału w obrębie każdej cząsteczki oraz ściślejsze upakowanie cząsteczek sąsiadujących. Zakłócenia w działaniu czynników ograniczających umożliwiają rozluźnienie konstrukcji HA, a w konsekwencji jego pęcznienie i powiększanie się dystansu między rozdzielanymi przez HA strukturalnymi składnikami ECM. Powstająca w ten sposób przestrzeń ułatwia swobodną migrację komórek (TOOLE 1981).

Receptory komórkowe wiążące się z solami kwasu hialuronowego w zewnątrzkomórkowej macierzy mogą być również proteoglikanami. Wśród nich proteoglikan CD44, należący do rodziny hialadheryn, jest znajdowany na powierzchni komórek ruchliwych zarówno prawidłowych, jak i nowotworowych (SHERMAN i współaut. 1994). Uważa się, że ekspresja CD44 w komórkach jest dodatnio skorelowana z ich zdolnością do tworzenia przerzutów (MERZAK i współaut. 1994, PONTA 1994). Domena cytoplazmatyczna CD44 może być połączona z aktywną cytoszkieletem komórkowego. W komórkach czerniaka stwierdzono zależność między istnieniem połączeń CD44 z cytoszkieletem a ruchliwością komórek. W momencie zaniku tych połączeń komórki tracą zdolność do lokomocji (THOMAS i współaut. 1992). Połączenia między CD44 na powierzchni komórki i HA w ECM są stosunkowo słabe (w porównaniu na przykład z połączeniami typu kontaktów ogniskowych, w których biorą udział integryny — ALBELDA i BUCK 1990). Dla lokomocji może to być jednak korzystne. W ruchu ameboidalnym ważna jest bowiem zarówno łatwość nawiązywania kontaktów, jak i ich zrywania. Kompleksy CD44/HA ulegać mogą internalizacji i następnie rozpadowi pod wpływem kwaśnych hydrolaz. Stopień degradacji HA, jak również jej ograniczenie tylko do określonych miejsc w ECM są ważne dla kontroli migracji komórkowej. Hipotezy dotyczące udziału proteoglikanów w adhezji komórek i ich migracji są stosunkowo dobrze udokumentowane (CAMP i współaut. 1991, LAURENT i FRASER 1992, THOMAS i współaut. 1992, UNDERHILL 1992, HERRLICH i współaut. 1993, KNUDSON i KNUDSON 1993).

Ostatnio wysuwa się także hipotezę, że proteoglikany otaczające powierzchnię komórki biorą udział w porządkowaniu kolagenów i glikoprotein ECM. Proteoglikanowy płaszcz komórkowy (coat) przytrzymuje nowo powstałe kolage-

ny i fibronektynę, a skupianie się ich we włókna może być ułatwiane przez giętkie i ruchliwe kompleksy powierzchniowe HA/agrekan (ryc. 2), wystające daleko poza powierzchnię komórki (LEE i współaut. 1993). Proteoglikany związane z powierzchnią komórki i daleko poza nią wysunięte mogą zarazem przeszkadzać w wiązaniu sąsiadujących ze sobą komórek przez E-kadheryny, a także w kontakcie komórek z podłożem (VLEMINCKS i współaut. 1994).



Ryc. 2. Kompleksy proteoglikanów na powierzchni komórki (według LEE i współaut. 1993, zmodyfikowany). A — środowisko, B — błona plazmatyczna, C — cytoplazma, HA — sole kwasu hialuronowego, PG — proteoglikany, $\ominus$ — ładunki ujemne.

PROTEOLIZA SKŁADNIKÓW ECM PODCZAS MIGRACJI KOMÓREK

Rusztowanie ECM jest zbudowane z włókien kolagenowych. Przestrzeń pomiędzy nimi jest wypełniona glikoproteinami tworzącymi przede wszystkim spoiwo (ANDERSON 1976). Pozostałą część ECM stanowią uwodnione proteoglikany umożliwiające dyfuzję cząsteczek przedostających się z krwi i limfy (cytokiny, hormony i inne) i ułatwiające ruch komórek. Warunkiem migracji komórki przez te trójwymiarowe struktury macierzy jest jej kontrolowana adhezja do elementów fibrylarnych, sterowanie ruchem w określonym kierunku oraz torowanie sobie drogi, za pomocą enzymów proteolitycznych.

WARUNKI MIGRACJI KOMÓREK PRZEZ ECM

Adhezja

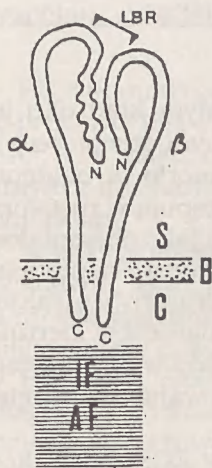
Warunkiem migracji i wzrostu komórek jest ich zdolność do adhezji. Brak adhezji uniemożliwia migrację, lecz zbyt silna adhezja ją ogranicza (DiMILLA i współaut. 1993, GIANCOTTI i MAINIERO 1994). Zarówno kolageny, jak glikoproteiny i proteoglikany mają punkty przyczepu dla migrujących komórek prawidłowych i neoplastycznych. Receptory komórkowe wiążące się z ligandami ECM to przede wszystkim integryny i proteoglikany powierzchniowe (ryc. 3, 4, tab. 1). Utworzone przez nie (i przez inne cząsteczki) połączenia między komórką i ECM mogą być rozkładane przez różne enzymy, w tym proteazy (tab. 2). Działają one w miejscach przylegania komórki do podłoża, kontrolując adhezję i reorganizując aktynowy cytoskielet (POLLANEN i współaut. 1988). Hamowanie aktywności tych enzymów specyficznymi inhibitorami utrzymuje adhezję komórek nowotworowych, natomiast znosi ich inwazyjność (ruchliwość).

Tabela 1

Niektóre proteoglikany powierzchniowe i integryny wiążące komórki z poszczególnymi elementami ECM
(Dane według: DAVID 1993, LAHAV 1993, TURLEY i współaut. 1993, VENSTROM i REICHARDT 1993, SHERMAN i współaut. 1994)

Elementy ECM	Powierzchnia komórki	
	Proteoglikany	Integryny
Glikoproteiny		
FN	siarczan heparanu, CD44, syndekan	$\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$
LN	siarczan heparanu, CD44, dystroglikan	$\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_7\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$
TSP	siarczan heparanu, syndekan	$\alpha_v\beta_3$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_x\beta_1$, $\alpha_v\beta_x$
TN	siarczan heparanu, syndekan	$\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_x\beta_1$
Kolageny	siarczan heparanu, CD44, syndekan	$\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_3\beta_1$
Proteoglikany	hialadhedryny	różne integryny
HA	CD44, RHAMM	

Istnieje silna korelacja między zmianami w cytoszkielecie aktynowym i indukcją ekspresji genów kodujących proteazy tak ważne w lokomocji komórek, jak kolagenazy i stromelizyny (WERB i współaut. 1989). Ekspresja genów kodujących enzymy istotne w regulacji adhezji komórkowej może być indukowana *via* cytoszkielet przez samą adhezję komórki do poszczególnych elementów ECM, przez krążące w ECM cytokiny, jak również przez fragmenty zdegradowanych



Ryc. 3. Schemat budowy cząsteczki integryny (według ALBELDA i BUCK 1990, zmodyfikowany). α , β — podjednostki heterodimeru, N — zakończenie aminowe, C — zakończenie karboksylowe, LBR — region wiążący integrynę z ligandem, S — środowisko, B — błona plazmatyczna, C — cytoplazma, IF — filamenty pośrednie, AF — filamenty aktynowe.

uprzednio składników ECM (WERB i współaut. 1989, JULIANO i HASKILL 1993, MAUVIEL 1993). Fragmenty te mogą też polaryzować komórkę i w rezultacie sterować jej ruchem.

Tabela 2

Enzymy degradujące ECM

(Dane według: WOESSNER 1991, MATRISIAN 1992, MAUVIEL 1993, MIGNATTI i RIFKIN 1993)

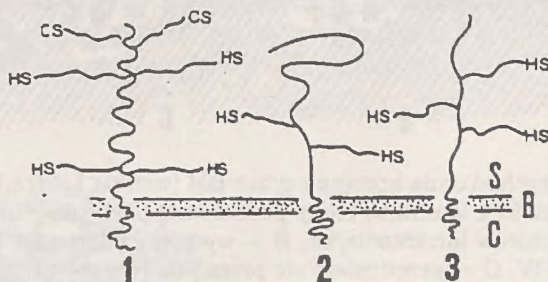
Enzym	Substrat							Inne funkcje: aktywuje
	Kolageny	Żela- tyny	Elas- tyna	FN	LN	Rdzeń PG	GAG	
uPA tPA plazmina		+		+	+	+		plazminogen, MMP2 plazminogen prokolagenazy elastazy, uPA
Katepsyny B L D	I-V, IX, XI + I, III	+ + +	+ +	+	+	+		uPA, prokolagenazy
Kolagenazy MMP1 MMP5 (8?) kolagenaza 3	I-III, V, VII, X I-III ?	+ + ?						
Żelatynazy MMP2 MMP9	IV, V, VII, X, XI IV, V, VII, X	+ +	+ +	+	+			
Stromelizyny MMP3 (+ST1) MMP10 (=ST2) ST3 MMP7	III-V, IX III-V, IX ? IV	+ + ? +		+	+	+		MMP1, MMP2 MMP1, MMP2 prokolagenazy
MT MMP								MMP2
Metaloeleasta		+	+	+		+		uPA
Glikozydazy							+	

Chemotaksja i haptotaksja

Migracja komórki nowotworowej czy prawidłowej w danym kierunku jest wynikiem interakcji cząsteczek atraktanta z jego specyficznym receptorem na powierzchni komórki, przekazania sygnału do wnętrza komórki, a następnie reorganizacji cytoskieletu. Jeżeli cząsteczki atraktanta występują w roztworze, kierunkowy ruch w stronę ich rosnącego stężenia określa się jako chemotaksję. Gdy wbudowane są one w podłoże, analogiczne zjawisko nosi nazwę haptotaksji. W obu przypadkach komórka podąża w kierunku rosnącego gradientu atraktanta, przy czym w drugim przypadku jest to równoznaczne z migracją w kierunku zwiększającej się adhezji. Kończy się to zatrzymaniem komórki w tym miejscu, w którym siła adhezji przewyższy siłę motoryczną generowaną we wnętrzu komórki.

Można przyjąć, że komórka rozpoczynająca migrację w ECM początkowo kieruje się głównie gradientem rosnącej adhezji (haptotaksja), której źródło

stanowią adhezywne domeny cząsteczek ECM (FURCHT i współaut. 1984). Ponieważ lokomocji towarzyszy częściowa degradacja tych cząsteczek i przechodzenie ich fragmentów do płynu interstycjalnego, stopniowo w zachowaniu komórki zaczyna przeważać odpowiedź chemotaktyczna (STETLER-STEVENSON i współaut. 1993a). Chemotaksję komórek prawidłowych i nowotworowych mogą wywoływać różne cytokiny (RUSCIANO i BURGER 1992) oraz produkty proteolizy takich składników ECM jak: LN, FN, kolagen IV, witronektyna i TNS, podczas gdy cząsteczki te w formie nietkniętej stymulują migrację na drodze haptotaksji (TARABOLETTI i współaut. 1987, AZNAVOORIAN i współaut. 1990, KLOMINEK i współaut. 1993).



Ryc. 4. Schemat budowy trzech wybranych proteoglikanów powierzchniowych (kombinowany na podstawie RUOSLAHTI 1988, RUOSLAHTI 1989 oraz HARDINGHAM i FOSANG 1992). 1 — syndekan, 2 — CD44, 3 — błonowy proteoglikan zawierający heparanu siarczan, CS — chondroityny siarczan, HS — heparanu siarczan, S — środowisko, B — błona plazmatyczna, C — cytoplazma.

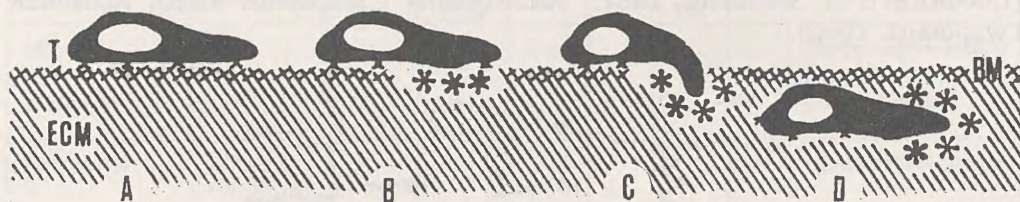
W prawidłowych komórkach ruchliwych, jakimi są leukocyty, w odbiorze bodźca pozytywnego (atraktanta) i przekazaniu sygnału do wnętrza komórki pośredniczy białko G. Wydaje się, że w przypadku komórek nowotworowych występują także inne drogi przekazywania sygnałów stymulujących ruchliwość. Dawałoby to komórce nowotworowej znaczną przewagę nad innymi komórkami poruszającymi się w ECM i odbierającymi z niej sygnały (STETLER-STEVENSON i współaut. 1993a).

Torowanie przejść przez ECM

ECM stanowi gęstą sieć splecionych elementów strukturalnych i przedostanie się przez nią jest szczególnie trudne dla komórek o niskim stopniu deformowalności, a do takich należą komórki nowotworowe. Proteoliza ECM może być zatem jednym z mechanizmów niezbędnych dla utorowania drogi migrującym w ECM komórkom.

Klasycznym tego przykładem jest przedostawanie się komórek przez błonę podstawną, która jest jedną z form ECM, a zarazem jedną z ważniejszych barier na drodze migrujących komórek (LIOTTA i współaut. 1984, 1986). Jest to proces trójstopniowy polegający na: a) przyczepieniu się migrującej komórki do lamininy BM przez receptory lamininowe na powierzchni komórki; b) rozkładaniu kolagenu IV tworzącego podstawę strukturalną BM; c) przedostawaniu się komórki przez utworzoną w ten sposób lukę w błonie podstawnej (ryc. 5). Warto w związku z tym dodać, że inwazyjne komórki nowotworowe charakteryzuje

wielokrotny wzrost liczby receptorów lamininowych (BARKSKY i współaut. 1984, MARTIN i TIMPL 1987). Uważa się też, że wiązanie z LN może stymulować w komórce produkcję żelatynazy A rozkładającej kolagen IV, drugi główny składnik błony podstawnej (KANEMOTO i współaut. 1990). Te komórki, które nie syntetyzują odpowiednich enzymów i nie degradują błony podstawnej, mają znacznie zmniejszone możliwości tworzenia metastaz. Komórki takie zatrzymane zostają bowiem przy błonie podstawnej, która staje się dla nich barierą nie do przebycia.



Ryc. 5. Schemat przechodzenia komórek przez BM (według LIOTTA 1984). A — komórka (T) nawiązuje kontakt z lamininą błony podstawnej (BM) za pośrednictwem powierzchniowych receptorów lamininowych, B — wydziela żelatynazę A, która rozbija cząsteczki kolagenu IV, C — przedostaje się przez przerwę powstałą w BM, D — rozpoczyna migrację w ECM.

Rolę pomocniczą mogą w takich przypadkach odgrywać leukocyty (ryc. 6). Według KRAMER i NICOLSON (1979) komórki nowotworowe mogą zatrzymywać się do 24 godzin pomiędzy komórkami śródbłonnka a błoną podstawną. Jeżeli w pobliżu przez ścianę naczynia przedostaje się w tym czasie jakaś ruchliwa komórka prawidłowa, tworzy się przejście dla czekającej komórki nowotworowej. Podobnie, przechodzenie leukocytów przez modelowe błony podstawne zwiększa liczbę przedostających się przez nie komórek nowotworowych (LIOTTA 1984). Leukocyty, gdy towarzyszą komórkom nowotworowym, zwiększają o 50% swoją produkcję żelatynazy i heparanazy, co właśnie ułatwia komórkom nowotworowym przedostawanie się przez BM (WELCH i współaut. 1989).

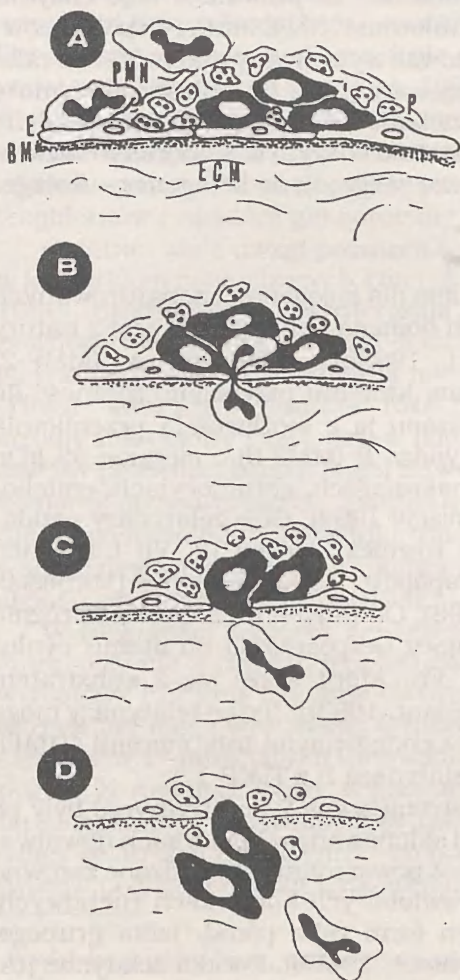
Trójstopniowy model Liott'y przechodzenia komórek przez błonę podstawną stosuje się również do migracji komórek przez trójwymiarowe struktury ECM. Są one gęsto utkane i często prawie równie trudne do sforsowania, jak błona podstawna. Prawidłowe komórki ruchliwe, jak makrofagi czy granulocyty, degradują więc ECM, by dotrzeć do ognisk zapalnych. Powodowane przez nie uszkodzenia są jednak minimalne, bo aktywność proteolityczna prowadząca do tworzenia nieciągłości w ECM (oraz regulująca adhezję) jest precyzyjnie kontrolowana. Dzieje się tak również w przypadku komórek nowotworowych. W ich migracji przez ECM również współdziałają specyficzne proteazy (tab. 2) o określonym rozmieszczeniu i czasie działania, regulowane przez odpowiednie aktywatory i inhibitory.

W ostatnim dziesięcioleciu zgromadzono wiele dowodów świadczących o tym, że w migracji komórek prawidłowych i w inwazji nowotworowej bardzo ważną rolę grają enzymy z rodziny metaloproteaz oraz urokinaza — aktywator plazminogenu i produkt jej działania — plazmina. Obie grupy enzymów są kontrolowane na wielu poziomach, włączając w to aktywację i transkrypcję genów,

translację, sekrecję proenzymów, wiązanie proenzymów do powierzchni komórki i elementów ECM, blokowanie ich przez specyficzne inhibitory oraz degradację bądź usuwanie czynnych enzymów. Wiele enzymów współdziała ze sobą. Klasyycznym tego przykładem jest aktywacja metaloproteaz przez plazminę należącą do grupy proteaz serynowych.

METALOPROTEAZY (MMP)

Enzymy te znane od 30 lat (GROSS i LAPIERE 1962) charakteryzują się obecnością w cząsteczce atomu cynku. Syntetyzowane są w formie proenzymów, jako takie wiązane z powierzchnią komórki i najczęściej tam aktywowane. Fizjologicznie są unieczynniane głównie przez tkankowe inhibitory metaloproteaz (TIMP). Metaloproteazy dzieli się w zależności od rodzaju substratu, jaki rozkładają na: kolagenazy, żelatynazy i stromelizyny.



Ryc. 6. Przedostawanie się komórek nowotworowych przez błonę podstawną (BM) w ślad za komórkami normalnymi. Schemat sporządzony według opisu HILGARD i HELLMANN 1983. A — komórki nowotworowe wprowadzone drogą iniekcji do naczyń adhegują w żyłkach powłósczkowych do komórek śródbłonna (E), po czym zostają otoczone przez płytki krwi (P) i fibrynę; wokół tak powstałego skrzepu gromadzą się leukocyty polimorfonuklearne (PMN). B — PMN przeciwskają się pomiędzy dwiema sąsiadującymi komórkami śródbłonna i degradują BM. C — komórki nowotworowe dążą w ślad za leukocytami korzystając z wytworzonej przez nie przerwy w BM. D — przerwa powiększa się, komórki nowotworowe wydostają się z naczynia i podejmują wędrówkę przez ECM, która zakończy się utworzeniem przerzutu (porównaj ryc. 1).

Kolagenazy

Znane są dwie kolagenazy rozcinające włókienka kolagenowe. Są to: kolagenaza interstycjalna (MMP-1) o ciężarze 54.1 kDa i kolagenaza neutrofilowa (MMP-5) o ciężarze 53.4 kDa. Oba enzymy przecinają łańcuchy kolagenów: I, II, III, VII i X w domenach helikoidalnych (MATRISIAN 1992, MIGNATTI i RIFKIN 1993). W wyniku cięcia, które następuje blisko końca karboksylowego cząsteczki, powstają dwa fragmenty o proporcjach 1:3. Te fragmenty ulegają dalszej proteolizie, która może być prowadzona przez inne enzymy (GROSS 1981, TRYGGVASON i współaut. 1987).

Kolagenazę interstycjalną syntetyzują przede wszystkim makrofagi i fibroblasty, a kolagenazę neutrofilową granulocyty obojętnochłonne. Kolagenazę interstycjalną, której poziom zwiększa się w komórkach wielu nowotworów człowieka (OSSOWSKI 1992, STETLER-STEVENSON i współaut. 1993a), znajduje się również w fibroblastach ECM bezpośrednio otaczających przemieszczające się komórki nowotworowe, co pozwala przypuszczać, że produkcja tego enzymu może być przez komórki nowotworowe stymulowana. NABESHIMA i współpracownicy (1991) odkryli i częściowo scharakteryzowali wytwarzany w komórkach raka płuc czynnik stymulujący produkcję kolagenazy przez fibroblasty. Być może czynnik ten stymuluje też syntezę i wydzielanie żelatynazy A i stromelizyny (STETLER-STEVENSON i współaut. 1993a). Ostatnio odkryto w komórkach niektórych nowotworów piersi nową metaloproteazę zaliczoną do kolagenaz —kolagenazę 3 (według URIA i współaut. 1994).

Żelatynazy

Te enzymy są specyficzne przede wszystkim dla kolagenów zdenaturowanych (stąd nazwa), a także kolagenów, w których domena helikoidalna jest z natury nieciąгла (STETLER-STEVENSON i współaut. 1993b). Żelatynaza A (MMP-2) o ciężarze 72 kDa była pierwszym enzymem, któremu przypisano zdolność do rozkładania cząsteczek kolagenu IV i wiązano ją z możliwością przenikania komórek nowotworowych przez BM. Żelatynaza B (MMP-9) o ciężarze 92 kDa występuje, podobnie jak żelatynaza A, w makrofagach, granulocytach, epitelio-cytach i komórkach nowotworowych (MATRISIAN 1992). Obie żelatynazy rozkładają oprócz kolagenów zdenaturowanych również kolagen IV, VII i X w ich domenach helikoidalnych (BERNHARD i współaut. 1994), elastynę (MATRISIAN 1992) i fibronektynę (MIGNATTI i RIFKIN 1993). Od innych metaloproteaz różnią się między innymi tym, że mają przylegający bezpośrednio do atomu cynku region homologiczny do jednej z domen FN, który wiąże się z substratem (MATRISIAN 1992, STETLER-STEVENSON i współaut. 1993b). Tylko żelatynazy mogą się łączyć, jeszcze w formie proenzymów, z endogennymi inhibitorami (TIMP). Prożelatynaza A łączy się z TIMP-2, a prożelatynaza B z TIMP-1.

Zarówno żelatynaza A jak i B (a także stromelizyna 2 i matrylizyna) były po raz pierwszy zidentyfikowane, oczyszczone i sklonowane w komórkach nowotworowych. Obecnie występowanie żelatynaz jest powszechnie stwierdzone zarówno w komórkach nowotworowych, jak i w prawidłowych komórkach ruchliwych. Znajduje się je w większości inwazyjnych form raka piersi, jelita grubego, pęcherza i płuc (STETLER-STEVENSON i współaut. 1993b). Poziom żelatynaz jest skorelowany ze stopniem inwazyjności komórek (ZUCKER i współaut. 1987, 1993,

DAVIES i współaut. 1993, WATANABE i współaut. 1993, BERNHARD i współaut. 1994). Żelatynaza A może też być syntetyzowana i wydzielana przez komórki stromy przylegające do frontów inwazji nowotworowej (STETLER-STEVENSON i współaut. 1993a).

Stromelizyny

Do tej grupy należą cztery enzymy: stromelizyna 1 (ST-1, MMP-3), stromelizyna 2 (ST-2, MMP-10), stromelizyna 3 (ST-3) i matrylizyna (MMP-7).

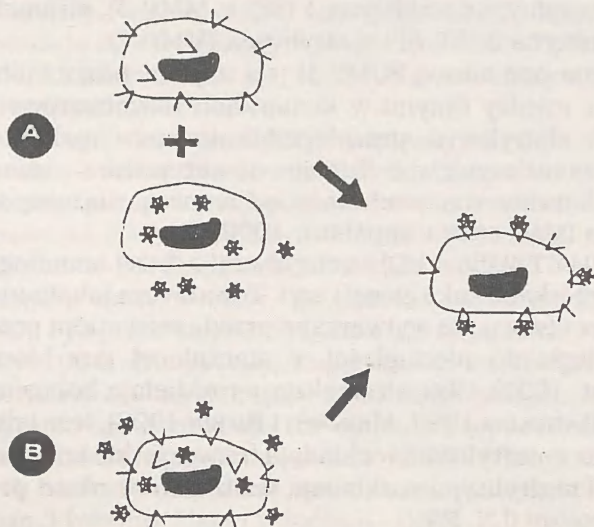
Matrylizyna (uprzednio znana pod nazwą PUMP-1) jest najmniejszą z metaloproteaz (29.7 kD). Występuje między innymi w komórkach nowotworowych (rak żołądka i jelita grubego). Matrylizyna prawdopodobnie może rozkładać elastynę (MATRISIAN 1992), może też regulować działalność aktywatora plazminogenu oddzielając domenę katalityczną urokinazy od domeny wiążącej się z receptorem powierzchniowym (MARCOTTE i współaut. 1992).

Stromelizyny ST-1 (54.0 kD) i ST-2 (54.1 kD) są enzymami o dużej homologii. Występują między innymi w komórkach raka głowy i szyi. Towarzyszą lokalnemu wzrostowi inwazyjności tego nowotworu. Są wytwarzane przede wszystkim przez fibroblasty stromy guza przyległe do nieciągłości w otaczającej guz błonie podstawnej (POLETTE i współaut. 1991). Obie stromelizyny rozkładają kolageny: III (MATRISIAN 1992), IV, V i IX (MATRISIAN 1992, MIGNATTI i RIFKIN 1993), lecz tylko w domenach globularnych. Wraz z matrylizyną rozkładają też wszystkie kolageny zdenaturowane. Stromelizyny i matrylizyna rozkładają też białkowy rdzeń proteoglikanów i niektóre glikoproteiny (LN, FN).

Ostatnio wiele uwagi poświęca się stromelizynie 3. Enzym ten został odkryty w komórkach pochodzących z biopsji inwazyjnego raka piersi (BASSET i współaut. 1990). Stromelizynę 3 syntetyzują fibroblasty otaczające migrujące komórki nowotworowe. Poziom RNA ST-3 maleje wraz ze wzrostem odległości wytwarzających go fibroblastów od czoła inwazji nowotworu. MULLER i współpracownicy (1993) stwierdzili obecność RNA ST-3 i białka ST-3 również w komórkach stromy raka głowy i szyi. Jak w poprzednim przypadku enzym ten był syntetyzowany przez fibroblasty. Sądzi się więc, że synteza ST-3 odbywa się pod kontrolą komórek nowotworowych, a ściślej dyfundującego czynnika wytwarzanego przez nie bezpośrednio lub pośrednio. Tak więc komórki nowotworowe mogą przeprowadzać degradację ECM za pomocą prawidłowych komórek stromy, które w ten sposób przygotowują im przejście.

W większości komórek nowotworowych ekspresja genów kodujących metaloproteazy nie jest stała, lecz indukowana różnymi aktywatorami, jak czynniki wzrostowe lub inne cytokiny (MATRISIAN 1990, MAUVIEL 1993). Podobnie różne aktywatory mogą wywoływać syntezę i wydzielanie przez komórki nowotworowe czynników stymulujących inne komórki. Coraz więcej zwolenników znajduje też pogląd, że metaloproteazy, włączając ST-3 (w raku głowy i szyi) oraz interstycjalną kolagenazę i żelatynazę A (w raku skóry) mogą być traktowane jako pochodzący ze stromy parakrynn³ czynnik, konieczny w progresji złośliwych nowotworów pochodzenia nabłonkowego. Wystarczy więc, by komórka nowotworowa

miała receptory dla określonej metaloproteazy oraz mogła stymulować jej syntezę i wydzielanie przez otaczające prawidłowe komórki stromy, by zyskała możliwość degradacji określonego składnika ECM. Wydaje się, że w migracji komórek nowotworowych parakrynnie i autokrynnie⁴ czynniki (ryc. 7) są równie ważne i być może stanowią rozwiązania alternatywne.



Ryc. 7. Parakrynnny i autokrynnny sposób przekazywania i przechwytywania ligandów. A — komórka syntetyzuje i wydziela do środowiska cząsteczki, które są przechwytywane i wiązane przez sąsiednie komórki niezdolne do ich wytwarzania, ale wyposażone w odpowiednie receptory. B — komórka wytwarzająca i wydzielająca określone cząsteczki sama je wiąże do własnej powierzchni, gdyż zarazem posiada specyficzne dla nich receptory powierzchniowe.

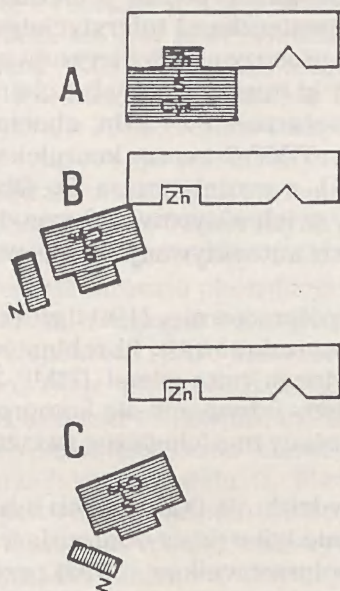
W stromie raka piersi stwierdzono współwystępowanie stromelizyny 3 i tenascyny (BASSET i współaut. 1990). Tenascyna jest tą glikoproteiną, która prawdopodobnie — przez swoje własności antyadhezywne — ułatwia komórkom guza odrywanie się i podnosi ich inwazyjność. Tenascyna jest syntetyzowana i wydzielana przez fibroblasty stymulowane między innymi przez neoplastyczne komórki nabłonka (ERICKSON i BOURDON 1989).

