

**Wybrane zagadnienia
z zakresu inżynierii genetycznej
i biologii molekularnej**

Wybrane zagadnienia z zakresu inżynierii genetycznej i biologii molekularnej

Redakcja:
Monika Maciąg
Kamil Maciąg

Lublin 2018

**Wydawnictwo Naukowe TYGIEL składa serdecznie podziękowania
dla zespołu Recenzentów za zaangażowanie w dokonane recenzje
oraz merytoryczne wskazówki dla Autorów.**

Recenzentami niniejszej monografii byli:

- prof. dr hab. Maciej Krzysztof Kurpisz
- dr hab. n. med. Krystyna Laszki-Szcząchor
- dr hab. n. o zdr. Anna Pacian
- dr hab. n. farm. Tomasz Tuzimski
- dr n. o zdr. Mariola Janiszewska
- dr n. med. Marta Łuczyk
- dr n. med. Robert Łuczyk
- dr inż. Magdalena Milczarek
- dr n. med. Ewa Rojczyk
- dr Michał Piotr Burmistrz
- dr Maciej Masłyk

Wszystkie opublikowane rozdziały otrzymały pozytywne recenzje.

Skład i łamanie:
Monika Maciąg

Projekt okładki:
Marcin Szklarczyk

© Copyright by Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o.

ISBN 978-83-65932-36-5

Wydawca:
Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o.
ul. Głowackiego 35/341, 20-060 Lublin
www.wydawnictwo-tygiel.pl

Spis treści

Karolina Majewska, Patrycja Wróblewska <i>Retencja mRNA na terenie jądra – nowy element w regulacji ekspresji genów</i>	7
Magdalena Kuradczyk <i>Etapy dojrzewania małych, jądrowych RNA – snRNA</i>	23
Kamila Szymańska, Grzegorz Adamczuk, Ewelina Humeniuk <i>Mutacje genów kodujących hormony gonadotropowe</i>	38
Karolina Rychtyk, Justyna Miszczyk <i>Optymalizacja metody przedwczesnej kondensacji chromatyny w kontekście wpływu różnych czynników na radiowrażliwość pacjentów</i>	49
Ewelina Wędrowska, Maciej Chmielarski, Arkadiusz Goede, Joanna Golińska <i>Próby terapii genowej reumatoidalnego zapalenia stawów</i>	58
Marcin Michalik, Patrycja Szmytkowska, Bogdan Dugiełło, Piotr Czekaj <i>Wpływ dymu tytoniowego na symetrię podziałów komórkowych</i>	68
Kamil Bałabuszek, Marta Pawlicka, Anna Mroczek, Halina Pieciewicz-Szczęśna, Agnieszka Sikora <i>Niektóre aspekty stosowania komórek macierzystych w medycynie</i>	86
Ewa Berlińska, Danuta Hajduga <i>Znaczenie nowotworowych komórek macierzystych w leczeniu glejaka wielopostaciowego</i>	96
Arkadiusz Goede, Ewelina Wędrowska, Joanna Golińska, Maciej Chmielarski <i>CRISPR i jej potencjalne zastosowania w biomedycynie</i>	111
Grzegorz Adamczuk, Ewelina Humeniuk, Kamila Szymańska, Marta Ostrowska, Agnieszka Korga <i>Rola białek szoku termicznego w patogenezie i terapii przeciwnowotworowej</i>	125
Ewelina Humeniuk, Grzegorz Adamczuk, Kamila Szymańska, Marta Ostrowska, Agnieszka Korga <i>Mniej znane inhibitory proteasomu w terapii przeciwnowotworowej</i>	136

Agata Tadeja, Robert Pluskota, Anna Welz <i>Profilowanie metaboliczne aminokwasów jako metoda wykrywania i monitorowania chorób nowotworowych</i>	152
Arkadiusz Goede, Ewelina Wędrowska, Joanna Golińska, Maciej Chmielarski <i>Immunosupresja a rak płuca</i>	159
Olga Kuźmycz, Paulina Machała <i>Szczepionki nowej generacji</i>	173
Justyna Kubacka, Paulina Cembrowska, Anna Stefańska <i>Zaburzenia metabolizmu tryptofanu w patogenezie chorób sercowo-naczyniowych</i>	182
Indeks Autorów.....	191

Retencja mRNA na terenie jądra – nowy element w regulacji ekspresji genów

1. Wstęp

Eukariotyczna ekspresja genów obejmuje procesy zachodzące na terenie jądra komórkowego jak i cytoplazmy, które połączone są eksportem dojrzałego mRNA poprzez pory jądrowe. Zarówno procesy zachodzące na terenie jądra jak i te, które mają miejsce w cytoplazmie są wzajemnie powiązane i zależne od siebie [1]. Podczas procesu transkrypcji zachodzącego na terenie jądra, pre-mRNA ulegają czapeczkowaniu na końcach 5' zaraz po zapoczątkowaniu transkrypcji. Jednocześnie w momencie pojawiania się miejsca splicingowego następuje montowanie spliceosomu i pre-mRNA ulega ko-transkrypcyjnemu splicingowi w celu usunięcia niekodujących sekwencji (intronów) i połączenia ze sobą wcześniej oddalonych sekwencji kodujących (eksonów). Podczas, gdy splicing pierwszych intronów oddziałuje zwrotnie na elongację transkryptu, wydajność splicingu ostatniego intronu wpływa na cięcie końca 3' i jego poliadenylację (CPA) [2-4]. Z drugiej zaś strony skuteczność poliadenylacji wpływa na moment terminacji transkrypcji, uwolnienia dojrzałego mRNA z chromatyny, eksport do cytoplazmy, jak również warunkuje jądrowy rozkład wadliwych transkryptów [5-7]. Wszystkie etapy poszczególnych procesów, którym ulega mRNA są katalizowane, koordynowane oraz powiązane z białkami wiążącymi RNA (RBPs – *RNA-binding proteins*).

W celu gwarancji integralności ekspresji genów, komórki w toku ewolucji wykształciły mechanizmy mające na celu zapobieganie przedwczesnemu uwalnianiu niedojrzałego mRNA do cytoplazmy. Uwolnienie takiego mRNA mogłoby skutkować produkcją nefunkcyjnych i szkodliwych białek mogących przyczynić się do powstania stresu komórkowego, śmierci komórki, bądź chorób włącznie z chorobami nowotworowymi [8].

Do zabezpieczeń tych należą:

- ograniczenie występowania czynników splicingowych do obszaru jądra oraz brak możliwości przedostania się ich do cytoplazmy [9];
- funkcjonowanie białek wiążących RNA (RBPs) jako swoiste punkty kontrolne stanowiące o prawidłowym przebiegu poszczególnych etapów przebiegających procesów. Dzięki temu komórka rozróżnia prawidłowe produkty mRNA od nieprawidłowych [9];

¹ karolinalewandowska94@gmail.com, Zakład Biologii Komórki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu www.biol.umk.pl.

² pwroblewska09@gmail.com, Zakład Biologii Komórki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu www.biol.umk.pl.

- precyzyjne skoordynowanie splicingu z eksportem mRNA, czynniki eksportujące mRNA ulegają rekrutacji jedynie do pre-mRNA podczas splicingu lub dopiero po jego zakończeniu [10];
- precyzyjna kontrola mRNPs w porach jądrowych. Wadliwe transkrypty ulegają retencji w jądrze i ostatecznie degradacji [11-13].

W przypadku gdy jądrowa retencja zawodzi i niedojrzałe mRNA przedostaje się do cytoplazmy, jest ono rozpoznawane i ulega degradacji zależnej od kodonu nonsense (NMD) [14, 15]. Na terenie cytoplazmy może również zachodzić degradacja mRNA poprzez działanie krótkich niekodujących RNA (miRNA i siRNA) [16]. Są to interferencyjne RNA, które przyłączają się na zasadzie komplementarności zasad do docelowego mRNA i powodują jego degradację. Sposób działania cząsteczek miRNA zależy od tego, w jakim stopniu ich sekwencja jest komplementarna do sekwencji mRNA. Jeśli miRNA jest w pełni komplementarna do mRNA zachodzi hydroliza mRNA przeprowadzana przez enzym Dicer. Niepełna komplementarność powoduje zatrzymanie translacji i przechowywanie transkryptu w ciałach P na terenie cytoplazmy [17, 18]. Mechanizm działania siRNA jest podobny do mechanizmu działania miRNA [19]. Dodatkowo siRNA może działać na strukturę chromatyny powodując jej heterochromatyzację [16].

2. Retencyjne mRNA

Retencja może dotyczyć transkryptów, w obrębie których doszło do niekompletnego splicingu, jak również w pełni dojrzałego mRNA. Hiperedytowane mRNA oraz transkrypty z wyciętymi intronami, które jednak nie zostały odpowiednio edytowane, również ulegają zatrzymaniu na terenie jądra [20].

2.1. Kontrola jakości mRNA

Mechanizm ten jak się przypuszcza może służyć kontroli jakości transkryptów na terenie jądra. Degradacja przy udziale egzosomów może być poprzedzona retencją transkryptu. Z drugiej zaś strony wstrzymanie mRNA, które negatywnie przeszło kontrolę jakości może stanowić swego rodzaju szansę na jego naprawę, przykładowo w wyniku uruchomienia potranskrypcyjnego splicingu.

2.2. Funkcjonalna kontrola mRNA

Kontrola funkcjonalna mRNA odnosi się do kontroli czasu i warunków w jakich mRNA uwalniane jest do cytoplazmy. Zaistnienie ściśle określonych warunków, takich jak chociażby stres czy infekcja wirusowa, może doprowadzić do wstrzymania określonych transkryptów na terenie jądra.

2.2.1. Gromadzenie zapasowego mRNA w celu uruchomienia szybkiego potranskrypcyjnego splicingu

Transkrypty zawierające introny mogą być magazynowane w jądrowych speckles jako zapasy dla szybkiego potranskrypcyjnego splicingu, w momencie gdy warunki komórkowe ulegną zmianie np. po ekspozycji na specyficzny stres. Przykładowo szok termiczny, powoduje zwiększenie ilości transkryptów zawierających retencyjny intron w obrębie jąder mysich fibroblastów linii 3T3. Transkrypty ulegają stabilnej retencji w jądrze. W momencie, gdy komórka powraca do równowagi po ekspozycji na stres, zachodzi potranskrypcyjny splicing i komórka może z powrotem osiągnąć normalną ekspresję genów [21].

2.2.2. Zapobieganie degradacji cytoplazmatycznej oraz toksycznego wpływu dsRNA

Jądrowe odizolowywanie mRNA zawierających regiony dsRNA jest ważne dla komórek we względu na unikanie wywoływania wrodzonych odpowiedzi immunologicznych w cytoplazmie, które mogłyby doprowadzić do aktywacji PKR i globalnego wyłączenia translacji. Na przykład mRNA białka LIN28A posiada dwa odwrócone powtórzenia retranspozozonu Alu w obrębie jego długiego 3' UTRu, które formują wydłużone regiony dsRNA. To powoduje rozległe edytowanie A-I (przez enzym ADAR) oraz retencję hiperedytowanego mRNA białka LIN28A w obrębie paraspeckles [22]. Przypuszczalnie w sytuacji w, której nie istniałby mechanizm retencji, powstające wadliwe mRNA ulegałyby z całą pewnością degradacji jądrowej bądź też cytoplazmatycznej. Jądrowa retencja daje zatem szansę na naprawę wadliwych transkryptów, a co za tym idzie umożliwia ich eksport na teren cytoplazmy oraz dalszą ekspresję [23].

2.2.3. Ścisła regulacja czasu ekspresji transkryptów

Przypuszcza się, iż wstrzymanie transkryptów na terenie jądra może służyć oddaleniu czasu syntezy transkryptów od momentu ich translacji, która to może być uruchamiana dopiero po zajściu potranskrypcyjnego splicingu. W badaniach prowadzonych na mysich komórkach linii germinalnej, wykazano obecność dużej liczby poliadenylowanych transkryptów, które ulegały retencji na terenie jądra w obrębie spermatocytów I rzędu (komórki będące w trakcie profazy I podziału mejotycznego – komórki mejotyczne). Po upływie około 9 dni od czasu detekcji poliadenylowanych transkryptów zakotwiczonych na terenie jądra, dokonano kolejnych pomiarów, które wykazały około 90% spadek ilości retencyjnych transkryptów na terenie jąder komórek. Należy jednak dodać, że w trakcie tychże 9 dni doszło do zakończenia podziałów mejotycznych, zatem obserwowane komórki były już post-mejotycznymi komórkami spermatyd. Sugeruje to zatem, iż komórki w stadium spermatocytarnym, charakteryzującym się wzmożoną aktywnością metaboliczną komórek, syntetyzują dużą liczbę transkryptów podlegających retencji na terenie jądra. Transkrypty te zostaną wykorzystane dopiero po zakończeniu podziałów mejotycznych, czyli dopiero w obrębie spermatyd. W obrębie spermatyd dochodzi do uruchomienia programu postranskrypcyjnej obróbki co prowadzi do wytworzenia dojrzałych zdolnych do eksportu na teren cytoplazmy mRNA. Takie mRNA kolejno podlega translacji mającej na celu syntezę białek niezbędnych do dalszego różnicowania komórek w kierunku dojrzałych plemników. Widzimy zatem, że w takim przypadku retencja służyła czasowemu oddaleniu syntezy transkryptu od jego translacji [24]. Analogiczną sytuację obserwujemy podczas podziałów mejotycznych mikrosporocytów modrzewia europejskiego, gdzie również dochodzi do akumulacji retencyjnych transkryptów na terenie jądra. Wątek ten zostanie rozwinięty w dalszej części rozdziału [25].

2.2.4. Autoregulacja poziomu białek

Wykazano również, że retencja transkryptów może służyć swoistej autoregulacji poziomu białek. Jądrowe białka wiążące poly A (PABPN1) negatywnie autoregulują swój poziom poprzez jądrową retencję mRNA zawierającego intron w celu utrzymania homeostazy białka. Gdy białko to pojawia się w zbyt dużej ilości, PABPN1 wiąże się do ciągu A w obrębie 3'UTRu swego własnego Mrna. W ten sposób zapo-

biega związaniu czynnika splicingowego jakim jest białko SRSF10, co skutkuje wstrzymaniem terminalnego intronu i jądrową retencją transkryptu. W sytuacji niskiego poziomu PABPN1, ostatni intron ulega potranskrypcyjnemu splicingowi i dojrzały mRNA jest uwalniany do cytoplazmy w celu zsyntetyzowania białka [26].

3. Mechanizmy retencji mRNA

Niezależnie od splicingowego statusu retencyjnych transkryptów mechanizmy retencji można podzielić na dwie kategorie :

- Pierwsza kategoria dotyczy transkryptów, które są wiązane przez jądrowe czynniki retencji aktywnie zakotwiczone w jednostkach strukturalnych na terenie jądra;
- Druga kategoria związana jest z mRNP, których eksport na teren cytoplazmy jest uniemożliwiony przez aktywne blokowanie rekrutacji czynników eksportujących.

3.1. Macierz jądrowa

Transkrypty podlegające retencji mogą być zlokalizowane w obrębie rozmaitych domen jądrowych. Mechanizmy prowadzące do ich zakotwiczenia na terenie tychże domen wykazują między sobą pewne różnice. Jedną z obserwowanych do tej pory lokalizacji retencyjnych mRNA jest nukleoplazma (macierz jądrowa). Nieefektywny splicing terminalnych intronów może osłabiać wiązane CPF (czynniki cięcia i poliadenylacji) i powodować retencję mRNA, które pozostają związane z chromatyną. Białka budujące wczesny spliceosom takie jak U1 i U2AF związane z terminalnym intronem oddziałują na czynniki CPF uniemożliwiając cięcie 3'UTRu oraz rozpoznawanie sygnału poliadenylacji. W konsekwencji polimeraza pozostaje na matrycy, a transkrypt jest nadal związany z chromatyną w miejscu transkrypcji. Tego typu retencyjne transkrypty nie posiadają ogona poli A i są skazane na degradację poprzez jądrowe egzozomy [6].

3.2. Retencja na terenie skupisk jądrowych zwanych z ang. *nuclear speckles* (NS)

Kolejną jednostką strukturalną w obrębie, której retencyjne mRNA mogą ulec zakotwizeniu są jądrowe speckles. Do niedawna uważano, że wszystko co trafia do jądrowych speckles na zawsze zostaje w obrębie tych domen. Obecnie sugeruje się, że te jądrowe domeny funkcjonują jako centra kontroli jakości, przez które przechodzą wszystkie przetworzone mRNA. Kiedy pozytywnie przejdą kontrolę jakości są natychmiastowo wydajnie eksportowane [27]. Jednym z sygnałów skierowujących do jądrowych speckles są domeny bogate w argininę (RS), które charakterystyczne są dla białek regulatorowych, takich jak U2AF65 i U1-70K, jak również białek SR [28]. Udowodniono, że retencyjne poliadenylowane RNA, które ulegają akumulacji w obrębie jądrowych speckles pozostają nadal związane z unieruchomionymi nieaktywnymi spliceosomami [29]. Domeny RS czynników splicingowych, które nie są aktywnie zaangażowane w splicing posiadają ufosforylowane reszty serynowe [30]. Prawdopodobnie produktywnie wiązanie ufosforylowanych białek zawierających domeny RS (U2AF65 i U1-70K) do 5'ss i 3'ss ometkowuje mRNA jako zawierające niewycięty intron kierując je do jądrowych speckles i fizycznie zakotwicząc poprzez interakcję z innymi ufosforylowanymi białkami zawierającymi domeny RS [29, 31]. Obecnie bada się w jaki sposób dojrzałe mRNA ulegają retencji w obrębie jądrowych speckles [27].

3.3. Retencja na terenie skupisk jądrowych zwanych z ang. *paraspeckles*

Mechanizm retencji prowadzący do zatrzymania transkryptów na terenie tych domen obejmuje potranskrypcyjną deaminację adozyny do inozyny (edytowanie A do I) w obrębie mRNA. Enzym ADAR (Adenosine Deaminase on RNA) wiąże regiony ds (double-stranded) w obrębie RNA i katalizuje tę konwersję [32]. Reszty inozynowe są kolejno rozpoznawane przez kompleks białkowy składający się z PSPC1, NONO i MATR3, co skutkuje retencją kompleksu mRNP w obrębie nukleoplazmy lub w paraspeckles. Jądrowe odizolowywanie mRNA zawierających regiony dsRNA jest ważne dla komórek we względu na unikanie wywoływania wrodzonych odpowiedzi immunologicznych w cytoplazmie o czym była już mowa [33].

3.4. Retencja w obrębie porów jądrowych – ang. *nuclear basket*

Nuclear basket prezentuje kolejną jednostkę strukturalną w obrębie jądra, gdzie związanie pre-mRNA z porami jądrowymi zostaje uniemożliwione [12]. Jądrowa retencja w obrębie porów jądrowych jest zależna od splicingu i wymaga około-jądrowych białek TPR u ssaków [11]. Najnowsze badania wskazują na to, że kontrolna jakości w obrębie porów może być osiągana przez kombinację interakcji pomiędzy RBPs, NXF1 (czynnik eksportu) i TPR. Sugeruje się, że niskie powinowactwo pomiędzy RBP i NXF1 jak również silne interakcje pomiędzy pewnymi RBP i TPR są wystarczające do odróżnienia między składnikami eksportu, nieprawnymi mRNP i ich zatrzymania w obrębie nuclear basket [34].

3.5. Inhibicja czynników eksportowych rekrutujących do mRNP

Dla efektywnego eksportu, mRNP musi rekrutować do NXF1, który przyłącza się przy pomocy białkowych adapterów. Wyczerpanie tych adapterów takich jak: UAP56 czy ALYREF doprowadza do akumulacji poliadenylowanego mRNA na terenie jądrowych speckles sugerując, że ich rekrutacja jest niezbędna do uwolnienia dojrzalego mRNA z tych domen. Oznacza to, że retencyjne transkrypty zlokalizowane w obrębie jądrowych speckles są niezdolne do rekrutacji czynników eksportowych lub są związane przez czynniki retencji [7, 27, 35].