Ostatnio (SATO i współaut. 1994) odkryto i opisano nową metaloproteazę, którą określono jako „membrane-type matrix metalloprotease” (MT-MMP). Ten enzym o ciężarze 66 kD jest integralnym białkiem błonowym o domenie transmembranowej. Występuje w komórkach inwazyjnego raka płuc, a głównym jego zadaniem jest aktywacja prożelatynazy A. MT-MMP ściśle ogranicza aktywność proteolityczną żelatynazy do bezpośredniego sąsiedztwa błony komórkowej, gdyż na niej właśnie odbywa się aktywacja tego enzymu również wtedy, gdy jest on syntetyzowany przez komórki stromy i wydzielany do środowiska. Sekwencja zjawisk przedstawiać się wtedy może następująco: komórki nowotworowe stymulują fibroblasty do produkcji żelatynazy A, jako proenzym pojawia się ona w stromie, wiązana przez receptor na powierzchni komórki nowotworowej ulega tam aktywacji przez MT-MMP. Powoduje to punktową degradację kolagenów (przede wszystkim kolagenu IV).

REGULACJA AKTYWNOŚCI METALOPROTEAZ

Aktywacja proenzymów

Wszystkie znane metaloproteazy są wydzielane w postaci nieaktywnych proenzymów. Dopiero po aktywacji zyskują zdolność degradowania składników ECM. W przypadku metaloproteaz rolę fizjologicznych aktywatorów pełnią przede wszystkim urokinaza i plazmina. Aktywowanie MMP odbywa się poprzez zakłócenie interakcji cysteiny z atomem cynku w cząsteczce. Zachodzące w cząsteczkach metaloproteaz zmiany konformacyjne prowadzą do autokatalitycznego odcięcia domeny propeptydowej i powstania czynnej formy enzymu (LIOTTA i współaut. 1991, WOESSNER 1991, KLEINER i STETLER-STEVENSON 1993, STETLER-STEVENSON i współaut. 1993b) (ryc. 8). Ponieważ zarówno prometaloproteazy, jak urokinaza i plazmina, są związane z błoną komórkową, aktywacja najczęściej zachodzi na powierzchni komórki lub w jej bezpośrednim sąsiedztwie. Często jest ograniczona do określonych regionów powierzchni komórki — inwadopodiów — których zadaniem jest intensywna degradacja ECM umożliwiającą komórce migrację (CHEN 1992, MONSKY i CHEN 1993, MONSKY i współaut. 1993). Aktywacja prozelatyny, ściśle ograniczona do miejsc kontaktu komórki z BM, może prowadzić do miejscowej proteolizy kolagenu IV i utworzenia przejścia dla migrującej komórki. Wzrost aktywności proteolitycznej komórek może też być wynikiem interakcji pomiędzy samymi metaloproteazami. Na przykład, stromelizyna podnosi aktywność kolagenazy interstycjalnej i żelatynazy A (MATRISIAN 1992, STETLER-STEVENSON i współaut. 1993b).



Ryc. 8. Aktywacja żelatynazy A. A — propeptyd zawierający cysteinę jest związany poprzez siarkę z atomem Zn w katalitycznie czynnej domenie enzymu; maskując Zn blokuje on aktywność żelatynazy. B — aktywator (plazmina, tripsyna) powoduje zerwanie połączenia cysteiny z Zn; wywołana tym zmiana konformacyjna cząsteczki enzymu prowadzi do odsłonięcia domeny katalitycznej zawierającej cynk. C — następuje autokatalityczne odcięcie propeptydu.

Aktywacja jednej z ważniejszych metaloproteaz, żelatynazy A, może również zachodzić niezależnie od systemu urokinaza/plazminogen/plazmin w obecności inhibitorów proteaz serynowych za pomocą wspomnianej już proteazy MT-MMP.

Istnienie niezależnego od proteaz serynowych powierzchniowego mechanizmu specyficznej proteolizy pojedynczego elementu ECM może mieć ważne fizjologiczne następstwa. Taki mechanizm pozwala na szczególnie subtelną kontrolę degradacji ECM i ograniczenie do minimum powstających uszkodzeń.

Aktywacja metaloproteaz jest jednym z czynników potrzebnych, aby komórka mogła uzyskać fenotyp inwazyjny.

Inhibicja metaloproteaz i ich proenzymów

Sama aktywacja metaloproteaz nie wystarcza dla osiągnięcia przez komórkę wysokiego stopnia inwazyjności. W przypadku ruchliwych komórek prawidłowych tkankowe inhibitory metaloproteaz kontrolują ich aktywność w określonych miejscach. W przypadku komórek nowotworowych poziom aktywnych metaloproteaz również musi znajdować się pod kontrolą, ponieważ nadmierna proteoliza ECM może tak samo utrudniać migrację, jak zbyt słaba degradacja zewnątrzkomórkowej macierzy. Prowadzi ona bowiem z jednej strony do zniszczenia ECM, w tym i proteoglikanów tworzących środowisko sprzyjające migracji, a z drugiej strony przeciwdziała nawiązywaniu przez komórki kontaktów z podłożem (lub zbyt szybko je niszczy), co też utrudnia lokomocję. Wykazano, że podczas gdy w komórkach nowotworowych, syntetyzujących niewielkie ilości proteaz degradujących ECM dodatek inhibitora znosił ich inwazyjność, w przypadku komórek wytwarzających duże ilości proteaz taki sam dodatek inhibitora ją wzmacniał (TSUBOI i RIFKIN 1990). Tak więc inwazyjny fenotyp komórek nowotworowych wynika również z odpowiedniej proporcji aktywnych proteaz i ich inhibitorów na powierzchni komórki i w środowisku.

Tkankowy inhibitor metaloproteaz, TIMP-1, jest glikoproteiną o ciężarze 25–36 kDa, tworzącą nieodwracalne kompleksy z cząsteczkami interstycjalnej kolagenazy, stromelizyn, aktywnej żelatynazy B i jej proenzymu. Syntetyzuje go i wydzielają fibroblasty, komórki śródbłonna, komórki mięśni gładkich i chondrocyty. Drugi inhibitor metaloproteaz, TIMP-2 o ciężarze 20–24 kDa, chociaż podobny do TIMP-1 jest immunologicznie odrębny. TIMP-2 tworzy kompleksy z proenzymem żelatynazy A, podobnie jak TIMP-1 z prożelatynazą B. Oba inhibitory blokują wszystkie znane metaloproteazy w ich aktywnych formach, a łącząc się z prożelatynazą A lub B zapobiegają ich autoaktywacji (HAYAKAWA 1994).

STASKUS i współpracownicy (1991) oraz URIA i współpracownicy (1994) zidentyfikowali trzeci tkankowy inhibitor metaloproteaz, izolowany z fibroblastów zarodka kurzego (CHIMP-3) oraz komórek inwazyjnego raka piersi (TIMP-3) o ciężarze 22 kDa. Przypuszcza się, że TIMP-3 ułatwia odrywanie się komórek nowotworowych od elementów ECM i przyspiesza zmiany morfologiczne związane z transformacją komórek (HAYAKAWA 1994).

Wykazano, że podniesienie poziomu syntezy i wydzielania tkankowych inhibitorów metaloproteaz znosi inwazyjność komórek nie tylko przez obniżenie ich ruchliwości. Zgodnie z wynikami DECLERCK'a i współpracowników (1992) przypuszcza się, że zwiększenie produkcji inhibitora metaloproteaz w inwazyjnych i metastatycznych fibroblastach transformowanych onkogenem *ras* powoduje drastyczne ograniczenie procesów proteolitycznych wokół kolonii nowotworowej. W rezultacie gromadzi się tam nadmiar składników ECM, co utrudnia komórkom

nowotworowym przedostanie się na teren prawidłowej tkanki okołonowotworowej, a więc hamuje inwazję już na jej wczesnym etapie.

Inhibitory metaloproteaz znajdują się w ECM, osoczu i płynach interstycjalnych. Dlatego mogą one łatwo docierać do enzymów znajdujących się na powierzchni komórek. Związanie z receptorem powierzchniowym może chronić niektóre enzymy przed działaniem inhibitorów. Istnieją także dodatkowe mechanizmy zabezpieczające proteazy przed działaniem ich inhibitorów. Należy do nich między innymi usytuowanie kolagenazy po cytoplazmatycznej stronie błony komórkowej, co chroni ten enzym przed zetknięciem z inhibitorem obecnym w środowisku (DECLERCK i współaut. 1992). Podobnie, otaczanie przez miejsca kontaktowe inwadopodiów, w których są nagromadzone enzymy proteolityczne i które intensywnie degradują ECM, utrudnia masowy napływ inhibitorów i unieczynnianie enzymów (MONSKY i CHEN 1993). Natomiast kontrolowana aktywność inhibitorów minimalizuje uszkodzenia ECM ściśle ograniczając miejsce i stopień degradacji jej struktur.

ROLA SYSTEMU UROKINAZA/PLAZMINOGEN/PLAZMINA

Cykl aktywacji plazminogenu i rola urokinazy

Plazminogen (90 kD) jest jednym z białek biorących udział w kontrolowanej proteolizie wewnątrz- i zewnątrznaczyniowej. Występuje w osoczu i w ECM, gdzie pełni ważną rolę w adhezji i migracji komórek. W cząsteczce plazminogenu można wyróżnić między innymi 5 domen typu zwanych kringle oraz trypsynopodobną domenę proteolityczną (MCLEAN i współaut. 1987). Plazminogen wiąże się z receptorami powierzchniowymi o niskiej specyficzności (FLOW i współaut. 1986, HAJJAR 1991, VAHERI 19922). Wiąże się też z okołokomórkowymi elementami ECM: glikozaminoglikanami i fibryną (MIGNATTI i RIFKIN 1993) oraz z fibronektyną, lamininą i witronektyną oraz trombospondyną (MOSCATELLI i RIFKIN 1988, VAHERI i współaut. 1992).

Aktywacja plazminogenu jest jednym z ważniejszych indukowanych, zewnątrzkomórkowych systemów proteolitycznych, związanych z kontrolą interakcji komórek nowotworowych z ECM (BLASI 1993). Aktywacja plazminogenu w wyniku proteolizy zachodzi głównie na powierzchni komórki. W czasie tej reakcji zarówno plazminogen, jak i jego aktywatory (przede wszystkim urokinaza) są związane ze swymi receptorami (STEPHENS i współaut. 1989, MCLEAN i współaut. 1987, MENHART i współaut. 1993). Produkt reakcji, plazmina, też pozostaje na powierzchni, związana z błoną komórkową, co chroni ją przed działaniem inhibitora, $\alpha 2$ -antyplazminy obecnej w środowisku. Okołokomórkowe rozmieszczenie elementów systemu urokinaza/plazminogen/plazmina przedstawia tabela 3. Plazmina jest proteazą serynową o bardzo szerokim spektrum działania. Może rozkładać takie składniki ECM jak fibronektyna i laminina, rdzeń białkowy proteoglikanów i zdenaturowane kolageny (tab. 2). Ponadto plazmina aktywuje metaloproteazy i elastazę oraz niektóre czynniki wzrostowe.

Jedną z ważniejszych funkcji plazminy jest aktywacja urokinazy, która sama jest aktywatorem plazminogenu. Z trzech fizjologicznych aktywatorów plazminogenu, streptokinaza jest wytwarzana przez bakterie, a dwa pozostałe: uroki-

naza (uPA, UK) i tkankowy aktywator plazminogenu (tPA) są endogenne. Charakteryistyczne w ich budowie są domeny kringle (McMULLEN i FUJIKAWA 1985). Znajduje się je w wielu białkach związanych z koagulacją i fibrynolizą krwi. Odpowiedzialne są między innymi za wiązanie z fibrynogenem, fibryną, $\alpha 2$ -antyplazminą, trombospondyną, a także różnymi rodzajami komórek (MENHART i współaut. 1993). Pomimo pewnego podobieństwa obu endogennych aktywatorów (ryc. 9) urokinaza wydaje się pełnić o wiele ważniejszą rolę w skomplikowanej sekwencji procesów prowadzących do powstania przerzutu.

Tabela 3

Okołokomórkowe rozmieszczenie elementów cyklu urokinaza/
plazminogen/plazmina (według VAHERI i współaut. 1992)

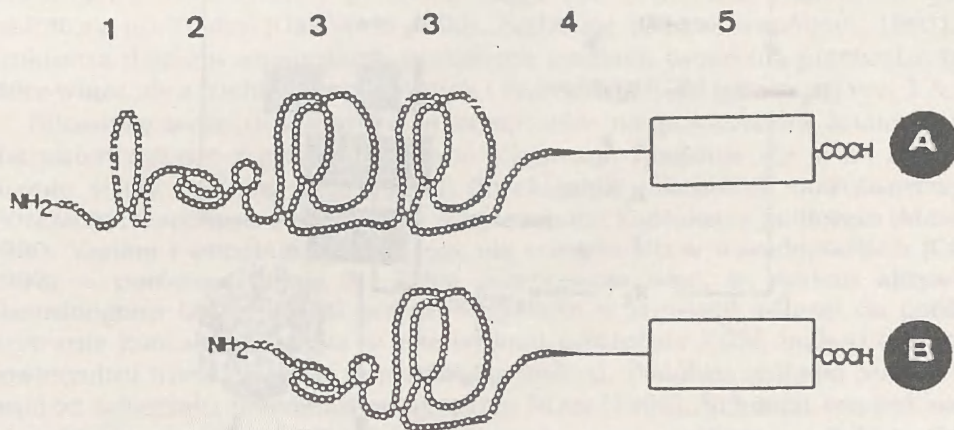
Element cyklu uPA/plg/pl	Rozmieszczenie
pro-uPA	kontakty ogniskowe, kontakty międzykomórkowe, zakończenia microspikes
aktywna uPA	kontakty ogniskowe, kontakty międzykomórkowe, zakończenia microspikes
uPAR	kontakty ogniskowe, kontakty międzykomórkowe, zakończenia microspikes
plg	równomierne na spodniej powierzchni komórki
PAI- 1	równomierne w podłożu pod komórką, wyłączając kontakty ogniskowe

Wysoki poziom ekspresji genu kodującego urokinazę wykazano różnymi metodami w większości badanych komórek ruchliwych, nowotworowych i prawidłowych (MONSKY i CHEN 1993). Stwierdzono też, że zakłócenia w działaniu urokinazy mogą zapobiec tworzeniu metastaz (CROWLEY i współaut. 1993).

Pro-urokinaza, zbudowana z pojedynczego łańcucha peptydowego, może być syntetyzowana przez prawidłowe komórki ruchliwe, komórki nowotworowe lub przez komórki stromy otaczające nowotwór (PYKE i współaut. 1991, CHEN 1992, BLASI 1993). W tym ostatnim przypadku przechwytyują ją ze środowiska i wiążą komórki nowotworowe mające na powierzchni receptory urokinazy (ryc. 7 A). Receptory te występują u komórek o własnościach inwazyjnych, lecz nie ma ich na powierzchni stacjonarnych komórek prawidłowych (BIANCHI i współaut. 1994). Natomiast prawidłowe komórki migrujące, jak monocyty czy granulocyty, mogą mieć od 10 000 do 250 000 receptorów urokinazy (BLASI 1993).

Receptor urokinazy wiąże zarówno urokinazę, jak i jej prekursor (ZHANG i współaut. 1993). Receptor jest glikoproteiną o ciężarze 55–65 kDa. Łączy się z błoną komórkową przez kowalencyjne wiązanie z GPI — glikozylofosfatydylinozytolem (FAZIOLI i BLASI 1994). Takie połączenie zapewnia kompleksowi urokinaza-receptor swobodne przemieszczanie się w błonie komórkowej (VAHERI i współaut. 1992). Urokinaza aktywowana na drodze ograniczonej proteolizy składa się z dwóch łańcuchów — A i B. Łańcuch A zbudowany jest z jednej domeny kringle oraz znajdującej się w pobliżu końca aminowego domeny EGF-podobnej, przez którą urokinaza łączy się z receptorem powierzchniowym. Łańcuch B urokinazy jest aktywny katalitycznie.

Najważniejszym aktywatorem urokinazy jest plazmina (ryc. 10). Pojawiają się doniesienia także o innych aktywatorach urokinazy jak: elastaza (MAKOVICH i OWEN 1989), kathepsyna B i serynowa proteaza błonowa występująca w fibroblastach transformowanych wirusem Rous (MIGNATTI i RIFKIN 1993).



Ryc. 9. Schemat budowy cząsteczek aktywatorów plazminogenu: tPA (A) i urokinazy (B). 1 — domena FN, 2 — domena czynnika wzrostowego, 3 — domena kringle, 4 — regiony łączące, 5 — region katalityczny.

Aktywacja urokinazy (podobnie jak plazminogenu) zachodzi na powierzchni komórki. Tempo aktywacji przez plazminę urokinazy związanej z receptorami powierzchniowymi jest około 20 razy wyższe niż urokinazy w roztworze. W związku z tym badano występowanie i lokalizację receptorów urokinazy oraz receptorów plazminy i plazminogenu na powierzchni tych samych komórek (nowotworowych i zarodkowych — PLOW i współaut. 1986, ZHANG i współaut. 1993). Stwierdzono, że oba rodzaje receptorów nie tylko występują na powierzchni tych samych komórek, ale również bezpośrednio ze sobą sąsiadują w ich przednich krawędziach. Ułatwia to ogniskowe aktywowanie urokinazy przez plazminę oraz aktywowanie plazminogenu przez urokinazę. Ponieważ w tej drugiej reakcji powstaje plazmina, cykl się zamyka (ryc. 10).

Aktywowana urokinaza bardzo wolno oddysocjuje od swego receptora i pozostaje czynna na powierzchni komórkowej przez 4–6 godzin. Związanie z receptorem nie powoduje jej internalizacji. Dopiero związanie powierzchniowej urokinazy z szybko działającym inhibitorem PAI-1 (plasminogen activator inhibitor type 1) hamuje aktywność proteolityczną urokinazy i powoduje internalizację całego kompleksu receptor-urokinaza-inhibitor (CUBELLIS i współaut. 1990). Pomimo tego, że internalizacji ulega cały kompleks, tylko urokinaza i jej inhibitor są rozkładane w lizosomach. Receptor zaś powraca na powierzchnię (ryc. 10), co pozwala komórce na szybkie przegrupowanie receptorów urokinazy, a więc na szybkie zmiany rozmieszczenia na powierzchni komórek regionów o wysokiej aktywności proteolitycznej. Może to być jedną z ważniejszych funkcji inhibitora urokinazy.

Są tego liczne dowody. Stwierdzono między innymi wzrost poziomu aktywności urokinazy w migrujących komórkach śródbłonna, podczas gdy po ich zatrzymaniu spadał on do wartości wyjściowej (PEPPER i współaut. 1987). Urokinaza stymuluje chemotaksję granulocytów (GUDEWICZ i GILBOA 1987). Podniesiony poziom ekspresji urokinazy charakteryzuje komórki większości nowotworów złośliwych, a przerzuty mogą być skutecznie hamowane przez inhibitory urokinazy (OSSOWSKI 1992). Sądzi się (QUAX i współaut. 1991), że urokinaza działa w stosunkowo wczesnych stadiach tworzenia przerzutu, tych które wiążą się z ruchliwością komórek i degradacją ECM (porównaj ryc. 1 A, B).

Rozmieszczenie urokinazy i jej receptorów na powierzchni komórki jest charakterystyczne z punktu widzenia lokomocji. Znajduje się je na spodniej stronie strefy czołowej migrujących fibroblastów i komórek nowotworowych (POLLANEN i współaut. 1987) oraz w miejscach ich kontaktu z podłożem (MANGEL 1990, VAHERI i współaut. 1992), lecz nie odkryto ich w inwadopodiach (CHEN 1992) — porównaj tabela 3. CHEN przypuszcza więc, że system aktywacji plazminogenu bierze udział przede wszystkim w regulacji adhezji do podłoża (zrywanie kontaktów), a nie w intensywnej proteolizie ECM zachodzącej przy powierzchni inwadopodiów (torowanie przejścia). Podobne wnioski można wysnuć ze schematu przedstawionego przez BLASI (1993). Schemat ten pokazuje, jak cykl aktywacji/inaktywacji plazminogenu przez urokinazę i inhibitor PAI-1 w migrującej komórce może wpływać na jej kontakty z podłożem.

Związanie urokinazy z jej komórkowym receptorem stymuluje migrację komórek i potęguje ich reakcje chemotaktyczne. Ponieważ receptor urokinazy wiąże się z błoną przez GPI, który nie ma połączeń z cytoszkieletem odpowiedzialnym za ruchliwość komórek, przypuszcza się, że receptor ten tworzy kompleks z innymi białkami, z których przynajmniej jedno ulega istotnym zmianom w następstwie przyłączenia urokinazy do receptora (BUSO i współaut. 1994).

Ekspresja urokinazy w komórce może być wywołana przez wiele czynników takich jak cytokiny, CAMP, prostaglandyny, UV. Cytokiny i hormony kontrolują także ekspresję receptorów urokinazy. Ekspresję urokinazy można też wywoływać w komórkach nowotworowych przez zerwanie połączeń międzykomórkowych, tworzonych przez cząsteczki E-kadheryny. Zerwanie tych połączeń w wyniku wprowadzenia do środowiska odpowiednich przeciwciał powoduje reorganizację aktywnego cytoszkieletu tych komórek, co indukuje ekspresję genu kodującego urokinazę (FRIXEN i NAGAMINE 1993, BOTTERI i współaut. 1990). Prowadzi to więc do współdziałania dwóch elementów fenotypu metastatycznego: utraty połączeń międzykomórkowych i podjęcia syntezy urokinazy, a przy tym pojawiają się one we właściwej kolejności. Najpierw działa czynnik umożliwiający migrację (przez uwolnienie komórek), potem czynnik, który ją ułatwia (przez kontrolę adhezji i torowanie przejść).

WYSTĘPOWANIE I WSPÓŁDZIAŁANIE ENZYMÓW DEGRADUJĄCYCH ECM

Ruchliwość komórek połączona z ich zdolnością do proteolizy składników ECM jest jedną z podstawowych cech inwazyjnego fenotypu komórek nowotwo-

rowych (MATRISIAN 1992). Proteoliza jest konieczna, aby komórki rakowe mogły penetrować interstycjum dokonując inwazji tkanki okołonowotworowej oraz tworząc odległe przerzuty (STETLER-STEVENSON 1993a).

Pierwsze obserwacje dotyczące proteolitycznych zdolności komórek nowotworowych datują się od czasów, kiedy podczas prób prowadzenia hodowli komórek używano jako podłoża skrzepów. Zwrócono wtedy uwagę, że komórki nowotworowe rozpuszczają takie podłoża. FISCHER (1925) wysunął na podstawie swoich badań hipotezę, że zjawisko to może być wynikiem degradacji stromy pod wpływem substancji wydzielanej przez inwazyjny nowotwór. Później Fischer i inni badacze postulowali, że liza skrzepu przez komórki nowotworowe może wiązać się z aktywacją obecnego w osoczu (i w skrzepie) plazminogenu i działaniem produktu jego aktywacji — plazminy.

Przez wiele lat obserwacje te nie budziły szczególnego zainteresowania. Renesans badań nad tym zjawiskiem nastąpił w latach 70-tych, kiedy zauważono, że wirusowa transformacja hodowanych komórek tkankowych wywołuje gwałtowny wzrost ich zewnątrzkomórkowej aktywności proteolitycznej, spowodowany aktywacją plazminogenu (QUINGLEY i współaut. 1974). W wyniku dalszych badań w tym kierunku stwierdzono, że i inne proteazy serynowe, a także metaloproteazy oraz glikozydazy również towarzyszą komórkom transformowanym i nowotworowym. Okazało się też, że wzmocniona zewnątrzkomórkowa aktywność proteolityczna charakteryzuje także migrujące komórki zarodkowe, leukocyty, komórki biorące udział w gojeniu rany i inne ruchliwe komórki prawidłowe.

Współczesne badania nad mechanizmami interakcji proteaz z elementami ECM podczas inwazji nowotworowej skupiają się wokół dwóch problemów: lokalizacji tych enzymów i ich współdziałania.

LOKALIZACJA ENZYMÓW

CHEN i współpracownicy (1984, 1985), CHEN i CHEN (1987), CHEN (1989, 1992), MONSKY i CHEN (1993), oraz MONSKY i współpracownicy (1993) wykazali, że degradacja fibronektyny i innych elementów ECM zachodzi w miejscach kontaktów migrujących komórek z podłożem, co wskazuje na przestrzenne ograniczenie proteolizy ECM do okolic bezpośrednio sąsiadujących z błoną komórkową. JONES i DECLERCK (1980) wykazali również, że degradacja glikoprotein, kolagenu i elastyny w ECM komórek mięśni gładkich zachodzi tylko wtedy, gdy komórki nowotworowe są osadzone bezpośrednio na albo w ECM. Gdy fragmenty ECM zawieszano w środowisku, nie następowała degradacja kolagenów ani elastyny. Degradacja jest więc ograniczona przestrzennie i wymaga bezpośredniego kontaktu tych białek z powierzchnią komórki. Zarówno wymienieni badacze, jak i wielu innych autorów (TRYGGVASON i współaut. 1987, ZUCKER i współaut. 1987, MOSCATELLI i RIFKIN 1988, MONSKY i CHEN 1993, MIGNATTI i RIFKIN 1993, STETLER-STEVENSON i współaut. 1993a i b), zgodnie lokalizują enzymy degradujące ECM na powierzchni migrujących przez nią komórek prawidłowych i nowotworowych.

Według MOSCATELLI i RIFKIN (1988) taka lokalizacja ma następujące znaczenie: a) związane z błoną proenzym łatwiej ulega aktywacji, a enzym może być

bardziej aktywny niż ten sam enzym swobodny w ECM. Sąsiedztwo proenzymów i ich aktywatorów na powierzchni komórki umożliwia i przyspiesza proces aktywacji; b) dzięki związaniu z receptorem powierzchniowym enzym może być chroniony przed inaktywacją przez inhibitor; c) związanie enzymów z powierzchnią komórki może prowadzić do ich gromadzenia się i skupiania w określonych miejscach; nagromadzenie i ko-lokalizacja na powierzchni komórki enzymów rozkładających ten sam substrat zwiększa prędkość degradacji tego jednego substratu; w przypadku enzymów rozkładających różne składniki ECM oznacza to koncentrację elementów biorących udział w wielostopniowej degradacji ECM, co usprawnia i przyspiesza ten proces; d) zatrzymanie enzymów przy błonie komórkowej ogranicza proteolizę tylko do bezpośredniego sąsiedztwa komórki, co pozwala na jej kontrolę i przestrzenne ograniczenie.

WSPÓLDZIAŁANIE ENZYMÓW

Badania dotyczące współdziałania enzymów pokazały między innymi, że działają one w określonej kolejności. Wynikać to może z kolejności ich aktywacji. Przykładem tego może być opisywana, między innymi przez VAN ASWEGEN i DU PLESSIS (1992), typowa sekwencja aktywacji proteaz: aktywacja plazminogenu przez uPA, po czym aktywowanie kolagenazy przez produkt pierwszej reakcji — plazminę. W rezultacie najpierw ulegają degradacji glikoproteiny (rozkładane przez plazminę), a następnie kolageny rozkładane przez kolagenazę.

Kolejność tę potwierdzają MONTGOMERY i współpracownicy (1993). Autorzy ci stwierdzili na powierzchni komórek czerniaka M24met występowanie interstycjalnej kolagenazy, żelatynazy A i B, stromelizyny i urokinazy (ta ostatnia znajdowała się również w środowisku). Po użyciu specyficznych inhibitorów (TIMP-2 i uPAI-1) udało im się pokazać kolejność degradacji poszczególnych elementów ECM (BM i interstycjum) przez komórki M24met. Zależny od urokinazy i plazminy rozpad glikoprotein zawsze wyprzedzał działanie metaloproteaz.

Prawdopodobnie ta kolejność jest związana z budową ECM. Glikoproteiny ECM otaczają rusztowanie kolagenowe i chronią je przed proteolizą. Dlatego usunięcie glikoprotein jest konieczne, aby powierzchniowe kolagenazy komórek nowotworowych miały dostęp do swego substratu. Proteoliza obu tych składników ECM narusza jej ciągłość strukturalną w wystarczającym stopniu, by mogła nastąpić infiltracja przez komórki nowotworowe (JONES i DECLERCK 1980).

Funkcje urokinazy i stymulowanej przez nią aktywacji plazminogenu wzbudziły już zainteresowanie klinicystów (JANICKE i współaut. 1994). Można spodziewać się, że wyniki prac w tym kierunku pozwolą na zastosowanie inhibitorów tego enzymu jako pomocniczego środka w leczeniu nowotworów (FAZIOLI i BLASI 1994). Podobne nadzieje budzą badania inhibitorów metaloproteaz (TROLL i współaut. 1984, HENDRIX i współaut. 1990, KENNEDY 1994, VASSALI i PEPPER 1994). W obu przypadkach dokładniejsze poznanie mechanizmów ułatwiających poruszanie się komórek nowotworowych w organizmie może pomóc w konstruowaniu skutecznych barier na ich drodze.

MIGRATION OF THE TUMOUR CELLS

Summary

The environment of each individual cell in the tissue of the body is formed by extracellular matrix (ECM). The macromolecules that make up the ECM can be grouped into: 1. fiber forming elements as collagens and elastin, 2. glycoproteins, and 3. proteoglycans. The normal and neoplastic migrating cells need to "carve a path" through the surrounding matrix to reach their destination. Recently, experiments employing model systems for the study of cell invasion, have allowed a more direct evaluation of the role of proteolytic enzymes in this process and have characterized the interactions of various degradative enzymes with each other and with their inhibitors. Neoplastic and normal migrating cells elaborate a vast array of proteases that enable them to proteolytically digest the underlying adhesion molecules. In doing this, the tumour cells disrupt the interactive interactions holding them in place, so they are free to degrade and migrate through the basement membrane and interstitial stroma. All the major classes of secreted proteases (mainly the metalloproteases and plasminogen activator—urokinase) are reported to be associated with the plasma membrane. This cell surface localisation is an essential feature in the control of cell migration, invasion and metastasis.