Wykazano również, że uwalnianie transkryptów zawierających DI jest regulowane przez defosforylację białek SR. Białka SR jak już wcześniej wspomniano mogą również pełnić rolę adapterów eksportu rekrutując NXF1 do mRNP, gdy są defosforylowane w wyniku produktywnego splicingu. Bezproduktywny spliceosom montowany na retencyjnych intronach może zapobiegać defosforylacji związanych białek SR, co z kolei może stać na przeszkodzie NXF1(uniemożliwia jego związanie) i powodować retencję w obrębie jądrowych speckles [7, 36, 37].

3.6. Poszukiwany mechanizm retencji pre-mRNA/mRNA z udziałem CB u modrzewia (nasz przykład)

Jedne z obecnie prowadzonych badań skupiają się na analizie procesu jądrowej retencji podczas rozwoju komórek generatywnych u roślin. W mikrosporocytach modrzewia podczas profazy pierwszego podziału mejotycznego obserwuje się kilka cykli retencji mRNA w jądrze. Transkrypty ulegają retencji na terenie nukleoplazmy jak również ciał Cajala. Mechanizm jądrowej retencji w obrębie ciał Cajala jak to tej pory nie został jeszcze opisany, przypuszcza się jednak, że dotyczy on wyłącznie organizmów roślinnych. Zagadnienie to zostanie dokładniej omówione w dalszej części rozdziału [25].

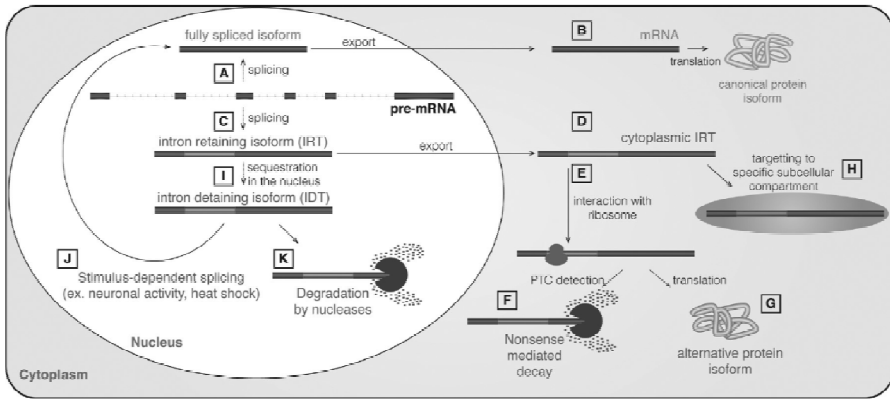
4. Elementy odpowiedzialne za retencję mRNA

Bardzo często w obrębie retencyjnego mRNA obserwuje się obecność niewyciętych w procesie splicingu intronów. Sugeruje się, że retencyjne RNA może ponadto zawierać inne specyficzne elementy cis, które są wiązane przez czynniki retencyjne bądź też posiadają jakieś inne retencyjne cechy.

4.1. Retencja spowodowana zachowaniem intronu

Obecnie wiadomo, że znaczna część poliadenylowanych mRNA jest stabilnie zatrzymywana w jądrze, a wiele z nich zawiera jeden lub dwa introny, które nie zostały usunięte w procesie splicingu. Fakt ten początkowo był dużym zaskoczeniem, ponieważ splicing wewnętrznych intronów zazwyczaj zostaje ukończony ko-transkrypcyjnie, czyli przed terminacją transkrypcji i pojawianiem się poliadenylowanego ogona. Tymczasem regulowana retencja intronów pojawiła się jako nowy sposób regulacji ekspresji genów, która z jednej strony umożliwia eliminację nieprawidłowych transkryptów, a z drugiej strony daje komórce szanse na natychmiastową odpowiedź na zaistniały stres [38, 39]. Wyróżnia się dwa typy retencyjnych intronów:

- **RI (ang. *retained introns*)** – są to introny, które oflankują eksony zawierające przedwczesne kodony terminacji (PTCs). Te introny są zazwyczaj wysoko retencyjne, jednak niektóre transkrypty są transportowane do cytoplazmy, gdzie ulegają degradacji na drodze NMD. Czasem zdarza się jednak, że transkrypty te właśnie dzięki obecności tychże retencyjnych intronów zdołają uciec przed degradacją na drodze NMD. Ulegają wówczas translacji na terenie cytoplazmy w konsekwencji czego zsyntetyzowane zostają izoformy białek, które posiadają odmienne funkcje (Rys.1.). Mogą one stanowić zatem narzędzie do zachodzenia specyficznej ekspresji [40].
- **DI (ang. *detained introns*)** – tego typu introny są zasocjowane z transkryptami, które nie zostają przetransportowane do cytoplazmy ale pozostają na terenie jądra. Z tego względu są niewrażliwe na degradację na drodze NMD. DI są często lokalizowane między konstytutywnymi eksonami. Są one krótsze i mają słabsze miejsca 5' i 3' splicingowe w porównaniu do intronów podlegających splicingowi. Tak samo jak RI, również DI negatywnie wpływają na ekspresję genów poprzez zapobieganie translacji poszczególnych transkryptów. Nie mniej jednak w przypadku DIs taka inhibicja jest przejściowa i odwracalna, ponieważ transkrypty te nie ulegają degradacji (Rys.1.). Różne bodźce takie jak chociażby uszkodzenia DNA czy szok cieplny, mogą wywołać nagły potranskrypcyjny splicing zatrzymanych intronów, aby regulować jądrowe uwalnianie transkryptów i kolejno translację funkcjonalnie powiązanych transkryptów [40].



Rys.1. Schemat przedstawiający losy transkryptów z zachowanymi intronami typu DI (detained introns) oraz RI (retained introns) [zmodyfikowano – 40].

4.2. Hiperadenylacja

Jak do tej pory udało się ustalić, że ogony poly A zbudowane są z około 50-250 nt. Warunkuje to ich efektywny eksport do cytoplazmy, podczas gdy dłuższe ogony poly A przyczyniają się do retencji mRNA. Hiperadenylacja powyżej 250 nt kompletnie blokuje eksport mRNA [41]. Co interesujące długość ogonów poli A różnych mRNA może ulegać zmianie w odpowiedzi na warunki stresowe. Jak udowodniono wirusowe białka mogą doprowadzać do translokacji cytoplazmatycznych białek wiążących polyA (PABPC1) do jądra, co indukuje ich hiperadenylację i akumulację transkryptów na terenie jądra [42].

4.3. Inne elementy cis

Ostatnie badania wskazują na to, iż retencyjne mRNA są: przeciętnie około 8 razy dłuższe, posiadają dłuższe regiony kodujące, 3'UTRy, jak również zredukowaną liczbę fragmentów bogatych w GC w porównaniu do transkryptów, które podlegają eksportowi na teren cytoplazmy [43, 44]. Oprócz retencyjnych intronów i wydłużonego ogona poly A zidentyfikowano również kilka innych elementów cis w obrębie długich niekodujących RNA (lncRNA), mRNA jak i reporterowych transkryptów, które przyczyniają się do ich retencji. Elementami takimi są m.in. motyw retencyjny 5'ss (GUAUGUU) [45], pentametr AGCCC [46] i polipirymidynowy obszar wiązany przez PTB (białko będące inhibitorem splicingu) [47].

5. Mechanizmy uwalniania retencyjnego mRNA

Na terenie jądra komórkowego mogą znajdować się transkrypty, które są niefunkcjonalne. Spowodowane to może być nieprawidłowym składaniem mRNP. W takim przypadku dochodzi do degradacji mRNA przez egzozom [48]. Transkrypty, które uległy retencji w jądrze komórkowym mogą zostać uwolnione do cytoplazmy pod wpływem różnych czynników. Aby doszło do uwolnienia retencyjnego mRNA muszą zajść procesy, które doprowadzą do powstania transkryptu, który będzie zdolny do opuszczenia jądra. Obecnie przypuszcza się, że istnieje kilka mechanizmów pozwalających na uwolnienie retencyjnego mRNA.

5.1. Splicing potranskrypcyjny i rekrutacja czynników eksportujących w celu selektywnego eksportu

Początkowe badania retencji mRNA wskazywały, że zatrzymane transkrypty zlokalizowane są na terenie ciał jądrowych wraz z inaktywowanymi spliceosomami. W peryferycznych obszarach ciał jądrowych może dochodzić do potranskrypcyjnego splicingu [36]. Przypuszcza się, że istotną rolę w tym procesie odgrywa białko SR, które może wiązać się z RNA i jednocześnie inaktywować lub aktywować spliceosom. Białko to wiąże się z RNA za pomocą domeny RS (region powtórnego dipeptydu arginina – seryna) [7,49]. Reszty seryny mogą ulegać fosforylacji i w ten sposób hamować działanie spliceosomu. Defosforylacja białka SR pozwala na zajęcie splicingu i wycięcie intronu [7]. W ten sposób może dochodzić do post-transkrypcyjnego wycięcia intronu i umożliwienia przyłączenia czynników eksportujących. Do defosforylowanego białka SR mogą przyłączać się czynniki eksportujące, np. NXF1 (nuclear export factor 1) [49]. Uwolnienie mRNA po transkrypcji z ciał jądrowych zależy również od adapterów eksportowych ALYREF i UAP56 [27, 50]. UAP56 wchodzi w skład kompleksu TREX, który funkcjonuje w eksporcie mRNA [27]. Uwolnienie zatrzymanych transkryptów może zachodzić poprzez modulację rekrutacji ALYREF, która jest spowodowana post-transkrypcyjną modyfikacją białka lub sygnalizacją komórkową [51]. Białko to przyłącza się do mRNA w formie ufosforylowanej i tylko w takiej formie może spowodować eksport transkryptu [52,53]. Fosforylację białka ALYREF przeprowadza kinaza AKT1. Innym sposobem na ufosforylowanie białka jest przyłączenie pochodnych fosfoinozytolu. W efekcie fosforylacji, ALYREF przyłącza się do mRNA i umożliwia transport przez pory jądrowe.

5.2. Rekrutacja czynników eksportu do retencyjnych intronów

Obecność niewyciętego intronu nie daje pewności, że transkrypt z intronem retencyjnym zostanie zatrzymany na terenie jądra komórkowego. W komórkach obserwuje się transkrypty z zachowanym intronem na terenie cytoplazmy. Zjawisko to wskazuje na to, że czynniki eksportu jądrowego mogą przyłączać się również do intronów retencyjnych. Czynnikiem eksportu, który przyłącza się do intronów jest NXF1 [54]. Tak samo jak w przypadku przyłączania się czynników eksportu do mRNA z wyciętymi intronami, NXF1 łączy się z RNA poprzez białko SR [55] lub bezpośrednio z sekwencjami w obrębie tych intronów, w celu promowania ich eksportu i translacji. Większość wykrywanych intronów w cytoplazmie zawiera przedczesny kodon stop, który powinien kierować transkrypty na drogę degradacji poprzez NMD. Jednak liczne transkrypty są odporne na NMD i ulegają translacji, co powoduje powstawanie skróconych form białek [56, 57].

5.3. Potranskrypcyjne rozerwanie końca 3' i poliadenylacja (CPA)

Jednym z elementów odpowiedzialnych za retencję mRNA jest hiperedytowany i wydłużony 3'UTR. Mechanizm pozwalający na uwolnienie takiego transkryptu do cytoplazmy polega na skróceniu ogona poly A. w procesie potranskrypcyjnego rozerwania końca 3' dochodzi do wybrania proksymalnych miejsc poli A i odcięcia zbyt długiego regionu 3'UTR. Mechanizm ten został zasugerowany przez CTN-RNA, który normalnie używa dystalnego miejsca poliadenylacji i wytwarza długi

koniec 3'UTR [58]. W warunkach stresowych (IFN γ +LPS), CTN-RNA jest post-transkrypcyjnie odcinany, co usuwa wydłużony koniec 3'UTR i uwalnia region kodujący mCAT2 do cytoplazmy, aby zapewnić szybką translację do białka mCAT2 i produkcję NO [58]. Do tej pory zidentyfikowano tylko jeden czynnik związany z CPA, który zlokalizowany jest na terenie paraspeckles, jest to CFIm68. Ostatnie badania obejmujące cały genom dowiodło, że mRNA z krótszymi 3'UTR są nadmiernie obecne w cytoplazmie, zaś mRNA z dłuższymi 3'UTR są często zatrzymywane w jądrach [59].

5.4. Rozpad maskujących lncRNAs

W komórkach eukariotycznych obecne są długie niekodujące RNA (lncRNA), które mogą być rozcinane i tworzyć krótkie niekodujące RNA (np. miRNA, siRNA, piRNA, snoRNA). Transkrypcję tych RNA przeprowadza polimeraza RNA II. Wiele lncRNA ulega szybszej degradacji przez jądrowe RNazy niż inne transkrypty polimerazy RNA II [60]. Przypuszcza się, że zmniejszenie transkrypcji lncRNA lub wzmocnienie ich rozpadu może umożliwiać uwolnienie docelowego mRNA do cytoplazm.

5.5. Jądrowy rozpad transkryptów z intronami retencyjnymi

Dotychczas uważano, że transkrypty, które są nieefektywnie łączone i zatrzymywane w miejscu transkrypcji, są wrażliwe na rozpad zależny od egzozomu [61]. Jednak wydaje się, że mRNA z zachowanymi intronami są odporne na rozpad przez egzozom [14, 50, 62]. Jest to możliwe, ponieważ są one poliadenylowane. Zwykle rozpadowi jądrowemu ulegają transkrypty, które są nieefektywnie poliadenylowane i najczęściej są zbyt krótkie [63]. Wyczerpanie podjednostek egzozomu, DIS3 i EXOSC10, powoduje silne nagromadzenie różnych transkryptów.

6. Lokalizacja retencyjnego mRNA na terenie jądra

Retencyjne mRNA obserwowane jest na terenie nukleoplazmy i ciał jądrowych. Wśród ciał jądrowych w akumulację transkryptów zaangażowane są jądrowe speckles, paraspeckles i ciała Cajala. Paraspeckles i jądrowe speckles w swojej morfologii mają dużo ziarnistości [64, 65]. Paraspeckles zaangażowane są w hiperdytację mRNA poprzez zamianę adenozyiny w inozynę [64]. W ten sposób są miejscem retencji pre-mRNA. Jądrowe speckles biorą udział w magazynowaniu, montażu oraz modyfikacji czynników spilingowych [66, 67]. Dotychczas uważano, że ciała Cajala są zaangażowane w modyfikację snRNA i snoRNA oraz w montaż snRNP i snoRNP [64]. W ostatnich badaniach zaobserwowano w ciałach Cajala nagromadzenie transkryptów z zachowanym intronem, co świadczy o ich dotychczas niepoznanej funkcji jaką jest udział w retencji mRNA.

7. Obecność retencyjnych transkryptów na terenie jąder w komórkach ssaczycy oraz roślinnych

Obecność transkryptów wstrzymywanych na terenie jądra obserwowana jest zarówno w komórkach zwierzęcych jak i roślinnych. Poniżej pokrótce przedstawiono wyniki badań prowadzonych na mysich komórkach linii generatywnej oraz modele roślinne opisujące retencję transkryptów obserwowaną na terenie jąder komórek rozrodczych.

7.1. Model ssaczy – komórki generatywne

Podczas procesu spermatogenezy u myszy dochodzi do globalnej rearanżacji genomu w obrębie komórek linii generatywnej, co umożliwia zachodzenia czasowej ekspresji genów kodujących białka regulatorowe odgrywające kluczowe role podczas tego procesu. Rearanżacja ta jest konieczna w przypadku spermatocytów oraz spermatyd w celu przejścia z podziałów mejotycznych do mitotycznych czy też w celu wspomagania morfogenezy. Dochodzi wówczas do uruchomienia programu alternatywnego splicingu, który ma na celu włączenie specyficznej ekspresji. Dochodzi do wytworzenia alternatywnych form transkryptów pochodzących z tego samego a zatem i różnorodnych form białkowych. W przypadku analizowanych komórek, bardzo duży procentowy udział zachodzących alternatywnych zdarzeń obejmował retencję intronu (aż 30%). Podczas, gdy komórki somatyczne charakteryzują się około 3% udziałem tego zdarzenia. Nie da się ukryć zatem, że zjawisko to jest czymś co zdecydowanie odróżnia komórki mejotyczne od komórek, które nie podlegają tym podziałom. Początkowo sugerowano, iż retencyjne introny promują jedynie eliminację niepożądanych transkryptów podczas zmian rozwojowych oraz różnicowania męskich komórek rozrodczych. Nie mniej jednak badania wykazały, że introny te mogą również odgrywać pozytywną rolę bowiem regulują one czas ekspresji wybranych genów podczas trwania wysoce wyspecjalizowanych programów rozwojowych. Retencyjne introny charakteryzowały się obecnością słabych miejsc 5'ss oraz 3'ss, a ich obecność była charakterystyczna dla genów kodujących białka istotne dla prawidłowego funkcjonowania gamet. W przypadku spermatocytów obserwowano znacznie większą ilość retencyjnych intronów, a także ogólną liczbę retencyjnych transkryptów w porównaniu do spermatyd. Badania te wykazały, że transkrypty były stabilne oraz charakteryzowały się dłuższym okresem półtrwania w porównaniu do mRNA, które podlegały bezzwłocznemu procesowi splicingu. Sugeruje to zatem, że w obrębie spermatyd dochodzi do uruchomienia programu potranskrypcyjnej obróbki co prowadzi do wytworzenia dojrzałych, zdolnych to eksportu na teren cytoplazmy mRNA. Takie mRNA podlega translacji mającej na celu syntezę białek niezbędnych to dalszego różnicowania komórek w kierunku dojrzałych plemników [24].

7.2. Modele roślinne

Uważa się, że zjawisko retencji mRNA zachodzi znacznie częściej u roślin niż u zwierząt [68-70]. Dotychczas zjawisko to opisano na modelu paproci *Marsilea vestita* oraz *Arabidopsis thaliana* [69, 71]. Uważa się, że większość zdarzeń zachowania intronów obejmuje słabo zdefiniowane sygnały splicingowe. Przyczynia się to do nieoptymalnej wydajności wycinania intronów. U *Marsilea vestita* dochodzi do nagromadzenia pre-mRNA na terenie jądra komórkowego podczas spermatogenezy. Nagromadzone transkrypty posiadały jeden zachowany intron, mimo że geny kodujące te transkrypty miały więcej intronów. Aby retencyjne transkrypty zostały uwolnione do cytoplazmy zachodzi ich splicing. Po procesie wycinania intronów na terenie cytoplazmy pojawiają się dojrzałe transkrypty. Natomiast po zahamowaniu splicingu nie obserwuje się transportu mRNA do cytoplazmy i translacji. W przypadku *M. vestita* zahamowanie splicingu powoduje zatrzymanie

rozwoju [71]. Splicing poszczególnych transkryptów z zachowanym intronem zachodzi w różnym czasie podczas rozwoju.

Innym modelem roślinnym, w którym zaobserwowano retencję mRNA jest modrzew europejski *Larix decidua*. Przeprowadzane badania na mikrosporocytach tego gatunku wskazują retencje mRNA w jądrze komórkowym. Kumulacja transkryptów widoczna jest na terenie całego jądra komórkowego, a zwiększona ilość pre-mRNA lokalizowana jest w ciałach Cajala. W przypadku modrzewia europejskiego w rozwoju generatywnym podczas pierwszego podziału mejotycznego dochodzi do wydłużonego diplotenu, który trwa kilka miesięcy. W tym okresie obserwuje się naprzemiennie fazy zwiększonej aktywności transkrypcyjnej i fazy, w których pozornie nic się w komórce nie dzieje. Zsyntetyzowane transkrypty zostają zatrzymane w jądrze komórkowym i w okresie braku transkrypcji dochodzi do post-transkrypcyjnego splicingu. Pozwala to na produkcję białek w ściśle określonym czasie.