LITERATURA

- AKIYAMA S. K., NAGATA K., YAMADA K. M., 1990. *Cell surface receptors for extracellular matrix components*. Bioch. Biophys. Acta 1031, 91-110.
- ALBELDA S. M., BUCK C. A. 1990. *Integrins and other cell adhesion molecules*. FASEB J. 4, 2868-2880.
- ANDERSON J. C., 1976. *Glycoproteins of the connective tissue matrix*. Int. Connect. Tiss. Res. 7, 251-322.
- AZNAVOORIAN S., STRACKE M. I., KRUTZSCH H., SCHIFFMANN E., LIOTTA L. A., 1990. *Signal transduction for chemotaxis and haptotaxis by matrix molecules in tumor cells*. J. Cell Biol. 110, 1427-1438.
- BARSKY S. H., RAO C. N., HYAMS D., LIOTTA L. A., 1984. *Characterization of a laminin receptor from human breast carcinoma tissue*. Breast Canc. Res. Treat. 4, 181-188.
- BASSET P., BELLOCQ J. P., WOLF C., STOLL J., HUTIN P., LIMACHER J. M., PODHAJECER O. L., CHENARD M. P., RIO M. C., CHAMBON P., 1990. *A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas*. Nature 348, 699-703.
- BERNHARD R. J., GRUBER S. B., MUSCHEL R. J., 1994. *Direct evidence linking expression of matrix metalloproteinase 9 (92 kDa gelatinase, collagenase) to the metastatic phenotype in transformed rat embryo*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 4293-4297.
- BIANCHI E., COHEN R. L., THOR A. T., TODD R. F., MIZUKAMI I. F., LAWRENCE D. A., LJUNG B. M., 1994. *The urokinase receptor is expressed in invasive breast cancer but not in normal breast tissue*. Canc. Res. 54, 861-866.
- BLASI F., 1993. *Urokinase and urokinase receptor: a paracrine- autocrine system regulating cell migration and invasiveness*. BioEs. 15, 105-111.
- BORCHERS A. H., POWELL M. B., FUSENIG N. E., BOWDEN G. T., 1994. *Paracrine factor and cell-cell contact-mediated induction of protease and c-ets gene expression in malignant keratinocyte/dermal cocultures*. Exp. Cell Res. 213, 143-147.
- BOTTERI F. M., BALMER-HOFER K., RAJPUT P., NAGAMINE Y., 1990. *Disruption of cytoskeletal structures results in the induction of the urokinase-type plasminogen activator gene expression*. J. Biol. Chem. 265, 13327-13333.
- BUCK C. A., HORWITZ A. F., 1987. *Cell surface receptors for extracellular matrix molecules*. Ann. Rev. Cell Biol. 3, 179-205.
- BUCK C. A., KNUDSEN K. A., DAMSKY C. H., DECKER C. L., GREGGS R. R., DUGGAN K. E., BORYCZKO D., HORWITZ A. F., 1985. *Integral membrane protein complexes in cell-matrix adhesion*. [W:] *The cell in contact*. EDELMAN G. M. i THIERY J.-P. (red.) John Wiley and Sons, New York, 345-364.
- BUSO N., MASUR S. K., LAZEGA D., WAXMAN S., OSSOWSKI L., 1994. *Induction of cell migration by pro-urokinase binding to its receptor: possible mechanism for signal transduction in human epithelial cells*. J. Cell Biol. 126, 259-270.

- CAMP R. L., KRAUS T. A., PURE E., 1991. Variation in the cytoskeletal interaction and posttranslational modification of the CD44 homing receptor in macrophages. *J. Cell Biol.* 115, 1283-1292.
- CHEN W.-T., 1989. Proteolytic activity of specialized surface protrusion formed at rosette contact sites of transformed cells. *J. Exp. Zool.* 251, 167-185.
- CHEN W.-T., 1992. Membrane proteases: roles in tissue remodeling and tumor invasion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4, 802-809.
- CHEN W.-T., OLDEN K., BERNARD B. A., CHU F. F., 1984. Expression of transformation —associated protease(s) that degrade fibronectin at cell contact sites. *J. Cell Biol.* 98, 1546-1555.
- CHEN W.-T., CHEN J. M., PARSONS S. J., PARSONS J. T., 1985. Local degradation of fibronectin in sites of expression of the transforming gene product pp60src. *Nature (London)* 316, 156-158.
- CHEN J. M., CHEN W.-T., 1987. Fibronectin-degrading proteases from the membranes of transformed cell. *Cell* 48, 193-203.
- CHIUQUET-EHRISMANN R., 1990. What distinguishes tenascin from fibronectin. *FASEB J.* 4, 2598-2604.
- CROWLEY C. W., COHEN R. L., LUCAS B. K., LIU G., SHUMAN M. A., LEVINSON A. D., 1993. Prevention of metastasis by inhibition of the urokinase receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5021-5025.
- CUBELLIS M. V., WUN T.-C., BLASI F., 1990. Receptor-mediated internalization and degradation of urokinase is caused by its specific inhibitor PAI-1. *EMBO J.* 9, 1079-1085.
- DAVID G., 1993. Integral membrane heparan sulphate proteoglycans. *FASEB J.* 7, 1023-1030.
- DAVIES B., WAXMAN J., WASAN H., ABEL P., WILLIAMS G., KRAUSZ T., NEAL D., THOMAS D., HANBY A., BALKWILL F., 1993. Levels of matrix metalloproteases in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion. *Canc. Res.* 53, 5365-5369.
- DECLERCK Y. A., PEREZ N., SHIMADA H., BOONE T. C., LANGLEY K. E., TAYLOR S. M., 1992. Inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinases. *Canc. Res.* 52, 701-708.
- DI MILLA P. A., STONE J. A., QUINN J. A., ALBELDA S. M., LAUFFENBURGER D. A., 1993. Maximal migration of human smooth muscle cells on fibronectin and type IV collagen occurs at an intermediate attachment strength. *J. Cell Biol.* 122, 729-737.
- ENTERLINE H. T., COMAN D. R., 1950. The amoeboid motility of human and animal neoplastic cells. *Cancer* 3, 1033-1038.
- ERICKSON H. P., 1993. Tenascin-C, tenascin-R and tenascin-X: a family of talented proteins in search of function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 869-876.
- ERICKSON H. P., BOURDON M. A., 1989. Tenascin: an extracellular matrix protein prominent in specialized embryonic tissues and tumors. *Ann. Rev. Cell Biol.* 5, 71-92.
- FAZIOLI F., BLASI F., 1994. Urokinase-type plasminogen activator and its receptor: new targets for anti-metastatic therapy? *TIPS* 15, 25-29.
- FISCHER A., 1925. Tissue culture. Studies in experimental morphology and general physiology of tissue cells in vitro. Levin and Munksgaard. Copenhagen.
- FRANZBLAU C., FARIS B., 1981. Elastin. [W:] *Cell biology of extracellular matrix*. Hay E. D. (red.) Plenum Press. New York and London, 65-93.
- FRIEXEN U. H., NAGAMINE Y., 1993. Stimulation of urokinase-type plasminogen activator expression by blockage of E-cadherin-dependent cell-cell adhesion. *Canc. Res.* 53, 3618-3623.
- FURCHT L. T., MCCARTHY J. B., PALM S. L., BASARA M. L., ENENSTEIN I., 1984. Peptide fragments of laminin and fibronectin promote migration (haptotaxis and chemotaxis) of metastatic cells. [W:] *Basement membranes and cell movement*, Ciba Foundation Symp. 108, Pitman, London, 130-145.
- GAMIAN A., 1992. Słownictwo glikoprotein, glikopeptydów i peptydoglikanów. *Postępy Biochemii* 38, 81-87.
- GIANCOTTI F. G., MAINIERO F., 1994. Integrin-mediated adhesion and signaling in tumorigenesis. *Bioch. Biophys. Acta* 1198, 47-64.
- GROSS J., 1981. An assay on biological degradation of collagen. [W:] *Cell biology of extracellular matrix*. Hay E. D. (red.) Plenum Press, New York and London, 217-258.
- GROSS J., LAPIERE C. M., 1962. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54, 1197-1204.
- GUDEWICZ P. W., GILBOA N., 1987. Human urokinase-type plasminogen activator stimulates chemotaxis of human neutrophils. *Bioch. Bioph. Res. Commun.* 147, 1176-1181.
- HAJJAR K. A., 1991. The endothelial cell tissue plasminogen activator receptor. *J. Biol. Chem.* 266, 21962-21970.
- HARDINGHAM T. E., FOSANG A. J., 1992. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J.* 6, 861-870.

- HAR-EL B., TANZER M. L., 1993. *Extracellular matrix 3: Evolution of the extracellular matrix in invertebrates*. FASEB J. 7, 1115-1123.
- HART I. R., GOODE N. T., WILSON R. E., 1989. *Molecular aspects of metastatic cascade*. Bloch. Biophys. Acta 989, 65-84.
- HASCALL V. C., HASCALL G. K., 1981. *Proteoglycans*. [W:] *Cell biology of extracellular matrix*. HAY E. D. (red.), Plenum Press, New York and London, 39-63.
- HAYAKAWA T., 1994. *Tissue inhibitors of metalloproteinases and their cell growth-promoting activity*. Cell Str. Funct. 19, 109-114.
- HENDRIX M. J. C., WOOD W. R., SEFTOR E. A., LOTAN D., NAKAJIMA M., MISIOROWSKI R. L., SEFTOR R. E. B., STETLER-STEVENSON W. G., BEVACQUA S. J., LIOTTA L. A., SOBEL M. E., RAZ A., LOTAN R. 1990. *Retinoic acid inhibition of human melanoma cell invasion through a reconstituted basement membrane and its relation to decreases in the expression of proteolytic enzymes and motility factor receptor*. Canc. Res. 50, 4121-4130.
- HERRLICH P., ZOLLER M., PALS S. T., PONTA H., 1993. *CD44 splice variants: metastases meet lymphocytes*. Immunol. Today 14, 395-399.
- HILGARD P., HELLMANN K., 1983. *Invasion and metastases as targets for tumour therapy. An overview* [W:] *The control of tumour growth and its biological bases*. DAVIES W., MALTONI C., TANNEBERGER S. (red.), Akademie-Verlag Berlin, 33-41.
- HYNES R. O., 1981. *Fibronectin and its relation to cellular structure and behavior*. [W:] *Cell biology of extracellular matrix*. HAY E. D. (red.) Plenum Press, New York and London, 295-334.
- JANICEK F., PACHE L., SCHMITT M., ULM K., THOMSEN C., PRECHTL A., GRAEFF H., 1994. *Both the cytosol and detergent extracts of breast cancer tissue are suited to evaluate the prognostic impact of the urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor, plasminogen activator inhibitor type 1*. Canc. Res. 54, 2527-2530.
- JONES P. A., DECLERCK Y. A., 1980. *Destruction of extracellular matrices containing glycoproteins, elastin and collagen by metastatic human tumor cells*. Canc. Res. 40, 3222-3227.
- JOUANNEAU J., MOENS G., BOURGEOIS Y., POUPON M. F., THIERY J.-P., 1994. *A minority of carcinoma cells producing acidic fibroblast growth factor induces a community effect for tumor progression*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 286-290.
- JULIANO R. L., 1987. *Membrane receptors for extracellular matrix macromolecules: relationship to cell adhesion and tumor metastasis*. Bloch. Bioph. Acta 907, 261-278.
- JULIANO R. L., HASKILL S., 1993. *Signal transduction from extracellular matrix*. J. Cell Biol. 120, 577-585.
- KANEMOTO T., REICH R., ROYCE L., 1990. *Identification of an amino acid sequence from the laminin A chain that stimulates metastasis and collagenase IV production*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 2279-2283.
- KENNEDY A. R., 1994. *Prevention of carcinogenesis by protease inhibitors*. Canc. Res. (suppl.) 54, 1999-2005.
- KLEINER D. E. Jr., STETLER-STEVENSON W. G., 1993. *Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteinases*. Curr. Opin. Cell Biol. 5, 891-897.
- KLOMINEK J., ROBERT K.-H., SUNDQVIST K.-G., 1993. *Chemotaxis and haptotaxis of human malignant mesothelioma cells: effects of fibronectin, laminin, type IV collagen, and an autocrine motility factor-like substance*. Canc. Res. 53, 4376-4382.
- KNUDSON C. B., KNUDSON W., 1993. *Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis, and disease*. FASEB J. 7, 1233-1241.
- KNUDSON W., BISWAS C., TOOLE B. B., 1984. *Interactions between human tumor cells and fibroblasts stimulate hyaluronate synthesis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6767-6771.
- KOVACS E. J., 1991. *Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue*. Immunol. Today 12, 17-23.
- KRAMER R. H., NICOLSON G. L., 1979. *Interactions of tumor cells with vascular endothelial cell monolayers: a model for metastatic invasion*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5704-5708.
- LAHAV J., 1993. *The functions of thrombospondin and its involvement in physiology and pathophysiology*. Bloch. Biophys. Acta 1182, 1-14.
- LAURENT T. C., FRASER R. E., 1992. *Hyaluronan*. FASEB J. 6, 2397-2404.
- LEE G. M., JOHNSTONE B., JACOBSON K., CATERSON B., 1993. *The dynamic structure of the pericellular matrix on living cells*. J. Cell Biol. 123, 1899-1907.
- LIN C. Q., BISSELL M. J., 1993. *Multi-faced regulation of cell differentiation by extracellular matrix*. FASEB J. 7, 737-743.

- LINSENMAYER T. F., 1981. *Collagen* [W:] *Cell biology of extracellular matrix*. HAY E. D. (red.) Plenum Press, New York and London, 5-37.
- LIOTTA L. A., 1984. *Final general discussion* [W:] *Basement membranes and cell movement*, Ciba Foundation Symp. 108, Pitman, London, 269.
- LIOTTA L. A., RAO C. N., BARSKY S. H., BRYANT G., 1984. *The laminin receptor and basement membrane dissolution: role in tumour metastasis* [W:] *Basement membranes and cell movement*, Ciba Foundation Symp. 108, Pitman, London, 146-162.
- LIOTTA L. A., WEWER U. M., RAO C. N., BRYANT G., 1985. *Laminin receptor* [W:] *The cell in contact*. EDELMAN G. M. i THIERY J.-P. (red.) John Wiley and Sons, New York, 333-344.
- LIOTTA L. A., RAO C., WEWER U. M., 1986. *Biochemical interaction of tumor cells with the basement membrane*. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 1037-1057.
- LIOTTA L. A., STEEG P. S., STETLER-STEVENSON W. G., 1991. *Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation*. *Cell* 64, 327-336.
- MAKOVICH R., OWEN W. G., 1989. *An elastase-dependent pathway of plasminogen activation*. *Biochemistry* 28, 4517-4522.
- MANGEL W. F., 1990. *Better reception for urokinase*. *Nature* 344, 488-489.
- MARCOTTE P. A., KOZAN I. M., DORWIN S. A., RYAN J. M., 1992. *The matrix metalloproteinase pump-1 catalyze formation of low molecular WEIGHT (Pro)urokinase in cultures of normal human kidney cells*. *J. Biol. Chem.* 267, 13803-13806.
- MAREEL M. M., VAN ROY F. M., BRACKE M. E., 1993. *How and when do tumor cells metastasize*. *Crit. Rev. Oncogen.* 4, 559-594.
- MARTIN G. R., TIMPL R., 1987. *Laminin and other basement membrane components*. *Ann. Rev. Cell Biol.* 3, 57-85.
- MATRISIAN L. M., 1990. *Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling*. *Trends Genet.* 6, 121-125.
- MATRISIAN L. M., 1992. *The matrix-degrading metalloproteinases*. *BioEss.* 14, 455-463.
- MAUVIEL A., 1993. *Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression*. *J. Cell. Biochem.* 53, 288-295.
- MAYNE R., BREWTON R. G., 1993. *New members of the collagen superfamily*. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 883-890.
- MCDONALD J. A., 1988. *Extracellular matrix assembly*. *Ann. Rev. Cell Biol.* 183-207.
- MCGOWAN S. E., 1992. *Extracellular matrix and the regulation of lung development and repair*. *FASEB J.* 6, 2895-2903.
- MCLEAN J. W., TOMLISON J. E., KUANG W.-J., EATON D. L., CHEN E. Y., FLESS G. M., SCANU A. M., LAWN R. M., 1987. *cDNA sequence of human apolipoprotein (a) is homologous to plasminogen*. *Nature* 300, 132-137.
- McMULLEN B. A., FUJIKAWA K., 1985. *Amino acid sequence of the heavy chain of human alfa-factor XIIa (activated Hageman factor)*. *J. Biol. Chem.* 260, 5328-5334.
- MENHART N., McCANCE S. G., SEHL L. C., CASTELLINO F. J., 1993. *Functional independence of the kringle 4 and kringle 5 region of human plasminogen*. *Biochem.* 32, 8799-8806.
- MERZAK A., KOOCHECKPOUR S., PILKINGTON G. J., 1994. *CD44 mediates human glioma cell adhesion and invasion in vitro*. *Canc. Res.* 54, 3988-3992.
- MIGNATTI P., RIFKIN D. B., 1993. *Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion*. *Physiol. Rev.* 73, 161-195.
- MIGNATTI P., ROBBINS E., RIFKIN D. B., 1986. *Tumor invasion through the human amniotic membrane: requirement for a proteinase cascade*. *Cell* 47, 487-498.
- MONSKY W. L., CHEN W.-T., 1993. *Proteases of cell adhesion proteins in cancer*. *Canc. Biol.* 4, 251-258.
- MONSKY W. L., KELLY T., LIN C.-Y., YEH Y., STETLER-STEVENSON W. G., MUELLER S. C., CHEN W.-T., 1993. *Binding and localization of M_r72,000 matrix metalloproteinase at cell surface invadopodia*. *Canc. Res.* 53, 3159-3164.
- MONTGOMERY A. M. P., DEClerck Y. A., LANGLEY K. E., REISFELD R. A., MUELLER B. M., 1993. *Melanoma-mediated dissolution of extracellular matrix: contribution of urokinase-dependent and metalloproteinase-dependent proteolytic pathways*. *Canc. Res.* 53, 693-700.
- MOSCATELLI D., RIFKIN D. B., 1988. *Membrane and matrix localization of proteinases: a common theme in tumor cell invasion and angiogenesis*. *Biochem. Biophys. Acta* 948, 67-85.
- MOSHER D. F., SOTTILE J., WU C., MCDONALD J. A., 1992. *Assembly of extracellular matrix*. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4, 810-818.
- MULLER D., WOLF C., ABECASSIS J., MILLON R., ENGELMAN A., BRONNER G., ROUYER N., RIO M.-C., EBER M., MATHLIN G., CHAMBON P., BASSET P., 1993. *Increased stromelysin 3 gene expression is*

- associated with increased local invasiveness in head and neck squamous cell carcinomas. *Canc. Res.* 53, 165-169.
- MYOHANEN H. T., STEPHENS R. W., HEDMAN K., TAPIOVAARA H., RONNE E., HOYER-HANSEN G., DANO K., VAHERI A., 1993. *Distribution and lateral mobility of the urokinase-receptor complex at the cell surface.* *J. Hist. Cytoch.* 41, 1291-1301.
- NABESHIM D. K., LANE W. S., BISWAS C., 1991. *Partial sequencing and characterization of the tumor cell-derived collagenase stimulatory factor.* *Arch. Bioch. Biophys.* 285, 90-96.
- NOEL A., MUNAUF C., BOULVAIN A., CALBERG-BACQ C. M., LAMBERT C. A., NUSGENS B., LAPIERE C. M., FOIDART J. M., 1992. *Modulation of collagen and fibronectin synthesis in fibroblasts by normal and malignant cells.* *J. Cell. Bioch.* 48, 150-161.
- OSSOWSKI L., 1992. *Invasion of connective tissue by human carcinoma cell lines: requirement for urokinase, urokinase receptor and interstitial collagenase.* *Canc. Res.* 52, 6754-6760.
- OSTROWSKI K., KAWIAK J. (red.), 1990. *Cytofizjologia.* PZWL, Warszawa.
- PAWELEC, D. N., BOXBERGER H.-J., 1994. *Defined tumor cell-host interactions are necessary for malignant growth.* *Crit. Rev. Oncogen.* 5, 69-105.
- PEPPER M. S., VASSALI J. D., MONTESANO R., ORCI L., 1987. *Urokinase-type plasminogen activator in induced in migrating capillary endothelial cells.* *J. Cell Biol.* 105, 2535-2541.
- PLOW E. F., FREANEY D. E., PLESCIA J., MILES L. A., 1986. *The plasminogen system and cell surface: evidence for plasminogen and urokinase receptors on the same cell type.* *J. Cell Biol.* 103, 2411-2420.
- POLETTE M., CLAVEL C., MULLER D., ABEÇASSIS J., BINNIGER I., BIRENBOUT P., 1991. *Detection of mRNAs encoding collagenase 1 and stromelysin 2 in carcinomas of the head and neck by in situ hybridization.* *Inv. Met.* 11, 76-83.
- POLLANEN J., SAKSELA O., SALONEN E.-M., ANDREASEN P., NIELSEN I. S., DANO K., VAHERI A., 1987. *Distinct localization of urokinase-type plasminogen activator and its type 1 inhibitor under cultured human fibroblasts and sarcoma cells.* *J. Cell Biol.* 106, 124-132.
- POLLANEN J., HEDMAN K., NIELSEN L. S., DANO K., VAHERI A., 1988. *Ultrastructural localization of plasma membrane-associated urokinase-type plasminogen activator at focal contacts.* *J. Cell Biol.* 106, 87-95.
- PONTA H., SLEEMAN J., HERRLICH P., 1994. *Tumor metastasis formation: cell-surface proteins confer metastasis-promoting or -suppressing properties.* *Bioch. Biophys. Acta* 1198, 1-10.
- PRIETO A. L., ANDERSSON-FISONE C., CROSSIN K. L., 1992. *Characterization of multiple adhesive and counteradhesive domains in the extracellular matrix protein cytactin.* *J. Cell Biol.* 119, 663-678.
- PYKE C., KRISTENSEN P., RALFKIAER E., GRONDAHL-HANSEN J., ERIKSEN J., BLASI F., DANO K., 1991. *Urokinase-type plasminogen activator is expressed in stromal cells and its receptors in cancer cell at invasive foci in human colon adenocarcinomas.* *Am. J. Pathol.* 138, 1059-1067.
- QUAX P. H. A., VAN MUIJEN G. N. P., WEENING-VERHOEFF E. J. D., LUND L. R., DANO K., RUITER D. J., VERHEIJEN J. H., 1991. *Metastatic behaviour of human melanoma cell lines in nude mice correlates with urokinase-type plasminogen activator, its type 1 inhibitor and urokinase-mediated matrix degradation.* *J. Cell Biol.* 115, 191-199.
- QUINGLEY J. P., OSSOWSKI L., REICH E., 1974. *Plasminogen, the serum proenzym activated by factors from cell transformed by oncogenic viruses.* *J. Biol. Chem.* 249, 4306-4311.
- RAGHOW R., 1994. *The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis.* *FASEB J.* 8, 823-831.
- RAZ A., ZÖLLER N., BEN-ZE'EV, 1986. *Cell configuration and adhesive properties of metastasizing and non-metastasizing BSp73 rat adenocarcinoma cells.* *Exp. Cell Res.* 162, 127-141.
- RUOSLAHTI E., 1988. *Structure and biology of proteoglycans.* *Ann. Rev. Cell Biol.* 4, 229-255.
- RUOSLAHTI E., 1989. *Proteoglycans in cell regulation.* *J. Biol. Chem.* 264, 13369-13372.
- RUOSLAHTI E., YAMAGUCHI Y., 1991. *Proteoglycans as modulator of growth factor activities.* *Cell* 64, 867-869.
- RUSCIANO D., BURGER M. M., 1992. *Why cancer cells metastasize into particular organs?* *BioEssays* 14, 185-193.
- SAGE E. H., BORNSTEIN P., 1991. *Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions.* *J. Biol. Chem.* 266, 14831-14834.
- SATO H., TAKINO T., OKADA Y., CAO J., SHIGANAWA A., YAMAMOTO E., SEIKI M., 1994. *A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cell.* *Nature* 370, 61-65.
- SCOTT-BURDEN T., 1994. *Extracellular matrix: the cellular environment.* *NIPS* 9, 110-115.
- SHERMAN L., SLEEMAN J., HERRLICH P., PONTA H., 1994. *Hyaluronate receptors: key players in growth, differentiation, migration and tumor progression.* *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 726-733.

- SHIRASUNA K., SAKO M., HAYASHIDO Y., YOSHIOKA H., SUGIURA T., MATSUYA T., 1993. *Extracellular matrix production and degradation by adenoid cystic carcinoma cells: participation of plasminogen activator and its inhibitor in matrix degradation*. *Canc. Res.* 53, 147-152.
- STAHL A., MUELLER B. M., 1994. *Binding of urokinase to its receptor promotes migration and invasion of human melanoma cells in vitro*. *Canc. Res.* 54, 3066-3071.
- STASKUS P. W., MASIAZ F. R., PALLANCK L. J., HAWKES S. P., 1991. *The 21 kDa protein is a transformation-sensitive metalloproteinase inhibitor of chicken fibroblasts*. *J. Biol. Chem.* 266, 449-454.
- STEPHENS R. W., POLLANEN J., TAPIOVAARA H., LEUNG K.-C., SIM P. S., SALONEN E.-M., RANNE E., BEHRENDT N., DANO K., VAHERI A., 1989. *Activation of pro-urokinase and plasminogen of human sarcoma cells: a proteolytic system with surface-bound reactant*. *J. Cell Biol.* 108, 1987-1995.
- STETLER-STEVENSON W. G., AZNAVOORIAN S., LIOTTA L. A., 1993a. *Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis*. *Ann. Rev. Cell Biol.* 9, 541-573.
- STETLER-STEVENSON W. G., LIOTTA L. A., KLEINER J. D., JR., 1993b. *Extracellular matrix 6: Role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis*. *FASEB J.*, 7, 1434-1441.
- STOKER M., GHERARDI E., 1991. *Regulation of cell movement: the motogenic cytokines*. *Bioch. Bioph. Acta* 1072, 81-102.
- TARABOLETTI G., ROBERTS D. D., LIOTTA L. A., 1987. *Thrombospondin-induced tumor cell migration: haptotaxis and chemotaxis are mediated by different domains*. *J. Cell Biol.* 105, 2409-2415.
- THOMAS L., BYERS H. R., VINK J., STAMENKOVIC I., 1992. *CD44H regulates tumor cell migration on hyaluronate-coated substrate*. *J. Cell Biol.* 118, 971-977.
- TOOLE B. P., 1981. *Glycosaminoglycans in morphogenesis*. [W:] *Cell biology of extracellular matrix*. HAY E. D. (red.) Plenum Press, New York and London, 259-294.
- TROLL W., FRENKEL K., WIESNER R., 1984. *Protease inhibitors as anticarcinogens*. *J. Natl. Cancer Inst.* 73, 1245-1250.
- TRYGGVASON K., 1993. *The laminin family*. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 877-872.
- TRYGGVASON K., HOYHTYA M., SALO T., 1987. *Proteolytic degradation of extracellular matrix in tumor invasion*. *Bioch. Bioph. Acta* 907, 191-217.
- TSUBOI R., RIFKIN D. B., 1990. *Bimodal relationship between invasion of the amniotic membrane and plasminogen activator activity*. *Int. J. Canc.* 46, 56-60.
- TURLEY E. A., AUSTEN L., MOORE D., HOACE K., 1993. *Ras-transformed cells express both CD44 and RHAMM hyaluronan receptors: only RHAMM is essential for hyaluronan-promoted locomotion*. *Expl. Cell. Res.* 207, 277-282.
- UNDERHILL C., 1992. *CD44: the hyaluronan receptor*. *J. Cell Sci.* 103, 293-298.
- URIA J. A., FERRANDO A. A., VELASCO G., FREIJE J. M. P., LOPEZ-OTIN C., 1994. *Structure and expression in breast tumors of human TIMP-3, a new member of the metalloproteinase inhibitor family*. *Canc. Res.* 54, 2091-2094.
- VAHERI A., TAPIOVAARA H., BIZIK J., SIVEN V., MYOHANEN H., REISBERG T., LYMBOVSSAKIS A., PALOLAHTI M., STEPHENS R. W. 1992. *Plasminogen activation on tumour cell surface* [W:] *Metastasis: Basic research and its clinical applications*. RABES H., PETERS P. E., MUNK K. (red.), Karger, Basel, 127-140.
- VAN ASWEGEN C. H., DU PLESSIS D. J., 1992. *The detachment cascade during metastasis*. *Med. Hyp.* 39, 364-366.
- VAN DEN REST M., GARRONE R., 1991. *Collagen family of proteins*. *FASEB J.* 5, 2814-2822.
- VASSALI J.-D., PEPPER M. S., 1994. *Membrane proteases in focus*. *Nature* 370, 14-15.
- VENSTROM K. A., REICHARDT L. F., 1993. *Extracellular matrix 2: Role of extracellular matrix molecules and their receptors in the nervous system*. *FASEB J.* 7, 996-1002.
- VISCHER P., VOLKER W., SCHMIDT A., SINCLAIR N., 1988. *Association of thrombospondin of endothelial cells with other matrix proteins and cell attachment sites and migration tracks*. *Eur. J. Cell Biol.* 47, 36-46.
- VLEMINCKS K. L., DEMAN J. J., BRUYNEEL E. A., VANDENBOSSCHE G. M. R., KEIRSEBILCK A. A., MAREEL M. M., VAN ROY F. M., 1994. *Enlarged cell-associated proteoglycans abolish E-cadherin functionality in invasive tumor cells*. *Canc. Res.* 54, 873-877.
- WATANABE H., NAKANISHI I., YAMASHITA K., HAYAKAWA T., OKADA T., 1993. *Matrix metalloproteinase-9 (92 kDa gelatinase, type IV collagenase) from monoblastoid cells: correlation with cellular invasion*. *J. Cell Sci.* 104, 991-999.
- WELCH D. R., SCHISSEL D. J., HOWREY R. P., AEED P. A., 1989. *Tumor-elicited polymorphonuclear cells, in contrast to "normal" circulating polymorphonuclear cells, stimulate invasive and metastatic potentials of rat mammary adenocarcinoma cells*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5859-5863.

- WERB Z., TREMBLE P. M., BEHRENDTSEN O., CROWLEY E., DAMSKY C. H., 1989. *Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression*. J. Cell Biol. 109, 877-889.
- WIGHT T. A., KINSELLA M. G., QUARNSTROM E. E., 1992. *The role of proteoglycans in cell adhesion, migration and proliferation*. Curr. Op. Cell Biol. 4, 793-801.
- WOESSNER J. F. Jr., 1991. *Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling*. FASEB J., 5, 2145-2154.
- YAMADA K. M., 1981. *Fibronectin and other structural proteins*. [W:] *Cell biology of extracellular matrix*. Hay E. D. (red.) Plenum Press. New York and London, 95-110.
- YAMADA K. M., HUMPHRIES M. J., HASEGAWA T., HASEGAWA E., OLDEN K., CHEN W-T., AKIYAMA S. K., 1985. *Fibronectin: molecular approaches to analyzing cell interactions with the extracellular matrix*. [W:] *The cell in contact*. EDELMAN G. M. i THIERY J.-P. (red.) John Wiley and Sons, New York, 303-333.
- YAMADA Y., KLEINMAN H. K., 1992. *Functional domains of cell adhesion molecules*. Curr. Opin. Cell Biol. 4, 819-823.
- YURCHENCO P. D., SCHITTNY J. C., 1990. *Molecular architecture of basement membranes*. FASEB J. 4, 1577-1589.
- YURCHENCO P. D., CHENG T. S., COLOGNATO I. H., 1992. *Laminin forms an independent network in basement membranes*. J. Cell Biol. 117, 1119-1133.
- ZHANG S., LAURENT M., LOPEZ-ALEMANY R., MAZAR A., HENKIN J., RONNE E., BURTIN P., 1993. *Comparative localization of receptors for plasmin and for urokinase on MCF7 cells*. Exp. Cell Res. 207, 290-299.
- ZUCKER S., WIEMAN J. M., LYSIK R. M., WILKIE D., RAMUMURTHY N. S., GOLUB L. M., LANE B., 1987. *Enrichment of collagen and gelatin degrading activities in the plasma membranes of human cancer cells*. Canc. Res. 47, 1608-1614.
- ZUCKER S., LYSIK R. M., ZARRABI M. H., MOLL U., 1993. *M-92 type IV collagenase is increased in plasma of patients with colon cancer and breast cancer*. Canc. Res. 53, 140-146.)

ZYGMUNT POJDA

Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii
Zakład Hematologii Radiacyjnej
Kozielska 4, 01-163 Warszawa

IMMUNOTERAPIA NOWOTWORÓW

WPROWADZENIE

Terminem immunoterapia są określane te wszystkie rodzaje postępowania leczniczego, które w efekcie zmieniają strukturę i/lub czynność układu odpornościowego. Klasyczne metody leczenia nowotworów polegają na mechanicznym usunięciu (interwencja chirurgiczna), bądź zniszczeniu na drodze fizycznej (radioterapia) lub farmakologicznej (chemioterapia) komórek nowotworowych. Metody te są (w zależności od rodzaju nowotworu) stosunkowo skuteczne w zakresie leczenia zlokalizowanego guza pierwotnego, natomiast znacznie mniej przydatne w leczeniu rozsianych zmian wtórnych (przerzutów). Wprawdzie metody te są w pewnym stopniu selektywne w stosunku do komórek nowotworowych, wyróżniając je w oparciu o specyficzne różnice w zakresie procesów metabolicznych i aktywności cyklu komórkowego, jednak równocześnie w dużym odsetku niszczą one również komórki prawidłowe.

Stosunkowo szybko rozwijająca się dziedzina, jaką jest immunoterapia, opiera się na dążeniu do takiego przestrojenia układu odpornościowego, aby potrafił on rozpoznać a następnie zniszczyć nowotwór. Osiągnięcie tego celu powinno pozwolić na przezwyciężenie jednego z największych problemów, jakim jest rozprzestrzenianie się pochodzących ze zmiany pierwotnej mikroprzerzutów, to jest pojedynczych komórek lub niewielkich grup komórek nowotworowych migrujących do różnych tkanek. Inną zaletą immunoterapii jest jej wysoka specyficzność w stosunku do komórek nowotworowych a w konsekwencji nie uszkodzenie tkanek prawidłowych. Do chwili obecnej jednak, pomimo bardzo niekiedy obiecujących wyników wstępnych, nie uzyskano wystarczająco wysokiej skuteczności zwalczania nowotworów w warunkach klinicznych. Stąd też, pomijając emocjonalne oceny niektórych wyznawców bądź antagonistów metody, jej rzeczywistą skuteczność można będzie ocenić dopiero w (niedalekiej prawdopodobnie) przyszłości.

DLACZEGO UKŁAD ODPORNOŚCIOWY NIE JEST W STANIE ZNISZCZYĆ NOWOTWORU?

CZYM DYSPONUJE UKŁAD ODPORNOŚCIOWY?

Często w opracowaniach popularyzatorskich układ odpornościowy jest porównywany do armii z jej służbą wywiadowczą, sztabem, systemem łączności i jednostkami bojowymi. Stosując podobne porównanie dla komórek nowotworowych, należałoby uznać, że nie są one przeciwnikiem przestrzegającym zasad fair play, gdyż atakują w przebraniu i bez oficjalnego wypowiedzenia wojny. Słabość układu odpornościowego leży głównie w zakresie rozpoznania świetnie maskującego się przeciwnika. Mechanizmy immunologiczne (PTAK 1987) służące do niszczenia patogenów (układ odporności komórkowej i układ odporności humoralnej) są w stanie eliminować tak różnych agresorów, jak obce organizmy wielokomórkowe (niektóre pasożyty), pierwotniaki, bakterie, grzyby lub wirusy. Zniszczenie komórki nowotworowej leży więc całkowicie w możliwościach układu odpornościowego. Praktycznie zresztą taki proces w odniesieniu do pojedynczych transformowanych nowotworowo („uzłośliwiających się”) komórek zachodzi stale i eliminuje potencjalny rozwój nowotworów w zarodku. Dowodem na to jest fakt, że gdyby wyliczyć oczekiwaną teoretycznie częstość zmian prowadzących do wystąpienia nowotworu (mutacje spontaniczne, niektóre zakażenia wirusowe, skutki działania mutagenów chemicznych chociażby tych zawartych w dymie tytoniowym oraz promieniowania jonizującego), to częstość zachorowań na nowotwory byłaby nieporównywalnie większa niż jest praktycznie obserwowana.

Jak już wspomniano, słabość obrony przed nowotworem polega nie na możliwości jego zwalczania, ale na trudności odróżnienia komórek nowotworowych od prawidłowych. Układ odpornościowy nie rozpoznaje struktur wielkości komórki, a jedynie znacznie mniejsze fragmenty cząsteczek zwane antygenami. W niektórych przypadkach wyspecjalizowane komórki, na przykład makrofagi, „wypreparowują” fragmenty specyficznej struktury i uczą inne komórki (limfocyty) ich rozpoznawania w procesie zwanym prezentacją antygeny. W innych już sama obecność antygeny znanego uprzednio układowi odpornościowemu jako „obcy” wyzwała jego reakcję. Istnieją również specyficzne mechanizmy pozwalające na niszczenie komórek nowotworowych bez uprzedniej immunizacji, to jest uczenia układu odpornościowego. Wyspecjalizowane populacje komórek, pełniących taką funkcję („naturalni zabójcy” czyli komórki NK, „komórki zabijające aktywowane cytokinami”, tak zwane komórki LAK, „limfocyty naciekające guz” czyli TIL, „limfocyty naciekające ranę” — WIL oraz „makrofagi przeciwnowotworowe” czyli MAK) są w stanie samoistnie rozpoznać i zniszczyć komórkę nowotworową. Prawdopodobnie właśnie te populacje komórkowe nie dopuszczają do rozwoju znacznej liczby nowotworów niszcząc w zarodku transformowane komórki. Kiedy jednak komórek nowotworowych jest zbyt dużo lub ich lokalizacja utrudnia do nich dostęp elementów układu odpornościowego, to wspomniane mechanizmy nie wystarczają, aby powstrzymać rozwój choroby.

CECHY KOMÓREK NOWOTWOROWYCH, ODRÓŻNIAJĄCE JE OD PRAWIDŁOWEJ POPULACJI KOMÓRKOWEJ

Najważniejsze z punktu widzenia przebiegu choroby cechy komórek nowotworowych, jakimi są zdolność do niekontrolowanej proliferacji w połączeniu z niereagowaniem na fizjologiczne czynniki regulatorowe, nie są parametrami rozpoznawanymi przez układ odpornościowy. Potencjalnymi cechami rozpoznawczymi są natomiast tak zwane „antygeny nowotworowe”.

Obecność jakiegokolwiek antygeny jest uwarunkowana posiadaniem przez komórkę, prezentującą go, aktywnego genu regulującego jego wytwarzanie. Nietypowe antygeny mogą pojawiać się na komórkach nowotworowych w wyniku aktywowania genów specyficznych dla innych okresów życia osobniczego (życia płodowego) lub dla innych, wyspecjalizowanych populacji komórkowych (na przykład komórek nerwowych), transfekcji w wyniku zakażenia wirusowego, wreszcie mutacji genowej. Stąd też tak zwane antygeny nowotworowe można, w zależności od pochodzenia, podzielić na kilka grup:

1. Antygeny obecne w okresie życia płodowego. Ta stosunkowo często prezentowana przez komórki nowotworowe rodzina antygenów fizjologicznie jest obecna w okresie życia płodowego. Geny odpowiedzialne za ich wytwarzanie mogą być wtórnie aktywowane w komórkach uległych transformacji nowotworowej. Antygeny te mogą być zarówno związane z powierzchnią komórek, jak uwalniane do otoczenia. Przedstawicielami tej grupy są:

- alfa fetoproteina (AFP), fizjologicznie obecna w wątrobie i pęcherzyku żółtkowym płodu (WU i współaut. 1982);
- choriongonadotropina beta (bHCG), występująca w łożysku (HUSSA i SELL 1981);
- antygen karcynoembrionalny (CEA), obecny w przewodzie pokarmowym płodu (KABAWAT i współaut. 1983);
- łożyskowa fosfataza alkaliczna (PLAP), występująca w trofoblaście (NATHANSON i FISHMAN 1971).

2. Antygeny swoiste dla specyficznych struktur komórkowych lub obecne jedynie w części populacji ludzkiej. Antygeny te występują w warunkach prawidłowych u osobników dorosłych, ale albo jedynie w pewnym procencie populacji, albo na specyficznych strukturach komórek prawidłowych:

- CA 19-9, sialoglikoproteina (Lewis^a; Le^a) — antygen grupowy obecny w warunkach prawidłowych, na przykład w 7% populacji amerykańskiej lub 20% populacji japońskiej (RITTENHOUSE i współaut. 1985);
- neuroono-specyficzna enolaza (NSE), w warunkach prawidłowych swoista dla neuronów i komórek neuroendokrynnych.

3. Antygeny swoiste wyłącznie dla specyficznych nowotworów — antygen raka kolczystokomórkowego (SCC), obecny poza chorobą nowotworową jedynie w niektórych zaawansowanych stanach chorobowych, na przykład rozległym uszkodzeniu wątroby (KATO i TORIGOE 1977).

4. Antygeny obecne w strukturach wewnętrznych komórki — proteina p120, obecna w jąderku komórki, niewykrywalna na jej powierzchni (VALDEZ i współaut. 1990).

Ta grupa antygenów nie jest dostępna dla układu odpornościowego, stąd nawet po immunizacji, to jest nauczaniu komórek odpornościowych ich rozpoznawania, odgrywają one niewielką rolę w procesach niszczenia nowotworów.

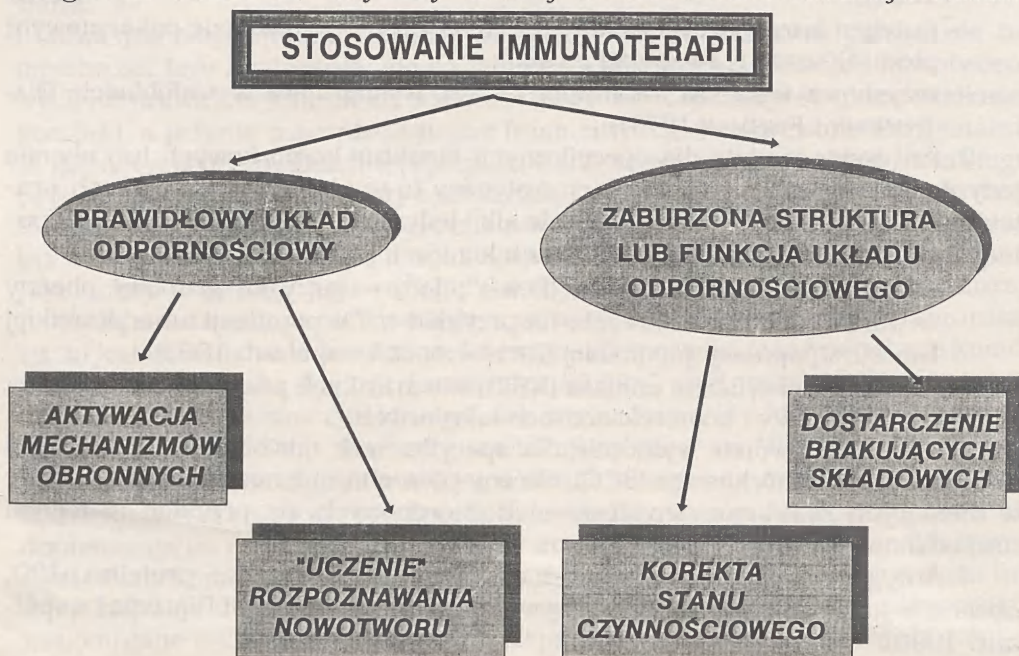
Zasadniczą przyczyną, dla której antygeny nowotworowe nie wystarczają dla samoistnej immunizacji układu odpornościowego pacjenta jest ich tożsamość lub znaczne podobieństwo do „prawidłowych” antygenów chorego. Wspecjalizowane limfocyty, zwane komórkami pamięci immunologicznej, posiadają zaindukowane wzorce „swoich” antygenów, stąd też powtórna aktywacja genów odpowiedzialnych za syntezę na przykład antygenów płodowych nie jest sygnałem zagrożenia dla układu odpornościowego i nie powoduje niszczenia komórek prezentujących te antygeny.

CELE I METODY IMMUNOTERAPII W ODNIESIENIU DO LECZENIA NOWOTWORÓW

Celami stosowanej immunoterapii (schemat 1) mogą być:

- zmiana liczebności określonych komórek układu odpornościowego;
- zmiana aktywności komórek tego układu;
- wytworzenie elementów nieobecnych w normalnym repertuarze środków obronnych organizmu (na przykład przeciwciał sprzężonych z molekułami o działaniu cytotoksycznym);
- wytworzenie i aktywacja mechanizmów umożliwiających rozpoznawanie nowotworu przez układ odpornościowy.

Formalny podział (CURRIE 1977) wyróżnia cztery rodzaje immunoterapii, czynną, bierną, adoptywną i grupę metod nie mieszczących się w poprzednich kategoriach (tabela 1.). Używany rzadziej termin immunomodulacja określa



wszelkie rodzaje świadomej interwencji z zewnątrz, mającej na celu zmianę własności układu odpornościowego. Bywa on używany zamiennie z wymienionymi powyżej, ale przeważnie jest rezerwowany dla określania działań wywierających bardziej złożony efekt.

Tabela 1

Ogólny podział metod immunoterapii nowotworów według CURRIE (1977), zmodyfikowany przez autora

Rodzaj terapii	Swoista	Nieswoista
Czynna	Szczepionki z komórek nowotworowych bądź uzyskanych z nich antygenów. Komórki nowotworowe poddane manipulacjom genetycznym. Cytokiny podawane doguzowo celem poprawy skuteczności immunizacji komórkami nowotworu.	Inne szczepionki, nie zawierające antygenów swoistych dla nowotworu (np. BCG)
Bierna	Swoiste przeciwciała w postaci „naturalnej” lub sprzężone z izotopami promieniotwórczymi lub substancjami cytotoksycznymi.	Typowe składniki surowicy, nie zawierającej przeciwciał swoistych dla nowotworu
Adoptywna	Frakcje komórkowe o pożądanej aktywności, aktywowane i/lub namnożone <i>in vitro</i> . Komórki układu odpornościowego poddane manipulacjom genetycznym. Cytokiny podawane ogólnie celem zmiany liczebności lub cech komórek układu odpornościowego.	Komórki układu odpornościowego w postaci takiej, w jakiej występują u normalnego osobnika
Inne	Wirusy onkolityczne. Toksyna Coleya.	

NARZĘDZIA PRACY IMMUNOTERAPEUTY

Cytokiny

W ciągu ostatnich kilku lat poznano szereg biologicznie aktywnych substancji zwanych cytokinami. Czynniki te są produkowane przez wiele rodzajów komórek i mają za zadanie przekazywać informację innym komórkom, między innymi należącym do układów krwiotwórczego i odpornościowego. Są to więc pewnego rodzaju „hormony krótkodystansowe” — substancje, które podobnie jak hormony pełnią funkcje regulacyjne, ale w przeciwieństwie do tych ostatnich nie muszą być obecne w całym ustroju, bo przenoszą sygnały pomiędzy komórkami położonymi w bezpośredniej bliskości. Nazwy tych czynników (przy stosunkowo dużym bałaganie panującym w zakresie ich mianownictwa) wywodzą się na ogół od nazw komórek produkujących je i komórek będących adresatem przekazywanych sygnałów. Tak więc wszystkie czynniki przenoszące sygnał pomiędzy izolowanymi komórkami są nazywane cytokinami. Czynniki wytwarzane przez leukocyty to leukokiny, a wytwarzane przez leukocyty i przekazujące sygnał leukocytom to interleukiny. Podobnie można nazywać monokinami czynniki produkowane przez monocyty, limfokinami przez limfocyty i tak dalej. Kłopot z tym, że przeważająca liczba cytokin jest produkowana przez kilka różnych rodzajów komórek.

Praktycznie znaczenie cytokin w immunoterapii nowotworów niepomiaralnie wzrosło po opanowaniu techniki ich wytwarzania metodami inżynierii genetycznej, co pozwoliło na ich stosowanie jako leków. Do najistotniejszych preparatów w praktyce doświadczalno-klinicznej należą obecnie: interleukiny (IL-2, IL-4,

IL-6, IL-7, IL-10, IL-12), czynniki martwicy nowotworów (TNF- α i TNF- β), granulocyty/makrofagopoetyny (G-CSF, GM-CSF, M-CSF) oraz interferony (IFN- α , IFN- γ). Cytokiny w immunoterapii nowotworów są wykorzystywane do zmieniania liczby i właściwości komórek układu odpornościowego w układach *in vivo* i *in vitro*, zmieniania właściwości komórek nowotworowych (podawanie doustne lub transfekcja genu do komórek pobranych z guza) oraz do bezpośredniego hamowania wzrostu nowotworów.

Antygeny niespecyficzne

Szereg antygenów bakteryjnych, podanych drogą pozajelitową, aktywuje odpowiedź układu odpornościowego również na czynniki inne niż bakterie (między innymi nowotwory). Antygeny te (*Propionibacterium granulosum*, BCG, OK-432) są stosowane jako szczepionki.

Manipulacja genami

Rozwój inżynierii genetycznej umożliwił poznawanie sekwencji genowej znanych cytokin, syntezę genów odpowiedzialnych za ich produkcję i wszczepianie ich „zgodnie z zamówieniem” wybranym komórkom. Pierwsze zastosowanie tej metody w omawianym temacie to transfekowanie komórek bakterii, drożdży lub organizmów wyższych i przemysłowa produkcja cytokin w procesie przypominającym fermentację wina.

Kolejną aplikacją metod inżynierii genowej jest korekta genomu izolowanych uprzednio komórek układu odpornościowego poprzez „wszczepianie” im genów inicjujących syntezę produktów przydatnych do niszczenia nowotworu (na przykład TNF).

Ostatnim wreszcie zastosowaniem inżynierii genetycznej jest modyfikowanie komórek nowotworu poprzez zmuszanie ich do produkcji tych czynników, które zmieniają odpowiedź immunologiczną chorego (transfekcja komórek nowotworowych genami indukującymi syntezę wybranych cytokin).

Komórki nowotworowe

Komórki nowotworu były i są wykorzystywane jako wyjściowy produkt dla modyfikacji odpowiedzi immunologicznej chorego. We wcześniejszym okresie całe komórki bądź ich izolowane frakcje służyły do produkcji szczepionek, a obecnie w tym celu wykorzystuje się produkty manipulacji genetycznej, to znaczy wspomniane już komórki „obdarzone” genem zmuszającym je do produkcji wybranych cytokin.

Komórki układu odpornościowego *in vitro*

Szereg manipulacji, jakim są poddawane komórki układu odpornościowego chorego nie jest możliwych do wykonania *in situ*, to jest w środowisku organizmu pacjenta z powodu efektów ubocznych, jakie wywoływane byłyby przez czynniki stosowane w tym celu. Dotyczy to takich zabiegów, jak indukowanie nowych cech komórek (powstawanie komórek obdarzonych zdolnością spontanicznego niszczenia nowotworu, tak zwanych komórek LAK), manipulacje genetyczne (wspomniana transfekcja genami zmieniającymi antynowotworową aktywność komórek), wreszcie selektywne namnażanie komórek pożądaných dla celów immunoterapii.

Obecny poziom techniczny klinicznych metod separacji komórek z krwi pacjenta pozwala na uzyskiwanie dużej liczby pożądaných komórek w sposób stosunkowo mało uciążliwy i bezpieczny (tak zwany zabieg cytaferazy). Innym źródłem komórek może być szpik chorego lub tkanka odczynu zapalnego otaczającego zmiany nowotworowe (pozyskiwanie tak zwanych komórek TIL, to jest limfocytów nacieku nowotworowego). Stąd też zdobycie wyjściowego materiału dla wspomnianych zabiegów prowadzonych następnie w warunkach *in vitro* nie jest problemem.

IMMUNOTERAPIA CZYNNA

Zgodnie z klasycznym podziałem (CURRIE 1977), jako czynną immunoterapię określano metody oparte na immunizacji pacjenta szczepionkami wytworzonymi z komórek nowotworowych. Do chwili obecnej próby takie są podejmowane, a szczepionki wytworzone z ekstraktów uzyskiwanych z tkanki nowotworu (AAPRO 1993) lub komórek nowotworu połączonych z adiuwantem, to jest czynnikiem wzmagającym ich immunogenność (BEATTY 1992), wykazują pewną chociaż niewystarczającą skuteczność.

Nowe podejście metodyczne stało się możliwe od momentu rozwoju warsztatu biologii molekularnej. Założeniem tej koncepcji jest takie przekształcenie komórek nowotworowych, aby w większym stopniu prowokowały do reakcji układ odpornościowy. Oczywiście manipulacjom może być poddana tylko część komórek, które następnie pełnią rolę szczepionki, „ucząc” układ odpornościowy, jak ma zwalczać pozostałe komórki nowotworu. Praktycznie zmierza się do tego wyposażając uprzednio pobrane od chorego lub zwierzęcia doświadczalnego komórki nowotworu w gen zmuszający je do produkcji określonych cytokin (PARDOLL 1992), na przykład IL-2 (TSAI i współaut. 1993), IL-2 plus IL-4 (OHE i współaut. 1993), IFN- α , IFN- γ (OGASAWARA i ROSENBERG 1993) czy też genów układu zgodności tkankowej (PLAUTZ i współaut. 1993). Transfekowane komórki, po uniemożliwieniu im namnażania, na przykład poprzez napromienienie, są wszczepiane choremu. Najprostszy postulowany efekt leczniczy miałby polegać na wytworzeniu wokół tych komórek dużego stężenia cytokin produkowanych przez transfekowany gen, a cytokiny te z kolei aktywowałyby komórki układu odpornościowego umożliwiając skuteczniejsze niszczenie nowotworu. Szereg obserwacji (OGASAWARA i ROSENBERG 1993, TSANG i współaut. 1993, HILLMAN i współaut. 1994) sugeruje dodatkowy mechanizm polegający na zwiększonej ekspresji różnych, w tym „nowotworowych”, antygenów na powierzchni komórek transfekowanych genami inicjującymi produkcję cytokin. Autorzy cytowanych prac obserwowali nie tylko eliminację genetycznie modyfikowanych komórek nowotworu po ich wszczepieniu zwierzętom doświadczalnym, ale również jednoczesną redukcję masy „natywnego” guza, składającego się z komórek nie posiadających genu indukującego produkcję cytokin. Zaobserwowano również, że transfekowane nie napromienione, a więc zdolne do namnażania komórki nowotworu wykazywały mniejszą zdolność do inicjacji wzrostu nowotworu niż kontrolne komórki tego samego nowotworu, nie poddane uprzednio manipulacji genetycznej (CHAKRAVARTY i współaut. 1992, DOUVDEVANI i współaut. 1992, KATSANIS i współaut. 1994). Pomimo bardzo obiecujących wyników doświadczeń

na zwierzętach, opisana metoda na obecnym etapie rozwoju nie pozwala jednak na radykalne wyleczenie nowotworu niemożliwego do eliminacji metodami konwencjonalnymi.

Podobny efekt zwiększonej ekspresji antygenów na powierzchni komórek nowotworowych osiągnąć można w niektórych przypadkach podawaniem cytokin doguzowo lub ogólnoustrojowo. Opisano (HILL i współaut. 1994) regresję brodawczaka i raka u bydła po doguzowym wstrzykiwaniu IL-2. Podawanie myszom IL-2 i IFN- α wzmagало ekspresję genu odpowiedzialnego za syntezę czynnika martwicy nowotworów (TNF- α) w komórkach raka nerki (SONOUCHI 1994). Zaobserwowano również, że IFN- γ indukował ekspresję antygenów zgodności tkankowej MHC II na komórkach raka pęcherza moczowego, a TNF- α , nie wykazując takiej zdolności, wzmagал intensywność ekspresji na komórkach już prezentujących te antygeny (HAWKYARD i współaut. 1993). Wyniki te sugerują, że niekiedy podawanie cytokin w układzie *in vivo* również może ułatwiać rozpoznawanie nowotworu przez układ odpornościowy gospodarza.

Kolejna metoda wchodząca w zakres czynnej immunoterapii, jaką jest stosowanie szczepionek nieswoistych, nie odnotowała w latach ostatnich większych sukcesów. Poznano lepiej mechanizmy działania dawno stosowanych czynników (na przykład stwierdzono, że BCG aktywuje komórki NK niszczące nowotwór (THANHAUSER i współaut. 1993)). Poznano również bardziej specyficzne metody nieswoistego aktywowania komórek odpornościowych, jak na przykład stymulacja limfocytów T podaniem odpowiednio spreparowanych przeciwciał anti-CD3 (WEDRYCHOWSKI i współaut. 1993). Żadna z tych metod jednak nie poprawia w zasadniczy sposób wyników leczenia nowotworów w warunkach klinicznych.

IMMUNOTERAPIA BIERNA

Klasyczna, historycznie najwcześniejsza metoda polegała (tabela 1.) na podawaniu pacjentowi przeciwciał izolowanych z surowicy zwierząt immunizowanych komórkami nowotworu lub frakcji surowicy zdrowych dawców. Próby takie nie przynosiły istotnych klinicznie korzyści.

Powtórne zainteresowanie stosowaniem przeciwciał w onkologii nastąpiło po opracowaniu metody otrzymywania przeciwciał monoklonalnych. Metoda ta pozwala uzyskiwać praktycznie dowolne ilości przeciwciała skierowanego przeciwko pożądanemu antygenowi, a odpowiednie manipulacje genowe stwarzają możliwość planowania szczegółów jego struktury (PTAK 1987). Przeciwciała monoklonalne nie są co prawda w stanie zniszczyć pierwotnej zmiany nowotworowej, co tłumaczone jest między innymi ich trudnym dostępem do komórek nowotworowych (RIETHMULLER i JOHNSON 1992), ale mogą być wykorzystywane do wykrywania i zwalczania mikroprzerzutów. Skierowane mogą być albo przeciwko specyficznym antygenom nowotworowym, albo receptorom czynników niezbędnych dla proliferacji komórek guza (TAETLE i współaut. 1994). Skuteczność przeciwciał konstruowanych dla zwalczania nowotworów może być dodatkowo zwiększona poprzez sprzęganie ich z chemicznymi związkami cytotoksycznymi lub izotopami promieniotwórczymi, które są w ten sposób wybiórczo koncentrowane w bezpośredniej bliskości komórek nowotworowych (HARTMANN i współaut. 1994). W perspektywie można oczekiwać, że specyficznie konstruo-

wane przeciwciała nie wystarczą co prawda do kompletnego niszczenia nowotworów, ale będą cennym narzędziem uzupełniającym, pozwalającym lokalizować i niszczyć mikroprzerzuty nowotworowe.

IMMUNOTERAPIA ADOPTYWNA

Próby modyfikacji odporności chorego poprzez dożylnie przetaczanie aktywowanych limfocytów lub makrofagów były czynione od stosunkowo długiego czasu. Zakładano, że zwiększanie w ten sposób liczby takich komórek, zdolnych do niszczenia nowotworów, jak komórek NK (SKÓRSKI 1986a) limfocytów cytotoksycznych (SKÓRSKI 1986b) i makrofagów (SKÓRSKI 1985) może spowodować regres choroby. Z uwagi jednak na niewielką liczbę komórek zdolnych do niszczenia nowotworu możliwych do izolowania a następnie przetoczenia choremu, metody te nie dawały istotniejszych korzyści terapeutycznych. Dopiero opublikowane przez GRIMM i współpracowników (1982) obserwacje, wskazujące na istnienie odrębnej populacji tak zwanych komórek LAK (komórki zabijające aktywowane limfokinami) dały początek nowej grupie znacznie skuteczniejszych metod. Komórki LAK rozpoznają i niszczą nowotwory znacznie skuteczniej niż poprzednio wymienione populacje komórek, przy czym nie wymagają uprzedniego „uczenia się” rozpoznawania przeciwnika. Cechą, która czyni z nich wyjątkowo dobre narzędzie immunoterapeuty jest możliwość uzyskiwania dużej ich liczby i aktywowania ich funkcji poprzez inkubację limfocytów *in vitro* z IL-2. Stąd też podstawowym schematem leczniczym była izolacja limfocytów pacjenta, ich inkubacja z IL-2 i „zwracanie” choremu zawiesiny jego komórek znacznie wzbogaconych w populację LAK (ROSENBERG 1984). Wkrótce zaobserwowano, że podawanie choremu IL-2 zwiększa liczbę komórek LAK w jego organizmie, co dało początek metodzie leczenia interleukiną 2 (ROSENBERG i współaut. 1985b) lub połączonemu podawaniu choremu wytworzonych *in vitro* komórek LAK i IL-2 (ROSENBERG i współaut. 1985a). Od tej pory metoda adoptywnej immunoterapii przy wykorzystaniu interleukiny 2 została szeroko rozpowszechniona, a wyniki badań zestawione w szeregu prac przeglądowych (Foa i współaut. 1992, HILLMAN i współaut. 1992, TARTOUR i współaut. 1992, BUBENIK 1993, DIETRICH i współaut. 1993, MAAS i współaut. 1993, OSULLIVAN i LEWIS 1994). Wraz z rozwojem metody wyróżniono inne subpopulacje komórek zdolnych do niszczenia nowotworu (TIL, czyli „limfocyty naciekające guz”, WIL — „limfocyty naciekające ranę”, czy też MAK — „makrofagi przeciwnowotworowe”) (WALLACE i współaut. 1993, DUBINETT i współaut. 1993, CHOKRI i współaut. 1992) oraz znacznie udoskonalono metody pozyskiwania *in vitro* dużej ich liczby (HILLMAN i współaut. 1994). Podjęto również próby uzyskiwania *in vivo* lub *in vitro* komórek LAK przy użyciu innych cytokin stosowanych oddzielnie albo w różnych kompozycjach, na przykład GM-CSF z witaminą D3 (CHOKRI i współaut. 1992), IL-2 z interferonem alfa (KEILHOLZ i współaut. 1994) lub beta (LIBERATI i współaut. 1994), IL-7 (SCHADENDORF i współaut. 1994), oraz IL-2, IL-4, IL-7, IL-10 i IL-12 (LOTZE i współaut. 1992).