8. Choroby związane z zaburzeniami retencji mRNA u ludzi

Retencja mRNA dotyczy również ludzi i jest odpowiedzialna za różne schorzenia. Wiele chorób związanych jest z mutacjami w sekwencjach regulatorowych, czynnikach eksportu, białkach wiążących RNA (RBP) i miejscach splicingu. Może to powodować nienormalną retencję transkryptów i poważne skutki patologiczne. Akumulowanie transkryptów w jądrze komórkowym jest wynikiem wadliwych czynników eksportu lub niewycięciem intronu. Nieprawidłowe fałdowanie czynnika eksportującego GLE1 uniemożliwia jego połączenie z nukleoporinami NUP155 i CG1 [72, 73]. Zaburzenia w GLE1 zostały połączone z kilkoma chorobami mono-neuronów [74]. Za retencję mRNA może również odpowiadać niewycięcie intronu, które jest spowodowane mutacją w miejscach splicingu [75, 76]. Do chorób spowodowanych zachowaniem intronu należy wrodzona łamliwość kości, która jest spowodowana niewycięciem intronu 26 z mRNA genu COL1A1 [77]. U chorych na tą chorobę dochodzi do gromadzenia transkryptów w ciałach jądrowych [77] co skutkuje powstawaniem mniejszej ilości kolagenu. Zaburzenia wycinania intronów dotyczą również apolipoproteiny E (APOE), która jest zaangażowana w transport lipidów oraz naprawę uszkodzeń synaps. APOE jest głównym genem podatności na chorobę Alzheimera i innych chorób neurodegeneracyjnych. W prawidłowych neuronach hipokampu dochodzi do niewycięcia intronu 3 i zmniejszenia ilości białka APOE [78], zaś w neuronach ulegających degradacji zachodzi poprawne wycinanie intronu i zwiększenie ilości APOE [78]. Dalsze badania nad zjawiskiem retencji i czynników ją wywołujących ma na celu dokładne poznanie tego zjawiska ale również umożliwienie opracowania metod, które będą pomocne w terapii tych schorzeń.

9. Podsumowanie

Retencja mRNA na terenie jądra komórkowego jest nowo poznany post-transkrypcyjnym mechanizmem regulacji ekspresji genów. Związana jest z czasową regulacją syntezy białek. Proces zatrzymania mRNA w jądrze komórkowym dotyczy wszystkich organizmów eukariotycznych i jest zaangażowany w przebieg wiele procesów. Dotychczasowe badania wskazują na udział retencji mRNA w spermatogenezie roślin i zwierząt. Niestety zatrzymanie transkryptów w jądrze komórkowym

związane jest również z chorobami człowieka. Zrozumienie tego zjawiska pozwoliłoby na opracowanie metod zapobiegania i leczenia chorób spowodowanym retencją mRNA. Dlatego dokładne poznanie mechanizmów odpowiedzialnych zarówno za zatrzymanie transkryptów jak i ich późniejsze uwolnienie jest tak istotne.

Literatura

1. Müller-McNicoll M., Neugebauer K.M., *How cells get the message: dynamic assembly and function of mRNA-protein complexes*, Nat. Rev. Genet. 14 (4)(2013) s. 275-287.
2. Bieberstein N.I., Carrillo Oesterreich F., Straube K., Neugebauer K.M., *First exon length controls active chromatin signatures and transcription*, CellRep. 2 (1) (2012) s. 62-68.
3. Martinson H.G., *An active role for splicing in 3' end formation*, WileyInterdiscip. Rev. RNA 2 (4) (2011), s. 459-470.
4. Movassat M., Crabb T.L., Busch A., Yao C., Reynolds D.J., Shi Y., Hertel K.J., *Coupling between alternative polyadenylation and alternative splicing is limited to terminal introns*, RNA Biol. 13 (7) (2016) s. 646-655.
5. Anamika K., Gyenis A., Tora L., *How to stop: the mysterious links among RNA polymerase II occupancy 3' of genes, mRNA 3' processing and termination*, Transcription 4 (1) (2013), s. 7-12.
6. Martins S.B., Rino J., Carvalho T., Carvalho C., Yoshida M., Klose J.M., deAlmeida S.F., Carmo-Fonseca M., *Spliceosome assembly is coupled to RNA polymerase II dynamics at the 3' end of human genes*, Nat. Struct. Mol. Biol. 18 (10) (2011), s. 1115-1123.
7. Müller-McNicoll M., Botti V., de Jesus Domingues A.M., Brandl H., Schwich O.D., Steiner M.C., Curk T., Poser I., Zarnack K., Neugebauer K.M., *SR proteins are NXF1 adaptors that link alternative RNA processing to mRNA export*, Genes Dev. 30 (5) (2016), s. 553-566.
8. Gallego-Paez L.M., Bordone M.C., Leote A.C., Saraiva-Agostinho N., Ascensao-Ferreira M., Barbosa-Morais N.L., *Alternative splicing: the pledge, the turn, and the prestige: the key role of alternative splicing in human biological systems*, Hum. Genet. 136 (9) (2017), s. 1015-1042.
9. Eberle A.B., Visa N., *Quality control of mRNP biogenesis: networking at the transcription site*, Semin. Cell Dev. Biol. 32 (2014), s.37-46.
10. Bjork P., Wieslander L., *Integration of mRNP formation and export*, Cell. Mol. Life Sci. 74 (16) (2017), s. 2875-2897.
11. Galy V., Gadal O., Fromont-Racine M., Romano A., Jacquier A., Nehrbass U., *Nuclear retention of unspliced mRNAs in yeast is mediated by perinuclear Mlp1*, Cell 116 (1) (2004), s. 63-73.
12. Palancade B., Zuccolo M., Loeillet S., Nicolas A., Doye V., *Pml39 a novel protein of the nuclear periphery required for nuclear retention of improper messenger ribonucleoparticles*, Mol. Biol. Cell 16 (11) (2005), s. 5258-5268.
13. Tutucci E., Stutz F., *Keeping mRNPs in check during assembly and nuclear export*, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 12 (6) (2011), s. 377-384.
14. Carvalho T., Martins S., Rino J., Marinho S., Carmo-Fonseca M., *Pharmacological inhibition of the spliceosome subunit SF3b triggers exon junction complex-independent nonsense-mediated decay*, J. Cell Sci. 130 (9)(2017), s.1519-1531.
15. Kurosaki T., Maquat L.E., *Nonsense-mediated mRNA decay in humans at a glance*, J. Cell Sci. 129 (3) (2016), s. 461-467.
16. Filip A., *MikroRNA: nowe mechanizmy regulacji ekspresji genów*, Postępy Biochemii 53 (4) (2007), s. 413-419.

17. Majorek K., Krzyżosiak W.J., *Rola mikroRNA w patogenezie, diagnostyce i terapii nowotworów*, Współczesna Onkologia vol. 10; 8, (2006), s. 359-366.
18. Szweykowska-Kulińska Z., Szarzyńska B., *Nagroda Nobla 2006 za fundamentalne odkrycia w regulacji genów eukariontów*, Postępy Biologii Komórki, tom 34 nr 1 (2007), s. 3-13.
19. Hukowska-Szematowicz B., Deptuła W., *Biologiczna rola mikroRNA (miRNA) nowe dane*, Postępy Biologii Komórki tom 37 nr 3, (2010), s. 585-597.
20. Prasanth K.V., Prasanth S.G., Xuan Z., Hearn S., Freier S.M., Bennett C.F., Zhang M.Q., Spector D.L., *Regulating gene expression through RNA nuclear retention*, Cell 123 (2) (2005), s. 249-263.
21. Shalgi R., Hurt J.A., Lindquist S., Burge C.B., *Widespread inhibition of posttranscriptional splicing shapes the cellular transcriptome following heat shock*, Cell Rep. 7 (5) (2014), s. 1362-1370.
22. Chen L.L., Carmichael G.G., *Altered nuclear retention of mRNAs containing inverted repeats in human embryonic stem cells: functional role of a nuclear noncoding RNA*, Mol. Cell 35 (4) (2009) s.467-478.
23. Sakurai M., Shiromoto Y., Ota H., Song C., Kossenkov A.V., Wickramasinghe J., Showe L.C., Skordalakes E., Tang H.Y., Speicher D.W., Nishikura K., *ADAR1 controls apoptosis of stressed cells by inhibiting Staufen1-mediated mRNA decay*, Nat. Struct. Mol. Biol. 24 (6) (2017), s. 534-543.
24. Naro CH., Jolly A., Di Persio S., Bielli S., Setterblad N., Alberdi A.J., Vicini E., Geremia R., De la Grange P., Sette C., *An Orchestrated Intron Retention Program in Meiosis Controls Timely Usage of Transcripts during Germ Cell Differentiation*, Dev Cell. 2017 Apr 10; 41(1), s. 82-93.e4.
25. Kołowerzo-Lubnau A., Niedojadło J., Świdziński M., Bednarska-Kozakiewicz E., Smoliński D.J., *Transcriptional activity in diplotene larch microsporocytes, with emphasis on the diffuse stage*, PLoS ONE 10(2) (2015) e0117337 doi: 10.1371/journal.pone.0117337
26. Bergeron D., G. Pal, Y.B. Beaulieu, B. Chabot, F. Bachand, *Regulated intron retention and nuclear pre-mRNA decay contribute to PABPN1 autoregulation*, Mol. Cell. Biol. 35 (14) (2015), s. 2503-2517.
27. Dias A.P., Dufu K., Lei H., Reed R., *A role for TREX components in the release of spliced mRNA from nuclear speckle domains*, Nat. Commun. 1 (2010) 97.
28. Hedley M.L., Amrein H., Maniatis T., *An amino acid sequence motif sufficient for subnuclear localization of an arginine/serine-rich splicing factor*, Proc.Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92 (25) (1995), s. 11524-11528.
29. Girard C., Will C.L., Peng J., Makarov E.M., Kastner B., Lemm I., Urlaub H., Hartmuth K., Luhrmann R., *Post-transcriptional spliceosomes are retained in nuclear speckles until splicing completion*, Nat. Commun. 3 (2012), s. 994.
30. Lai M.C., Tarn W.Y., *Hypophosphorylated ASF/SF2 binds TAP and is present in messenger ribonucleoproteins*, J. Biol. Chem. 279 (30) (2004), s. 31745-31749.
31. Vargas D.Y., Shah K., Batish M., Levandoski M., Sinha S., Marras S.A., Schedl P., Tyagi S., *Single-molecule imaging of transcriptionally coupled and uncoupled splicing*, Cell 147 (5) (2011), s. 1054-1065.
32. Nishikura K., *A-to-I editing of coding and non-coding RNAs by ADARs*, Nat.Rev. Mol. Cell Biol. 17 (2) (2016), s. 83-96.
33. Chen L.L., Carmichael G.G., *Altered nuclear retention of mRNAs containing inverted repeats in human embryonic stem cells: functional role of a nuclear noncoding RNA*, Mol. Cell 35 (4) (2009), s. 467-478.
34. Soheilypour M., Mofrad M.R., *Regulation of RNA-binding proteins affinity to export receptors enables the nuclear basket proteins to distinguish and retain aberrant mRNAs*, Sci. Rep. 6 (2016), s. 35380.

35. Cohen H.R., Panning B., *XIST RNA exhibits nuclear retention and exhibits reduced association with the export factor TAP/NXF1*, *Chromosoma* 116 (4)(2007), s. 373-383.
36. Botti V., McNicoll F., Steiner M.C., Richter F.M., Solovyeva A., Wegener M., Schwich O.D., Poser I., Zarnack K., Wittig I., Neugebauer K.M., Müller-McNicoll M., *Cellular differentiation state modulates the mRNA export activity of SR proteins*, *J. Cell Biol.* 216 (7) (2017), s. 1993-2009.
37. Huang Y., Steitz J.A., *SR prides along a messenger's journey*, *Mol. Cell* 17 (5)(2005), s. 613-615.
38. Jacob A.G., Smith C.W., *Intron retention as a component of regulated gene expression programs*, *Hum. Genet.* 136 (9) (2017), s. 1043-1057.
39. Brugiolo M., Herzel L., Neugebauer K.M., *Counting on co-transcriptional splicing*, *F1000Prime Rep.* 5 (2013) 9.
40. Vanichkina D.P., Schmitz U., Wong J.J.L., Rasko J.E.J., *Challenges in defining the role of intron retention in normal biology and disease*, *Seminars in Cell & Developmental Biology* Vol 75, (2018), s. 40-49.
41. Fuke H., Ohno M., *Role of poly (A) tail as an identity element for mRNA nuclear export*, *Nucleic Acids Res.* 36 (3) (2008), s. 1037-1049.
42. Kumar G.R., Glaunsinger B.A., *Nuclear import of cytoplasmic poly(A) binding protein restricts gene expression via hyperadenylation and nuclear retention of mRNA*, *Mol. Cell. Biol.* 30 (21) (2010), s. 4996-5008.
43. Mauger O., Lemoine F., Scheifflele P., *Targeted intron retention and excision for rapid gene regulation in response to neuronal activity*, *Neuron* 92 (6)(2016), s.1266-1278.
44. Solnestam B.W., Stranneheim H., Hallman J., Kaller M., Lundberg E., Lundeberg J., Akan P., *Comparison of total and cytoplasmic mRNA reveals global regulation by nuclear retention and miRNAs*, *BMC Genom.* 13 (2012), s. 574.
45. Lee E.S., Akef A., Mahadevan K., Palazzo A.F., *The consensus 5'splice site motif inhibits mRNA nuclear export*, *PLoS One* 10 (3) (2015).
46. Zhang B., Gunawardane L., Niazi F., Jahanbani F., Chen X., Valadkhan S., *A novel RNA motif mediates the strict nuclear localization of a long noncoding RNA*, *Mol. Cell. Biol.* 34 (12) (2014), s. 2318-2329.
47. Roy D., Bhanja Chowdhury J., Ghosh S., *Polypyrimidine tract binding protein (PTB) associates with intronic and exonic domains to squelch nuclear export of unspliced RNA*, *FEBS Lett.* 587 (23) (2013), s. 3802-3807.
48. Schmid M., Jensen TH. *Quality control of mRNP in the nucleus*. *Chromosoma* 2008; 117, s. 419-29.
49. Boutz P.L., Bhutkar A., Sharp P.A., *Detained introns are a novel, widespread class of post-transcriptionally spliced introns*, *Genes Dev.* 29 (1) (2015), s. 63-80.
50. Girard C., Will C.L., Peng J., Makarov E.M., Kastner B., Lemm I., Urlaub H., Hartmuth K., Luhrmann R., *Post-transcriptional spliceosomes are retained in nuclear speckles until splicing completion*, *Nat. Commun.* 3 (2012), s. 994.
51. Wickramasinghe V.O., Laskey R.A., *Control of mammalian gene expression by selective mRNA export*, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16 (7) (2015), s. 431-442.
52. Okada M., Jang S.W., Ye K., *Akt phosphorylation and nuclear phosphoinositide association mediate mRNA export and cell proliferation activities by ALY*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (25) (2008), s. 8649-8654.
53. Wickramasinghe V.O., Savill J.M., Chavali S., Jonsdottir A.B., Rajendra E., Gruner T., Laskey R.A., Babu M.M., Venkitaraman A.R., *Human inositol polyphosphate multikinase regulates transcript-selective nuclear mRNA export to preserve genome integrity*, *Mol. Cell* 51 (6) (2013), s. 737-750.
54. Li Y., Bor Y.C., Misawa Y., Xue Y., Rekosh D., Hammarskjöld M.L., *An intron with a constitutive transport element is retained in a tap messenger RNA*, *Nature* 443 (7108) (2006), s. 234-237.

55. Brugiolo M., Botti V., Liu N., Müller-McNicoll M., Neugebauer K.M., *Fractionation iCLIP detects persistent SR protein binding to conserved, retained introns in chromatin, nucleoplasm and cytoplasm*, *Nucleic Acids Res.* 45 (18) (2017) s.10452–10465.
56. Brady L.K., Wang H., Radens C.M., Bi Y., Radovich M., Maity A., Ivan C., Ivan M., Barash Y., Koumenis C., *Transcriptome analysis of hypoxic cancer cells uncovers intron retention in EIF2B5 as a mechanism to inhibit translation*, *PLoS Biol.* 15 (9) (2017).
57. Li Y., Bor Y.C., Fitzgerald M.P., Lee K.S., Rekosh D., Hammarskjöld M.L., *An NXF1 mRNA with a retained intron is expressed in hippocampal and neocortical neurons and is translated into a protein that functions as an NXF1 cofactor*, *Mol. Biol. Cell* 27 (24) (2016), s. 3903-3912.
58. Prasanth K.V., Prasanth S.G., Xuan Z., Hearn S., Freier S.M., Bennett C.F., Zhang M.Q., Spector D.L., *Regulating gene expression through RNA nuclear retention*, *Cell* 123 (2) (2005), s. 249-263.
59. Neve J., Burger K., Li W., Hoque M., Patel R., Tian B., Gullerova M., Furger A., *Subcellular RNA profiling links splicing and nuclear DICER1 to alternative cleavage and polyadenylation*, *Genome Res.* 26 (1) (2016), s. 24-35.
60. Mukherjee N., Calviello L., Hirsekorn A., de Pretis S., Pelizzola M., Ohler U., *Integrative classification of human coding and noncoding genes through RNA metabolism profiles*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24 (1) (2017), s. 86-96.
61. de Almeida S.F., Garcia-Sacristan A., Custodio N., Carmo-Fonseca M., *A link between nuclear RNA surveillance, the human exosome and RNA polymerase II transcriptional termination*, *Nucleic Acids Res.* 38 (22) (2010), s. 8015-8026.
62. Hett A., West S., *Inhibition of U4 snRNA in human cells causes the stable retention of polyadenylated pre-mRNA in the nucleus*, *PLoS One* 9 (5) (2014).
63. Saguez C., Schmid M., Olesen J.R., Ghazy M.A., Qu X., Poulsen M.B., Nasser T., Moore C., Jensen T.H., *Nuclear mRNA surveillance in THO/sub2 mutants is triggered by inefficient polyadenylation*, *Mol. Cell* 31 (1) (2008), s. 91-103.
64. Mao Y.S., Zhang B., Spector D.L., *Biogenesis and function of nuclear bodies*, *Trends in Genetics*, August 2011, Vol. 27, No. 8.
65. Courchaine E. M., Lu A., Neugebauer K. M., *Droplet organelles?*, *The EMBO Journal* Vol 35, No 15, (2016).
66. Dundr M., Misteli T., *Biogenesis of Nuclear Bodies*, *Cold Spring Harb Perspect Biol* (2010).
67. Nunes V. S., Moretti N.S., *Nuclear subcompartments: an overview*, *Cell Biol Int* 41 (2017).
68. Ner-Gaon H., Halachmi R., Savaldi-Goldstein S., Rubin E., Ophir R., Fluhr R. *Intron retention is a major phenomenon in alternative splicing in Arabidopsis*, *Plant J.* 39 (2004), s. 877-885.
69. Marquez Y., Brown J.W., Simpson C., Barta A., Kalyna M. *Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in Arabidopsis*. *Genome Res.* 22 (2012), s.1184-1195.
70. Clark F., Thanaraj T.A. *Categorization and characterization of transcript-confirmed constitutively and alternatively spliced introns and exons from human*, *Hum. Mol. Genet.* 11 (2002), s. 451-464.
71. Boothby T. C., Zipper R. S., van der Weele C. M., Wolniak S. M., *Removal of retained introns regulates translation in the rapidly developing gametophyte of Marsilea vestita*, *Developmental Cell* 24 (2013), s. 517-529
72. Kendirgi F., Rexer D.J., Alcazar-Roman A.R, Onishko H.M., Wente S.R., *Interaction between the shuttling mRNA export factor Gle1 and the nucleoporin hCG1: a conserved mechanism in the export of Hsp70 mRNA*, *Mol. Biol. Cell* 16 (9) (2005) s. 4304-4315.
73. Rayala H.J., Kendirgi F., Barry D.M., Majerus P.W., Wente S.R., *The mRNA export factor human Gle1 interacts with the nuclear pore complex protein Nup155*, *Mol. Cell. Proteom.* 3 (2) (2004), s. 145-155.

74. Nousiainen H.O., Kestila M., Pakkasjarvi N., Honkala H., Kuure S., Tallila J., Vuopala K., Ignatius J., Herva R., Peltonen L., *Mutations in mRNA export mediator GLE1 result in a fetal motoneuron disease*, Nat. Genet. 40 (2)(2008) s. 155-157.
75. Bjork P., Wieslander L., *Integration of mRNP formation and export*, Cell. Mol. Life Sci. 74 (16) (2017), s. 2875-2897.
76. Lee E.S., Akef A., Mahadevan K., Palazzo A.F., *The consensus 5' splice sitemotif inhibits mRNA nuclear export*, PLoS One 10 (3) (2015).
77. Johnson C., Primorac D., McKinstry M., McNeil J., Rowe D., Lawrence J.B., *Tracking COL1A1 RNA in osteogenesis imperfecta. splice-defective transcripts initiate transport from the gene but are retained within the SC35domain*, J. Cell Biol. 150 (3) (2000), s. 417-432.
78. Xu Q., Walker D., Bernardo A., Brodbeck J., Balestra M.E., Huang Y., *Intron-3retention/splicing controls neuronal expression of apolipoprotein E in the CNS*, J. Neurosci. 28 (6) (2008), s. 1452-1459.