Ostatnią wreszcie koncepcją adoptywnej immunoterapii jest modyfikowanie komórek typu TIL poprzez transfekowanie ich genami odpowiedzialnymi za produkcję takich czynników, jak na przykład TNF, które w odpowiednim stężeniu niszczą komórki nowotworowe. Tak modyfikowane komórki, obdarzone zdolno-

ścią naciekania okolicy nowotworu, pełniłyby rolę japońskich kamikadze, dostarczających ładunki wybuchowe na okręty wroga. Podobnie, jak opisana już metoda sprzęgania przeciwciał z izotopami promieniotwórczymi, sposób ten powinien umożliwić uzyskiwanie w otoczeniu nowotworu wysokiego stężenia czynników toksycznych, minimalnie narażając na ich działanie zdrowe komórki chorego.

PODSUMOWANIE

Możliwości ingerencji w funkcje układu odpornościowego zwiększają się proporcjonalnie do pogłębiania znajomości mechanizmów działania tego układu i rozwoju dziedzin „narzędziowych”, na przykład inżynierii genetycznej. Układ odpornościowy samoistnie posiada bardzo ograniczoną zdolność niszczenia komórek nowotworowych. Są one zbyt podobne do komórek prawidłowych, aby uruchamiać mechanizmy obronne oparte na metodzie rozpoznawania antygenów w kategoriach „swój — obcy”. Jednocześnie mechanizmy specyficzne, na przykład aktywność komórek NK nie wystarczają w przypadkach intensywnego rozrostu nowotworowego. Współczesne metody immunoterapii nowotworów zmierzają do:

- uczynienia komórek nowotworowych bardziej „widocznymi” dla układu odpornościowego, na przykład poprzez ich modyfikacje genetyczne lub podawanie cytokin miejscowo w okolicę nowotworu;
- lokalizację i niszczenie mikroprzerzutów za pomocą przeciwciał o odpowiednio zaprojektowanej strukturze;
- wytworzenie *in vitro* lub *in vivo* komórek potrafiących odszukać nowotwór w organizmie chorego i zniszczyć go — w miarę możliwości uzbrojenie tych komórek w bardziej skuteczne mechanizmy niszczące poprzez wszczepienie im odpowiednich genów.

Opisane metody dają obiecujące wyniki w testach *in vitro* i testach na zwierzętach doświadczalnych. Również niektóre doświadczenia kliniczne sugerują korzystne efekty (zmniejszanie masy guza, czasowe cofanie się zmian nowotworowych) uzyskiwane przy zastosowaniu immunoterapii. Do chwili obecnej nie opublikowano jednak przekonujących danych wykazujących możliwość skutecznego wyleczenia choroby nowotworowej metodami immunoterapii w sytuacji, gdy metody konwencjonalne (chirurgia, chemio- i radioterapia) takiego wyleczenia nie umożliwiają. Zważywszy na stosunkowo bardzo krótki okres, przez jaki współczesne metody immunoterapeutyczne są udoskonalane i wdrażane, trudno jednoznacznie prognozować dalszy ich rozwój i przyszłą skuteczność. Wydaje się jednak, że będą one co najmniej cennym leczeniem uzupełniającym, o ile nie jedną z ważniejszych metod terapeutycznych w onkologii.

IMMUNOTHERAPY OF CANCER

The basic methods applied in the cancer immunotherapy are reviewed in the paper. Normally, the patient's immune system possesses a rather poor ability to destroy cancer cells, due to inadequate

recognition of the so-called "tumor antigens". The purpose of immunotherapy is to improve its anticancer activity through:

- application of factors increasing the number and activity of the immune system cells;
- preparation of the immune system for better recognition of neoplastic cells (modification of cancer cells through genetic engineering for vaccination of a cancer patient, local cytokine treatment);
- induction of *ex vivo* production of large quantities of leucocytes capable, when infused into the patient, to recognize and destroy cancer cells, injections of cytokines generating *in vivo* the cancer-killing cells.
- construction of the antibodies and cells which are normally non-existing, specifically prepared for cancer treatment.

Although the present state of the art of immunotherapy does not offer the possibility of a complete cure of cancer patients, this method seems to be a very promising tool for cancer treatment in a not so distant future.

LITERATURA

- AAPRO M. S., 1993. *Advances in systemic treatment of malignant melanoma*. Eur. J. Cancer 29A, 13-617.
- BEATTY J. D., 1992. *Immunotherapy of colorectal cancer*. Cancer 70, 1425-1433.
- BUBENIK J., 1993. *IL-2 and gene therapy of cancer — review*. Int. J. Oncol. 2, 1049- 1052.
- CHAKRAVARTY P. K., FUJI H., ABUHADID M. M., HSU S. C., SOOD A. K., 1992. *Tumorigenicity of interleukin-2 (IL-2)-cDNA-transfected L1210 — lymphoma and its in vivo variants in modulated by changes in IL-2 expression — potential therapeutic implications*. Cancer Immunol. Immunother. 35, 347-354.
- CHOKRI M., LOPEZ M., OLERON C., GIRARD A., MARTINACHE C., CANEPA S., SIFFERT J. C., BARTHOLEYNS J., 1992. *Production of human macrophages with potent antitumor properties (MAK) by culture of monocytes in the presence of GM-CSF and 1,25-dihydroxy vitamin-D3*. Anticancer Res. 12, 2257-2260.
- CURRIE G., 1977. *Malignant disease*. [W:] HOLBOROWA E. J., REEVES W. G. (red.). Immunology in medicine. Academic Press, Grune and Stratton, 999-1023.
- DIETRICH P. Y., FARACE F., CAIGNARD A., ESCUDIER B., TRIEBEL F., 1993. *Immunotherapy of cancer — current developments and future strategies*. Bull. Cancer 80, 584-600.
- DOUVDEVANI A., HULEIHEL M., ZOLLER M., SEGAL S., APTE R.N., 1992. *Reduced tumorigenicity of fibrosarcomas which constitutively generate IL-1-alpha either spontaneously or following IL-1-alpha gene transfer*. Int. J. Cancer 51, 822- 830.
- DUBINETT S. M., PATRONE L., HUANG M., MARKOWITZ J., MCBRIDE W. H., ECONOMOU J. S., TOBIAS J., KELLEY D., YAN D., SEELIG M., 1993. *Interleukin-2-responsive wound-infiltrating lymphocytes in surgical adjuvant cancer immunotherapy*. Immunol. Invest. 22, 13-23.
- FOA R., GUARINI A., GANSBACHER B., 1992. *IL2 treatment for cancer — from biology to gene therapy*. Br. J. Cancer 66, 992-998.
- GRIMM E. A., MAZUMDER A., ZHANG H. Z., ROSENBERG S. A., 1982. *Lymphokine- activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes*. J. Exp. Med. 155, 1823-1841.
- HARTMANN F., HORAK E. M., GARMESTANI K., WU C. C., BRECHBIEL M. W., KOZAK R. W., TSO J., KOSTEINY S. A., GANSOW O. A., NELSON D. L., WALDMANN T. A., 1994. *Radioimmunotherapy of nude mice bearing a human interleukin 2 receptor alpha-expressing lymphoma utilizing the alpha-emitting radionuclide-conjugated monoclonal antibody B1-212-anti-Tac*. Cancer Res. 54, 4362-4370.
- HAWKYARD S. J., JACKSON A. M., PRESCOTT S., JAMES K., CHISHOLM G. D., 1993. *The effect of recombinant cytokines on bladder cancer cells in vitro*. J. Urol. 150, 514-518.
- HILL F. W. G., KLEIN W. R., HOYER M. J., RUTTEN V. P. M. G., KOCK N., KOTEN J. W., STEERENBERG P. A., RUITENBERG E. J., DENOTTER W., 1994. *Antitumor effect of locally injected low doses of recombinant human interleukin-2 in bovine vulval papilloma and carcinoma*. Vet. Immunol. Immunopathol. 41, 19-29.
- HILLMAN G. G., HAAS G. P., WAHL W. H., CALLEWAERT D. M., 1992. *Adoptive immunotherapy of cancer — biological response modifiers and cytotoxic cell therapy*. Biotherapy 5, 119-129.

- HILLMAN G. G., PURI R. K., KUKURUGA M. A., PONTES J. E., HAAS G. P., 1994. *Growth and major histocompatibility antigen expression regulation by IL-4, interferon-gamma (IFN-gamma) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) on human renal cell carcinoma*. *Clwspółaut. Exp. Immunol.* 96, 476-483.
- HILLMAN G. G., WOLF M. L., MONTECILLO E., YOUNES E., ALI E., PONTES J. E., HAAS G. P., 1994. *Expansion of activated lymphocytes obtained from renal cell carcinoma in an automated hollow fiber bioreactor*. *Cell Transplant.* 3, 263-271.
- HUSSA R. O., SELL W., 1981. *Human chorionic gonadotropin as clinical marker: review of its biosynthesis*. *Endocr. Rev.* 3, 1.
- KABAWAT S. E., BAST R. C. Jr., BAHAN A. K., *Tissue distribution of a coelomic-epithelium-related antigen recognized by the monoclonal antibody OC125*. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 2, 275-285.
- KATO H., TORIGOE T., 1977. *Radioimmunoassay for tumor antigen of human cervical squamous cell carcinoma*. *Cancer* 41, 1621-1628.
- KATSANIS E., ORCHARD P. J., BAUSERO M. A., GORDEN K. B., MCIVOR R. S., BLAZAR B. R., 1994. *Interleukin-2 gene transfer into murine neuroblastoma decreases tumorigenicity and enhances systemic immunity causing regression of preestablished retroperitoneal tumors*. *J. Immunother.* 15, 81-90.
- KEILHOLZ U., SCHEIBENBOGEN C., STOELBEN E., SAEGER H. D., HUNSTEIN W., 1994. *Immunotherapy of metastatic melanoma with interferon-alpha and interleukin-2: pattern of progression in responders and patients with stable disease with or without resection of residual lesions*. *Eur. J. Cancer* 30A, 955-958.
- LIBERATI A. M., DEANGELIS V., FIZZOTTI M., SCHIPPA M., CECCHINI M., ADIUTO D., DICLEMENTE F., PALMISANO L., MICOZZI E., ZUCCACCIA M., CINIERI S., 1994. *Natural-killer-stimulatory effect of combined low-dose interleukin-2 and interferon beta in hairy-cell leukemia patients*. *Cancer Immunol. Immunother.* 38, 323-331.
- LOTZE M. T., ZEH H. J., ELDER E. M., CAI Q., PIPPIN B. A., ROSENSTEIN M. M., WHITESIDE T. L., HERBERMAN R., 1992. *Use of T-cell growth factors (interleukin-2, interleukin-4, interleukin-7, interleukin-10 and interleukin-12 in the evaluation of T-cell reactivity to melanoma*. *J. Immunother.* 12, 212-217.
- MAAS R. A., DULLENS H. F. J., DENOTTER W., 1993. *Interleukin-2 in cancer treatment — disappointing or (still) promising — a review*. *Cancer Immunol. Immunother.* 36, 141-148.
- NATHANSON L., FISHMAN W. H., 1971. *New observations on the Regan isoenzyme of alkaline phosphatase in cancer patients*. *Cancer* 55, 1388-1397.
- OGASAWARA M., ROSENBERG S. A., 1993. *Enhanced expression of HLA molecules and stimulation of autologous human tumor infiltrating lymphocytes following transduction of melanoma cells with gamma-interferon genes*. *Cancer Res.* 53, 3561-3568.
- OHE Y., PODACK E. R., OLSEN K. J., MIYAHARA Y., OHIRA T., MIURA K., NISHIO K., SAJO N., 1993. *Combination effect of vaccination with IL2 and IL4 against LEWIS lung carcinoma cells*. *Int. J. Cancer* 53, 432-437.
- OSULLIVAN C., LEWIS C. E., 1994. *Tumour-associated leucocytes — friends or foes in breast carcinoma*. *J. Pathol.* 172, 229-235.
- PARDOLL D., 1992. *New strategies for active immunotherapy with genetically engineered tumor cells*. *Curr. Opwspółaut. Immunol.* 4, 619-623.
- PLAUTZ G. E., YANG Z. Y., WU B. Y., GAO X., HUANG L., NABEL G. J., 1993. *Immunotherapy of malignancy by in vivo gene transfer into tumors*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4645-4649.
- PTAK W., 1987. *Podstawy immunologii*. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1987.
- RIETHMULLER G., JOHNSON J. P., 1992. *Monoclonal antibodies in the detection and therapy of micrometastatic epithelial cancers*. *Curr. Opwspółaut. Immunol.* 4, 647-655.
- RITTENHOUSE H. G., MANDERINO G. L., HASS G. M., 1985. *Mucin-type glycoproteins as tumor markers*. *Lab. Med.* 16, 556-560.
- ROSENBERG S. A., 1984. *Adoptive immunotherapy of cancer: accomplishments and prospects*. *Canc. Treat. Rep.* 68, 233-255.
- ROSENBERG S. A., LOTZE M. T., MUUL L. M., 1985a. *Observations of the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer*. *N. Engl. J. Med.* 313, 1485-1492.
- ROSENBERG S. A., MULE J. J., SPIESS P. J., REICHERT C. M., SCHWARZ S. L., 1985b. *Regression of established pulmonary metastases and subcutaneous tumor mediated by the systemic administration of high-dose recombinant interleukin 2*. *J. Exp. Med.* 161, 1169-1188.
- SCHADENDORF D., BOHM M., MOLLER P., GRUNEWALD T., CZARNETZKI B. M., 1994. *Interleukin-7 induces differential lymphokine-activated killer cell activity against human melanoma cells, keratinocytes, and endothelial cells*. *J. Invest. Dermatol.* 102, 838-842.

- SKÓRSKI T., 1985. *Rola makrofagów, monocytów i granulocytów w zwalczaniu nowotworów*. Post. Biol. Kom. 12, 185-204.
- SKÓRSKI T., 1986a. *Komórki NK i K: Charakterystyka, stymulacja aktywności i rola w zwalczaniu nowotworów*. Post. Biol. Kom. 13, 51-74.
- SKÓRSKI T., 1986b. *Linfocyty B i T: Charakterystyka, stymulacja aktywności i rola w zwalczaniu nowotworów*. Post. Biol. Kom. 13, 335-358.
- SONOUCHI K., HAMILTON T. A., TANNENBAUM C. S., TUBBS R.R., BUKOSKI R., FINKE J. H., 1994. *Chemokine gene expression in the murine renal cell carcinoma, RENCA, following treatment in vivo with interferon-alpha and interleukin-2*. Am. J. Pathol. 144, 747-755.
- TARTOUR E., MATHIOT C., FRIDMAN W. H., 1992. *Current status of interleukin-2 therapy in cancer*. Biomed. Pharmacother. 46, 473-484.
- TAETLE R., DOSSANTOS B., OHSUGI Y., KOISHIHARA Y., YAMADA Y., MESNER H., DALTON W., 1994. *Effects of combined antigrowth factor receptor treatment on in vitro growth of multiple myeloma*. J. Nat. Cancer Inst. 86, 450-455.
- THANHAUSER A., BOHLE A., FLAD H. D., ERNST M., MATTERN T., ULMER A.J., 1993. *Induction of Bacillus-Calmette-Guerin-activated killer cells from human peripheral blood mononuclear cells against human bladder carcinoma cell lines invitro*. Immunol. Immunother. 37, 105-111.
- TSAI S. C. J., GANSBACHER B., TAIT L., MILLER F. R., HEPPNER G. H., 1993. *Induction of antitumor immunity by interleukin-2 gene-transduced mouse mammary tumor cells versus transduced mammary stromal fibroblasts*. J. Nat. Cancer Inst. 85, 546-553.
- TSANG K. Y., KASHMIRI S. V. S., QI C. F., NIERODA C., CALVO B., DEFILIPPI R., GREINER J. W., PRIMUS F. J., SCHLOM J., 1993. *Transfer of the IL-6 gene into a human colorectal carcinoma cell line and consequent enhancement of tumor antigen expression*. Immunol. Lett. 36, 179-186.
- VALDEZ B. C., BUSCH R. K., BUSCH H., 1990. *Phosphorylation of the human cell proliferation-associated nuclear protein p120*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 173, 423-430.
- WALLACE P. K., PALMER L. D., PERRYLALLEY D., BOLTON E. S., ALEXANDER R., B., HORAN P. K., YANG J. C., MUIRHEAD K. A., 1993. *Mechanisms of adoptive immunotherapy — improved methods for in vivo tracking of tumor-infiltrating lymphocytes and lymphokine-activated killer cells*. Cancer Res. 53, 2358-2367.
- WEDRYCHOWSKI A., KIM Y. W., CHANG T. W., 1993. *Immune enhancers composed of polyvalent binding sites of anti-CD3 antibodies*. Biotechnology 11, 486-489.
- WU A. H. B., SELL S., 1982. *Markers for hepatocellular carcinoma*. [W:] HERBERMAN R. B., MERCER D. W. (red.) Immunodiagnosis of Cancer, 2nd ed. Marcel Dekker, New York, 403-422.

ELŻBIETA WAŁAJTYS-RODE

*Instytut Parazytologii im. W. Stefańskiego PAN**Pasteura 3, 02-093 Warszawa*

CZYNNIK MARTWICY NOWOTWORÓW

CZYNNIK MARTWICY NOWOTWORÓW (TNF, TUMOR NECROSIS FACTOR)

WYKRYCIE I USTALENIE BUDOWY TNF- α I TNF- β

Na przełomie obecnego stulecia chirurg William Coley zaobserwował, że gdy u chorych na raka rozwijają się bakteryjne zakażenia, może dojść do martwicy nowotworu. W nadziei, że może to stanowić drogę leczenia, Coley zaczął wstrzykiwać chorym na raka nadsącz, uzyskiwany z hodowli bakteryjnych, zwany „toksyną Coleya”. Powodował w ten sposób krwotoczną martwicę nowotworów, ale równocześnie występowało wiele niekorzystnych objawów ubocznych, co sprawiło, że koncepcja ta upadła.

Wiele lat później zidentyfikowano aktywny składnik „toksyny Coleya” jako lipopolisacharyd (LPS) będący składnikiem ścian bakterii. Sam LPS nie powoduje martwicy nowotworów, ale indukuje produkcję przez makrofagi i inne komórki substancji, nazwanej przez CARSWELLA terminem „tumor necrosis factor” (TNF, czynnik martwicy nowotworów), która jest cytotoksyczna dla pewnych komórek nowotworowych (CARSWELL i współaut. 1975). Czynnik ten został następnie oznaczony literą α , jako TNF- α . Również w latach osiemdziesiątych inne zespoły badaczy niezależnie wykryły, że czynnik wytwarzany przez zaktywowane makrofagi jest odpowiedzialny za występowanie stanu katabolicznego prowadzącego do utraty wagi ciała, wyniszczenia i śmierci w wyniku raka oraz pewnych zakażeń bakteryjnych i pasożytniczych. Czynnik ten nazwano kachektyną. Sklonowanie genów odpowiedzialnych za syntezę TNF- α i kachektyny pozwoliło ustalić, że to jest to samo białko (cyt. w VILCEK i LEE 1991).

Ludzki TNF- α został oczyszczony do homogenności z nadsącza hodowli linii HL-60 komórek białaczki promielocytarnej, stymulowanych estrem forbolowym (PMA) przez AGGARWALA i współpracowników (1985). Przeprowadzono również badania porównawcze z inną cytolityczną limfokiną, wydzielaną przez te komórki, a mianowicie limfotoksyną α , którą nazwano TNF- β . Po ustaleniu sekwencji aminokwasów TNF- α , zbudowanego ze 157 aminokwasów (17 kDa) i TNF- β , w którego skład wchodzi 171 aminokwasów (25 kDa) stwierdzono, że sekwencje te są w około 50% homologiczne. Ten sam zespół uzyskał również cDNA klonu TNF- α i dokonał analizy jego sekwencji, która potwierdziła opisane wyniki (AGGARWAL i współaut. 1985). Główne różnice w budowie TNF- α i - β polegają na

zawartości aminokwasów zawierających siarkę. TNF- α zawiera mostek dwusiarczkowy utworzony przez dwie reszty cysteinowe i nie zawiera metioniny, podczas gdy TNF- β nie zawiera cysteiny, natomiast trzy metioniny. TNF- β zawiera również przyłączoną do asparaginianu cząsteczkę węglowodanową, co sprawia, że różni się od TNF- α reaktywnością immunochemiczną. Stanowi to ważny element w różnicowaniu tych białek, wykazują one bowiem wiele podobieństw w aktywności biologicznej, na przykład oba powodują liżę mysiego włókniakomiesaka L-929 *in vitro* (komórki używane do oznaczania TNF metodą biologiczną) oraz martwicę mięsaka Meth A *in vivo*. Obie cytokiny różnią się również mechanizmem prowadzącym do ich uwalniania z komórek. TNF- β jest wydzielany w procesie typowym dla sekrecji białek z komórki, podczas gdy TNF- α jest uwalniany z prekursora błonowego poprzez proteolizę prawdopodobnie w wyniku działania proteazy serynowej (VILCEK i LEE 1991). W wielu pracach brak jest rozróżnienia, o którą formę TNF chodzi. Lista komórek zdolnych do ekspresji i uwalniania TNF- α ciągle rośnie, prawdopodobnie nie jest ona również zamknięta w stosunku do TNF- β (patrz tabela 1).

Tabela 1

Komórki wytwarzające białko lub mRNA TNF- α i/lub - β po
specyficznej stymulacji

Rodzaj komórki	TNF alfa	TNF beta
Monocyty i makrofagi	+	
Komórki T (CD4+ i CD8+)	+	+
Komórki B	+	+
Komórki LAK	+	+
Komórki NK	+	
Fibroblasty	+	
Neutrofile	+	
Eozynofile	+	
Komórki tuczne	+	
Astrocyty	+	+
Komórki śródbłonka	+	
Komórki mięśni gładkich	+	
Różne linie komórek nowotworowych	+	+

Należy zaznaczyć, że w wielu komórkach prekursory cząsteczki TNF- α są wbudowane w błonę komórkową. Cząsteczki TNF- α i TNF- β (czyli limfotoksyna), są formami uwalnianymi z komórek, w odróżnieniu od opisanej ostatnio limfotoksyny, która jest formą błonową, posiadającą zdolność wiązania formy α i tworzenia funkcjonalnych heteromerów limfotoksyny α - β na powierzchni komórek (CROWE i współaut. 1994).

Do czynników indukujących produkcję TNF w komórkach oprócz endotoksyny bakteryjnej (LPS), pewnych wirusów (retrowirusów) i komórek nowotworowych należą również mitogeny, czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów-makrofagów (GM-CSF), interleukiny 1 i 2, interferony, estry forbolowe

i jonofory wapniowe. Supresja produkcji TNF jest powodowana cyklosporyną A, transformującym czynnikiem wzrostu (TGF- β), prostaglandyną E2, glikokortykosteroidami, cyklicznymi nukleotydami, inhibitorami lipooksygenazy, interleukinami 4 i 6 oraz histaminą (AGGARWAL 1992).

ROLA TNF- α I - β W ORGANIZMIE

Badanie roli TNF rozpoczęło się od obserwacji przeciwnowotworowej aktywności tej cytokiny, uwalnianej przez zaktywowane endotoksynami bakteryjnymi makrofagi i limfocyty. Przez pewien czas uważano nawet, że nie oddziałuje ona z normalnymi komórkami. Dopiero sklonowanie genu TNF- α i uzyskanie jego białkowego produktu pozwoliło stwierdzić jego wpływ na różne typy komórek. Obecnie wiadomo, że TNF- α i - β mają podobną, choć nieidentyczną aktywność biologiczną i należą do najbardziej wieloczynnościowych cytokin. Biorą one udział w regulacji normalnego rozwoju i homeostazy komórek. Pośredniczą w regulacji odpowiedzi immunologicznej, warunkującej odporność organizmu na wiele czynników zakaźnych oraz biorą udział w eliminacji złośliwych nowotworów. Uczestniczą w rozwoju reakcji zapalnej, która rozwija się w celu eliminacji różnych inwazyjnych patogenów, a przy nadmiernej stymulacji prowadzą do rozwoju wielu procesów patologicznych.

Szeroko zakrojone badania kliniczne wykazały, że obie te cytokiny stanowią istotną składową wstrząsu septycznego rozwijającego się w wyniku zakażenia bakteriami Gram-negatywnymi, zespołu ostrej niewydolności oddechowej dorosłych (ARDS), reumatoidalnego zapalenia stawów, pewnych zaburzeń autoimmunologicznych oraz choroby wywołanej reakcją przeszczepu przeciwko gospodarzowi (VILCEK i LEE 1991.)

Wspomniane patogenne właściwości TNF polegają na jego zdolności do aktywacji wielu reakcji komórek leukocytnych oraz zwiększaniu przyczepności komórek śródbłonna naczyń, co powoduje stymulację aktywności prokoagulacyjnej płytek krwi w wielu narządach. TNF- α i - β działają jako modulatory funkcji neutrofilów poprzez zwiększenie produkcji i uwalnianie aktywnych metabolitów tlenowych. TNF- α powoduje nagromadzenie i aktywację innych komórek zapalnych, jak eozynofile oraz aktywację limfocytów i komórek śródbłonna naczyń (LEPPER-WOODFORD i współaut. 1991, PARSONS i współaut. 1992). Reakcja może ulec spotęgowaniu poprzez oddziaływanie TNF- α na inne typy komórek, które uwalniają czynniki zapalne, takie jak IL-1 i metabolity kwasu arachidonowego, a także czynnik aktywujący płytki (PAF) (TRACEY i współaut. 1988).

Postuluje się istotną rolę TNF w chorobach płuc, wynikających z reakcji nadwrażliwości, takich jak astma atopowa oraz ziarniniakowych, do których należą sarkoidoza i gruźlica płuc. Obecnie wiadomo, że choroby te mają podłoże immunologiczne i towarzyszy im aktywacja specyficznych podtypów limfocytów T oraz złożona interakcja pomiędzy tymi komórkami i makrofagami, komórkami polimorfonuklearnymi, jak neutrofile i eozynofile oraz komórkami tucznymi i komórkami nabłonka dróg oddechowych. Zwiększenie nasilenia reakcji jest powodowane faktem, że TNF- α może być wydzielany również przez neutrofile i eozynofile, a także przez komórki tuczne pod wpływem wielu czynników stymulujących. TNF- α może bezpośrednio powodować degranulację komórek

tucznych i uwalnianie histaminy i tryptazy, enzymu proteolicznego znajdującego się w płucnych komórkach tucznych u ludzi (CEMBRZYŃSKA-NOWAK i współaut. 1993).

Występowanie opóźnionej fazy reakcji astmatycznej (po 6 i więcej godzinach od kontaktu z antygenem), jak i wytwarzanie ziarniniaków w sarkoidozie, czy rozwój procesu martwiczego w przebiegu gruźlicy płuc, są wynikiem interakcji zaktywowanych komórek i cytokin przez nie wytwarzanych. Zarówno w astmie atopowej, jak i w sarkoidozie istotne jest współdziałanie interferonu- γ (IFN- γ), który stymuluje prozapalne działanie TNF, polegające na aktywacji komórek nabłonka dróg oddechowych i zwiększaniu migracji komórek zapalnych, a także na zwiększaniu ekspresji receptorów dla TNF (STEFFEN i współaut. 1993, CEMBRZYŃSKA-NOWAK i współaut. 1993).

Stosując specyficzne aktywatory i inhibitory kinazy białkowej C (PKC) SER-FILIPPI i współpracownicy (1994) stwierdzili, że TNF- α odgrywa rolę w rozwoju skurczu naczyń i obrzęku płuc poprzez aktywację kinazy białkowej C, wzrost produkcji wolnych rodników tlenowych i obniżenie poziomu tlenu azotu, znanego czynnika rozkurczowego mięśni gładkich dróg oddechowych.

Oprócz bakteryjnych endotoksyn, również wirusy powodują produkcję TNF- α przez płucne makrofagi lub monocyty z krwi obwodowej. W modelach *in vitro* TNF- α aktywuje, w sposób autokrynnny, ekspresję wirusa HIV poprzez indukcję jądrowego czynnika transkrypcji NF-kB. Zwiększona produkcja TNF- α przez płucne makrofagi chorych zainfekowanych wirusem HIV, ze współistniejącymi oportunistycznymi zakażeniami mykobakteryjnymi (*Mycobacterium tuberculosis*) lub grzybiczymi (*Pneumocystis carinii*), może powodować rozszerzenie się infekcji w organizmie (ISRAEL-BIET i współaut. 1991). U chorych na AIDS TNF- α jest również odpowiedzialny za cytopenię we krwi obwodowej, wynikającą z jego supresyjnego działania na wzrost kolonii komórek progenitorowych szpiku kostnego, a także za wyniszczenie obserwowane w przebiegu tego zespołu. Kacheksja, czyli wyniszczenie, jest spowodowane hamowaniem przez TNF- α ekspresji genów odpowiedzialnych za enzymy szlaku syntezy lipidów w adipocytach oraz za syntezę lipazy lipoproteinowej i dehydrogenazy glicerofosforanowej (TRACEY i współaut. 1989).