Retencja mRNA na terenie jądra – nowy element w regulacji ekspresji genów

Streszczenie

Jądrowa retencja transkryptów jest zjawiskiem obserwowanym zarówno w komórkach zwierzęcych jak i roślinnych. Do tej pory udało się ustalić przypuszczalne mechanizmy prowadzące do wstrzymywania na terenie jądra transkryptów zarówno dojrzałych jak i niedojrzałych. Drogi prowadzące do retencji różnią się między sobą w zależności od tego w obrębie jakich domen końcowo obserwujemy zakotwiczenie retencyjnych mRNA. Transkrypty te mogą ulegać degradacji, bądź też mogą być stabilnie zatrzymywane w obrębie jądrowych domen po to by w ściśle określonym momencie ulec potranskrypcyjnym modyfikacjom mającym na celu uwolnienie dojrzałego mRNA i jego eksport na teren cytoplazmy. Taka jądrowa retencja może być powodowana obecnością specyficznych elementów cis w obrębie transkryptu bądź też wpływem elementów trans wiążących się do transkryptu i uniemożliwiających przyłączenie czynników eksportujących. Zjawisko to wskazuje na nieznaną do tej pory rolę jądra komórkowego w regulacji ekspresji genów. Dokładniejsze poznanie mechanizmów rządzących wstrzymywaniem ściśle określonych transkryptów na terenie jądra może przyczynić się do opracowania efektywniejszych metod terapii schorzeń, których podłoże dotyczy właśnie retencji mRNA.

Słowa kluczowe: jądrowa retencja, kontrola jakości, post-transkrypcyjny splicing, selektywny eksport mRNA.

mRNA retention in the nucleus – a new element in the regulation of gene expression

Abstract

Nuclear retention of transcripts is a phenomenon observed in animal and plant cells. So far it has been possible retention mechanism of transcripts in the nucleus. Transcripts undergoing retention are mature or immature. Roads leading to retention differ depending on the domain within which the final retention mRNAs are observed. These transcripts may be degraded or they may be stably retained within nuclear domains in order to undergo specific post-transcriptional modifications to release mature mRNA and export it to the cytoplasm. Such nuclear retention may be due to the presence of specific cis elements within the transcript or the effect of trans elements that bind to the transcript and prevent the attachment of export factors. This phenomenon indicates the previously unknown role of the cell nucleus in the regulation of gene expression. A more accurate understanding of the mechanisms governing the suspension of well-defined transcripts in the nucleus may contribute to the development of more effective methods of therapy of diseases, the basis of which is the mRNA retention.

Keywords: nuclear retention, quality control, post-transcriptional splicing, selective mRNA transport.

Etapy dojrzewania małych, jądrowych RNA – snRNA

1. Wstęp

W komórkach w procesie transkrypcji powstaje pierwotny transkrypt pre-mRNA, który zawiera sekwencje egzonowe i intronowe. Aby mógł stać się funkcjonalnym mRNA musi przejść między innymi przez proces splicingu, polegający na wycięciu intronów i połączeniu egzonów. W proces ten zaangażowane są małe cząsteczki RNA oraz wiele białek, które tworzą strukturę zwaną spliceosomem. Jednymi z najważniejszych czynników biorących udział w procesie splicingu są UsnRNP [1, 2].

W budowie intronu wyróżniamy miejsce splicingowe 5' wyznaczone przez nukleotydy GU pierwszego egzonu i intronu, miejsce rozgałęzienia intronu, trakt polipirymidynowy oraz miejsce splicingowe 3' wyznaczone przez AG intronu oraz drugiego egzonu. Pierwszym etapem formowania spliceosomu jest przyłączenie się U1snRNP do miejsca splicingowego 5'. U1 snRNA posiada wysoce konserwowaną sekwencję nukleotydów, która tworzy wiązanie wodorowe z miejscem splicingowym 5' [1]. Jednocześnie do miejsca rozgałęzienia intronu przyłączają się czynniki SF1 oraz BBP, a do traktu polipirymidynowego przyłącza się U2AF, który łączy się jednocześnie z miejscem splicingowym 3'. Następnym etapem jest asocjacja U2snRNP do miejsca rozgałęzienia intronu, co wymaga hydrolizy ATP i powoduje przestrzenną zmianę konformacji intronu (wygięcie). Daje to możliwość przyłączenia się innych białek, czynników. W tym momencie do spliceosomu dołącza się kompleks U4/U6-U5 snRNP, co również wymaga energii z ATP i następuje zbliżenie miejsca splicingowego 3' do miejsca splicingowego 5'-formowanie struktury lassa. Dalej następuje oddysocjowanie U1 i U4 snRNP i tworzy się aktywny spliceosom, pobudzona zostaje aktywność katalityczna U2 i U6 snRNP. U4 snRNP jest inhibitorem U6 snRNP. W wyniku tego zachodzi I reakcja transestryfikacji, a mianowicie atak aktywnej adeniny, znajdującej się w miejscu rozgałęzienia intronu, na miejsce splicingowe 5', następuje rozwiązanie wiązania fosfodiesterowego nukleotydu G egzonu i U intronu i powstanie wiązania pierwszego nukleotydu G intronu z adeniną. Po tym zachodzi II reakcja transestryfikacji: atak wolnej grupy OH końca 3' pierwszego egzonu na miejsce splicingowe 3' – pierwszy nukleotyd kolejnego egzonu, następuje cięcie i uwolnienie lassa oraz połączenie się egzonów. Po uwolnieniu intronu zachodzi demontaż spliceosomu.

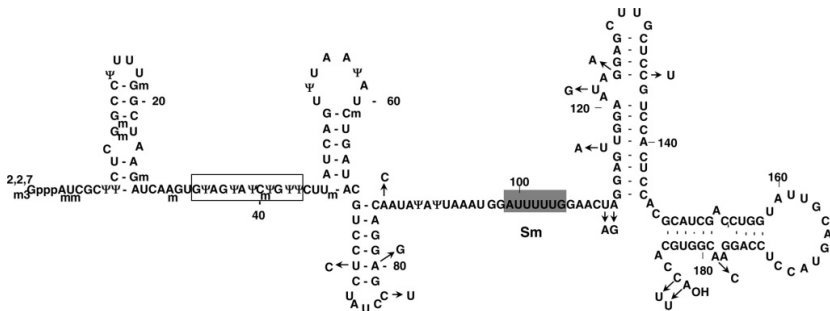
2. SnRNP – funkcja, budowa, droga dojrzewania

W procesie splicingu bierze udział kilka rodzajów cząsteczek snRNP, które przyłączają się do mRNA w odpowiedniej kolejności wybierając tym samym miejsce cięcia i składania w nowo powstałym pre-mRNA [3]. Dodatkowo są katalizatorami reakcji splicingu [4].

¹ magdakuradczyk@wp.pl, Katedra Biologii Komórkowej i Molekularnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, <https://www.biol.umk.pl/>

SnRNP to spliceosomalne, małe, jądrowe, rybonukleoproteinowe cząsteczki, które składają się z małych RNA (snRNA), zawierających 60-450nt, heptamerycznego pierścienia białek Sm lub LSm (Like-Sm), a także od 1 do 12 białek, charakterystycznych dla każdego snRNA oraz prawie 200 innych białek budujących spliceosom bądź białek fakultatywnych towarzyszących procesowi splicingu [5]. SnRNP występują głównie w nukleoplazmie [6].

Jedną z cząsteczek snRNP, tworzącą spliceosom jest U2snRNP. SnRNA, tworzące cząsteczkę U2snRNP składa się z 5 struktur typu spinka do włosów oraz regionów jednoniciowych (rys.1). Na końcu 5' znajduje się czapeczka TMG, w środkowej części cząsteczki, w rejonie jednoniciowym występuje sekwencja AUUUUUG służąca do połączenia z pierścieniem białek Sm, tworząc rdzeń cząsteczki snRNP. Za pierwszą strukturą typu spinka do włosów od końca 5' U2 snRNA, w rejonie jednoniciowym występuje sekwencja komplementarna do miejsca rozgałęzienia intronu na mRNA [7].



Rysunek 1. Pierwszo i drugorzędowa struktura U2snRNA występującego u człowieka oraz *Xenopus*.

Zaznaczono tu nukleotydy ulegające metylacji (m) oraz pseudourydylacji (Ψ). Szarym prostokątem oznaczono sekwencję wiążącą białka Sm, natomiast jasny prostokąt przedstawia sekwencję komplementarną do miejsca rozgałęzienia intronu. Strzałkami zaznaczono nukleotydy różniące się u *Xenopus* [7]

Dojrzała cząsteczka U2 snRNP posiada U2 snRNA, do którego przyłączają się różne białka. W domenie rdzeniowej U2 snRNP występuje pierścień białek Sm, w okolicy końca 3' znajdują się białka U2A i U2B", natomiast w okolicy 5' i części rdzeniowej U2 snRNP występują czynniki splicingowe SF3a i SF3b [8].

W zależności od funkcji oraz lokalizacji wyróżniamy 5 głównych-spliceosomowych snRNP oraz cztery rodzaje snRNP występujące w komórce w mniejszej ilości. Nazwa każdej cząsteczki zależy od rodzaju związanego z nią snRNA. Do głównych snRNP zaliczamy: U1, U2, U4, U5 i U6 snRNP, a do tych, które występują w komórce w mniejszej ilości: U11, U12, U4atac, i U6atac snRNP [9].

2.1. Biogeneza snRNP

Biogeneza snRNP to złożony proces, który zazwyczaj obejmuje 4 etapy:

1. Synteza dużego pre-snRNA.
2. Procesy przycinania pre-snRNA do długości dojrzałego sarna.
3. Modyfikacje poszczególnych nukleotydów sarna.
4. Łączenie snRNA ze specyficznymi białkami.

Jednakże różne snRNP przechodzą przez różne drogi biogenezy [6].

2.2. Transkrypcja snRNA

Spliceosomowe snRNA (z wyjątkiem U6 snRNA) są transkrybowane przez Polimerazę RNA II. Geny snRNA posiadają promotory „TATA-less” – bez kasety TATA, zawierające sekwencję PSE - rekrutującą specyficzne dla snRNA czynniki transkrypcyjne, niezbędne do inicjacji transkrypcji oraz sekwencję DSE. W odróżnieniu od mRNA, snRNA nie posiadają sygnału dla poliadenylacji, w tym miejscu zaś występuje konserwowany 3'-box, umiejscowiony za regionem kodującym. Element ten bierze udział w post-transkrypcyjnych modyfikacjach pre-snRNA [10]. Jednakże, do powstałych transkryptów pre-snRNA zostaje dołączona czapeczka monometyloguanozynowa (7mGpppG) [6]. Metylacja pierwszego nukleotydu zachodzi ko-transkrypcyjnie po zsyntetyzowaniu pierwszych 20 nukleotydów, przez kompleks enzymów związanych z ufosforylowaną Seryną 5 domeny CTD Polimerazy RNA II [11].

Transkrypcja genów przez Polimerazę RNA II obejmuje montaż kompleksu pre-inicjacyjnego, inicjację transkrypcji, elongację oraz terminację transkrypcji. Główną rolę w tych procesach odgrywa domena C-końcowa CTD dużej podjednostki polimerazy RNA II, która służy do rekrutacji i interakcji z różnymi czynnikami biorącymi udział w transkrypcji. Domena CTD obejmuje powtórzenia tandemowe sekwencji heptapeptydowej Tyr1-Ser2-Pro3-Thr4-Ser5-Pro6-Ser7. Podczas transkrypcji, rekrutacja czynników przez domenę CTD jest ściśle związana z pozycją Polimerazy wzdłuż genu snRNA i fosforylacji specyficznych reszt Seryny [10].

Fosforylacja Seryny 5 zachodzi podczas inicjacji transkrypcji przy udziale CDK7 (ssaki), będącej składnikiem czynnika transkrypcyjnego TFIIH [12]. Proces ten powoduje rekrutację i aktywację enzymu odpowiedzialnego za syntezę czapeczki monometyloguanozynowej na końcu 5' nowo syntetyzowanych snRNA [13], co chroni transkrypty przed działaniem egzonukleaz. Seryna 2 jest fosforylowana podczas elongacji transkrypcji oraz rekrutuje czynniki niezbędne do kotranskrypcyjnego przetwarzania końca 3' [14].

Fosforylacja Seryny 7 jest szczególnie istotna dla transkrypcji snRNA. Wykazuje, że zamiana Seryny 7 na alaninę w domenie CTD Polimerazy RNA II znacząco wpływa na poziom transkrypcji genów U1 i U2 snRNA, a także zmniejsza efektywność reakcji przetwarzania końca 3'. Proponuje się, że fosforylacja Seryny 7 przez Cdk7 inicjuje kaskadę reakcji prowadzącą do wydajnej ekspresji genu snRNA. Bierze ona zatem udział w inicjacji transkrypcji sarna [15].

Terminację transkrypcji snRNA powoduje przycięcie końca 3' transkryptu. W tym miejscu znajduje się box 3', za którym następuje cięcie i tym samym terminacja transkrypcji. [6] Proces ten stymulowany jest przez białko Ars2, które odpowiada także za wiązanie PHAX do CBC, białek biorących udział w eksporcie pre-snRNA na teren cytoplazmy [11].

2.2.1. Post-transkrypcyjne etapy dojrzewania pre-snRNA

Pierwszy etap procesu dojrzewania to dalsze przycinanie końca 3', a mianowicie cięcie w kierunku upstream od boxa 3', co pozostawia ogon zbudowany z kilku nukleotydów. Po transkrypcji i przetworzeniu końca 3', częściowo zmodyfikowane snRNA są transportowane do cytoplazmy [5].

Aby doszło do eksportu cząsteczki do cytoplazmy poprzez kompleks porowy NPC, musi zawiązać się układ związków umożliwiający eksport. Należą do niego:

- kompleks CBC (*cap-binding complex*) połączony z czapeczką;
- PHAX – którego fosforylacja powoduje zawiązanie kompleksu eksportowego i transport snRNA do cytoplazmy;
- kompleks CRM1/RanGTP [16].

Dodatkowo NONO i SFPQ (PSF) promują połączenie PHAX z snRNA [17].

Na terenie cytoplazmy następuje defosforylacja PHAX i hydroliza RanGTP, co indukuje rozpad kompleksu służącego do eksportu snRNA [16].

W cytoplazmie wokół sekwencji AUUUUUG dla białek Sm zostaje wmontowany heptameryczny pierścień zbudowany z 7 białek Sm powodując powstanie rdzenia snRNP. Montaż białek Sm jest promowany i kontrolowany przez kompleksy PRMT5 (dimetylaza białek Sm) i kompleks białkowy SMN. [5]. Przyłączenie białek Sm jest warunkiem do hipermetylacji czapeczki 7mG przez metylotransferazę TGS1 do 2,2,7-trimetyloguanozyny (TMG) oraz do przycięcia końca 3' [6]. Jednakże, lokalizacja ostatecznego etapu cięcia nie jest ustalona.

Trimetyloguanozynowa czapeczka, razem z pierścieniem białek Sm, służą jako sygnały dla importu do jądra [5]. Do tego procesu potrzebne są białka:

- Snurportin-1 (SPN1) – łączy się z trimetyloguanozynową czapeczką;
- importyna- β połączona z Snuportin-1;
- Sm IR – receptor wchodzący w interakcję z pierścieniem Sm [18].

Wiadomo również, że kompleks SMN współdziała w cytoplazmie z rdzeniem snRNP i importyną- β , przez co wnioskuje się, że kompleks SMN jest zaangażowany w import jądrowy pre-snRNP [19]. Po powrocie do jądra białka importujące oddysocjują, a nowe snRNP akumulują się w ciałach Cajala [20]. Po powtórnym imporcie kilka nukleotydów snRNA ulega 2'-O-metylacji i pseudourydylacji przez scaRNP, które jest zgromadzone w ciałach Cajala [21].

Oprócz białek rdzeniowych Sm, dojrzałe U1, U2, U4 i U5 snRNP zawierają również białka specyficzne dla danego rodzaju RNP [6]. W dotychczasowej literaturze występuje mało informacji na temat ostatniego etapu biogenezy snRNP – dodania specyficznych białek. Jednakże, kilka badań wskazuje, że dodanie specyficznych białek następuje po imporcie rdzenia snRNP do jądra, ponieważ białka specyficzne dla snRNP koncentrują się w ciałach Cajala. Uważa się więc, że cząsteczki te są związane z rdzeniem snRNP właśnie w ciałach Cajala [5].

Na koniec cyklu dojrzewania dojrzałe spliceosomalne snRNP gromadzą się w regionie międzychromatynowym w strukturach zwanych speckles. Zwykle struktury te zlokalizowane są w pobliżu aktywnie transkrybowanych genów. Prawdopodobnie zapewniają miejsce przechowywania snRNP lub pełnią funkcje ich recyklingu [22].

2.3. Biogeneza U6 snRNP

Uważa się, że U6 snRNP odgrywa główną rolę podczas katalitycznej reakcji splicingu, jest najsilniej konserwowanym spliceosomalnym RNP [23]. U6 snRNP przechodzi przez inny szlak biogenezy niż pozostałe spliceosomalne snRNP. U6snRNA jest syntetyzowane przez Polimerazę RNA III i jego cykl dojrzewania oraz miejsce pełnienia funkcji zamyka się w jądrze komórkowym. [6]. Sygnałem terminacji

transkrypcji jest pojawienie się U-odcinka – bogatego w urydynę. Nowe transkrypty U6 zawierają wydłużony ogon urydyn, który jest dodatkowo syntetyzowany przez TUTase – terminalną urydyno transferazę – TUT1 [23].

Podobnie jak inne transkrypty Polimerazy RNA III, koniec 3' U6 snRNA jest związany z białkiem La które chroni RNA przed degradacją oraz ułatwia jego dalsze dojrzewanie [24]. Koniec 5' U6 snRNA zawiera czapkę γ -monometylową, a koniec 3' jest zabezpieczony przez cykliczny 2'-3' fosforan który jest utworzony przez białko USB1 [25]. Tworzenie cyklicznego fosforanu na końcu 3' destabilizuje wiązanie La i ułatwia połączenie LSm2-8 z U6 snRNA [26].

Dojrzałe U6 snRNA łączy się z pierścieniem siedmiu białek LSM 2-8 (LSm2, LSm3, LSm4, LSm5, LSm6, LSm7, LSm8) [27]. Pierścień LSm2-8 jest wstępnie zmontowany bez RNA w cytoplazmie [28].

Dalej U6 snRNA również ulega 2'-O-metylacji oraz pseudourydylacji, jednakże w odróżnieniu od Sm-snRNA, które modyfikowane są przez scaRNP w ciałach Cajala, metylacja i pseudourydylacja U6 snRNA zachodzi przy udziale snoRNP, które znajduje się w jąderku [6]. To wskazuje, że w czasie dojrzewania U6 snRNA przechodzą przez jąderko w celu modyfikacji przez snoRNP. Połączenie białek LSm jest sygnałem do transportu cząsteczki do jąderka [29]. Pre-U6snRNP dalej współdziała z SART3, które kieruje je do ciała Cajala i wraz z białkami LSm promuje tworzenie kompleksu U4/U6 [27].

Zakończenie biogenezy snRNP skutkuje utworzeniem kompleksów U4/U6 i U4/U6•U5. Na początku U4 i U6 snRNA są łączone przez działanie SART3 i białek LSm 2-8. Po utworzeniu dimeru U6/U4, dodane zostają białka specyficzne dla U4/U6. Następnie U4/U6 łączy się z U5 tworząc dojrzałe tri-snRNP [5].

3. ScaRNP

Z uwagi na lokalizację tych RNP w ciałach Cajala, nazywamy je scaRNP (small CB-specific RNP) [30].

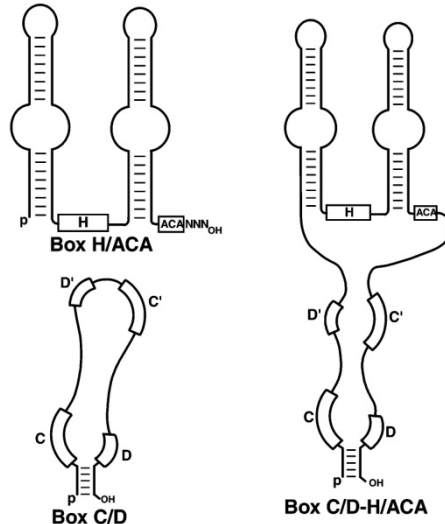
3.1. Charakterystyka scaRNP

SnRNA przechodzą potranskrypcyjne modyfikacje polegające na 2'-O-metylacji oraz pseudourydylacji [6]. Za przeprowadzenie tych procesów modyfikacji odpowiadają specyficzne dla ciała Cajala scaRNP. W ich budowie można wyróżnić charakterystyczne boxy: H/ACA oraz C/D [31]. ScaRNP zawierające box H/ACA odpowiadają za pseudourydylację snRNA, natomiast scaRNP, które posiadają box C/D są odpowiedzialne za 2'-O-metylację snRNA. Występują również scaRNP, które posiadają zarówno box H/ACA, jak również box C/D i mogą przeprowadzać proces pseudourydylacji i 2'-O-metylacji jednocześnie [32].

3.2. Budowa cząsteczki scaRNP

ScaRNA, które odpowiedzialne jest za przeprowadzanie procesu pseudourydylacji zbudowane jest z dwóch struktur typu „spinka do włosów”, oddzielonych rejonem jednoniciowym i zakończonych krótkim ogonem. Śledząc dokładną budowę tego scaRNA możemy zauważyć, że box H występuje za pierwszą strukturą „spinki do włosów” w regionie jednoniciowym, natomiast box ACA znajduje się za drugą „spinką”, również w regionie jednoniciowym (rys. 2) [33].

Nieco odmienną budową charakteryzują się scaRNA odpowiedzialne za proces 2'-O-metylacji. Ten rodzaj scaRNA tworzy strukturę typu laso, czy też ma postać długiej „spinki do włosów”, często związaną przez krótki odcinek dwuniciowy, w której umieszczone są boxy C i D. Wewnętrzny region boxa C/D zawiera boxy C' i D', które reprezentują bardziej lub mniej dokładne kopie boxów C/D (rys. 2) [33].



Rysunek 2. Schematyczny rysunek przedstawiający strukturę H/ACA scaRNA, C/D scaRNA oraz cząsteczkę zawierającą zarówno box H/ACA, jak również C/D [33]

Należy pamiętać, że aby pełnić funkcję katalityczną, scaRNA musi być połączone ze specyficznymi białkami. ScaRNA stanowi rusztowanie dla powiązanych białek oraz posiada sekwencje komplementarne do sekwencji na snRNA, co pozwala umieścić wybrany nukleotyd w centrum katalitycznym. Natomiast sprzężone z scaRNA białka zapewniają stabilność metaboliczną kompleksu oraz katalizują reakcje modyfikacji [33].

Jak wcześniej wspomniano, wyróżnia się dwa typy cząsteczek scaRNP różniące się budową oraz rodzajem katalizowanej reakcji. Jest to konsekwencją występowania różnych białek – enzymów zasocjowanych z cząsteczką. W skład rdzenia cząsteczki scaRNP zawierającej box C/D wchodzi białko: SNU13, dwa silnie związane białka NOP56 i NOP58 oraz metylotransferaza FBL (u drożdży nosząca nazwę Nop1p), która jest enzymem katalizującym proces 2'-O-metylacji. [34] Natomiast białkami wchodzącymi w skład rdzenia scaRNP z motywem H/ACA są: NHP2, NOP10, GAR1 oraz syntaza pseudourydyny DKC1 (CbfSp u drożdży), która, jak sama nazwa wskazuje, jest enzymem katalizującym reakcję pseudourydylacji urydyny do pseudourydyny. Montaż białek rdzeniowych warunkuje także lokalizację jądrową dojrzających scaRNP [35].

3.3. SnoRNP

Cząsteczkami podobnymi pod względem strukturalnym i funkcjonalnym do scaRNP są snoRNP. Nazwy tych rybonukleoprotein nawiązują do miejsca ich występowania. SnoRNP zlokalizowane jest w jąderku. Podobnie jak scaRNP, snoRNP zawierają krótkie, niekodujące RNA (snoRNA – small nucleolar RNA), w których budowie wyróżniamy boxy H/ACA, C/D lub jeden i drugi. W skład tych motywów wchodzi również enzymy: metylotransferaza oraz syntaza pseudourydyny. Cząsteczki te biorą udział w modyfikacji nukleotydów rRNA oraz także m.in. U6snRNA, co wiąże się z ich lokalizacją w jąderku. Modyfikacje te polegają, podobnie jak w przypadku scaRNP, na 2'-O-metylacji oraz pseudourydylacji wybranych nukleotydów RNA, będących targetem dla snoRNP. [36] Należy jednak pamiętać, że wśród cząsteczek, będących targetem dla tych RNP są także wyjątki. U *Drosophila melanogaster* pewne scaRNP o nazwie pugU1-6 scaRNP, oprócz tego, że przeprowadza proces pseudourydylacji U1snRNA, to ma także zdolność do tej samej modyfikacji 28S rRNA. Podobnie u tego gatunku pugU2-55 scaRNP przeprowadza 2'-O-metylację U2 snRNA oraz 28S rRNA. Także pugU6-40 scaRNP jest dość nietypowe, ponieważ odpowiedzialne jest za pseudourydylację U6 snRNA w jąderku [30].

3.4. Biogeneza sca/snoRNP

Etapy dojrzewania scaRNP w dużej mierze pokrywają się z drogą dojrzewania snoRNP. Z wyjątkiem U3, U8 i U13 snoRNA, które są transkrybowane z niezależnych genów, wszystkie ssacze snoRNA i scaRNA są kodowane w sekwencjach intronowych innych genów [6]. Cały proces dojrzewania scaRNP odbywa się na terenie jądra komórkowego. Jednakże, droga dojrzewania scaRNP z motywem C/D jest odmienna od tej, przez jaką przechodzą cząsteczki scaRNP z motywem H/ACA. Procesom tym towarzyszą także inne białka, czynniki. Cechą wspólną jest jednak obecność systemu chaperonowego HSP90/R2TP [36].

3.4.1. Dojrzewanie C/D box scaRNP

Montaż C/D sca/snoRNP zazwyczaj jest zależny od splicingu, podczas którego powstaje prekursor sca/snoRNA [36]. Pre-sca/snoRNA jest następnie rozwijany ze struktury lasa do struktury liniowej oraz przetwarzany poprzez egzonukleolityczne rozcinanie [37].

W tym czasie, przy udziale systemu chaperonowego HSP90/R2TP, powstaje kompleks białkowy zawierający białka rdzeniowe SNU13 i NOP58 oraz czynniki montażowe. W skład R2TP systemu chaperonowego wchodzi: PIH1D1, RPAP3, RUVBL1 i RUVBL2. PIH1D1 i RPAP3 – tworzą heterodimer, w którym RPAP3 – bezpośrednio kontaktuje się z HSP90, natomiast PIH1D1 – wiąże się z białkami substratowymi. RUVBL1/2 – tworzy heteroheksamer, który powoduje zależne od ATP reakcje z substratami, jak również z heterodimerem PIH1D1:RPAP3 [36].

Wczesny kompleks białkowy, który przyłączy się do sca/snoRNA składa się z: dwóch białek rdzenia C/D SNU13 i NOP58, czynników montażowych ZNHIT6 i kompleksu NUFIP:ZNHIT3 [36], który tworzy stabilny trójskładnikowy kompleks z SNU13 oraz wiąże się z PIH1D1 [38]. Wiadomo również, że NOP58 łączy się z RUVBL1 poprzez słabo scharakteryzowany łącznik C12orf45 [39]. Zatem czynniki

montażowe działają jako łączniki pomiędzy białkami rdzeniowymi, a systemem HSP90/R2TP lub też jako regulatory jego aktywności.

Tak zmontowany kompleks łączy się z pre-sca/snoRNP przy czym oddysocjuje czynnik montażowy ZNHIT3 oraz jednocześnie przyłączają się białka rdzeniowe NOP56 oraz enzym FBL (metylotransferaza), odpowiedzialna za proces 2'-O-metylacji. Po zamontowaniu rdzenia pre-snoRNP są transportowane do CB gdzie zachodzą ostateczne etapy dojrzewania. Nie wiadomo jednak, kiedy czynniki montażowe i białka opiekuńcze odłączają się od pre-snoRNP, przed, czy po transporcie do CB. [36] Wiadomo jednak, że interakcja NUFIP z SNU13 zapobiega przedwczesnemu tworzeniu aktywnych katalitycznie sca/snoRNP [39] oraz to, że RUVBL1 i RUVBL2 oddziałują z C/D sca/snoRNA i pozostają w kompleksach z pre-sca/snoRNP aż do ostatnich etapów dojrzewania [40]. Końcowe etapy dojrzewania sca/snoRNP polegają na usunięciu RUVBL1/2, ZNHIT6 i NUFIP, co prowadzi do powstania aktywnej katalitycznie cząsteczki [36]. Dojrzałe snoRNP zostają transportowane do jąderka, w czym bierze udział białko NOPP140, natomiast scaRNP pozostają w ciałach Cajala. NOPP140 oddziałuje z C/D oraz H/ACA sca/snoRNA oraz wykryto je zarówno w jąderku, jak i ciałach Cajala, dlatego sugeruje się, że białko to bierze udział w transporcie pomiędzy tymi strukturami [41].

3.4.2. Dojrzewanie H/ACA box scaRNP

W odróżnieniu od snoRNP z motywem C/D, montaż białek tworzących rdzeń sca/snoRNP zawierających box H/ACA jest niezależny od splicingu, natomiast związany jest z transkrypcją Polimerazy RNA II [42].

W procesie montażu boxa H/ACA ważną rolę odgrywają białka NAF1 i SHQ1, nie są one jednak częścią dojrzałej cząsteczki [36]. Pierwszym etapem tworzenia kompleksu białek tworzących box H/ACA jest połączenie się czynnika montażowego SHQ1 z DKC1 (syntazą pseudourydyny – enzymem warunkującym zdolność pseudourydylacji cząsteczki sca/snoRNP). Sugeruje się, że proces ten ma miejsce na terenie cytoplazmy zaraz po translacji tego białka, aby chronić DKC1 przed degradacją i agregacją. Wiadomo, że samotne białko DKC1 jest niestabilne [43]. W dalszych etapach montażu, do kompleksu SHQ1/DKC1 przyłącza się kolejny czynnik montażowy NAF1, a także białka rdzeniowe NOP10 i NHP2. Jednakże nie jest jasne, czy czynnik SHQ1 odłącza się od powstałego kompleksu białek przed lub równocześnie z rekrutacją białek rdzeniowych oraz czynnika NAF1, czy ma to miejsce dopiero po połączeniu się DKC1 z sca/snoRNA. [36] Badania pokazują, że odłączenie SHQ1 od DKC1 ma miejsce przy udziale systemu chaperonowego HSP90/R2TP [44]. Czynnikiem, który odgrywa ważną rolę w montażu powstałego kompleksu białek rdzeniowych: DKC1, NHP2 i NOP10 do transkrybowanego sca/snoRNA jest NAF1 [36]. Czynnikiem ten oddziałuje z domeną C-kończącą CTD dużej podjednostki Polimerazy RNA II, co powoduje przyłączenie zasocjowanych z tym czynnikiem białek rdzeniowych do syntetyzowanego sca/snoRNA z sekwencjami H/ACA. Powstały kompleks jest nieaktywny katalitycznie, za przyczyną czynnika NAF1, który musi zostać zamieniony na białko rdzeniowe GAR1 [35]. Zatem ostatnie etapy dojrzewania H/ACA sca/snoRNP polegają na transporcie nieaktywnej cząsteczki na teren ciał Cajala, gdzie ma miejsce wymiana czynnika NAF1 na GAR1, tworząc aktywne katalitycznie sca/snoRNP [36].

Podobnie jak w przypadku C/D sno/scaRNP, scaRNP pozostają w ciałach Cajala, natomiast snoRNP, przy udziale białka NOPP140, zostaje transportowane do jąderka [36, 41].

3.5. Lokalizacja scaRNP w ciałach Cajala

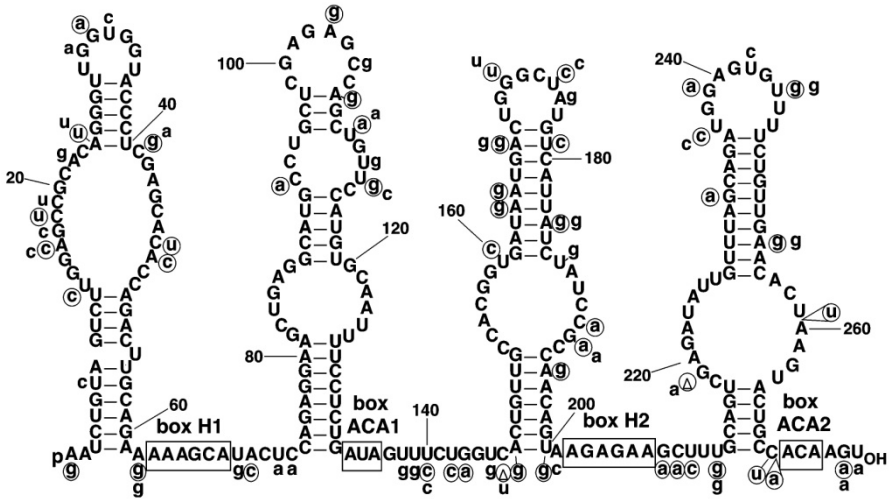
Podczas dojrzewania zarówno scaRNP, jak i snoRNP przechodzą przez ciała Cajala [36]. Musi zatem istnieć jakiś czynnik, który zatrzymywałby scaRNP w tych strukturach. Cechą charakterystyczną tych cząsteczek jest występowanie sekwencji na RNA, która służy połączeniu z białkiem WDR79 (inne nazwy: WD 79, WRAP53), które odpowiedzialne jest za akumulację scaRNP w ciałach Cajala. Wcześniejsze badania wykazały, że scaRNP zawierające motyw H/ACA zawierają sekwencję zwaną CAB-box, która służy do połączenia z białkiem WDR79 [45, 46]. Sekwencja ta znajduje się na pętli końcowej struktury spinki w H/ACA scaRNA, a także, w tym samym miejscu u scaRNA, które oprócz motywu H/ACA, zawierają motyw C/D [46].

Nieco mniej zrozumiałe było, co powoduje lokalizację C/D scaRNP w ciałach Cajala. U *Drosophila melanogaster* Tycowski i wsp. (2009) wykryli w C/D scaRNA sekwencję przypominającą CAB-box u H/ACA scaRNA, ale znacznie się od niego różniącą. Dodatkowo udowodniono, że fragment ten łączy się z homologiem ludzkiego WDR79 i odpowiada za lokalizację C/D-box scaRNA w ciałach Cajala [45]. Dopiero późniejsze badania na komórkach HeLa pozwoliły na zlokalizowanie sekwencji na C/D scaRNA, która będzie wiązała się z białkiem WDR79. Sekwencja ta składa się z licznych powtórzeń dinukleotydów GU lub UG. Nukleotydy te tworzą pętlę na końcu struktury spinki C/D scaRNA. Wydaje się jednak, że same nukleotydy nie przyczyniają się bezpośrednio do lokalizacji tych scaRNP w ciałach Cajala, tylko helisa, występująca u podstawy pętli, która składa się głównie z par G-U i U-G. Udowodniono, że struktura ta ma kluczowe znaczenie dla wiązania się C/D scaRNP z białkiem WDR79 oraz tym samym dla lokalizacji tych cząsteczek w ciałach Cajala [31].

3.6. Pseudourydylacja na przykładzie U93scaRNP

Aby przyjrzeć się bliżej procesom modyfikacji katalizowanych przez scaRNP, warto przedstawić budowę dwóch cząsteczek, spośród których jedna – U93scaRNP – odpowiedzialna jest za pseudourylylację, natomiast druga – U85snoRNP – odpowiada za proces 2'-O-metylacji i pseudourydylacji [33, 47].

U93 scaRNP, występuje u ssaków i jest odpowiedzialne za pseudourydylację U2snRNA. Cząsteczka ta składa się z dwóch ułożonych tandemowo boxów H/ACA (rys. 3). W budowie U93sca RNA można wyróżnić cztery dwuniciowe struktury typu „spinka do włosów” oddzielone regionami jednoniciowymi. Za pierwszą i trzecią „spinką” w rejonie jednoniciowym występują boxy H, natomiast za drugą i czwartą „spinką” także w rejonach jednoniciowych boxy ACA. Za ostatnią „spinką” występuje krótka sekwencja nukleotydów – ogon [33].



Rysunek 3. Pierwszorzędowa i przewidywana drugorzędowa struktura U93scaRNA u człowieka, myszy i bydła. Wielkimi literami oznaczono nukleotydy występujące w ludzkich U93scaRNA, małymi - w mysich, natomiast małymi z kółku - w U93scaRNA bydła. Wskazano również delekcje nukleotydowe (D) i insercje (groty strzałek). W ramkach oznaczono przypuszczalne sekwencje H (H1 i H2) i ACA (ACA1 i ACA2) [33]

Porównując budowę ludzkiego, mysiego i U93scaRNA u bydła obserwuje się wysokie konserwowanie boxów H i ACA. W większości przypadków zmienione nukleotydy zlokalizowane w regionach dwuniciowych, które mogą różnić się u ludzi, myszy i bydła nie kolidują z tworzeniem idealnych podwójnych helis [33]. Wskazuje to na fakt, że ważne jest zachowanie odpowiedniej struktury tworzącej spinki, a nie kolejności nukleotydów.

Badając sekwencję nukleotydów U93scaRNA wnioskuje się, że bierze ono udział w pseudourydylacji U2snRNA w pozycji U54. U93scaRNA zawiera sekwencje komplementarne do odcinka nukleotydów na U2snRNA, dzięki czemu możliwe jest umieszczenie wybranego nukleotydu w miejscu katalicznym U93scaRNP zawierającym enzym – syntazę pseudourydyny, która katalizuje reakcję modyfikacji urydyny do pseudourydyny [33].

Badania z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego oraz z zastosowaniem hybrydyzacji *in situ* wykazały, że U93scaRNP lokalizuje się w ciałkach Cajala [33].

3.7. Metylacja i pseudourydylacja na przykładzie U85snoRNP

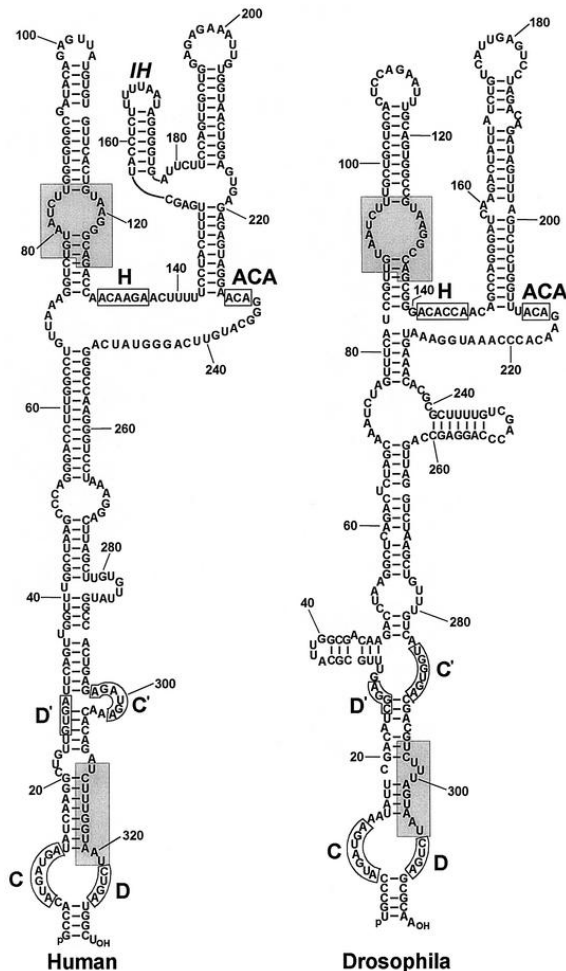
Wyjątkowym spośród snoRNP jest U85snoRNP, ponieważ bierze udział w modyfikacji spliceosomalnego RNA a mianowicie U5snRNA. W budowie tego snoRNA wyróżnia się zarówno box C/D jak i H/ACA, z czego wnioskuje się, że przeprowadza zarówno proces 2'-O-metylacji, jak i pseudourydylacji (rys. 4) [47].