W normalnych komórkach, takich jak ludzkie fibroblasty płucne, osteoblasty, astrocyty, a także komórki B, TNF stymuluje proliferację (AGGARWAL 1992, SELMAY i współaut. 1990, BOUSSIOTIS i współaut. 1994). Sprawia to, że TNF bierze udział w regulacji resorpcji kości oraz stanowi pośrednik pomiędzy układem immunologicznym i nerwowym. BOUSSIOTIS i współautorzy (1994) wykazali, że TNF- α jest autokrynnym czynnikiem wzrostu dla komórek B. Aktywacja ekspresji tego czynnika w ludzkich komórkach B zaktywowanych antygenem sugeruje, że TNF- α może być odpowiedzialny za proliferację komórek obserwowaną w kilku chronicznych chorobach zakaźnych, jak infekcja HIV, malaria i śpiączka afrykańska (trypanosomatoza).

MOLEKULARNE MECHANIZMY DZIAŁANIA TNF- α I - β Charakterystyka receptorów dla TNF- α i - β

TNF wywołuje biologiczne efekty przez interakcję ze specyficznymi receptorami o wysokim powinowactwie, zlokalizowanymi w błonie plazmatycznej komórek. Scharakteryzowano, po uprzednim sklonowaniu i ekspresji cDNA, dwa ludzkie receptory dla TNF, 55 kDa, nazwany p55 TNF-R i 75 kDa, nazwany p75 TNF-R, oba wiążące zarówno TNF- α jak i - β (limfotoksynę α). Liczba miejsc wiążących wynosi od 100 do 10000 na komórkę. Oba receptory TNF składają się z domeny zewnątrzkomórkowej, w której są zlokalizowane miejsca wiążące TNF, części wewnątrz błonowej oraz wewnątrzkomórkowej. Odcinki o homologicznej sekwencji aminokwasów (28%) występują w części znajdującej się na zewnątrz komórki, nie obserwuje się ich natomiast w części wewnątrzkomórkowej, co sugeruje, że odcinki zlokalizowane wewnątrzkomórkowo są częścią różnych dróg przenoszenia sygnału. P75 TNF-R (typ A) występuje głównie na komórkach pochodzących ze szpiku, podczas gdy p55 TNF-R (typ B) są obecne na komórkach typu nabłonkowego. Po przyłączeniu TNF do obu typów receptorów kompleks ulega szybkiej internalizacji i degradacji. Receptory te nie ulegają recykliczacji i utrzymanie stałej ilości receptorów na powierzchni komórki wymaga syntezy białka (BEYAERT i FIERIS 1994). Badania krystalograficzne pokazały, że zarówno TNF- α , jak i - β występują jako homotrimery, które są aktywnymi formami tych cytokin. Przenoszenie sygnału jest inicjowane przez krzyżowe połączenie dwu lub więcej receptorów na powierzchni komórki przez homotrimery TNF.

Istotną rolę receptorów dla TNF wykazano badając transgeniczne myszy pozbawione p55 TNF-R. U zwierząt tych stwierdzono upośledzenie w usuwaniu patogennych bakterii, prowadzące do śmierci w wyniku infekcji, a także dużą odporność na wstrząs septyczny powodowany lipopolisacharydem (endotoksyną, LPS). Jednakże populacja limfocytów i rozwój tymocytów u tych myszy nie odbiegały od normy. Wiele badań potwierdziło, że p55 TNF-R odgrywa rolę w cytotoksyczności i procesie apoptozy, stymulowanej przez TNF w wielu liniach komórkowych, a także pośredniczy w innych skutkach działania TNF, takich jak indukcja ekspresji i wydzielania cytokin, proliferacja fibroblastów oraz synteza prostaglandyn. Funkcja p75 TNF-R nie jest ostatecznie zdefiniowana, ale uważa się, że może on pełnić rolę w procesie cytotoksyczności oraz w stymulowaniu proliferacji fibroblastów. Dotychczas ustalono rolę p75 TNF-R w limfocytach T i pochodnych liniach komórkowych, gdzie TNF moduluje wydzielanie cytokin i proliferację komórek (SMITH i współaut. 1994). Ekspresja receptorów dla TNF jest stymulowana w sposób autokryny przez TNF oraz przez interferony, dibutyrylo cAMP (analog cAMP), maślan oraz lektyny i hamowana przez interleukinę -1 (IL-1), czynnik stymulujący wzrost makrofagów i granulocytów (GM-CSF), estry forbolowe, glikokortykosteroidy, czynniki depolimeryzujące mikrotubule i przez polisacharydy (HIGUCHI i AGRAWAL 1993).

Ostatnie badania wykazują, że zewnątrzkomórkowa domena receptorów TNF wykazuje strukturalne podobieństwo z pewnymi innymi receptorami i cząstkami powierzchniowymi komórek, które tworzą wspólną rodzinę receptorów i ligan-

dów (SMITH i współaut. 1994). Należą do nich, oprócz receptorów dla TNF, także receptor czynnika wzrostu nerwów o niskim powinowactwie, cząstki powierzchniowe CD40, CD30, CD27 i OX40 komórek T i B oraz antygen Fas. Odkryto również limfotoksynę β , wiążącą kompleks tworzony przez limfotoksynę α i β na powierzchni komórek, takich jak cytotoksyczne limfocyty T i komórki NK, co sugeruje rolę tych cząstek w odpowiedzi immunologicznej (CROWE i współaut. 1994). Występują również rozpuszczalne formy receptorów TNF, kodowane i wydzielane pod wpływem zakażenia wirusem ospy, których rola polega na wiązaniu i inaktywacji wydzielanego TNF (SMITH i współaut. 1994). Zróżnicowanie odpowiedzi komórek limfoidalnych, krwiotwórczych i innych linii na aktywację tej grupy receptorów tworzy sieć oddziaływań w procesach rozwoju i regulacji.

Grupa ligandów dla receptorów TNF oraz Fas i CD30 charakteryzuje się możliwością indukcji śmierci komórki poprzez martwicę lub proces apoptozy. Antygen Fas i 55p TNF-R posiadają homologiczny region w ich części cytoplazmatycznej, który jest istotny dla indukcji programowanej śmierci (apoptozy) komórek. Należy podkreślić, że zarówno receptor Fas, jak i receptory dla TNF- α i - β wykazują działanie plejotropowe, sprawiając, że komórki B, fibroblasty, jak i pewne komórki nowotworowe mogą odpowiadać proliferacją na sygnał. Specyficzna odpowiedź, prowadząca do śmierci komórki lub do jej podziału, zależy od typu komórki, stopnia jej zróżnicowania, stanu transformacji i obecności innych czynników stymulujących. Ze względu na znaczący udział w regulacji układu immunologicznego oraz powodowanie apoptozy, omawiana rodzina receptorów jest bardzo istotna dla rozwoju i homeostazy kręgowców (BEUTLER i VAN HUFFEL 1994).

Mechanizmy przenoszenia sygnału TNF- α i - β w komórce i ich rola w procesie hamowania rozwoju komórek nowotworowych

Zainteresowanie TNF rozpoczęło się od stwierdzenia jego istotnej roli w zabijaniu komórek nowotworowych *in vitro* przez zaktywowne makrofagi i cytotoksyczne komórki T. Dotychczas największą ilość badań poświęcono niewątpliwie próbom wyjaśnienia tego zjawiska. Wiadomo od dawna, że różne komórki nowotworowe wykazują bardzo zróżnicowaną wrażliwość na działanie TNF, która nie zależy od typu lub histologicznego pochodzenia komórek. Można przyjąć jako regułę, że nie stransformowane linie komórkowe są niewrażliwe na cytotoksyczne działanie TNF jakkolwiek embrionalne fibroblasty są wyjątkiem. Znane są też linie komórek nowotworowych nie reagujących na TNF (SUGARMAN i współaut. 1985). Wiele linii komórek nowotworowych, opornych na TNF uzyskuje wrażliwość na ten czynnik, jeśli jest on podany wspólnie z INF- γ lub pewnymi lekami stosowanymi w chemioterapii. Pomimo intensywnych badań molekularny mechanizm cytotoksyczności TNF i oporności w stosunku do tej cytokiny nie jest jeszcze wyjaśniony, ale postuluje się udział w nim wielu czynników (BEYAERT i FIERIS 1994).

Gen kodujący TNF- α należy do grupy genów podlegających najwcześniejszej transkrypcji; która następuje już po 30 min od aktywacji komórek T i B antygenem i nie wymaga syntezy białka. Wiadomo również, że cytotoksyczność TNF nie wymaga syntezy RNA lub białka. Co więcej, cytotoksyczna aktywność TNF wzrasta w obecności inhibitorów transkrypcji (aktynomycyna D) lub trans-

lacji (cykloheksimid). Inhibitory te uwrażliwiają na TNF pewne linie komórek nowotworowych, opornych w stosunku do tej cytokiny. Sugeruje to obecność lub indukcję przez TNF w komórce białka powodującego oporność na tę częstotliwość. Warto też wspomnieć, że transfekcja wrażliwych na TNF komórek włóknakomięsaka myszy L 929 genem *TNF* powoduje wystąpienie oporności (HIME-NO i współaut. 1990).

Zróznicowane oddziaływanie $TNF-\alpha$ i $-\beta$ na procesy komórkowe wynika z heterogenności receptorów dla tych cytokin oraz, w znacznie większym stopniu, z wielości dróg postreceptorowego przenoszenia sygnału. Liczne badania wykazały aktywację wielu wtórnych pośredników przenoszenia sygnału spośród poznanych dotychczas w komórkach ssaków oraz w wielu innych procesach komórkowych. Można je podzielić na kilka grup omówionych poniżej.

Stymulacja wiązania GTP i aktywności GTP-azy w błonie komórowej

Zbadano, że toksyna ksztuśca (petrussis toxin), która rozspręga białka Gt, Gi i Go od receptora, hamuje cytotoksyczność TNF oraz cofa wpływ TNF na zwiększone wiązanie nukleotydów guaninowych do błony komórek L929 i HL-60 i stymulację aktywności GTP-azy w tych komórkach (IMAMURA i współaut. 1988), co może świadczyć o udziale tych białek w cytotoksyczności TNF.

Aktywacja fosfolipaz

Istotna jest zwłaszcza aktywacja fosfolipazy A2, cytozolowego enzymu o wysokiej masie cząsteczkowej, specyficznego dla kwasu arachidonowego. Aktywność tego enzymu jest indukowana przez TNF w komórkach HeLa, a wprowadzenie genu tego enzymu przywraca wrażliwość odpornej na TNF linii komórek L929. Stwierdzono również aktywację fosfolipazy C, zwłaszcza specyficznej dla fosfatydylocholine, prowadzącą do nagromadzenia dwuacyloglicerolu i w konsekwencji do aktywacji kinazy białkowej C. Proces ten jest stymulowany przez aktywację fosfolipazy C katalizującej powstawanie fosfoinozytoli z błonowego dwufosforanu fosfatydyloinozytolu, spośród których trójfosfoinozytol stymuluje usuwanie jonów wapnia do cytozolu komórki i w ten sposób powoduje dalszą aktywację kinazy białkowej C. Aktywacja fosfolipazy D opisana w komórkach L929 prowadzi do nagromadzenia kwasu fosfatydowego. Powoduje to również wzmożone uwalnianie jonów wapnia i wzrost stężenia jego wolnych jonów w cytozolu komórki. Należy zaznaczyć, że brak jest jednak dotychczas dowodów na bezpośredni udział różnych fosfolipaz i ich produktów w cytotoksyczności TNF (BEYAERT i FIERS 1994).

Aktywacja neutralnej sfingomielinazy komórkowej

Enzym ten, zlokalizowany w błonie komórkowej, hydrolizuje sfingomielinę z utworzeniem ceramidu. Stwierdzono, że interakcja $TNF-\alpha$ z receptorem 55 $TNF-R$ powoduje aktywację sfingomielinazy i nagromadzenie ceramidu w komórce, co powoduje różnicowanie komórek HL-60 ludzkiej białaczki promielocytowej w kierunku monocytów (KIM i współaut. 1991), a także wywołuje apoptozę tych komórek, jak również komórek U937 białaczki monoblastycznej i włóknakomięsaka myszy L 929 i WEHI (JARVIS i współaut. 1994).

Wykazanie indukcji apoptozy w liniach komórkowych, w tym pochodzących ze szpiku, pozwala sądzić, że sygnał TNF poprzez ceramid selektywnie wywołuje

apoptozę oraz że enzymy aktywowane przez ceramid są istotnymi komponentami tej kaskady przenoszenia sygnału. Do enzymów aktywowanych przez ceramid należą zlokalizowana w błonie serynowo/treoninowa kinaza białkowa (MATHIAS i współaut. 1991) oraz cytozolowa fosfataza białkowa (DOBROWSKY i HANNUN 1992). Rola tych enzymów zostanie omówiona w punkcie dotyczącym fosforylacji białek.

Fosforylacja białek komórkowych

W ciągu paru minut od zadziałania TNF obserwuje się fosforylację wielu różnych białek w komórkach w wyniku aktywacji kilku białkowych kinaz. W niewielu liniach komórkowych obserwowano aktywację kinazy białkowej C, a także wzrost stężenia cyklicznego AMP i aktywację kinazy białkowej A (VILCEK i LEE 1991), jakkolwiek nie są one prawdopodobnie niezbędne do działania TNF, ponieważ stosowanie inhibitorów tych kinaz nie eliminuje cytotoksycznej aktywności TNF.

Stwierdzono również aktywację kilku cytozolowych serynowo/treoninowych kinaz białkowych, do których należą kinaza-2 kazeinowa oraz aktywowane mitogenami kinazy białkowe MAP.

Wiadomo, że grupa tyrozynowych kinaz białkowych wykazuje wysoki stopień homologii z produktem protoonkogenu *c-src*, a aktywność tyrozynowej kinazy białkowej pp60c-*src* wzrasta przejściowo podczas mitozy i ulega obniżeniu w okresie interfazy komórkowej (ZHENG i współaut. 1992). Pewne linie komórkowe ludzkich nowotworów, do których należą A-549 (gruczołakorak płuc), HT29 (rak odbytu) i SK-OV-3 (rak jajników), które mają zwiększoną ekspresję *c-src*, są odporne na TNF- α . Badania grupy Aggrawal wykazują rolę onkogenów, kodujących białka o aktywności tyrozynowych kinaz białkowych, w indukcji oporności komórek dla antyproliferacyjnego działania TNF- α . W 1988 roku stwierdzono, że oporność na rekombinantowy TNF- α (rTNF- α) pojawia się w komórkach ludzkiego raka sutka, wykazujących zwiększoną ekspresję receptora 2 dla ludzkiego nabłonkowego czynnika wzrostu HER2/ERBB2, który jest tyrozynową kinazą białkową. Zwiększenie ekspresji onkogenu *HER2* powoduje oporność na hamowanie wzrostu komórek NIH3T3 przez rTNF- α i zaktywowane makrofagi *in vitro* oraz transformację komórek i rozwój nowotworów. Pojawieniu się oporności towarzyszy wzrost stałej dysocjacji wiązania rTNF- α do jego receptorów (HUDZIAK i współaut. 1988). AGRAWAL i współautorzy (1994) wykazali, że zwiększona ekspresja tyrozynowej kinazy białkowej pp60v-*src*, będącej produktem onkogenu wirusa mięsaka Rousa powoduje wystąpienie oporności na TNF- α w komórkach fibroblastów mysich NIH3T3 poddanych transfekcji genem *pp60v-src*. Wystąpienie oporności było skorelowane z obniżeniem wewnątrzkomórkowego poziomu zredukowanego glutationu. Należy zaznaczyć, że zwiększenie ekspresji onkogenu *HER2* towarzyszy wielu liniom inwazyjnego ludzkiego raka sutka, zaś wzrost ekspresji tyrozynowej kinazy białkowej pp60v-*src* stwierdzono w neuroblastomie, rakach odbytu, pęcherza, sutka i drobnokomórkowym raku płuc.

Badania ZHENG i współpracowników (1992) rozszerzyły zasób wiadomości na temat mechanizmu transformacji komórek przez rodzinę tyrozynowych kinaz białkowych *src* stwierdzając, że biorą w nim udział tyrozynowe fosfatazy białko-

we. Autorzy ci wykazali, że zwiększenie ekspresji tyrozynowej fosfatazy białkowej w opornych na TNF- α komórkach G418, wywodzących się z fibroblastów embrionów szczurów rasy Fischer, prowadzi do trwałej aktywacji kinazy tyrozynowej pp60c-src i następnie do transformacji i rozwoju nowotworów. Nie stwierdzono natomiast zwiększenia ilości białka pp60c-src w tych komórkach. Sugeruje to udział tyrozynowych fosfataz białkowych w regulacji procesu proliferacji komórek i oporności na antyproliferacyjne działanie TNF- α . Rolę tyrozynowych kinaz i fosfataz białkowych w mechanizmie cytotoksyczności TNF potwierdzają również badania z użyciem specyficznych inhibitorów tych enzymów. Występuje znaczny efekt synergistyczny pomiędzy działaniem TNF- α i saturosporyny, inhibitora tyrozynowych kinaz białkowych. Natomiast jony wanadowe — inhibitor tyrozynowych fosfataz białkowych — hamują cytotoksyczność tej cytokiny (BEYAERT i FIERIS 1994).

Badając mechanizm apoptozy, czyli programowanej śmierci komórki powodowanej przez TNF w kilku nowotworowych liniach komórkowych, WRIGHT i współautorzy (1993) wysunęli hipotezę, że fosforylacja białek może determinować wrażliwość lub oporność na powodowanie apoptozy przez ten czynnik. W odróżnieniu od martwicy, która jest wynikiem patologicznego uszkodzenia komórki i która poprzez obrzęk organelli, uszkodzenie błony i rozpad DNA prowadzi do śmierci komórki, apoptoza jest fizjologicznym mechanizmem śmierci komórki, realizowanym w wyniku odmiennych mechanizmów, jakkolwiek pod wpływem tych samych czynników stymulujących. TNF powoduje apoptozę między innymi linii chłoniaka histiocytarnego U937, raka sutka BT-20 i raka prostaty LNCap. Autorzy ci wykazali, że inhibitory serynowo-treoninowych fosfataz białkowych PP1 i PP2A, kwas okadajowy i kalikulina, w sposób synergistyczny stymulują zależną od TNF apoptozę komórek U937. Oba te inhibitory znoszą oporność na TNF komórek U9-TR wyprowadzonych z U937. Ponieważ nie stwierdzono bezpośredniego hamowania przez TNF fosfataz białkowych, postuluje się, że cytokina ta działa przez stymulację kinazy lub kinaz białkowych. Do potencjalnych kandydatów należą kinaza lekkiego łańcucha miozyny, kinaza-2 kazeinowa i kinazy aktywowane przez mitogeny (MAPK) (VIETOR i współaut. 1993).

Aktywacja i indukcja czynników transkrypcji oraz ekspresji genów i białek

Pleiotropowe działanie biologiczne TNF wynika głównie ze zdolności tej cytokiny do aktywacji zdumiewająco dużej liczby genów w komórkach docelowych. Tę aktywność porównać można tylko do aktywności interleukiny-1, innej wieloczynnościowej cytokiny o podobnym spektrum aktywności biologicznej.

Do najlepiej zbadanych czynników transkrypcji, aktywowanych przez TNF- α , należy NF-kappa B, którego aktywacja nie wymaga syntezy białka, co stanowi mechanizm szybkiej i bezpośredniej aktywacji transkrypcji. Do syntetyzowanych *de novo* pod wpływem TNF- α należą czynnik transkrypcji AP-1, będący produktem genów *c-fos* i *c-jun*, które również są indukowane przez TNF, a także dwa czynniki regulujące ekspresję interferonu, IRF-1 i IRF-2. Do długiej listy genów, których ekspresja jest stymulowana przez TNF, należą interleukiny-1 alfa i beta, interleukina-6, interleukina-8, interferon-beta, płytkowy czynnik wzrostu, czynnik wzrostu kolonii granulocytów i makrofagów, receptory dla interleukiny-2

i endotelialnego czynnika wzrostu, cząstki przyczepności międzykomórkowej ELAM-1 i ICAM-1, a także kompleksy czynnika zgodności tkankowej MHC klasy I i II. TNF- α wpływa na ekspresję genu *c-myc*, odgrywającego ważną rolę w procesie indukcji wzrostu komórek oraz ich różnicowania, a także w toksyczności tej cytokiny dla komórek nowotworowych (VILCEK i LEE 1991, NINOMIYA-TSUI i współaut. 1993, JANICKE i współaut. 1994).

Stymulacja tworzenia aktywnych metabolitów tlenowych w mitochondriach

Wiele komórek po inkubacji z TNF wykazuje zmiany w morfologii mitochondriów, a także zaburzenia procesu przenoszenia elektronów w łańcuchu oddechowym. Takie komórki wykazują oporność na cytotoksyczne działanie TNF. Z drugiej strony wykazano, że TNF- α i - β indukują mRNA zależnej od manganu dysmutazy ponadtlenukowej w mitochondriach wielu linii komórkowych normalnych i nowotworowych ludzkich i zwierzęcych. Sugeruje się, że indukcja tego enzymu jest częścią mechanizmu obronnego przeciw cytotoksycznej aktywności TNF (WONG i GOEDEL 1988). Rolę wolnych rodników tlenowych w cytotoksyczności TNF potwierdza także ochronne działanie związków wiążących jony żelaza, które stymulują produkcję tych rodników w komórkach. Stwierdzono również bezpośrednio produkcję jonu ponadtlenukowego pod wpływem TNF (BEYAERT i FIERES 1994).

Pośród innych procesów komórkowych w mechanizmie cytotoksyczności TNF mogą brać udział proteazy serynowe oraz ADP-rybozylacja specyficznych białek (BEYAERT i FIERES 1994).

Rola TNF jako endogennego promotora powstawania nowotworów

W 1992 roku GUY i współpracownicy zaobserwowali, że kwas okadajowy, specyficzny inhibitor fosfataz białkowych typu P-2A i w mniejszym stopniu typu P-1, powoduje szybką fosforylację białek komórkowych w sposób porównywalny z obrazem uzyskiwanym po działaniu rTNF na ludzkie diploidalne fibroblasty FS-4. Obserwowane zmiany były identyczne zarówno w odniesieniu do fosforylacji białek cytosolowych i jądrowych, jak i do indukcji ekspresji genów. Kwas okadajowy jest również silnym promotorem nowotworów *in vivo* i *in vitro*. Inni badacze wykazali działanie TNF- α jako promotora transformacji nowotworowej w komórkach mysich BALB/3T3, inicjowanych 3-metylocholanantrenem, a także transfekowanych onkogenem *v-Ha-ras* (klon Bhas 42). W procesie transformacji TNF- α działał około 1000 razy bardziej efektywnie niż chemiczne promotory nowotworów, kwas okadajowy i estry forbolowe. Należy zaznaczyć, że TNF- α indukuje wzrost linii Bhas 42, podczas gdy nie stymuluje wzrostu nietransfekowanej linii komórek BALB/3T3. Wyniki te wykazują, że ludzki TNF- α powoduje klonowy wzrost inicjowanych komórek. Pozwoliło to autorom wysunąć hipotezę o działaniu TNF jako endogennego promotora nowotworów oraz generalnego pośrednika w procesie promowania nowotworów (FUJIKI i SUGANUMA 1994).

ZATOSOWANIE TNF W LECZENIU PEWNYCH TYPÓW NOWOTWORÓW

Sklonowanie genów kodujących TNF- α i - β umożliwiło produkcję znacznych ilości tych cytokin techniką rekombinacji DNA i podjęcie prób stosowania ich w klinice u chorych z nowotworami. Niestety, wyniki są dalekie od spełnienia nadziei wykrycia cudownego leku przeciwnowotworowego. Po przeprowadzeniu

wielu badań okazało się, że u pewnych chorych po iniekcji rTNF- α bezpośrednio do guza występowała regresja, u innych zaś tylko zatrzymanie rozwoju nowotworu, a często wręcz nie obserwowano żadnej zmiany (WATANABE i współaut. 1994). Podawanie rTNF jest ograniczone jego krótkim czasem półtrwania w organizmie (< 60 min w osoczu krwi), trudnym do przewidzenia efektem i, w największym stopniu, niepożądanymi efektami ubocznymi, do których należą gorączka, dreszcze, obniżenie ciśnienia krwi, senność, letarg, nudności, zaburzenia neurologiczne, zapalenie żył i spadek ilości leukocytów we krwi obwodowej. Wysiłki badaczy zostały skierowane na opracowanie metodyki podawania TNF, zapobiegającej tym niekorzystnym zjawiskom. Stwierdzono, na przykład, synergistyczny wpływ podawanego wspólnie z TNF interferonu i tamoksyfenu, antagonisty estrogenu, w leczeniu raka sutka (MATSUO i współaut. 1992). Wyjaśniono również dobroczynny wpływ podawania BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*), polegający na stymulacji makrofagów do wytwarzania TNF w leczeniu raka pęcherza (CONTI i współaut. 1994).

W 1991 roku STEVEN ROSENBERG i współpracownicy z National Cancer Institute w USA opracowali metodę uodporniania chorych na raka z użyciem komórek nowotworowych zmienionych metodami inżynierii genetycznej. Wprowadzano gen *TNF* do komórek czerniaka, uzyskanych od chorego w zaawansowanym stadium choroby, po czym wstrzykiwano te komórki ponownie. Kilka tygodni później pobierano choremu limfocyty z węzłów chłonnych i, po ich klonowym rozmnożeniu w hodowli, podawano pacjentowi (TOPALIAN i współaut. 1989). Ten sam zespół opracował również metodę immunoterapii raka z zastosowaniem infiltrujących guz limfocytów T, zmodyfikowanych genetycznie przez wprowadzenie genu *TNF*, które po wprowadzeniu do organizmu chorego powodują zwiększenie lokalnego stężenia TNF (HIRU i ROSENBERG 1994). W tym celu wykonano transfer genu *TNF*, włączonego do wektora pochodzącego od retrowirusa (na przykład wirus mięsaka Rousa). Metodę tą zastosowano do leczenia przerzutów płucnych u myszy z wykorzystaniem limfocytów infiltrujących guz, uzyskiwanych ze słabo immunizującego nowotworu mięsaka mysiego, indukowanego metylocholantrenem (MCA 102 hTNF), które po wprowadzeniu genu wydzielają ludzki TNF- α (MORINCOLA i współaut. 1994).

Sukces w leczeniu z zastosowaniem rTNF może również zależeć od ekspresji receptorów na komórkach nowotworowych, dlatego ISOBE i współpracownicy (1994) zaproponowali technikę polegającą na wprowadzeniu receptorów TNF-55 i TNF-75 do retrowiralnego wektora pLRNL i bezpośredniej jego iniekcji do komórek linii TK ludzkiego raka odbytu, charakteryzujących się bardzo małą ekspresją obu form receptorów dla TNF. Klony linii TK, zainfekowane retrowirusem zawierającym jedną lub obie formy receptora, wykazywały wysoką ekspresję tych cząsteczek i były zabijane po podaniu rTNF. Badania te są jeszcze w stadium doświadczeń na zwierzętach, ale ich wyniki budzą nadzieję z punktu widzenia poszukiwania nowych dróg w leczeniu nowotworów.

TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF)

The tumor necrosis factor family includes TNF- α (or cachectin), TNF- β (or lymphotoxin α), and lymphotoxin β . A close relationship between TNF- α and - β was established, when, after cloning of

the cDNA for these human cytokines in 1984, it appeared that they are in about 30% homologous. TNF- α is widely expressed in monocytes, macrophages, lymphocytes, natural killer cells, endothelial cells, mast cells, neutrophils and eosinophils, glial cells and astrocytes, smooth muscle cells and certain tumor cells. TNF- β can be produced mainly by lymphocytes, astrocytes, lymphokine-activated killer cells and myeloma cells.

TNF- α and - β bind to the same cell surface receptors and are functionally similar, although not identical. Originally described as antitumor agents (especially TNF- α), these extraordinarily pleiotropic cytokines are considered today the primary mediators of immune regulation and inflammatory response. They play a beneficial role as immunostimulants and important mediators of host resistance to many infectious agents (bacteria, viruses, parasites) and malignant tumors. Overproduction of TNF- α and - β is closely linked to development of many diseases, including septic shock, Adult Respiratory Distress Syndrome, rheumatoid arthritis, some autoimmune disorders, graft-host disease and cachexia.

TNF- α and - β exert their biological effects by interaction with high-affinity cell surface receptors, which have been cloned and characterized as p55 TNF-R and p75 TNF-R, both binding either of the two TNF forms. The extracellular portions of the receptors form a receptor family characterized by four domains with regularly spaced cysteine residues. The lack of relatedness of the intracellular portions of the two receptors suggests that they activate different intracellular signaling pathways.

The multiplicity of actions of TNF- α and - β can be ascribed to the facts that TNF receptors are present on virtually all the cells examined so far, and that TNF action leads to activation of multiple signal transduction pathways, kinases and transcription factors, as well as of an unusually large array of cellular genes.

Post-receptor mechanisms involved in TNF-induced cytotoxicity include such cell membrane events as G protein activation and neutral sphingomyelinase activation, the latter generating ceramide, which functions as intracellular mediator of apoptosis. Amplified expressions of the HER2/ERBB2 oncogene, a receptor tyrosine kinase, as well as of another oncogenic tyrosine kinase, pp60 v-src, induce resistance to TNF- α in NIH 3T3 cells. The role of protein phosphorylation in TNF-induced apoptosis was confirmed by results showing that in U937 cells the resistance to TNF may be circumvented by promoting protein phosphorylation with serine-threonine-dependent phosphatase inhibitors, okadaic acid and calyculin.

Recent results showing okadaic acid to mimic TNF- α in inducing a protein phosphorylation pattern and expression of the early response genes in human fibroblasts, as well as those showing TNF- α to stimulate transformation of BALB/3T3 cells, initiated with 3-methylcholantren, allowed to conclude in contrast to earlier suggestions that TNF- α acts as an endogenous tumor promoter.