U85 snoRNA człowieka składa się z 330nt, natomiast u *Drosophila melanogaster* z 316nt. Na końcu 5' U85snoRNA znajduje się box C w sąsiedztwie którego występuje box D', a na końcu 3' box D w sąsiedztwie którego występuje box C'. Końce 3' i 5' tworzą bardzo długą strukturę „spinki do włosów”. W centralnej części sekwencji U85snoRNA można zaobserwować drugą strukturę podobną do spinki przypominającą strukturę RNA zawierającego boxy H i ACA. W domenie H/ACA

jednociowy fragment sekwencji posiada box H, a jednociowy region za spinką domeny H/ACA zawiera box ACA. Dodatkowo w przypadku ludzkiego U85snoRNA wewnątrz domeny H/ACA obserwujemy dodatkową strukturę „spinki” zwaną IH (insert hairpin), którą można zaobserwować u kręgowców [47].

Domeny odpowiadające za metylację i pseudourydylację mogą przeprowadzać te procesy u sąsiadujących u siebie nukleotydów: metylację węgla rybozy należącej do 45 nukleotydu oraz pseudourydylację urydyny na 46 nukleotydzie. U5 snRNA to jedyne RNA komplementarne do sekwencji w miejscu katalicznym U85snoRNA [47].

Co ważne, u człowieka modyfikacji ulegają nukleotydy: 45 – metylacja, 46 – pseudourydylacja, natomiast u *Drosophila*: 46 – metylacja i 47 – pseudourydylacja, co dowodzi, że struktura i sekwencja nukleotydów tego snoRNA jest silnie konserwowana w całym królestwie zwierząt [47].



Rysunek 4. Przepuszczalne struktury drugorzędowe U85snoRNA człowieka i *Drosophila melanogaster*. Prostokątem zaznaczono boxy C, D, C', D', H oraz ACA. Na szaro oznaczono sekwencje występujące u *Drosophila melanogaster*, konserwowane u człowieka [47]

3.8. ScaRNP w komórkach roślinnych

Badania na *Arabidopsis thaliana* wskazują na istnienie 144 genów snoRNA. Roślinne snoRNP są zdolne do modyfikacji zarówno rRNA, jak również snRNA w tym spliceosomalnych snRNA. Poniższa tabela przedstawia odkryte przez Chen i Wu (2009) snoRNP, odpowiedzialne za modyfikacje spliceosomowych snRNA, które ze względu na target są de facto scaRNP (Tab. 1). Charakteryzują się różną liczbą nukleotydów, od 105 (snoR126) do 200 (snoR125 scaRNP). SnoR127 i snoR103-2 zlokalizowane są w intronach innych genów; snoR126 i snoR102-2 znajdują się w sekwencjach UTR-ów; snoR125 mieści się w sekwencji IGR (intergenic region), natomiast snoR143 lokalizuje się w sekwencji CDS (coding region). Cztery spośród przytoczonych przykładów scaRNP (snoR125, snoR126, snoR127, snoR102-2) w swojej budowie zawiera motyw C/D i katalizują proces 2'-O-metylacji nukleotydu/-ów na U snRNA. Dwa z nich (snoR103-2, snoR143) odpowiadają za procesy pseudourydylacji na U snRNA i należą do rodziny H/ACA scaRNP [48].

Tabela 1. Przykłady roślinnych scaRNA

Nazwa	Liczba nukleotydów	Lokalizacja	Rodzaj modyfikacji	Target
snoR125	200	IGR	2'-O-metylacja	U2snRNA nukleotyd 31
snoR126	105	UTR	2'-O-metylacja	U6snRNA nukleotyd 75 i 84
snoR127	138	Intron	2'-O-metylacja	U2snRNA nukleotyd 20
snoR102-2	165	UTR	2'-O-metylacja	U5snRNA nukleotyd 41
snoR103-2	132	Intron	pseudourydylacja	U5snRNA nukleotyd 47 i 50
snoR143	171	CDS	pseudourydylacja	U2snRNA nukleotyd 38

Źródło: [48]

4. Podsumowanie

Badając budowę i funkcję scaRNP w komórkach roślinnych i zwierzęcych obserwuje się bardzo duże podobieństwo tych rybonukleoprotein w obrębie obu królestw. Schemat budowy scaRNP roślinnych i zwierzęcych jest ten sam, co więcej pełnią one tą samą rolę w końcowych modyfikacjach snRNA w ciałach Cajala. ScaRNP są niezbędne do powstawania UsnRNP z prawidłową modyfikacją nukleotydów, a odpowiednia sekwencja nukleotydów komplementarnych do pre-mRNA warunkuje prawidłowy przebieg procesu splicingu. Z uwagi na swoją ważną funkcję, scaRNP muszą być silnie konserwowane.

Literatura

1. Stryer L., Berg J., Tymoczko J., *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2007.
2. Hyjek M., Wojciechowska N., Rudzka M., Kołowerzo-Lubnau A., Smoliński D.J., *Spatial regulation of cytoplasmic snRNP assembly at the cellular level*, Journal of Experimental Botany, 66, (2015), s. 7019-7030.
3. Jady B., Darzacq X., Tucker K., Matera G., Bertrand E., Kiss T., *Modification of Sm small nuclear RNAs occurs in the nucleoplasmic Cajal body following import from the cytoplasm*, The EMBO Journal, 22, (2003), s. 1878-1888.
4. Villa T., Pleiss J.A., Guthrie C., *Spliceosomal snRNAs: Mg²⁺-Dependent Chemistry at the Catalytic Core?*, Cell, 109, (2002), s. 149-152.
5. Stanek D., *Cajal body and snRNPs - friends with benefits*, RNA Biology, 14, (2017), s. 671-679.
6. Kiss T., *Biogenesis of small nuclear RNPs*, Journal of Cell Science, 117, (2004), s. 5949-5955.
7. Zhao X., Yu Y.T., *Incorporation of 5-fluorouracil into U2 snRNA blocks pseudouridylation and pre-mRNA splicing in vivo*, Nucleic Acids Research, 35, (2007), s. 550-558.
8. Kambach Ch., Walke S., Nagai K., *Structure and assembly of the spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particles*, Current Opinion in Structural Biology, 9, (1999), s. 222-230.
9. Will C., Lührmann R., *Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function*, Cell Biology, 13, (2001), s. 290-301.
10. Egloff S., Murphy S., *Role of the C-terminal domain of RNA polymerase II in expression of small nuclear RNA genes*, Biochemical Society Transactions, 36, (2008), s. 537-539.
11. Hallais M., Pontvianne F., Andersen P.R., Clerici M., Lener D., Benbahouche Nel H., Gostan T., Vandermoere F., Robert M.C., Cusack S., Verheggen C., Jensen T.H., Bertrand E., *CBC-ARS2 stimulates 3'-end maturation of multiple RNA families and favors cap-proximal processing*, Nature Structural & Molecular Biology, 20, (2013), s. 1358-1366.
12. Komarnitsky P., Cho E.J., Buratowski S., *Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription*, Genes & Development, 14, (2000), s. 2452-2460.
13. Ho C.K., Shuman S., *Distinct roles for CTD Ser-2 and Ser-5 phosphorylation in the recruitment and allosteric activation of mammalian mRNA capping enzyme*, Molecular Cell 3, (1999), s. 405-411.
14. Ahn S.H., Kim M., Buratowski S., *Phosphorylation of Serine 2 within the RNA Polymerase II C-Terminal Domain Couples Transcription and 3' End Processing*, Molecular Cell 13, (2004), s. 67-76.
15. Egloff S., *Role of Ser7 phosphorylation of the CTD during transcription of snRNA genes*, RNA Biology, 9, (2012), s. 1033-1038.
16. Ohno M., Segref A., Bachi A., Wilm M., Mattaj I.W., *PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation*, Cell, 101, (2000), s. 187-198.
17. Izumi H., McCloskey A., Shinmyozu K., Ohno M., *p54nrb/NonO and PSF promote U snRNA nuclear export by accelerating its export complex assembly*, Nucleic Acids Research, 42, (2014), s. 3998-4007.
18. Palacios I., Hetzer M., Adam S.A., Mattaj I.W., *Nuclear import of U snRNPs requires importin beta*, The EMBO Journal, 16, (1997), s. 6783-6792.
19. Narayanan U., Achsel T., Luhrmann R., Matera A.G., *Coupled in vitro import of U snRNPs and SMN, the spinal muscular atrophy protein*, Molecular Cell, 16, (2004), s. 223-234.

20. Sleeman J.E., Lamond A.I., *Newly assembled snRNPs associate with coiled bodies before speckles, suggesting a nuclear snRNP maturation pathway*, *Current Biology*, 9, (1999), s.1065-1074.
21. Jady B., Darzacq X., Tucker K., Matera G., Bertrand E., Kiss T., *Modification of Sm small nuclear RNAs occurs in the nucleoplasmic Cajal body following import from the cytoplasm*, *The EMBO Journal*, 22, (2003), s. 1878-1888.
22. Lamond A.I., Spector D.L., *Nuclear speckles: a model for nuclear organelles*, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4, (2003), s. 605-612.
23. Trippe R., Guschina E., Hossbach M., Urlaub H., Luhrmann R., Benecke B.J., *Identification, cloning, and functional analysis of the human U6 snRNA-specific terminal uridylyl transferase*, *RNA*, 12, (2006), s. 1494-1504.
24. Wolin S.L., Cedervall T., *The La protein*, *Annual Review of Biochemistry*, 71, (2002), s. 375-403.
25. Mroczek S., Krwawicz J., Kutner J., Lazniewski M., Kucinski I., Ginalski K., Dziembowski A., *C16orf57, a gene mutated in poikiloderma with neutropenia, encodes a putative phosphodiesterase responsible for the U6 snRNA 3' end modification*, *Genes & Development*, 26, (2012), s. 1911-1925.
26. Licht K., Medenbach J., Luhrmann R., Kambach C., Bindereif A., *3'-cyclic phosphorylation of U6 snRNA leads to recruitment of recycling factor p110 through LSm proteins*, *RNA*, 14, (2008), s. 1532-1538.
27. Achsel T., Brahm H., Kastner B., Bachi A., Wilm M., Luhrmann R., *A doughnut-shaped heteromer of human Sm-like proteins binds to the 3'-end of U6 snRNA, thereby facilitating U4/U6 duplex formation in vitro*, *The EMBO Journal*, 18, (1999), s. 5789-5802.
28. Zaric B., Chami M., Remigy H., Engel A., Ballmer-Hofer K., Winkler F.K., Kambach C., *Reconstitution of two recombinant LSm protein complexes reveals aspects of their architecture, assembly, and function*, *The Journal of Biological Chemistry*, 280, (2005), s. 16066-16075.
29. Gerbi S.A., Lange T.S., *All small nuclear RNAs (snRNAs) of the [U4/U6.U5] trisnRNP localize to nucleoli: identification of the nucleolar localization element of U6 snRNA*, *Molecular Biology of the Cell*, 13, (2002), s. 3123-3137.
30. Deryusheva S., Gall J. *Novel small Cajal-body-specific RNAs identified in Drosophila: probing guide RNA function*, *RNA*, 19, (2013), s. 1802-1814.
31. Marnef A., Richard P., Pinzon N., Kiss T., *Targeting vertebrate intron-encoded box C/D 2'-O-methylation guide RNAs into the Cajal body*, *Nucleic Acids Research*, 42, (2014), s. 6616-6629.
32. Enwerem I., Wu G., Yu Y.T., Hebert M., *Cajal Body Proteins Differentially Affect the Processing of Box C/D scaRNPs*, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122348>, 13.04.2015
33. Kiss A., Jady B., Darzacq X., Verheggen C., Bertrand E., Kiss T., *A Cajal body-specific pseudouridylation guide RNA is composed of two box H/ACA snoRNA-like domains*, *Nucleic Acids Research*, 30, (2002), s. 4643-4649.
34. Verheggen C., Mouaikel J., Thiry M., Blanchard J.M., Tollervey D., Bordonne R., Lafontaine D.L., Bertrand E., *Box C/D small nucleolar RNA trafficking involves small nucleolar RNP proteins, nucleolar factors and a novel nuclear domain*, *The EMBO Journal*, 20, (2001), s. 5480-5490.
35. Darzacq X., Kittur N., Roy S., Shav-Tal Y., Singer R., Meier U., *Stepwise RNP assembly at the site of H/ACA RNA transcription in human cells*, *The Journal of Cell Biology*, 173, (2006), s. 207-218.
36. Massenet S., Bertrand E., Verheggen C., *Assembly and trafficking of box C/D and H/ACA snoRNPs*, *RNA Biology*, 14, (2016), s. 680-692.
37. Hirose T., Shu M.D., Steitz J.A., *Splicing-dependent and -independent modes of assembly for intron-encoded box C/D snoRNPs in mammalian cells*, *Molecular Cell*, 12, (2003), s. 113-123.

38. Rothe B., Saliou J.M., Quinternet M., Back R., Tiotiu D., Jacquemin C., Loegler C., Schlotter F., Pena V., Eckert K., Moréra S., Dorsselaer A.V., Branlant Ch., Massenet S., Sanglier-Cianférani S., Manival X., Charpentier B., *Protein Hit1, a novel box C/D snoRNP assembly factor, controls cellular concentration of the scaffolding protein Rsa1 by direct interaction*, *Nucleic Acids Research*, 42, (2014), s. 10731-10747.
39. Bizarro J., Charron C., Boulon S., Westman B., Pradet-Balade B., Vandermoere F., Chagot M.E., Hallais M., Ahmad Y., Leonhardt H., *Proteomic and 3D structure analyses highlight the C/D box snoRNP assembly mechanism and its control*, *The Journal of Cell Biology*, 207, (2014), s. 463-480.
40. Newman D., Kuhn J., Shanab G., Maxwell E., *Box C/D snoRNA-associated proteins: two pairs of evolutionarily ancient proteins and possible links to replication and transcription*, *RNA*, 6, (2000), s. 861-879.
41. Isaac C., Yang Y., Meier U.T., *Nopp140 functions as a molecular link between s. 319-329.*
42. Richard P., Kiss A.M., Darzacq X., Kiss T., *Cotranscriptional recognition of human intronic box H/ACA snoRNAs occurs in a splicing-independent manner*, *Molecular & Cellular Biology*, 26, (2006), s. 2540-2549.
43. Grozdanov P., Roy S., Kittur N., Meier U., *SHQ1 is required prior to NAF1 for assembly of H/ACA small nucleolar and telomerase RNPs*, *RNA*, 15, (2009), s. 1188-1197.
44. Machado-Pinilla R., Liger D., Leulliot N., Meier U., *Mechanism of the AAAC ATPases pontin and reptin in the biogenesis of H/ACA RNPs*, *RNA*, 18, (2012), s.1833-1845.
45. Tycowski K., Shu M.D., Kukoyi A., Steitz J., *A Conserved WD40 Protein Binds the Cajal Body Localization Signal of scaRNP Particles*, *Molecular Cell*, 34, (2009), s. 47-57.
46. Richard P., Darzacq X., Bertrand E., Jady B., Verheggen C., Kiss T., *A common sequence motif determines the Cajal body-specific localization of box H/ACA scaRNAs*, *The EMBO Journal*, 22, (2003), s. 4283-4293.
47. Jady B., Kiss T., *A small nucleolar guide RNA functions both in 2'-O-ribose methylation and pseudouridylation of the U5 spliceosomal RNA*, *The EMBO Journal*, 20, (2001), s. 541-551.
48. Chen H.M., Wu S.H., *Mining small RNA sequencing data: a new approach to identify small nucleolar RNAs in Arabidopsis*, <https://doi.org/10.1093/nar/gkp225>, 08.04.2009.

Etapy dojrzewania małych, jądrowych RNA – snRNA

Streszczenie

SnRNP to kompleks rybnukleoproteinowy odgrywający kluczową rolę w procesie splicingu. SnRNA są transkrybowane przez Polimerazę RNA II. W kolejnych etapach zachodzi proces ich dojrzewania. Po transkrypcji, na terenie jądra następuje przetwarzania końca 3' pre-snRNA oraz metylacja pierwszego nukleotydu. Kolejnym etapem jest montaż kompleksu eksportowego i transport wstępnie zmodyfikowanych snRNA do cytoplazmy. Tam następuje dimetylacja pierwszego nukleotydu oraz przyłączenie białek Sm. Ostatni proces dojrzewania, po powrocie pre-snRNP do jądra, to 2'-O-metylacja i pseudourydylacja wybranych nukleotydów snRNA poprzez scaRNP w ciałach Cajala.

Słowa kluczowe: snRNP, scaRNP, snoRNP, ciała Cajala, Polimeraza RNA II.

Stages of maturation of small nuclear RNAs – snRNA

Abstract

SnRNP is a complex of ribonucleoproteins that plays an important role in the splicing process. SnRNAs are transcribed by RNA Polymerase II. In the subsequent stages, the process of their maturation takes place. After transcription, in the nucleus the 3' end of pre-snRNA is processed and there is the methylation of the first nucleotide of snRNA. The next stage is the assembly of the export complex and transport of pre-modified snRNA to the cytoplasm. There, the first nucleotide is dimethylated and the Sm proteins are attached. The last maturation process, after return the pre-snRNPs to the nucleus, is the 2'-O-methylation and pseudouridylation of selected nucleotides of snRNA by scaRNPs in Cajal bodies.

Keywords: snRNP, scaRNP, snoRNP, Cajal bodies, RNA Polymerase II.

Mutacje genów kodujących hormony gonadotropowe

1. Wstęp

Rodzina hormonów gonadotropowych obejmuje hormon luteinizujący (LH), hormon folikulotropowy (FSH) oraz ludzką gonadotropinę kosmówkową (hCG). Wraz z hormonem tyreotropowym tworzą one rodzinę hormonów glikoproteinowych. Hormon luteinizujący oraz hormon folikulotropowy wytwarzane są przez komórki przedniego płata przysadki, z kolei gonadotropina kosmówkowa wydzielana jest w okresie prenatalnym przez komórki łożyska – syncytiotrofoblasty. LH i FSH odgrywają istotną rolę w różnicowaniu płciowym płodu, dojrzewaniu płciowym, spermatogenezie, syntezie testosteronu i cyklu menstruacyjnym u kobiet.

Gonadotropina kosmówkowa jest niezbędna dla utrzymania rozwijającej się ciąży i podtrzymania produkcji progesteronu. Hormony glikoproteinowe są heterodimerycznymi białkami zbudowanymi z dwóch podjednostek połączonych wiązaniem niekowalencyjnym. Podjednostka α stanowi element wspólny dla całej rodziny hormonów glikoproteinowych, z kolei podjednostka β stanowi unikalny element odpowiedzialny za swoistość wiązania hormonu z receptorem [1, 2]. Mutacje w genach kodujących podjednostki hormonów gonadotropowych należą do niezwykle rzadkich. Zrozumienie struktury oraz mechanizmu działania hormonów gonadotropowych jest konieczne dla zrozumienia wpływu mutacji na fenotyp obserwowany u pacjentów. Nieprawidłowa struktura hormonów spowodowana obecnością mutacji może prowadzić do wystąpienia objawów takich jak między innymi hipogonadyzm hipogonadotropowy, bezpłodność, azoospermia czy wtórny brak miesiączki [3].

2. Hormony gonadotropowe – miejsce syntezy i pełnione funkcje

Komórki przedniego płata przysadki syntetyzują, a następnie uwalniają do krwioobiegu trzy hormony glikoproteinowe. Dwa z nich stanowią hormony gonadotropowe – hormon folikulotropowy (FSH) oraz hormon luteinizujący (LH), odgrywające kluczową rolę w regulacji funkcji rozrodczych zarówno u mężczyzn, jak i u kobiet [4]. U mężczyzn FSH wymagane jest do inicjacji oraz utrzymania prawidłowego pod względem ilościowym i jakościowym procesu spermatogenezy. Hormon folikulotropowy stymuluje komórki

Sertolego (komórki podporowe jąder), a tym samym pobudza proces spermatogenezy. FSH powoduje również zwiększone wytwarzanie białka wiążącego androgeny, a tym samym zwiększone stężenie testosteronu i dihydrotestosteronu wewnątrz kanalików nasiennych. Wyższe poziomy tych hormonów stymulują proces spermatogenezy w kanalikach nasiennych oraz dojrzewanie plemników w najądrzach. Niemniej jednak, badania przeprowadzone na transgenicznym myszach sugerują, że

¹ kamila.szymanska92@gmail.com, Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie.

² grzegorz.adamczuk3@wp.pl, Samodzielna Pracownia Biologii Medycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie.

³ ewelina.humeniuk@vp.pl, Samodzielna Pracownia Biologii Medycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie.

FSH nie jest konieczny dla zachowania płodności osobników płci męskiej [5]. Natomiast u kobiet hormon folikulotropowy stymuluje dojrzewanie pęcherzyków jajnikowych oraz produkcję estrogenów przez komórki ziarniste. Ponadto, zwiększa aktywność aromatazy P450 odpowiedzialnej za konwersję androgenów do estrogenów, powodując tym samym wzrost poziomu estrogenów [6]. FSH prawdopodobnie odgrywa również ważną rolę w regulowaniu funkcji osteoklastów oraz w rozwoju oocytów [7,8]. Z kolei hormon luteinizujący stymuluje komórki Leydiga (komórki śródmięzszowe jąder) do produkcji testosteronu. Odgrywa również istotną rolę w procesie różnicowania płciowego w okresie prenatalnym, umożliwiając rozwój wewnętrznych i zewnętrznych narządów płciowych męskich u płodu. U kobiet LH wiąże się z receptorem LHCGR (obecny na powierzchni komórek ziarnistych) powodując pęknięcie pęcherzyka jajnikowego i uwolnienie komórki jajowej (owulację), luteinizację ciała żółtego oraz wytwarzanie progesteronu. Co więcej, hormon luteinizujący stymuluje wytwarzanie androstendionu i testosteronu przez osłonkę pęcherzyka [9].

Ludzka gonadotropina kosmówkowa, w przeciwieństwie do FSH i LH, wytwarzana jest przez syncytiotrofoblast łożyska jedynie w okresie prenatalnym [10]. hCG jest hormonem pleiotropowym działającym w sposób endokrynni, autokrynni i parakrynni. Funkcją gonadotropiny kosmówkowej jest podtrzymywanie funkcji ciała żółtego oraz produkcji progesteronu przez ciało żółte, indukcja angiogenezy w obrębie macicy oraz stymulacja komórek Leydiga do produkcji testosteronu w początkowym okresie ciąży (udział w różnicowaniu płciowym). Dodatkowo hCG bierze udział w rozwoju immunotolerancji płodu dzięki aktywacji szlaków indukcji apoptozy prowadzących do apoptozy matczyńskich limfocytów T [11].

3. Struktura i molekularny mechanizm działania hormonów gonadotropowych

Hormony glikoproteinowe, (do których należą gonadotropiny) są heterodimerycznymi białkami zbudowanymi z dwóch podjednostek (α i β) połączonych wiązaniem niekowalencyjnym. Podjednostka α stanowi element wspólny dla wszystkich hormonów glikoproteinowych, a podjednostka β jest elementem specyficznym dla hormonu (LHB, FSHB, CGB) odpowiedzialnym za swoistość wiązania tego hormonu z odpowiednim receptorem. Łańcuch polipeptydowy α składa się z 92 lub 96 aminokwasów i zawiera 10 reszt cysteiny nie ulegających redukcji, dlatego w obrębie podjednostki wspólnej obecnych jest pięć mostków dwusiarczkowych. Pozycje reszt cysteinowych, a także sekwencje aminokwasów są niemal identyczne u wszystkich kręgowców. Wysoka konserwatywność sekwencji aminokwasowej podjednostki α umożliwia rekombinację dwóch podjednostek α i β pochodzących z różnych hormonów glikoproteinowych, jak i z różnych gatunków. Łańcuch polipeptydowy podjednostki β jest dłuższy od łańcucha podjednostki wspólnej – składa się z 105-150 reszt aminokwasowych. Ponadto, w podjednostce β występuje nie 10, a 12 reszt cysteiny, wobec czego obecnych jest sześć mostków dwusiarczkowych. Sekwencja aminokwasowa podjednostki β nie jest również aż tak wysoce konserwatywna jak sekwencja aminokwasowa podjednostki wspólnej.

Sekwencje LHB oraz CGB pochodzenia ludzkiego wykazują ok. 70% homologii, z kolei bydłce LHB i FSHB cechują się jedynie 34% homologią. Jedyнным wyjątkiem są koniowate, u których sekwencje aminokwasowe LHB i CGB są identyczne [2].

Dla prawidłowego działania hormonów gonadotropowych konieczna jest heterodimeryzacja podjednostki α i podjednostki β . Heterodimeryzacja między podjednostkami możliwa jest dzięki obecności „pasa bezpieczeństwa” (w strukturze podjednostek α i β charakterystyczna jest obecność trzech pętli, a koniec karboksylowy podjednostki β „owinięty” jest wokół podjednostki α tworząc „pas bezpieczeństwa”). Struktura ta stabilizowana jest mostkiem disulfidowym obecnym pomiędzy resztami cysteiny w pozycji 26 i 100 łańcucha polipeptydowego podjednostki specyficznej dla hormonu. Czwartorzędowa struktura hormonów glikoproteinowych wyróżnia się wysoką stabilnością ze względu na obecność „pasów bezpieczeństwa” oraz motywów węzłów cystynowych w obu podjednostkach [12].

Jedną z ważniejszych modyfikacji posttranslacyjnych hormonów glikoproteinowych stanowi glikozylacja. Jest ona procesem złożonym, stanowiącym niezbędny warunek dla prawidłowej funkcjonalności hormonów glikoproteinowych. Obecność łańcuchów węglowodanowych konieczna jest dla prawidłowego fałdowania białek, ich dojrzewania i wydzielania, heterodimeryzacji obu podjednostek oraz transdukcji sygnału do wnętrza komórki. Glikozylacja wpływa również na stabilność białka oraz jego biologiczny okres półtrwania. Reszty oligosacharydowe poprzez zwiększenie masy hormonów gonadotropowych zmniejszają ich klirens nerkowy. Niemniej jednak, mogą one także powodować ich zwiększone usuwanie przez wątrobę [13]. Glikozylacji podlegają obie podjednostki (α i β). Podjednostka wspólna charakteryzuje się obecnością dwóch reszt cukrowych przyłączonych wiązaniem N-glikozydowym do asparaginy. W podjednostce β hormonu luteinizującego obecna jest jedna reszta cukrowa, z kolei w podjednostkach β hormonu folikulotropowego oraz gonadotropiny kosmówkowej obecne są dwie reszty cukrowe dodane wiązaniem Nglikozydowym. Dodatkowo, CGB zawiera cztery blisko rozmieszczone łańcuchy oligosacharydowe przyłączone wiązaniem Oglikozydowym do seryny oraz treoniny [14]. Proces glikozylacji zachodzi w szorstkiej siateczce endoplazmatycznej i aparacie Golgiego przy udziale wielu enzymów, takich jak glikozydazy, mannozydazy i glikozylotransferazy. Dlatego też biosynteza glikoprotein zależy od aktywności wyżej wymienionych enzymów. Ich różnorodność wynika z niejednorodności przyłączonych glikanów oraz miejsc glikozylacji, w wyniku czego powstaje mieszanina różnych glikoprotein różniących się budową łańcucha oligosacharydowego. Związane z asparaginą łańcuchy oligosacharydowe można podzielić na cztery grupy na podstawie sulfurylacji oraz sializacji. Większość łańcuchów węglowodanowych przyłączonych do hormonu folikulotropowego, hormonu luteinizującego i hormonu tyreotropowego to struktury sjalowane, sulfuryzowane i mieszane. Natomiast oligosacharydy obecne w ludzkiej gonadotropinie kosmówkowej mogą zawierać acetyloglukozaminę, galaktozę, mannozę, kwas sialowy i fukozę [2].

Działanie hormonów glikoproteinowych rozpoczyna się od związania hormonu przez wysoce specyficznego receptora zlokalizowanego w błonie komórkowej komórki docelowej. Hormon folikulotropowy wiąże się z receptorem FSHR, z kolei hormon luteinizujący oraz ludzka gonadotropina kosmówkowa łączą się ze wspólnym receptorem LHCGR. Receptory hormonów glikoproteinowych należą do rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G (GPCR). Zbudowane są one z pojedynczego łańcucha polipeptydowego o zmiennej długości, składającego się z domeny zewnątrzkomórkowej, domeny transmembranowej oraz domeny wewnątrzkomórkowej. W wyniku przyłączenia się hormonu do receptora dochodzi do aktywacji trimerycznego białka G i aktywacji podjednostki α białka G wykazującej aktywność

GTP-azy. Podjednostka α s aktywuje cyklazę adenylową, w wyniku czego dochodzi do konwersji ATP do cAMP, będącego wtórnym przekaźnikiem transdukcji sygnału. cAMP aktywuje w sposób bezpośredni bądź pośredni kinazy białkowe (PKA), a te z kolei w wyniku fosforylacji aktywują substraty, którymi są liczne białka cytoplazmatyczne i jądrowe, co ostatecznie prowadzi do szeregu odpowiedzi biologicznych [15, 16].

4. Mutacje w genach kodujących hormony gonadotropowe

Podjednostka alfa wspólna dla wszystkich hormonów glikoproteinowych kodowana jest przez gen *CGA* zlokalizowany na ramieniu długim chromosomu 6q12.21. Gen ten składa się z czterech eksonów oraz trzech intronów [1,17]. Podjednostki β hormonu folikulotropowego, hormonu luteinizującego oraz ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej kodowane są przez geny umiejscowione na różnych chromosomach. Gen kodujący podjednostkę β FSH (*FSHB*) umiejscowiony jest na chromosomie 11p13 i zbudowany jest z trzech eksonów rozdzielonych dwoma intronami [18]. Z kolei podjednostka beta hormonu luteinizującego kodowana jest przez gen *LHB*, zawierający również trzy eksony i dwa introny. Gen *LHB* wchodzi w skład klasteru *LHB/CGB* zlokalizowanego na ramieniu długim chromosomu 19q13.32. Podjednostka beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (*CGB*) kodowana jest przez geny *CGB*, *CGB5*, *CGB8* i *CGB7* należące do klasteru *LHB/CGB*. Klaster ten zbudowany jest ze wspomnianego genu *LHB*, czterech genów kodujących *CGB* oraz dwóch kopii genów *CGB1* i *CGB2*, których funkcja jest nieznana. Przypuszcza się, że powstał on w wyniku duplikacji genu *LHB* wiele milionów lat temu. Geny *CGB5* i *CGB8* są najaktywniej transkrybowane i stanowią od 62 do 82% całej puli transkryptów mRNA *CGB* [19].

5. Podjednostka wspólna CGA

Mutacje genów kodujących podjednostki hormonów gonadotropowych należą do niezwykle rzadkich. W przypadku podjednostki wspólnej gonadotropin brak jest jakichkolwiek doniesień dotyczących mutacji w obrębie genu *CGA*. Jedyną znaną mutacją jest substytucja alaniny na glutaminę w pozycji 56 łańcucha polipeptydowego (Glu56Ala). Jednak została ona zidentyfikowana w podjednostce wytwarzanej ektopowo (czyli przez komórki inne niż komórki trofoblastu), u pacjenta z niezróżnicowanym nowotworem w obrębie kości udowej. Wydzielona podjednostka odznaczała się zdecydowanie większym rozmiarem, a więc niezdolnością do kojarzenia z podjednostką β [20]. Ponadto, Zhang i współpracownicy opisali polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. Single Nucleotide Polimorphism, SNP) w rejonie 3' niepodlegającym translacji (3'UTR) genu kodującego *CGA*, stanowiącego miejsce wiązania miR-1302. Zmiana ta skutkowałą zmniejszoną zdolnością przyłączania się miRNA, w wyniku czego obserwowana była nadekspresja genu *CGA* w warunkach in vitro.

Badania w kierunku SNPs zostały przeprowadzone wśród mężczyzn ze stwierdzoną bezpłodnością idiopatyczną [21].

5.1. Podjednostka β ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej CGB

W genie kodującym podjednostkę β gonadotropiny kosmówkowej dotychczas nie zidentyfikowano żadnej mutacji. Tak jak w przypadku podjednostki wspólnej, znane są jedynie polimorfizmy pojedynczych nukleotydów. Nagirnaja i współpracownicy

zidentyfikowali trzy SNPs o potencjalnym znaczeniu patofizjologicznym. Polimorfizm w genie *CGB5* powodujący zamianę waliny na leucynę w pozycji 56 łańcucha polipeptydowego (rs72556325) został opisany u jednej heterozygotycznej pacjentki ze zdiagnozowanymi nawrotowymi poronieniami (ang. *Recurrent Miscarriage*, RM). Zmiana ta skutkowała strukturalnymi przeszkodami w tworzeniu heterodimeru hCG. Ilość zmienionego łańcucha β przyłączonego do podjednostki α wynosiła jedynie 10% w porównaniu z typem dzikim podjednostki β . Mimo to, po związaniu hormonu z receptorem obserwowana była silniejsza odpowiedź spowodowana kompensacją słabej dimeryzacji. Kolejny SNP (rs72556345) w genie *CGB5*, skutkujący zamianą proliny na argininę w pozycji 73 łańcucha polipeptydowego, został znaleziony u pięciu heterozygot (trzech pacjentek z RM i dwóch osób z grupy kontrolnej).

Spowodował on powstanie alternatywnej konformacji w około 50% wydzielonych podjednostek β , jednak nie wpłynął na aktywność biologiczną gonadotropiny kosmówkowej. Z kolei w przypadku polimorfizmu rs72556341 w genie *CGB8* skutkującego zamianą argininy na tryptofan w kodonie 8, stosowane metody *in vitro* nie ujawniły żadnych zmian dotyczących heterodimeryzacji podjednostek. Wyniki przeprowadzonych badań potwierdzają, że zmiany sekwencji wpływające na funkcję ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej są niezwykle rzadkie. Przypuszcza się, że mutacje bądź polimorfizmy powodujące znaczące zmiany w funkcjonalności hCG uniemożliwiałyby utrzymanie ciąży i dlatego nie są obserwowane w populacji. Ta hipoteza jest zgodna z postulowanym znaczeniem gonadotropiny kosmówkowej w procesie implantacji zarodka. Polimorfizmy w genach kodujących podjednostkę β hCG wiążą się ze zwiększonym ryzykiem nawrotowych poronień [22].

5.2. Podjednostka β hormonu luteinizującego LHB

Mutacje w genie kodującym podjednostkę β hormonu luteinizującego również należą do bardzo rzadkich. Dotychczas zidentyfikowano jedynie 11 mutacji w genie podjednostki β lutropiny. Sześć z nich stanowiły mutacje typu nonsense lub missense, trzy stanowiły delecje, a kolejne dwie stanowiły mutacje splicingowe. Należy zauważyć, że mutacje w genie *LHB* mające charakter inaktywujący wiążą się z występowaniem u pacjentów hipogonadyzmu hipogonadotropowego. Pierwszy przypadek opisany w 1979 r. dotyczył pacjenta płci męskiej z biologicznie nieaktywną, choć aktywną immunologicznie formą hormonu luteinizującego [23]. W wyniku badań przeprowadzonych trzynaście lat później stwierdzono, że przyczyną tego zjawiska było zastąpienie glutaminy argininą w pozycji 54 łańcucha polipeptydowego (Gln54Arg) [24]. Hernán Valdes-Socin i współpracownicy opisali przypadek 30-letniego mężczyzny, u którego zdiagnozowano hipogonadyzm hipogonadotropowy, opóźnione dojrzewanie płciowe oraz bezpłodność, związane z nieobecnością krążącego hormonu luteinizującego. Badania molekularne wykazały, że pacjent był homozygotą z mutacją typu missense w genie kodującym LHB. Mutacja ta polegała na substytucji guaniny na adeninę w końcowej części eksonu drugiego, w wyniku czego doszło do zamiany glicyny na kwas asparaginowy w pozycji 36 łańcucha polipeptydowego podjednostki β hormonu luteinizującego (Gly36Asp) [25]. Natomiast Kenji Furui i współpracownicy przedstawili dwie nowe mutacje będące substytucjami polegającymi na zamianie cytozyny na tyminę (c.82T>C i c.104T>C). Pierwsza z nich skutkowała substytucją tryptofanu na argininę w pozycji 8 łańcucha polipeptydowego, druga zaś powodowała zamianę izoleucyny na treoninę w pozycji 15 łańcucha. Kobiety, u których zostały odkryte

mutacje były bezpłodne, a ich poziom hormonu luteinizującego w osoczu był niewykrywalny [26]. Kolejną mutacją zmiany sensu jest substytucja guaniny na adeninę (c.364G>A) powodująca zamianę seryny na glicynę w pozycji 102 dojrzałego łańcucha polipeptydowego. Mutacja ta związana jest z występowaniem u kobiet niepłodności spowodowanej endometriozą [27]. W wyniku screeningu przeprowadzonego w kierunku nowych polimorfizmów w genie kodującym podjednostkę β hormonu luteinizującego, Min Jiang i współpracownicy zidentyfikowali nową mutację w sekwencji sygnałowej peptydu LHB. Polegała ona na substytucji guaniny na adeninę (c.52G>A), czego następstwem była zamiana alaniny na treoninę w pozycji 3 łańcucha polipeptydowego. Sekwencja sygnałowa peptydu odgrywa istotną rolę w procesie syntezy białka i jest wymagana do transportu białka przez błonę retikulum endoplazmatycznego.

Mutacja opisana przez zespół Min Jiang prawdopodobnie zaburza proces odcinania sekwencji sygnałowej przez peptydazę sygnałową [28]. W 2017 r. opisano przypadek młodego mężczyzny z opóźnionym dojrzewaniem związanym z selektywnym niedoborem hormonu luteinizującego, spowodowanym homozygotyczną mutacją punktową. Polegała ona na delecji jednego nukleotydu – tyminy – w pozycji 215 [215delT] w eksonie trzecim, czego następstwem była zamiana leucyny na argininę w pozycji 72 łańcucha polipeptydowego (p.Leu72Arg) [29]. W 2012 r. Sabrina Basciani i współpracownicy opisali dwie nowe mutacje w genie kodującym podjednostkę β lutropiny. Fenotyp pacjenta charakteryzował się azoospermią i opóźnionym dojrzewaniem płciowym oraz hipogonadyzmem, spowodowanym brakiem hormonu luteinizującego w osoczu krwi. Wyniki sekwencjonowania wykazały delecję 12 par zasad w eksonie drugim oraz mutację miejsca splicingowego 5' IVS2+1G→T. Pierwsza mutacja skutkowałą delecją czterech reszt leucyny w hydrofobowym rdzeniu peptydu sygnałowego, natomiast druga mutacja zaburzała splicing mRNA [30]. Kolejna delecja została opisana u mężczyzny oraz u jego siostry w 2012 r. przez zespół Caroline Achard. Wyniki sekwencjonowania ujawniły homozygotyczną delecję dziewięciu zasad w eksonie 2, skutkującą delecją aminokwasów od 10 do 12 (histrydina-prolina-izoleucyna) w łańcuchu polipeptydowym podjednostki β . U pacjenta stwierdzony został brak wirylizacji (brak obecności typowych cech płciowych męskich) niewykrywalny poziom hormonu luteinizującego oraz niski poziom testosteronu w surowicy. Spermatogeneza była obecna (z prawidłową liczbą plemników), gdyż resztkowa aktywność hormonu luteinizującego (powodująca ekspresję enzymów steroidogennych w kilku dojrzałych komórkach Leydiga wytwarzających niewielkie ilości testosteronu) była wystarczająca do całkowitej i prawidłowej spermatogenezy [31]. W 2016 r. zidentyfikowano ostatnią znaną delecję – c.118_120del. Skutkowałą ona usunięciem lizyny w pozycji 40 łańcucha polipeptydowego (p.Lys40del). Region ten jest niezwykle istotny dla funkcjonowania wszystkich hormonów glikoproteinowych. Delecja określonych reszt w podjednostkach β gonadotropiny kosmówkowej, hormonu folikulo-tropowego i hormonu tyreotropowego doprowadza do wewnątrzkomórkowej retencji hormonów. (32) Ostatnią opisaną mutacją w genie kodującym podjednostkę β hormonu luteinizującego jest mutacja miejsca splicingowego 5' IVS2 + 1G → C. Mutacja ta została zidentyfikowana u trojga rodzeństwa – dwóch mężczyzn i kobiety. Ich fenotyp obejmował hipogonadyzm związany z izolowanym niedoborem hormonu luteinizującego. Ponadto, fenotyp kobiety charakteryzował się prawidłowym rozwojem w okresie pokwitania, wtórnym brakiem miesiączki i bezpłodnością [33].