LITERATURA

- AGGARWAL B. B., 1992. *Comparative analysis of the structure and function of TNF alfa and TNF beta*. Immunol. Se. 56, 61-78.
- AGGARWAL B. B., KOHR W. J., HASS-P. E., MOFFAT B., SPENCER S., HENZEL W. J., BRINGMAN T. S., NEDWIN G. E., GOEDDEL D. V., HARRIS R. N., 1985. *Human tumor necrosis factor. Production, purification and characterization*. J. Biol. Chem. 260, 2345-2354.
- AGGARWAL B. B., TOTPAL K., AL-OSMAN F., BUDE J. A., POCSIK E., 1994. *Pp60v-src kinase overexpression leads to cellular resistance to the antiproliferative effects of tumor necrosis factor*. FEBS Lett. 345, 219-224.
- BEYAERT, F., FIEERS W., 1994. *Molecular mechanism of tumor necrosis factor -induced cytotoxicity. What we do understand and what we do not*. FEBS Lett. 340, 9-14.
- BEUTLER B., VAN HUFFEL C., 1994. *Unraveling function in the TNF ligand and receptor families*. Science, 264, 667-668.
- BOUSSIOTIS V. A., NADLER L. M., STROMINGER J. L., GOLDFELD A. E., 1994. *Tumor necrosis factor alfa is an autocrine growth factor for normal human B cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. 91, 7007-7011.
- CARSWELL E. A., OLD L. J., KASSEL R. L., GREEN S., FIORE N., WILLIAMSON B., 1975. *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3666-3670.
- CEMBRZYŃSKA-NOWAK M., SZKLIARZ E., INGLÓT A. D., TEODORCZYK-INJEYAN J. A., 1993. *Elevated release of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma by bronchoalveolar leukocytes from patients with bronchial asthma*. Am. Rev. Respir. Dis. 147, 291-295.

- CONTI P., REALE M., NICOLAI M., BARBACANE R. C., PLACIDO F. C., IANTORNO R., TENEGHA R., 1994. *Bacillus Calamette-Guerin potentiates monocyte response to lipopolisaccharide-induced tumor necrosis factor and interleukin-1 but not interleukin-6 in bladder cancer patients*. Cancer Immunol. Immunother. 38, 365-371.
- CROWE P. D., VAN ARSDALE T. L., WALTER B. N., WARE C. F., HESSION C., EHRENFELS B., BROWNING J. L., DIN W. S., GOODWIN R. G., SMITH C. A., 1994. *A lymphotoxin-beta specific receptor*. Science, 264, 707-710.
- DOBROWSKY R. T., HANNUN Y. A., 1992. *Ceramide stimulates a cytosolic protein phosphatase*. J. Biol. Chem. 267, 5048-5051.
- FUJIKI H., SUGANUMA M., 1994. *Tumor necrosis factor alpha, a new tumor promoter, engendered by biochemical studies of okadaic acid*. J. Biochem. 115, 1-5.
- GUY G. R., CAO X., CHUA S. P., TAN Y. H., 1992. *Okadaic acid mimics multiple changes in early protein phosphorylation and gene expression induced by tumor necrosis factor or interleukin-1*. J. Biol. Chem. 267, 1846-1852.
- HIMENO T., WATANABE N., YAMAUCHI N., MAEDA M., TSUJI Y., OKAMOTO T., NEDA H., NIITSU Y., 1990. *Expression of endogenous tumor necrosis factor as protective protein against the cytotoxicity of exogenous tumor necrosis factor*. Cancer Res. 50, 4941-4945.
- HIGUCHI M., AGGARWAL B. B., 1993. *Okadaic acid induces down-modulation and shedding of tumor necrosis factor receptors*. J. Biol. Chem. 268, 5624-5631.
- HIRU P., ROSENBERG S. A., 1994. *The genetic modification of T cells for cancer therapy; an overview of laboratory and clinical trials*. Cancer Detect. Prev. 18, 43-50.
- HUDZIAK R. M., LEWIS G. D., SHALABY M. R., EESSALU T. E., AGGARWAL B. B., ULLRICH A., SHEPARD H. M., 1988. *Amplified expression of the HER2/ERBB2 oncogene induces resistance to tumor necrosis factor alpha in NIH 3T3 cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5102-5106.
- IMAMURA K., SHERMAN M. L., SPRIGGS D., KUFE D., 1988. *Effect of tumor necrosis factor on GTP binding and GTPase activity in HL-60 and L929 cells*. J. Biol. Chem. 263, 10247-10253.
- ISOBE K., FAN Z., EMI N., NAKASHIMA I., 1994. *Gene transfer of TNF receptor for treatment of cancer by TNF*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 202, 1538-1542.
- ISRAEL-BIET D., CADRANEL J., BELDJORD K., ANDRIEU J.-M., JEFFREY A., EVEN P., 1991. *Tumor necrosis factor production in HIV-seropositive subjects. Relationship with lung opportunistic infections and HIV expression in alveolar macrophages*. J. Immunol. 147, 490-494.
- JANICKE R. V., LEE F. H., PORTER A. G., 1994. *Nuclear c-myc plays an important role in the cytotoxicity of tumor necrosis factor alpha in tumor cells*. Mol. Cell. Biol. 14, 5661-570.
- JARVIS W. D., KOLESNICK R. N., FORNARI F. A., TRAYLOR R. S., GEWIRTZ D. A., GRANT S., 1994. *Induction of apoptotic DNA damage and cell death by activation of the sphingomyelin pathway*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 73-71.
- KIM M.-Y., LINARDIC C., OBEID L., HANNUN Y., 1991. *Identification of sphingomyelin turnover as an effector mechanism for the action of tumor necrosis factor alpha and gamma-interferon*. J. Biol. Chem. 266, 484-489.
- LEPPER-WOODFORD S. K., DECLAN CAREY P., BYRNE K., JENKINS J. K., FISCHER B. J., BLOCHER C., SUGERMAN H. J., FOWLER III A. A., 1991. *Tumor necrosis factor. Alpha and beta subtypes appear in circulation during onset of sepsis-induced lung injury*. Am. Rev. Respir. Dis. 143, 1076-1082.
- MATHIAS S., DRESSLER K. A., KOLESNICK R. N., 1991. *Characterization of a ceramide-activated protein kinase: stimulation by tumor necrosis factor alpha*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88, 10009-10013.
- MATSUO S., TAKANO S., YAMASHITA J., OGAWA M., 1992. *Synergistic cytotoxic effects of tumor necrosis factor, interferon-gamma and tamoxifen on breast cancer cell lines*. Anticancer Res. 12, 1575-1579.
- MORINCOLA F. M., ETTINGHAUSEN S., COHEN P. A., CHESHIRE L. B., RESTIFO N.P., MULE J. J., ROSENBERG S. A., 1994. *Treatment of established lung metastases with tumor infiltrating lymphocytes derived from a poorly immunogenic tumor engineered to secrete human TNF alpha*. J. Immunol. 152, 3500-3513.
- NINOMIYA-TSUI J., TORTI F.M., RINGOLD G. M., 1993. *Tumor necrosis factor-induced c-myc expression in the absence of mitogenesis is associated with inhibition of adipocyte differentiation*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 9611-9615.
- PARSONS P. E., MOORE F. A., MOORE E. E., IKLE D. N., HENSOS P. M., WORTHEN G. S., 1992. *Studies on the role of tumor necrosis factor in Adult Respiratory Distress Syndrome*. Am. Rev. Respir. Dis. 146, 694-700.
- SELMAY K. W., FAROOQ M., NORTON W.T., RAINE C. S., BROSNAN C.F., 1990. *Proliferation of astrocytes in vitro in response to cytokines. A primary role for tumor necrosis factor*. J. Immunol. 144, 129-135.

- SERFILIPPI G., FERRO T. J., JOHNSON A., 1994. Activation of protein kinase C mediates altered pulmonary vasoreactivity induced by tumor necrosis factor- α . *Am. J. Physiol.* 267, L282-L290.
- SMITH C. A., FARRAH T., GOODWIN R. G., 1994. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: Activation, costimulation and death. *Cell*, 76, 959-962.
- SMITH D.M., TRAN H. M., SOO V. W., McQUISTON S. A., TARTAGLIA L. A., GOEDDEL D. V., EPSTEIN L. B., 1994. Enhanced synthesis of tumor necrosis factor-inducible proteins, plasminogen activator inhibitor-2, manganese superoxide dismutase and protein 28/5.6, is selectively triggered by the 55-kDa tumor necrosis factor receptor in human melanoma cells. *J.Biol. Chem.* 269, 9898-9905.
- STEFFEN M., PETERSEN J., OLDIGS M., KARMEIER A., MAGNUSSEN H., THIELE H. G., RAEDLER A., 1993. Increased secretion of tumor necrosis factor- α , interleukin-1- β , and interleukin-6 by alveolar macrophages from patients with sarcoidosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 91, 939-949.
- SUGARMAN B. J., AGGARWAL B. B., HASS P. E., FIGARI I. S., PALLADINO M. A. Jr., SHEPARD H. M., 1985. Recombinant human tumor necrosis factor- α : Effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science*, 230, 943-945.
- TOPALIAN S. D., SALOMON D., ROSENBERG A., 1989. Tumor-specific cytotoxicity by lymphocytes infiltrating human melanomas. *J. Immunol.* 142, 3714-3719.
- TRACEY K. J., LOWRY S. F., CERAMI A., 1988. Cachectin/TNF- α in septic shock and septic Adult Respiratory Distress Syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138, 137-1379.
- TRACEY K. J., VLASSARA H., CERAMI A., 1989. Cachectin/tumor necrosis factor. *Lancet*, i 1122-1126.
- VIETOR I., SCHWENGER P., LI W., SCHLESSINGER J., VILCEK J., 1993. Tumor necrosis factor-induced activation and increased tyrosine phosphorylation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 268, 18994-18999.
- VILCEK J., LEE T. H., 1991. Tumor necrosis factor. New insight into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J. Biol. Chem.* 266, 7313-7316.
- WATANABE N., YAMAUCHI N., MAEDA M., NEDA H., TSUJI Y., OKAMOTO T., TSUJI N., AKIYAMA S., SASAKI H., MITSU Y., 1994. Recombinant tumor necrosis factor causes regression in patients with advanced malignancies. *Oncology*, 51, 360-361.
- WONG H. W., GOEDDEL D. V., 1988. Induction of manganese superoxide dismutase by tumor necrosis factor: Possible protective mechanism. *Science*, 242, 941-943.
- WRIGHT S., ZHENG J., TORTI F. M., LARRICK J. W., 1993. Role of protein phosphorylation in TNF-induced apoptosis: Phosphatase inhibitors synergize with TNF to activate DNA fragmentation in normal as well as TNF resistant U937 variants. *J. Cell. Biochem.* 53, 222-233.
- ZHENG X. M., WANG Y., PALLAN C. J., 1992. Cell transformation and activation of pp60c-src by overexpression of a protein tyrosine phosphatase. *Nature*, 359, 336-339.

JERZY NOWAK

*Zakład Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk,
Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań*

MOŻLIWOŚCI I PERSPEKTYWY TERAPII GENOWEJ CHORÓB NOWOTWOROWYCH*

GENY A RAK

Wyniki badań molekularnych wskazują na ścisły związek mechanizmów procesu nowotworowego z zaburzeniami genetycznymi. Czy przyczyna raka tkwi w genach? Aktualna koncepcja rozwoju nowotworu zakłada akumulację zaburzeń różnych genów, a zwłaszcza onkogenów i genów przeciwnowotworowych, prowadzącą w efekcie do klonalnej proliferacji, nie kontrolowanej przez mechanizmy homeostazy ustrojowej.

Olbrzymi postęp w zakresie zrozumienia genetyczno-molekularnych podstaw chorób nowotworowych stwarza całkowicie nowe możliwości zapobiegania i leczenia nowotworów (GUTIERREZ i współaut. 1992). Początkowo wydawało się, że terapia genowa, polegająca na osiągnięciu efektu leczniczego poprzez wprowadzenie do komórki genu prawidłowego w miejsce zmutowanego lub brakującego, będzie mogła być stosowana głównie w chorobach genetycznych (FRIEDMANN 1989, KOHN i współaut. 1989). Bardzo szybko okazało się jednak, że technologia transferu genu może być pomocna w leczeniu nowotworów (CULLITON 1990). Należy przypuszczać, że w niedalekiej przyszłości coraz precyzyjniej będzie można korygować zaburzenia genetyczne występujące w schorzeniach nowotworowych. Ponadto wczesne wykrycie genetycznej predyspozycji do nowotworzenia umożliwi podjęcie działań zapobiegawczych poprzez, na przykład, unikanie ekspozycji na czynniki genotoksyczne, niepalenie papierosów, zastosowanie szczepionek przeciwrakowych. Precyzyjna molekularno-genetyczna diagnostyka już obecnie pozwala na opracowywanie eksperymentalnych modeli zapobiegania i leczenia chorób nowotworowych (KARP i BRODER 1994).

Od pierwszej klinicznej próby terapii genowej ciężkiego złożonego niedoboru odporności minęło zaledwie 5 lat. Liczba prowadzonych aktualnie prób klinicznych terapii genowej nowotworów przewyższa łączną liczbę zatwierdzonych protokołów leczenia chorób genetycznych i zakaźnych, w tym AIDS. Wydaje się, że w najbliższych latach nastąpi wręcz eksplozja prób terapii genowej nowotwo-

*Praca finansowana przez Komitet Badań Naukowych. Numer projektu badawczego 4.S402 96 06p04.

rów, a za lat kilkadziesiąt technologia transferu genu może całkowicie zdominować inne formy leczenia nowotworów.

STRATEGIA TERAPII GENOWEJ NOWOTWORÓW

Możliwości zastosowania terapii genowej nowotworów zmierzają w kilku zasadniczych kierunkach:

1. Zwiększanie immunogenności komórek nowotworowych, na przykład, przez transfer genu kodującego immunogeny antygen.
2. Wzmacnianie aktywności przeciwnowotworowej limfocytów cytotoksycznych przez wprowadzenie genów cytokin.
3. Transfer do komórek nowotworowych genów tak zwanych samobójców aktywujących leki.
4. Hamowanie ekspresji onkogenów przez transfer sekwencji antysensownych.
5. Wprowadzanie prawidłowych genów przeciwnowotworowych w miejsce zmutowanych.
6. Transfer genów toksyn pod kontrolą promotorów specyficznych dla danego nowotworu.
7. Ochrona komórek macierzystych przed agresywną chemioterapią przez wprowadzanie genów wielolekowej oporności.

GENETYCZNE ZNAKOWANIE

Wstępem do zastosowania technologii transferu genu w eksperymentalnych próbach leczenia nowotworów było tak zwane genetyczne znakowanie, polegające na wprowadzeniu genu oporności na neomycynę do limfocytów naciekających guz — TIL (tumor infiltrating lymphocytes). Celem tych badań było wykazanie, że cytotoksyczne komórki (TIL) pobrane od chorego, namnożone w hodowli *in vitro* w obecności interleukiny 2 (IL-2) i podane z powrotem do organizmu gromadzą się na obrzeżach tkanki nowotworowej doprowadzając do jej niszczenia. Wykazanie skuteczności działania namnożonych *in vitro* komórek TIL zapoczątkowało wprowadzanie do TIL genów mogących mieć działanie terapeutyczne w wybranych nowotworach (MULLIGAN 1993). Znakowanie genetyczne jest obecnie wykorzystywane dla oceny skuteczności autologicznego przeszczepu szpiku u dzieci w ostrej białaczce szpikowej, ostrej białaczce limfoblastycznej, przewlekłej białaczce szpikowej i w zwojaku zarodkowym.

GENY STOSOWANE W TERAPII NOWOTWORÓW

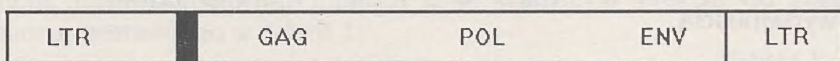
Transfer genu do komórki docelowej i uzyskanie jego ekspresji stanowi podstawowy element terapii genowej (MILLER 1992). W dotychczas podejmowanych próbach klinicznych oraz w eksperymentach na zwierzętach wykorzystuje się w terapii genowej nowotworów następujące geny:

1. Immunomodulujące.

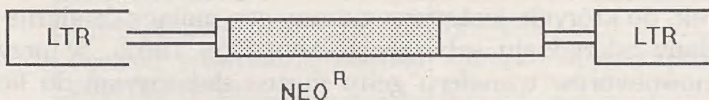
2. Aktywujące leki tak zwane geny samobójcy.
3. Blokujące ekspresję określonych genów — sekwencje antysensowne.
4. Onkogeny i geny przeciwnowotworowe.
5. Toksyn.
6. Ochronne.

Geny można wprowadzać do komórki różnymi metodami fizykochemicznymi i biologicznymi (OSTROVE 1994). W terapii genowej nowotworów największe zastosowanie znajdują wektory retrowirusowe i adenowirusowe. Próbuje się również wprowadzać terapeutyczne geny za pomocą liposomów (CULVER i BLEASE 1994). Schemat uzyskiwania wektora retrowirusowego przedstawiono na ryc.1.

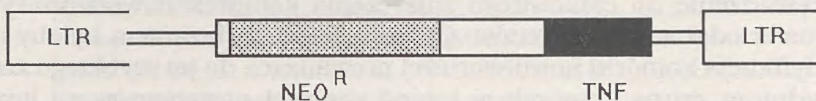
Retrowirus typu dzikiego



Wektor z genem Neo^R



Wektor z genem TNF



Ryc. 1. Schemat uzyskiwania wektora retrowirusowego. W miejsce genów strukturalnych *gag*, *pol*, *env* wirusa typu dzikiego jest wprowadzony gen oporności na neomycynę Neo^R (a) lub gen czynnika martwicy guza *TNF* (b).

W pewnym uproszczeniu można powiedzieć, że konstrukcja wektora retrowirusowego polega na usunięciu z wirusa typu dzikiego wszystkich genów strukturalnych i wprowadzeniu na ich miejsce genu terapeutycznego (HUBER i współaut. 1991). W celu wyprodukowania kompletnej cząsteczki wektora retrowirusowego jest konieczne użycie tak zwanych komórek pakujących, produkujących puste otoczki wirusowe. Komórki pakujące zawierają wszystkie geny konieczne do syntezy białek wirusowych, z wyjątkiem sekwencji psi i produkują otoczki wirusa bez RNA. Brak sekwencji psi uniemożliwia upakowanie RNA w otoczkę białkową. Po wprowadzeniu do komórek pakujących wektora retrowirusowego dochodzi do utworzenia pełnych cząsteczek wirionu, posiadających zdolność do zakażenia komórek docelowych bez możliwości namnażania. Taka cząsteczka jest zdolna do jednokrotnego zakażenia komórki docelowej, bez zdolności do dalszej replikacji ze względu na brak genów wirusowych (LANEUVILLE 1988).

TRANSFER GENU *EX VIVO* I *IN VIVO*

Wektory rekombinacyjne używane w celu wprowadzania terapeutycznego genu do różnych komórek mogą być zastosowane w dwojaki sposób. Pierwszy — transfer genu *ex vivo* obejmuje pobranie od chorego komórek docelowych, wprowadzenie *in vitro* — czyli *ex vivo* — terapeutycznego genu i transplantacja tak zmodyfikowanych komórek z powrotem do organizmu chorego. Drugi, trudniejszy transfer genu *in vivo* polega na wprowadzeniu terapeutycznego genu bezpośrednio do komórek (tkanki) chorego, bez pobierania komórek docelowych. W przypadku transferu *in vivo* zasadniczym ograniczeniem jest zastosowanie wektora, który swoiście przenosi gen terapeutyczny do komórek docelowych z dużą wydajnością.

KOMÓRKI DOCELOWE W TERAPII GENOWEJ NOWOTWORÓW

Rodzaj komórek, do których jest wprowadzany gen mający działanie lecznicze, jest uzależniony od rodzaju schorzenia (ANDERSON 1992). W przypadku terapii genowej nowotworów transferu genu można dokonywać do komórek nowotworowych, limfocytów, fibroblastów i komórek macierzystych szpiku kostnego (CULVER i współaut. 1994). Głównym celem w terapii genowej nowotworów jest doprowadzenie do całkowitego zniszczenia komórek nowotworowych poprzez transfer odpowiednich genów. Optymalnym rozwiązaniem byłaby genetyczna modyfikacja komórki nowotworowej prowadząca do jej szybkiego zniszczenia. Zasadniczą grupą komórek w terapii genowej nowotworów są limfocyty, które poprzez transfer genu stają się bardziej toksyczne lub indukują inne komórki do wywierania efektu cytotoksycznego na tkankę nowotworową. Genetycznie zmodyfikowane fibroblasty mogą również produkować czynniki toksyczne i immunomodulujące lub indukować odpowiedź przeciwnowotworową. Ostatnią grupę stanowią komórki macierzyste szpiku, do których wprowadzone geny oporności wielolekowej chronią przed agresywną chemioterapią.

ZWIĘKSZANIE IMMUNOGENNOŚCI KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

W eksperymentalnym leczeniu nowotworów od wielu lat podejmowano próby zwiększania immunogenności komórek nowotworowych. Próby te obejmowały hybrydyzację komórek nowotworowych z prawidłowymi, działanie na komórki nowotworowe wirusami lub związkami zmieniającymi powierzchniowe antygeny (na przykład mutagenami). W celu zwiększania immunogenności komórek nowotworowych próbowano stosować interferon gamma indukujący wzrost ekspresji antygenów zgodności tkankowej. Wszystkie te zamierzenia miały prowadzić do zwiększonej aktywności przeciwnowotworowej poprzez indukcję cytotoksycznych i wspomagających limfocytów T, komórek naturalnej (spontanicznej) cytotoksyczności — NK (natural killers), makrofagów i przeciwciał.

ANTYGENY NOWOTWOROWE JAKO CEL ATAKU TERAPII GENOWEJ

Rozwój badań nad antygenami nowotworowymi pozwolił na lepsze zrozumienie mechanizmów odporności przeciwnowotworowej. Odkrycie antygenów specyficznych dla czerniaka, takich jak MAGE 1,2 i 3, MART 1, gp100 umożliwia podjęcie prób mających na celu indukcję swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej i wykorzystanie jej w terapii (PARDOL 1994). Oprócz stosunkowo nielicznych swoistych antygenów istnieje bardzo wiele antygenów występujących na komórkach nowotworowych, przeciwko którym jest możliwe uzyskanie efektywnej odpowiedzi immunologicznej. Przykłady antygenów indukujących swoistą odpowiedź immunologiczną, mogącą doprowadzić w efekcie do zniszczenia nowotworu, zestawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Antygeny występujące na komórkach nowotworowych mogące znaleźć praktyczne zastosowanie w immunoterapii

Rodzaj antygenu	Nowotwór
Produkty podwyższonej ekspresji genu <i>HER1/Neu</i>	raki jajników, piersi i płuca
Białka fuzyjne jako wynik translokacji chromosomów, na przykład <i>bcr-abl</i>	przewlekła białaczka szpikowa, ostra białaczka limfoblastyczna
Produkty punktowo zmutowanych genów <i>N-ras</i>	gruczolakoraki trzustki, jelita
Białka prawidłowych genów o ekto-powej ekspresji, na przykład antygen karcynoembrionalny	guzy trzustki
Nieprawidłowo glikozylowane powierzchniowe białka, na przykład <i>Muc1</i>	raki jajników, piersi, trzustki
Produkty genów wirusowych, na przykład E7 HPV	rak szyjki macicy

GENY ZGODNOŚCI TKANKOWEJ W IMMUNOTERAPII NOWOTWORÓW

Bardzo ważnymi czynnikami zwiększającymi immunogenność komórek nowotworowych są antygeny zgodności tkankowej — MHC (major histocompatibility complex). Z reguły limfocyty T wspomagające (helper — CD4+) rozpoznają antygen nowotworowy łącznie z produktami genów zgodności tkankowej klasy II, prezentowanymi przez makrofagi czyli komórki prezentujące antygen. Zaktywowane limfocyty T wspomagające CD4+ produkują cytokiny stymulujące cytotoksyczność limfocytów T (CD8+). Z kolei cytotoksyczne limfocyty T w celu aktywacji oprócz limfokin muszą rozpoznawać antygeny komórek nowotworowych łącznie z produktami genów zgodności tkankowej klasy I (MHC I).

Wiadomo było od dawna, że wzrost ekspresji antygenów zgodności tkankowej klasy I wzmacnia zdolność do lizy komórek nowotworowych przez cytotoksyczne

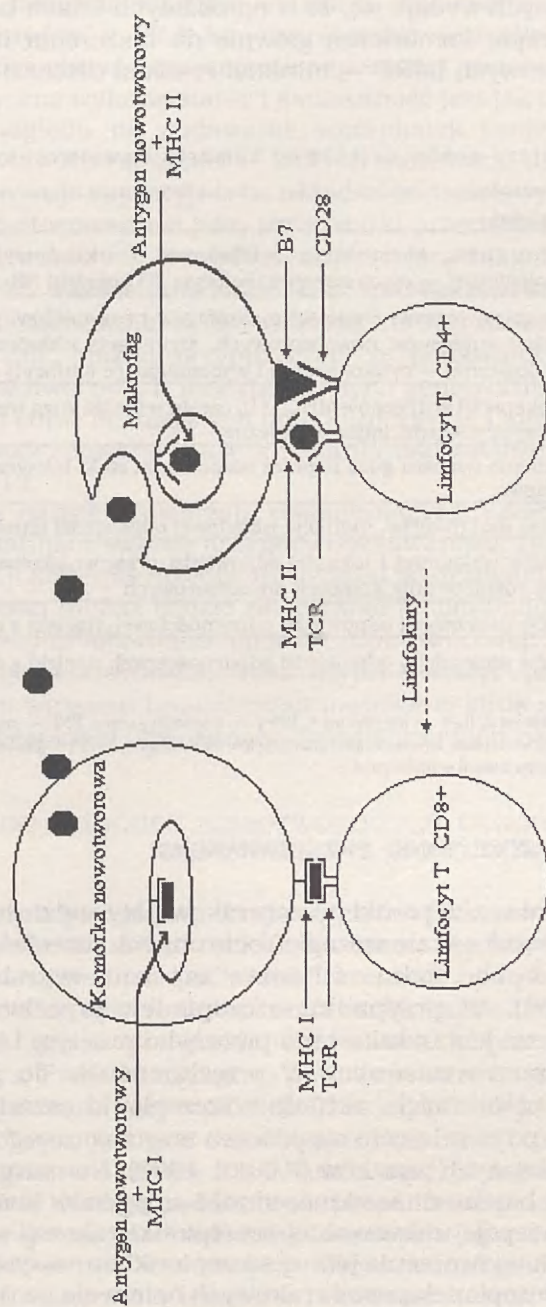
limfocyty T. Badania wykonane na zwierzętach doświadczalnych wykazały, że transfer genów *MHC I* powodował obniżenie tumorogenności komórek nowotworowych oraz ich zdolności do tworzenia przerzutów. Obserwacje te tłumaczono efektywnym niszczeniem komórek guza przez cytotoksyczne limfocyty T rozpoznające antygeny nowotworowe, łącznie z produktami genów *MHC I*. Niestety, nie we wszystkich układach doświadczalnych udało się potwierdzić ścisłą zależność pomiędzy poziomem ekspresji antygenów *MHC I* a tumorogennością i zdolnością do tworzenia przerzutów. Co więcej, zwiększona ekspresja antygenów *MHC I* na komórkach używanych w szczepionkach przeciwrakowych nie zawsze powodowała potencjalizację odporności przeciwnowotworowej.

Ekspresja antygenów *MHC II* na większości komórek nowotworowych pochodzenia nabłonkowego może być indukowana przez działanie interferonu gamma. Dzięki temu komórki rakowe mogą funkcjonować jako prezentujące antygen (antygen nowotworowy łącznie z *MHC II*) limfocytom T wspomagającym (helper). Jednakże z uwagi na brak na komórkach rakowych molekuł B7 nie mogą one efektywnie stymulować limfocytów T helper. Co więcej, brak cząsteczek B7 może prowadzić do anergii limfocytów T i tak zwanej ucieczki immunologicznej. Równoczesne zastosowanie transferu genu dla B7 i indukcji antygenów *MHC II* stwarza duże szanse na uzyskanie szczepionki przeciwrakowej skutecznie stymulującej powstawanie swoistych cytotoksycznych limfocytów T (SIKORA 1994). Molekuły B7 występują na aktywowanych antygenem komórkach prezentujących antygen takich jak makrofagi, komórki dendrytyczne i limfocyty B. Molekuły B7 stanowią ligandy dla dwóch receptorów limfocytów T — CD28 i CTLA4. Schemat komórkowych interakcji prowadzących do wytworzenia odporności przeciwnowotworowej przedstawiono na rycinie 2.

Aktualnie są prowadzone badania mające na celu transfer do komórek nowotworowych sztucznie utworzonych genów kodujących hybrydowe cząsteczki złożone z *MHC I* i *II*, których produkty po związaniu antygeny nowotworowego mogłyby skutecznie stymulować powstawanie swoistych limfocytów T wspomagających i cytotoksycznych.

ZWIĘKSZANIE ODPORNOŚCI PRZECIWNOWOTWOROWEJ POPRZECZ TRANSFER GENÓW CYTOKIN

Transfer genów cytokin i ich receptorów ma na celu potencjalizację odpowiedzi immunologicznej miejscowej i układowej. Dzięki wytwarzaniu przez genetycznie zmodyfikowane komórki nowotworowe dużych ilości cytokin dochodzi do wzmocnienia lokalnej odpowiedzi immunologicznej. Cytokiny mogą stymulować cytotoksyczne i wspomagające limfocyty T, komórki NK (natural killers), makrofagi i eozynofile. Cytokiny produkowane przez komórki nowotworowe powodują również wystąpienie miejscowej reakcji zapalnej, mogącej przyczynić się do niszczenia tkanki rakowej mechanizmami odporności nieswoistej. Niektóre cytokiny, jak na przykład czynnik martwicy guza — TNF (tumor necrosis factor), działają bezpośrednio niszcząco na komórki nowotworowe. W tabeli 2 zestawiono wyniki transferu genów różnych cytokin na komórki nowotworowe. W badaniach na zwierzętach uzyskano szereg obiecujących wyników wskazujących na możli-



Ryc. 2. Schemat komórkowych interakcji prowadzących do wytworzenia odpowiedzi przeciwnowotworowej. Do aktywacji limfocytów wspomagających CD4+ jest konieczne związanie antygenu nowotworowego łącznie z produktami MHC klasy II oraz molekuł B7 przez receptory CD28. Te dwa sygnały stymulują limfocyty T CD4+ do produkcji limfokin, które aktywują limfocyty T cytotoksyczne CD8+ rozpoznające na komórcie nowotworowej antygen łącznie z produktami MHC klasy I.

wość skutecznego niszczenia komórek nowotworowych poprzez potencjalizację układowej lub miejscowej odpowiedzi immunologicznej. Na podstawie przeprowadzonych prób klinicznych wydaje się, że w najbliższych latach będzie można wykorzystywać immunoterapię komórkową głównie do niszczenia minimalnych ilości komórek nowotworowych (MRD — minimal residual disease) pozostałych po chemioterapii.

Tabela 2

Efekt transferu genów cytokin do komórek nowotworowych

Cytokina	Efekt <i>in vivo</i>
IL-2	regresja guza, stymulacja miejscowej i układowej odpowiedzi immunologicznej — cytotoksyczne limfocyty T i komórki NK
IL-4	regresja guza, masywne nacieki makrofagów i eozynofilów, potencjalizacja prezentacji antygenów nowotworowych, stymulacja układowej odpowiedzi immunologicznej — cytotoksyczne i wspomagające limfocyty T
INF γ	wzrost ekspresji antygenów MHC I i II, często regresja guza wskutek indukcji układowej odpowiedzi immunologicznej
TNF	spowolnienie wzrostu guza poprzez bezpośredni efekt toksyczny i aktywację makrofagów
IL-7	aktywacja makrofagów, indukcja układowej odpowiedzi immunologicznej
GM-CSF	stymulacja układowej i lokalnej odpowiedzi przeciwnowotworowej poprzez indukcję różnicowania komórek prekursorowych
MCP1	aktywacja nieswoistej odpowiedzi odpornościowej, nacieki z makrofagów
G-CSF	aktywacja nieswoistej odpowiedzi odpornościowej, nacieki z makrofagów

Objaśnienia skrótów: IL-2 — interleukina 2, IL-4 — interleukina 4, INF γ — interferon gamma, TNF — czynnik martwicy guza, IL-7 — interleukina 7, GM-CSF — czynnik wzrostu kolonii granulocytów i makrofagów, MCP1 — białko chemoatrakcji monocytów, G-CSF — czynnik wzrostu kolonii granulocytów

SZCZEPIONKI PRZECIWRAKOWE

Koncepcja wytworzenia szczepionki przeciwrakowej wywodzi się ze skutecznych i stosowanych na szeroką skalę szczepień ochronnych przeciwko chorobom wirusowym (na przykład polio, odra, wirusowe zapalenie wątroby, różyczka, a ostatnio nawet grypa). W przypadku szczepionek przeciwwirusowych odpowiedź immunologiczna jest indukowana przeciwko prostym i jednocześnie immunogennym antygenom wirusowym. W przeciwieństwie do powszechnie stosowanych szczepień ochronnych, aktualnie szczepionki przeciwrakowe są stosowane nie przed, ale po rozwinieciu się procesu nowotworowego, co niestety nie daje w pełni zadowalających wyników (PARDOL 1993). Na marginesie warto zauważyć, że z uwagi na bardzo dużą różnorodność antygenów komórek nowotworowych wszelkie koncepcje uniwersalnej szczepionki rakowej są po prostu niemożliwe, podobnie jak wytworzenie jednej szczepionki na wszystkie choroby zakaźne. Uzyskiwanie szczepionek przeciwrakowych opiera się na dwóch zasadniczych strategiach. Pierwsza wykorzystuje komórki nowotworowe genetycznie zmodyfikowane. Druga strategia opiera się na uzyskiwaniu szczepionek przeciwko ściśle zdefiniowanym antygenom nowotworowym (PARDOL 1993). Z reguły

w celu uzyskania szczepionki przeciwrakowej wykorzystuje się komórki pobrane od chorego. W niektórych przypadkach, jak na przykład w czerniaku złośliwym próbuje się stosować komórki ustalonej linii czerniaka wykazujące wysoką ekspresję antygenów HLA-A1. Teoretycznie wszystkie antygeny zestawione w tabeli 2 mogą służyć wzmocnieniu odporności przeciwnowotworowej. Jednakże ich praktyczne wykorzystanie i skuteczność jest jak dotąd niewielkie, między innymi ze względu na podawanie szczepionek pacjentom z zaawansowaną chorobą nowotworową, często u których stosowano uprzednio chemioterapię, która oddziałuje supresyjnie na układ odpornościowy. Podejmowane są próby kliniczne z zastosowaniem jako szczepionki przeciwrakowej naświetlanych komórek nowotworowych modyfikowanych różnymi genami przede wszystkim cytokin i MHC. Naświetlane komórki z wprowadzonym genem na przykład dla INF lub IL-2 zachowują *in vivo* zdolność do wytwarzania cytokin nawet przez kilkanaście dni. Można przypuszczać, że podawanie chorym ich własnych komórek nowotworowych modyfikowanych genetycznie i naświetlanych będzie przedmiotem coraz liczniejszych prób klinicznych. Oprócz wyżej wspomnianych cytokin są podejmowane również badania nad zastosowaniem genów dla IL-4, IL-6, IL-7, IL-12.

Większą nadzieję stwarzają rekombinacyjne szczepionki, które posiadają sekwencje kodujące swoiste antygeny nowotworowe. Tym samym odpada konieczność izolacji komórek nowotworowych od poszczególnych chorych. Wydaje się, że w przyszłości można będzie zastosować rekombinacyjne szczepionki jeszcze przed pierwszymi objawami choroby nowotworowej. Dotyczy to szczególnie występującego endemicznie raka szyjki macicy, przyczynowo związanego z zakażeniem wirusem brodawczaka (papilloma virus subtyp 16). Skuteczność tego typu szczepionki wykazano w doświadczeniach na zwierzętach.

TRANSFER DO KOMÓREK NOWOTWOROWYCH GENÓW AKTYWUJĄCYCH LEKI TAK ZWANYCH SAMOBÓJCÓW

Atrakcyjnym podejściem terapeutycznym jest zastosowanie genów aktywujących nietoksyczne związki w leki skutecznie niszczące komórki nowotworowe. Metoda ta polega na „uwrażliwieniu” komórek nowotworowych na substancje nietoksyczne dla prawidłowych komórek (MOOLTEN 1994). Najczęściej wprowadza się *in situ* gen kinazy tymidynowej wirusa opryszczki za pomocą odpowiedniego wektora. Produkt tego genu powoduje konwersję nietoksycznego gancycloviru w środek hamujący replikację DNA, czyli działający cytotoksycznie. Innym genem samobójcą jest gen deaminazy cytozynowej, zmieniający nietoksyczną 5-fluorocytozynę w aktywny lek 5-fluorouracyl (SIKORA 1994). Geny samobójcy aktywujące leki działają pod kontrolą promotorów genów ulegających preferencyjnej ekspresji w komórkach nowotworowych (tabela 3). Dzięki temu wektory mogą zakażać również komórki prawidłowe, jednakże ekspresja genów samobójców zachodzi wyłącznie w komórkach nowotworowych. Transfer genów uwrażliwiających komórki na gancyclovir zastosowano u kilkudziesięciu chorych z guzami mózgu i rakiem jajnika. W guzach mózgu (glejaków), w których zawiodło standardowe leczenie, obserwowano u większości chorych zadowalające efekty,

w żadnym jednak przypadku nie uzyskano całkowitego wyleczenia. Na modelu myszy bezgrasiczych stwierdzono całkowitą regresję wielu ludzkich guzów litych bez objawów ubocznych. Wydaje się, że transferem genu kinazy tymidynowej będzie można podejmować próby leczenia w pierwotnym raku wątroby, rakach jelita grubego, jajnika i pęcherza moczowego oraz w czerniaku złośliwym, jak również w przerzutach do wątroby, opłucnej i otrzewnej.

Tabela 3

Przykłady genów ulegających selektywnej ekspresji w komórkach nowotworowych

Gen	Nowotwór
Antygen karcynoembrionalny	rak jelita grubego
Alfa- fetoproteina	rak pierwotny wątroby
Antygen specyficzny dla prostaty	rak prostaty
Amylaza	rak trzustki
Kalcytonina	rak rdzeniasty tarczycy
Tyrozynaza	czerniak złośliwy
Wilina	rak żołądka
<i>c-erbB2</i> , <i>c-erbB3</i>	rak piersi
<i>c-erbB4</i>	rak piersi, rak żołądka

Przy stosowaniu genów samobójców zaobserwowano efekt „bystander”, klinicznie bardzo pożądaný, polegający na „uczuleniu” na gancyclovir komórek sąsiadującymi z tymi, do których został wprowadzony gen kinazy tymidynowej wirusa opryszczki. Wykazano, że dla osiągnięcia efektu „bystander” jest konieczny bezpośredni kontakt między komórkami.

Istnieje możliwość profilaktycznego zastosowania transferu genów samobójców także w stanach przedrakowych. Geny samobójcy mogą być również wykorzystane jako dodatkowe zabezpieczenie komórek, do których są wprowadzane inne lecznicze geny w ramach terapii genowej różnych schorzeń. Komórki te mogłyby być niszczone po osiągnięciu zamierzonego efektu terapeutycznego.

HAMOWANIE EKSPRESJI ONKOGENÓW PRZEZ TRANSFER SEKWENCJI ANTYSSENSOWNYCH

Duże nadzieje wiąże się z zastosowaniem sekwencji antysensownych DNA lub RNA, które mogą wyłączać ekspresję niepożądanych genów i tym samym hamować rozwój procesu nowotworowego. W licznych doświadczeniach *in vitro* obserwowano zmianę fenotypu nowotworowego na prawidłowy w komórkach, do których wprowadzono komplementarne mRNA (antysens) do mRNA odpowiedniego onkogenu. Sekwencje antysensowne mogą blokować produkcję białek zmutowanych onkogenów. Sekwencje antysensowne *K-ras* zastosowano już w raku niedrobnokomórkowym płuca oraz w guzach mózgu. Istnieje również możliwość zastosowania tego samego leczenia w rakach trzustki, w których w 75% obserwuje się mutację *c-ras* (SIKORA 1994). Zasadniczym problemem

stosowania sekwencji antysensownych jest ich wprowadzenie do wszystkich komórek guza gwarantujące skuteczną terapię.

WPROWADZANIE PRAWIDŁOWYCH GENÓW PRZECIWNOWOTWOROWYCH W MIEJSCE ZMUTOWANYCH

Aktualna koncepcja rozwoju procesu nowotworowego zakłada między innymi zaburzenie relacji pomiędzy onkogenami i genami przeciwnowotworowymi. Uważa się wręcz, że rak to choroba cyklu komórkowego, w którym zasadniczą rolę odgrywa szereg genów, w tym najbardziej poznany gen *p53*. Gen ten oprócz niewątpliwego udziału w regulacji cyklu życiowego komórki jest zaangażowany w indukcję programowej śmierci komórki. Niezwykle atrakcyjnym wydaje się być podejście mające na celu włączanie w komórkach nowotworowych genów programowej śmierci, co mogłoby stanowić rzeczywisty przełom w terapii genowej nowotworów. W ostrych białaczkach limfoblastycznych typu T stwierdzono, że mutacja genu *p53* wywołana stosowaną chemioterapią koreluje z większym rozsiewem procesu chorobowego we wznowie białaczki. Transdukcja komórek nowotworowych genem *p53* typu dzikiego prowadzi do zahamowania potencjału przerzutowego blastów białaczkowych. Istnieje możliwość wprowadzania do komórki za pomocą odpowiednio skonstruowanych wektorów większej liczby kopii genu *p53*. W hodowlach *in vitro* udało się uzyskać zmianę fenotypu nowotworowego komórek poprzez wprowadzenie innych genów przeciwnowotworowych takich jak *Rb-1* (retinoblastoma) i *DCC* (deleted in colon cancer) (CULVER i BLEASE 1994, GUTIERREZ i współaut. 1992). Podobnie jak w przypadku stosowania sekwencji antysensownych poważnym problemem jest wprowadzenie prawidłowych genów przeciwnowotworowych do wszystkich komórek.

TRANSFER GENÓW TOKSYN

Inną możliwością niszczenia komórek nowotworowych jest transfer genów toksyn pod kontrolą promotorów specyficznych dla danego nowotworu. Produkcję toksyny, na przykład błoniczej, można indukować za pomocą promotorów genów ulegających ekspresji wyłącznie w komórkach nowotworowych, co może znaleźć zastosowanie w eksperymentalnych próbach terapii nowotworów (CULVER i BLEASE 1994).

OCHRONA KOMÓREK MACIERZYSTYCH PRZED AGRESYWNĄ CHEMIOTERAPIĄ PRZEZ WPROWADZANIE GENÓW WIELOLEKOWEJ OPORNOŚCI

W eksperymentalnym leczeniu nowotworów próbuje się ochraniać prawidłowe komórki przed wysoką toksycznością chemioterapeutyków. Ochrona komórek macierzystych szpiku poprzez transfer genu wielolekowej oporności pozwala na stosowanie bardzo wysokich dawek cytostatyków skutecznie niszczących komórki nowotworowe. Klasycznym genem wywołującym oporność na metotreksat jest gen reduktazy dihydrofolianowej. Zastosowanie genów ochra-

niających prawidłowe komórki jest jak dotąd ograniczone do komórek szpiku. Transfer genu wielolekowej oporności do komórek macierzystych CD34+ umożliwia rekonstrukcję szpiku kostnego. Należy dodać, że w niektórych przypadkach wprowadzenie, po zastosowanej chemioterapii prawidłowych, transdukowanych komórek CD34+ prowadziło do wznowy procesu chorobowego, co sugeruje istnienie pierwotnego defektu w pozornie „prawidłowych” komórkach CD34+.

PRZYSZŁOŚĆ TERAPII GENOWEJ NOWOTWORÓW

Należy sądzić, że w najbliższych latach dojdzie do wręcz eksponentyjnego wzrostu liczby prób klinicznych terapii genowej nowotworów. Badania kliniczne będą zmierzać zarówno do leczenia wysoce zaawansowanego nowotworu, zapobiegania przerzutom, jak i niszczenia opornych na konwencjonalną terapię komórek rakowych, to jest resztkowych (WEATHERALL 1991). Podejmowane próby kliniczne będą polegały głównie na obniżaniu tumorogenności i immunogenności komórek nowotworowych (SIKORA 1994). W miarę poznawania mechanizmów kontrolujących rozwój komórek coraz większe zainteresowanie będą wzbudzały geny kontrolujące cykl komórkowy, w tym różnego rodzaju czynniki transkrypcyjne (LARRICK i BURCK 1991).

Krytycznym elementem w terapii genowej nowotworów jest dostarczenie leczniczego genu do wszystkich komórek nowotworowych. Aktualnie stosowana technologia transferu genu, niestety nie jest w stanie w warunkach *in vivo* dostarczyć potrzebną sekwencję DNA do wszystkich komórek nowotworowych. Najlepsze efekty można uzyskać z transferem genu kinazy tymidynowej, gdzie obserwuje się efekt „bystandar”, czyli rozprzestrzenianie się produktu tego genu również do innych, sąsiednich komórek. Stosowane obecnie wektory, ze względu na swoją wielkość i właściwości, z trudem mogą przekraczać bariery śródbłonnka naczyń krwionośnych, a dotarcie do słabo unaczynionej tkanki rakowej jest prawie niemożliwe. Co więcej, komórki nowotworowe z reguły wykazują odmienny stopień zróżnicowania. Wydaje się, że o wiele bardziej skutecznie będą działały geny, których produkty posiadają aktywność miejscową, co nie wymaga konieczności wprowadzenia określonego genu do każdej komórki. Pewne nadzieje na rzeczywisty przełom w dostarczaniu wektorów z terapeutycznymi genami do komórek nowotworowych stwarzają ostatnie badania wyprodukowania wektorów, które na zasadzie swoistego tropizmu są wiązane przez receptory występujące wyłącznie na komórkach docelowych. Przykładem jest swoiste wiązanie skonstruowanego wektora z erytropoetyną do komórek z receptorami dla tego czynnika (BARINAGA 1994). Można przypuszczać, że w niedalekiej przyszłości będzie możliwe dostarczanie do ściśle określonych komórek pożądaných sekwencji, na przykład antyonkogenów, toksyn lub innych biologicznych leków, skutecznie niszczących komórkę rakową lub zmuszających ją do „powrotu” do stanu prawidłowego.

Terapia genowa nowotworów dopiero zaczyna się rozwijać. Obecnie nie można jeszcze stwarzać nadziei, szczególnie ciężko chorym na cudowne wyleczenie za pomocą nowej formy terapii. Można mieć natomiast pewność, że terapia

genowa będzie stawiała się coraz powszechniejszą i skuteczniejszą formą leczenia i zapobiegania nowotworom.

CANCER GENE THERAPY — FUTURE APPLICATIONS AND PERSPECTIVES

Summary

It is generally assumed that gene the transfer technology approaches will provide an effective treatment not only for genetic diseases but also for cancer. Improvements in the design of vectors and knowledge of the genetic basis of carcinogenesis have finally resulted in first clinical trials. The human gene therapy was started in September 1990 by transfer of the adenosine deaminase (ADA) gene into lymphocytes of a child having a lethal defect in this enzyme, leading to immuno deficiency. The first cancer gene therapy was initiated by transfer of *NeoR* gene into tumor infiltrating lymphocytes (TIL) folowed by insertion of the tumor necrosis factor (TNF) gene into TIL. Currently many approved human gene transfer trials are under way.

The clinical protocols that have been approved for the gene therapy of cancer reveal that several distinct approaches are being pursued, among them: (1) Enhancing the immunogenicity of the tumor cells, for example by insertion of genes that encode immunogenic antigenes. This can be often effectively achieved by introducing vectors carrying *HLA* class I or class II genes into a tumor cells, that are negative for the inserted *HLA* genes. The objective is to induce an immune response to the foreign *HLA* antigen with the hope that other tumor surface antigens are also recognized and an immune response is simultaneously developed against them; (2) Enhancing the antitumor activity of the immune cells, for example by introducing cytokine gene into tumor cells *in vitro*; this is basically a tumor cell vaccination to potentiate the anti-cancer immuno response; (3) Insertion of a "suicide" gene into tumor cells, for example by introducing the gene that encodes the herpes simplex virus thymidine kinase, the product of which subsequently converts prodrug into a cytotoxic metabolite leading to the tumor cell death; (4) The use of antisense DNA or RNA sequences, which block the expression of oncogenes; (5) This is a very promising approach and the first protocol approved in 1990 concerned the insertion of a normal *p53* gene into non-small cell lung carcinomas that are *p53* defective; (6) Killing tumor cells by inserting toxin genes under the control of a tumor-specific promoter (e.g. diphtheria toxin gene); (7) The use of the multidrug resistance (*MDR*) gene to protect bone marrow cells to allow higher-dose chemotherapy.

It is our great hope that in future the gene transfer technology will become a standard practice for the treatment and prevention of malignancies.

LITERATURA

- ANDERSON W. F., 1992. *Human Gene Therapy*. Science, 256, 808-813.
- BARINAGA M., 1994. *Gene therapy. Step taken toward improved vectors for gene transfer*. Science, 266, 13-26.
- CULLITON B. J., 1990. *Gene therapy begins*. Science, 249, 1372.
- CULVER K. W., BLEASE R. M., 1994. *Gene therapy for cancer*. TIG, 10, 174-178.
- FRIEDMANN T., 1989. *Progress toward human gene therapy*. Science, 244, 1275-1280.
- GUTIERREZ A. A., LEMOINE N. R., SIKORA K., 1992. *Gene therapy for cancer*. Lancet, 339, 715-720.
- HUBER B. E., RICHARDS C. A., KRENITSKY T. A., 1991. *Retroviral-mediated gene therapy for the treatment of hepatocellular carconoma: An innovative approach for cancer therapy*. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88, 8039-8034.
- KARP J. E., BRODER S., 1994. *New directions in molecular medicine*. Cancer Research, 54, 653-665.
- KOHN D. B., ANDERSON W. F., BLAESE R. M., 1989. *Gene therapy for genetic diseases*. Cancer Investigation, 7, 179-192.
- LANEUILLE P., CHANG W., KAMEL-RIED S. et al., 1988. *High efficiency gene transfer and expression in normal human hematopoietic cells with human hematopoietic cells with retrovirus vector*. Blood, 71, 811-814.
- LARRICK J. W., BURCK K. L., 1991. *Perspectives and future directions*, [W:] *Gene therapy*. 259-261. Elsevier, New York, Amsterdam, London, Tokyo.
- MILLER A. D., 1992. *Human gene therapy comes of age*. Nature, 357, 455-460.

- MOOLTEN F. L., 1994. Drug sensitivity („suicide”) for selective cancer chemotherapy. *Cancer gene therapy*, 1, 279-287.
- MULLIGAN R. C., 1993. *The basic science of gene therapy*. Science, 260, 926-931.
- OSTROVE J. M., 1994. Safety testing programs for gene therapy viral vectors. *Cancer Gene Therapy*, 1, 125-131.
- PARDOL D. M., 1993. Cancer vaccines. *Immunol.Today*, 14, 310-316.
- PARDOL D. M., 1994. A new look for the 1990s. *Nature*, 369, 357-358.
- SCHWARTZ R. H., 1992. Costimulation of T lymphocytes: The role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell*, 71, 1065-1068.
- SIKORA K., 1994. Genetic approaches to cancer therapy. *Gene Therapy*, 1, 149-151.
- WEATHERALL D. J., 1991. Gene therapy in perspective. *Nature*, 349, 275-276.

WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW KWARTALNIKA KOSMOS

1. *KOSMOS* publikuje artykuły informujące o stanie wiedzy w różnych dziedzinach szeroko pojętej biologii i jej pogranicza z innymi naukami, opracowane przez specjalistów dla czytelników z wyższym wykształceniem, zainteresowanych problemami biologii. Jest adresowany przede wszystkim do pracowników naukowych, nauczycieli szkół średnich i wyższych oraz studentów.

2. Artykuły powinny być zatem pisane językiem naukowym lecz zrozumiałym dla niespecjalistów w danej dziedzinie. Jest wskazane wyjaśnianie specjalistycznego słownictwa a zwłaszcza wprowadzanych skrótów. Należy unikać nadmiernej liczby cytowań oryginalnych prac, odsyłając czytelników w miarę możliwości do artykułów przeglądowych.

3. Objętość artykułu nie powinna w zasadzie przekraczać 1 arkusza autorskiego, to jest około 20 stron znormalizowanego maszynopisu, łącznie ze spisem literatury, tabelami i ilustracjami. W przypadku zeszytów tematycznych, objętość artykułu należy ustalić w porozumieniu z redaktorem merytorycznym zeszytu.

4. Prace należy nadsyłać w formie maszynopisu w 2 kopiach na białym papierze formatu A4 oraz 1 kopię na dyskietce, napisaną pod dowolnym edytorem tekstu na komputerze klasy IBM PC, bez centrowania tytułów, zaznaczania akapitów, formatowania i wymuszania przenoszenia.

5. Teksty powinny być pisane z podwójnym odstępem między wierszami i lewym marginesem szerokości około 4 cm, bez używania wyróżnień (podkreślania, spacjiowania, pisania kursywą). Wszelkie wskazówki dotyczące wyróżnień w tekście oraz miejsca włamania ilustracji należy zaznaczać zwykłym ołówkiem na marginesie maszynopisu. Wszystkie śródtytuły piszemy bez numeracji, czcionką tej samej wielkości a ich gradację zaznaczamy na marginesie ołówkiem: I-, II- lub III-rzędu. Strony należy numerować. Na oddzielnej, nie numerowanej stronie tytułowej należy podać tytuł pracy, imię (w pełnym brzmieniu) i nazwisko autora(ów), nazwę i adres zakładu pracy, adres zamieszkania, numer telefonu, telefaksu i adres poczty elektronicznej (E-mail).

6. Cytowane w tekście prace zaznaczamy przez podanie nazwiska autora(ów) i roku publikacji w nawiasie półokrągłym, np. (BROOKS i FROG 1993), (FISHER i współaut. 1992). Cytowaną literaturę należy zestawić na końcu maszynopisu bez numeracji w alfabetycznej kolejności według nazwisk autorów w następujących formatach:

— artykuł: BROOKS W. J., FROG T. K., 1993. Tytuł pracy w języku oryginału. Przyjęty skrót nazwy czasopisma, tom, strony od...do..., np.: *Kosmos* 43, 129-146;

— rozdział: FISHER D., KAY M. D., JUREK Z., 1992. Tytuł rozdziału. [W:] Nazwisko(a) i inicjały redaktora(ów), (red.). Nazwa wydawnictwa miejsce wydania, strony od...do....;

—książka: WÓJCICKI B., 1993. Tytuł. Wydawnictwo, miejsce wydania, str...

7. Do maszynopisu należy dołączyć na oddzielnej kartce tytuł i krótkie streszczenie artykułu w jęz. angielskim (nie przekraczające 1 str.), informujące o zasadniczej jego treści.

8. Rysunki, schematy i fotografie (oryginały + 2 kserokopie) muszą być dostarczone łącznie z maszynopisem w formie nadającej się do reprodukcji. Na odwrocie należy zaznaczyć ołówkiem ich numerację oraz nazwisko(a) autora(ów) i kilka pierwszych słów tytułu pracy. Rysunki powinny być wykonane w skali 1:1 (maksymalna szerokość 13,5 cm a wysokość — 19,5 cm z uwzględnieniem miejsca na podpis pod rysunkiem, dostosowane do wymiarów kolumny 13,5 × 19,5 cm), lub proporcjonalnie większej, czarnym tuszem na kalce (białym papierze wysokiej jakości), a w przypadku rysunków wykonanych techniką komputerową — wydrukowane na białym papierze drukarką laserową (oryginał prosimy przysłać na dyskietce). Opisy na rysunkach powinny być wykonane czcionką odpowiedniej wielkości: nie mniejszą niż 12 punktów dla rysunków w skali 1:1, lub odpowiednio większą, tak aby po zmniejszeniu do druku opis był czytelny. Kolorowe ilustracje mogą być umieszczone wyłącznie na koszt Autora(ów) lub zatrudniającej instytucji.

9. Autorzy otrzymują 25 nadbitków autorskich. Dodatkowe nadbitki są odpłatne i należy je zamawiać wraz ze wzrotem korekty tekstu.

ADRESY REDAKCJI:

Redaktor Naczelny — prof. dr Kazimierz L. Wierchowski
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa
Sekretarz Redakcji — mgr Barbara Bierzyńska
Muzeum i Instytut Zoologii PAN, Wilcza 64, 00-679 Warszawa

Adresy, pod którymi można zamówić prenumeratę lub nabyć bieżące zeszyty KOSMOSU:

Medyczna Agencja Wydawniczo Informacyjna, Żłota 60/28

Nr konta: PKO BP IX O/W-wa nr 1599-321004-136.

Amos, Zuga 12, 01-806 Warszawa

Nr konta: PKO VIII O/W-wa nr 1586-77578-136

oraz numery archiwalne:

Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika

Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

Nr konta: Bank Gdański IV O/W-wa nr 300009-6943-132.

KOSMOS

KONTYNUACJA PRENUMERATY:

TAK ☐

NIE ☐

ROCZNA ☐

PÓŁROCZNA ☐

LICZBA EGZ. 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐

WARTOŚĆ.....zł

Zakreśl właściwie!

KOSMOS

KONTYNUACJA PRENUMERATY:

TAK ☐

NIE ☐

ROCZNA ☐

PÓŁROCZNA ☐

LICZBA EGZ. 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐

WARTOŚĆ.....zł

Zakreśl właściwie!

KOSMOS

KONTYNUACJA PRENUMERATY:

TAK ☐

NIE ☐

ROCZNA ☐

PÓŁROCZNA ☐

LICZBA EGZ. 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐

WARTOŚĆ.....zł

Zakreśl właściwie!

CZASOPISMO JEST DOSTĘPNE GŁÓWNIEM W PRENUMERACIE

SPIS TREŚCI

<i>Wstęp</i>	253
<i>Mieczysław Chorąży i Kazimierz Dux</i> — Wprowadzenie do biologii nowotworów	259
<i>Janusz Limon</i> — Dlaczego cytogenetycy analizują aberracje chromosomowe, które pojawiają się w komórkach nowotworowych człowieka?	279
<i>Jan Steffen</i> — Uwarunkowania dziedziczne w zachorowaniach na nowotwory złośliwe u ludzi	295
<i>Janusz A. Siedlecki</i> — Molekularne podstawy chorób nowotworowych	311
<i>Barbara Grzelakowska-Sztabert</i> — Geny supresorowe — molekularne mechanizmy działania i ich znaczenie w kontroli proliferacji komórek	323
<i>Ewa Sikora</i> — Apoptoza a onkogeneza	353
<i>Małgorzata Balińska, Dorota Jacewicz, Katarzyna Kaczorowska</i> — Biochemiczne podstawy chemioterapii nowotworów	365
<i>Barbara Grzelakowska-Sztabert</i> — Mechanizmy oporności komórek na leki przeciwnowotworowe	375
<i>Lucyna Grębecka</i> — Migracja komórek nowotworowych w organizmie	405
<i>Zygmunt Pojda</i> — Immunoterapia nowotworów	437
<i>Elżbieta Wałajtyś-Rode</i> — Czynniki martwicy nowotworów	451
<i>Jerzy Nowak</i> — Możliwości i perspektywy terapii genowej chorób nowotworowych	465

CONTENTS

<i>Introduction</i>	257
<i>Mieczysław Chorąży i Kazimierz Dux</i> — Cancer biology — an introduction	259
<i>Janusz Limon</i> — Why should chromosome aberrations in human neoplastic cells be analyzed by cytogenetists?	279
<i>Jan Steffen</i> — Hereditary factors in human cancer	295
<i>Janusz A. Siedlecki</i> — Molecular basis of cancer disease	311
<i>Barbara Grzelakowska-Sztabert</i> — Suppressor genes — molecular mechanisms of their action and importance for control of cellular proliferation	323
<i>Ewa Sikora</i> — Apoptosis and oncogenesis	353

<i>Małgorzata Balińska, Dorota Jacewicz, Katarzyna Kaczorowska</i> — Experimental basis of cancer chemotherapy	365
<i>Barbara Grzelakowska-Sztabert</i> — Mechanisms of cellular resistance to anticancer drugs	375
<i>Lucyna Grębecka</i> — Migration of the tumour cells	405
<i>Zygmunt Pojda</i> — Immunotherapy of cancer	437
<i>Elżbieta Wałajtyś-Rode</i> — Tumor necrosis factor (TNF)	451
<i>Jerzy Nowak</i> — Cancer gene therapy — future applications and perspectives	465

Prenumeratę, jak również sprzedaż pojedynczych zeszytów **KOSMOSU** prowadzi, oprócz Wydawcy — **MAWI**, także firma **AMOS**, 01-806 Warszawa, ul. Zuga 12. Koszt prenumeraty w 1995 r. wynosi 28,00 zł.

Zlecenie dostawy za granicę jest o 100 procent droższe. W przypadku życzenia dostaw drogą lotniczą zamawiający pokrywa dodatkową opłatę.

Wpłaty są przyjmowane na konto firmy **AMOS**:

PKO VIII O/W-wa Nr 1586-77578-136, z dopiskiem na blankiecie tytułu i okresu prenumeraty, a w przypadku pojedynczych zeszytów numeru tomu i zeszytu.