5.3. Podjednostka β hormonu folikulotropowego FSHB

Do chwili obecnej opisano 7 mutacji w genie kodującym podjednostkę β hormonu folikulotropowego. Obejmują one pięć mutacji typu missense/nonsense oraz dwie delecje. Fenotyp pacjentów dotkniętych mutacjami w genie *FSHB* charakteryzuje się niedoborem hormonu folikulotropowego oraz bezpłodnością. Pierwszą zidentyfikowaną mutację stanowiła delecja c.236_237delTG opisana przez zespół Matthews w 1993 r. Przypadek dotyczył 27-letniej kobiety z pierwotnym brakiem miesiączki, niepłodnością, izolowanym niedoborem FSH oraz prawidłowym poziomem LH. Analiza sekwencji genu *FSHB* wykazała obecność delecji w eksonie 3, skutkującej przesunięciem ramki odczytu, a tym samym wystąpieniem przedwczesnego kodonu terminacyjnego. Skrócony łańcuch polipeptydowy nie zawierał regionów ważnych dla łączenia się z podjednostką α oraz dla wiązania i aktywacji receptora FSHR [34]. Szesnaście lat później Marie-

Laure Kottler i współpracownicy opisali drugą i jak dotąd ostatnią delecję w genie *FSHB*. Sekwencjonowanie ujawniło homozygotyczną delecję jednego nukleotydu (guaniny) w kodonie 79 (c.289delG) eksonu 3. Spowodowała ona przesunięcie ramki odczytu w kodonie 79 (A79fs108X) i pojawienie się przedwczesnego kodonu stop w pozycji 108. Kobieta, u której zidentyfikowano mutację cierpiała na pierwotny brak miesiączki, bezpłodność oraz izolowany niedobór FSH niereagujący na stymulację gonadoliberyną [35, 36]. W 1997 r. zespół Lawrence C. Leyman opisał przypadek kobiety z izolowanym niedoborem hormonu folikulotropowego i opóźnionym dojrzewaniem płciowym. Badania molekularne wykazały obecność dwóch mutacji w obu allelach odziedziczonych od rodziców. Pierwszą mutację (obecną w allelu pochodzącym od matki) stanowiła delecja dwóch nukleotydów – tyminy i guaniny – w kodonie 61, zidentyfikowana wcześniej u homozygotycznej pacjentki opisanej przez Matthews i współpracowników. Mimo, iż brak jest dowodów na pokrewieństwo obu pacjentek, przypuszcza się, że mogły wywodzić się od wspólnego przodka. W allelu odziedziczonym od ojca obecna była substytucja tyminy na guaninę c.205T>G skutkująca zamianą cysteiny (TGT) na glicynę (GGT) w kodonie 51 (Cys51Gly). Obie mutacje uniemożliwiały prawidłową heterodimeryzację podjednostki α i podjednostki β [37]. Pięć lat później zespół kierowany przez Lawrence C. Leyman'a opisał przypadek mutacji nonsensownej u homozygotycznego rodzeństwa – kobiety z częściowym rozwojem gruczołu piersiowego oraz mężczyzny z prawidłowym dojrzewaniem płciowym i azoospermią. Mutacja polegała na substytucji cytozyny na adeninę c.282C>A w eksonie 3, czego efektem było wystąpienie kodonu terminacyjnego w miejscu kodonu TAC (tyrozyna) w pozycji 76 łańcucha polipeptydowego (Tyr76X) [38]. Natomiast pierwszy przypadek niedoboru hormonu folikulotropowego u pacjenta płci męskiej został opisany przez Göran Lindstedt i współpracowników w 1998 r. Dotyczył on mężczyzny z prawidłowym dojrzewaniem płciowym i wirylicacją oraz prawidłowym popędem płciowym i libido. Pacjent zgłosił się po pomoc lekarską z powodu niepłodności. Przeprowadzone badania wykazały azoospermię, niski poziom inhibiny B oraz niewykrywalny w surowicy poziom hormonu folikulotropowego. Analiza eksonu 3 genu *FSHB* ujawniła substytucję tyminy na cytozynę c.298T>C, skutkującą zamianą cysteiny na argininę w pozycji 82 łańcucha polipeptydowego (Cys82Arg). Mutacja uniemożliwiała wytworzenie pierwszego mostka dwusiarczkowego w łańcuchu β folikulotropiny, powodując tym samym zaburzenia w jego strukturze trzeciorzędowej, wzmoczoną degradację,

niezdolność do heterodimeryzacji i nieprawidłową glikozylację, uniemożliwiając tym samym powstanie funkcjonalnego hormonu [39]. Kolejną mutację typu missense stanowi substytucja tyminy na cytozynę c.364T>C zidentyfikowana u młodego mężczyzny z izolowanym niedoborem FSH. Mutacja skutkowała zamianą cysteiny na argininę w pozycji 104 Cys104Arg. Fenotyp pacjenta obejmował niewykrywalny poziom FSH, zmniejszoną liczbę komórek Sertolego, hiperplazję komórek Leydiga oraz zmniejszoną objętość jąder [40]. Ostatnią znaną mutacją w genie *FSHB* jest substytucja cytozyny na tyminę (c.343C> T), powodująca zamianę argininy na kodon terminacyjny w pozycji 97 (Arg97X), a tym samym powodująca powstanie skróconego łańcucha polipeptydowego FSHB. Została ona opisana u pacjenta cierpiącego na bezpłodność, u którego dodatkowo stwierdzono występowanie wnetrostwa [41].

6. Podsumowanie

Ze względu na kluczową rolę hormonów gonadotropowych w rozwoju i regulacji funkcji rozrodczych, mutacje genów kodujących podjednostki hormonów gonadotropowych zaliczane są do niezwykle rzadkich. Mimo, że nie stanowią one powszechnego problemu klinicznego, ich potencjalna obecność powinna być rozważana w trakcie diagnostyki różnicowej opóźnionego dojrzewania płciowego, zaburzeń rozwoju płciowego oraz bezpłodności. Występowanie mutacji stwierdzono zarówno u mężczyzn, jak i u kobiet. Wszystkie dotychczas opisane mutacje miały charakter inaktywujący, wobec czego skutkowały utratą funkcji białka. Fenotyp pacjentów dotkniętych mutacjami w genie kodującym podjednostkę β hormonu luteinizującego obejmuje bezpłodność oraz hipogonadyzm. Z kolei pacjenci z mutacjami w genie kodującym podjednostkę β hormonu folikulotropowego charakteryzują się izolowanym niedoborem FSH oraz bezpłodnością.

Literatura

1. Themmen APN, Huhtaniemi IT. *Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: Elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary – gonadal function*, Endocrine Reviews, 21, (2000), s. 551-583.
2. Mullen MP, Cooke DJ, Crow MA. *Structural and Functional Roles of FSH and LH as Glycoproteins Regulating Reproduction in Mammalian Species*, [w:] Vizcarra J. (red.), Gonadotropin, InTech, 2013.
3. Salvi R, Pralong FP. *Molecular characterization and phenotypic expression of mutations in genes for gonadotropins and their receptors in humans*. [w:] Quinton R. (red.), Kallmann Syndrome and Hypogonadotropic Hypogonadism, Karger, 2010.
4. Chappel SC, Ulloa-Aguirre A, Coutifaris C. *Biosynthesis and secretion of follicle-stimulating hormone*. Endocrine Reviews, 4, (1983), s. 179-211.
5. Kumar TR, Wang Y, Lu N, Matzuk MM. *Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility*. Nature Genetics, 15, (1997), s. 201-204.
6. Rose MP, Das REG, Balen AH. *Definition and Measurement of Follicle Stimulating Hormone*. Endocrine Reviews, 21, (2000), s. 5-22.
7. Sun L, Peng Y, Sharrow AC, Iqbal J, Zhang Z, Papachristou DJ, Zaidi S, Zhu LL, Yaroslavskiy BB, Zhou H, Zallone A, Sairam MR, Kumar TR, Bo W, Braun J, Cardoso-Landa L, Schaffler MB, Moonga BS, Blair HC, Zaidi M. *FSH Directly Regulates Bone Mass*. Cell, 125, (2006), s. 247-260.
8. Méduri G, Charnaux N, Driancourt MA, Combettes L, Granet P, Vannier B, Loosfelt H, Milgrom E. *Follicle-Stimulating Hormone Receptors in Oocytes?* Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 87, (2002), s. 2266-2276.

9. Casarini L, Lispi M, Longobardi S, Milosa F, La Marca A, Tagliasacchi D, Pignatti E, Simoni M. *LH and hCG Action on the Same Receptor Results in Quantitatively and Qualitatively Different Intracellular Signalling*. PLoS One, 7, (2012).
10. Birken S, Maydelman Y, Gawinowicz MA, Pound A, Liu Y, Hartree AS. *Isolation and characterization of human pituitary chorionic gonadotropin*. Endocrinology, 137, (1996), s. 1402-1411.
11. Kayisli UA, Selam B, Guzeloglu-Kayisli O, Demir R, Arici A. *Human Chorionic Gonadotropin Contributes to Maternal Immunotolerance and Endometrial Apoptosis by Regulating Fas-Fas Ligand System*. The Journal of Immunology, 171, (2003), s. 2305-2313.
12. Bousfield GR, Dias JA. *Synthesis and secretion of gonadotropins including structure-function correlates*. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders, 12, (2011), s. 289-302.
13. Ben-Menahem D. *Single chain variants of the glycoprotein hormones and their receptors as tools to study receptor activation and for analogue design*. Journal of Neuroendocrinology, 16, (2004), s. 171-177.
14. Głodek A, Kubiczak M, Urbaniak P, Walkowiak G, Nowak-Markwitz E, Jankowska A. *Ludzka gonadotropina kosmówkowa – znany hormon o nieznanym funkcjach*. Ginekologia Polska, 83, (2012), s. 766-771.
15. Ulloa-Aguirre A, Dias JA, Bousfield GR. *Gonadotropins and the Importance of Glycosylation*. [w:] Walsh G. (red.), Post-translational Modification of Protein Biopharmaceuticals, Wiley-Blackwell, 2009, s. 109-147.
16. Lalli E, Sassone-Corsi P. *Signal transduction and gene regulation: The nuclear response to cAMP*. Journal of Biological Chemistry, 269, (1994), s. 17359-17362.
17. Counis R, Jutisz M. *Regulation of pituitary gonadotropin gene expression outline of intracellular signaling pathways*. Trends in Endocrinology and Metabolism, 2, (1991), s. 181-187.
18. Gharib SD, Roy A, Wierman ME, Chin WW. *Isolation and characterization of the gene encoding the beta-subunit of rat follicle-stimulating hormone*. DNA, 8, (1989), s. 339-349.
19. Nagirnaja L, Rull K, Uusküla L, Hallast P, Grigorova M, Laan M. *Genomics and genetics of gonadotropin beta-subunit genes: Unique FSHB and duplicated LHB/CGB loci*. Molecular and Cellular Endocrinology, 329, (2010), s. 4-16.
20. Nishimura R, Shin J, Ji I, Middaugh CR, Kruggel W, Lewis RV, Ji TH. *A single amino acid substitution in an ectopic alpha subunit of a human carcinoma choriogonadotropin*. The Journal of Biological Chemistry, 261, (1986), s. 10475-10477.
21. Zhang H, Liu Y, Su D, Yang Y, Bai G, Tao D, Ma Y, Zhang S. *A single nucleotide polymorphism in a miR-1302 binding site in CGA increases the risk of idiopathic male infertility*. Fertility and Sterility, 96, (2011), s. 34-39.
22. Nagirnaja L, Venclovas Č, Rull K, Jonas KC, Peltoketo H, Christiansen OB, Kairys V, Kivi G, Steffensen R, Huhtaniemi IT, Laan M. *Structural and functional analysis of rare missense mutations in human chorionic gonadotrophin β -subunit*. Molecular Human Reproduction, 18, (2012), s. 379-390.
23. Axelrod L, Neer RM, Kliman B. *Hypogonadism in a Male with Immunologically Active, Biologically Inactive Luteinizing Hormone: An Exception to a Venerable Rule*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 48, (1979), s. 279-287.
24. Weiss J, Axelrod L, Whitcomb RW, Harris PE, Crowley WF, Jameson JL. *Hypogonadism Caused by a Single Amino Acid Substitution in the Beta Subunit of Luteinizing Hormone*. New England Journal of Medicine, 326, (1994), s. 179-183.
25. Valdes-Socin H, Salvi R, Daly AF, Gaillard RC, Quatresooz P, Tebeu PM, Pralong FP, Beckers A. *Hypogonadism in a Patient with a Mutation in the Luteinizing Hormone Beta-Subunit Gene*. New England Journal of Medicine, 351, (2004), s. 2619-2625.
26. Furui K, Sukanuma N, Tsukahara S, Asada Y, Kikkawa F, Tanaka M, Ozawa T, Tomoda Y. *Identification of two point mutations in the gene coding luteinizing hormone*

- (LH) β -subunit, associated with immunologically anomalous LH variants. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 78, (1994), s. 107-113.
27. Liao WX, Roy AC, Chan C, Arulkumaran S, Ratnam SS. *A new molecular variant of luteinizing hormone associated with female infertility*. *Fertility and Sterility*, 69, (1998), s. 102-106.
 28. Jiang M, Lamminen T, Pakarinen P, Hellman J, Manna P, Herrera RJ, Huhtaniemi I. *A novel Ala(-3)Thr mutation in the signal peptide of human luteinizing hormone beta-subunit: potentiation of the inositol phosphate signalling pathway and attenuation of the adenylate cyclase pathway by recombinant variant hormone*. *Molecular Human Reproduction*, 8, (2002), s. 201-212.
 29. Song JW, Hwang HJ, Lee CM, Park GH, Kim CS, Lee SJ, Ihm SH. *Hypogonadotrophic hypogonadism due to a mutation in the luteinizing hormone β -subunit gene*. *Korean Journal of Internal Medicine*, 32, (2017), s. 1-4.
 30. Basciani S, Watanabe M, Mariani S, Passeri M, Persichetti A, Fiore D, Scotto d'Abusco A, Caprio M, Lenzi A, Fabbri A, Gnassi L. *Hypogonadism in a patient with two novel mutations of the luteinizing hormone β -subunit gene expressed in a compound heterozygous form*. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 97, (2012), s. 3031-3038.
 31. Schumacher M, Kuttent F, Touraine P, Misrahi M. *Normal Spermatogenesis in a Man with Mutant Luteinizing Hormone*. *The New England Journal of Medicine*, 361, (2009), s. 1856-1863.
 32. Potorac I, Rivero-Müller A, Trehan A, Kielbus M, Jozwiak K, Pralong F, Hafidi A, Thiry A, Ménagé JJ, Huhtaniemi I, Beckers A, Daly AF. *A vital region for human glycoprotein hormone trafficking revealed by an LHB mutation*. *Journal of Endocrinology*, 231, (2016), s. 197-207.
 33. Lofrano-Porto A, Barra GB, Giacomini LA, Nascimento PP, Latronico AC, Casulari LA, da Rocha Neves Fde A. *Luteinizing Hormone Beta Mutation and Hypogonadism in Men and Women*. *The New England Journal of Medicine*, 357, (2007), s. 897-904.
 34. Matthews CH, Borgato S, Beck-Peccoz P, Adams M, Tone Y, Gambino G, Casagrande S, Tedeschini G, Benedetti A, Chatterjee VK. *Primary amenorrhoea and infertility due to mutation in the B-subunit of folliclestimulating hormone*. *Nature Genetics*, 5, (1993), s. 83-86.
 35. Kottler ML, Richard N, Chabre O, Alain S, Young J. *FSH β gene mutation in a female with delayed puberty and hypogonadism: Response to recombinant human FSH*. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 47, (2009), s. 55-58.
 36. Kottler ML, Chou YY, Chabre O, Richard N, Polge C, Brailly-Tabard S, Chanson P, Guiochon-Mantel A, Huhtaniemi I, Young J. *A new FSH β mutation in a 29-year-old woman with primary amenorrhea and isolated FSH deficiency: Functional characterization and ovarian response to human recombinant FSH*. *European Journal of Endocrinology*, 162, (2010), s. 633-641.
 37. Layman LC, Lee EJ, Peak DB, Namnoum AB, Vu KV, van Lingen BL, Gray MR, McDonough PG, Reindollar RH, Jameson JL. *Delayed puberty and hypogonadism caused by mutations in the follicle-stimulating hormone betasubunit gene*. *The New England Journal of Medicine*, 337, (1997), s. 607-611.
 38. Layman LC, Porto AL, Xie J, da Motta LA, da Motta LD, Weiser W, Sluss PM. *FSHB gene mutations in a female with partial breast development and a male sibling with normal puberty and azoospermia*. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87, (2002), s. 3702-3707.
 39. Lindstedt G, Nyström E, Matthews C, Ernest I, Janson PO, Chatterjee K. *Follitropin (FSH) deficiency in an infertile male due to FSH β gene mutation. A syndrome of normal puberty and virilization but underdeveloped testicles with azoospermia, low FSH but high lutropin and normal serum testosterone concentrations*. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 36, (1998), s. 663-665.

40. Şimşek E, Montenegro LR, Binay C, Demiral M, Aclkalin MF, Latronico AC. *Clinical and hormonal features of a male adolescent with congenital isolated follicle-stimulating hormone deficiency*. Hormone Research in Paediatrics, 85, (2016), s. 207-212.
41. Zheng J, Mao J, Cui M, Liu Z, Wang X, Xiong S, Nie M, Wu X. *Novel FSH β mutation in a male patient with isolated FSH deficiency and infertility*. European Journal of Medical Genetics, 60, (2017), s. 335-339.

Mutacje genów kodujących hormony gonadotropowe

Streszczenie

Rodzina hormonów gonadotropowych obejmuje hormon luteinizujący (LH) oraz hormon folikulo-tropowy (FSH) wytwarzane przez komórki gonadotropowe przedniego płata przysadki, a także ludzką gonadotropinę kosmówkową, która (w przeciwieństwie do LH i FSH) produkowana jest przez łożysko w okresie prenatalnym. FSH i LH odgrywają kluczową rolę w regulacji funkcji rozrodczych zarówno u mężczyzn, jak i u kobiet. Hormon folikulo-tropowy jest niezbędny do wytwarzania estradiolu i do spermatogenezy. Hormon luteinizujący jest z kolei konieczny do prawidłowego rozwoju męskich wtórnych cech płciowych i do dojrzewania u mężczyzn, podczas gdy u kobiet odpowiedzialny jest za owulację, luteinizację i tworzenie ciała żółtego oraz za produkcję progesteronu. Ludzka gonadotropina kosmówkowa sprzyja utrzymaniu czynności ciała żółtego i wytwarzaniu progesteronu podczas ciąży.

Mutacje w genach kodujących hormony gonadotropowe (*LHB*, *FSHB*, *CGB*, *CGA*) należą do niezwykle rzadkich, jednak ich obecność może wiązać się z wystąpieniem objawów takich jak bezpłodność, brak miesiączki czy hipogonadyzm hipogonadotropowy. Następstwa mutacji zależą od ich charakteru (aktywującego i inaktywującego) oraz od płci osoby, u której dana mutacja występuje.

Celem niniejszej pracy jest omówienie dotychczas odkrytych mutacji w genach kodujących hormony gonadotropowe oraz wyjaśnienie ich wpływu na fenotyp obserwowany u pacjentów.

Słowa kluczowe: gonadotropiny, LH, FSH, hCG, mutacje.

Mutations in the genes encoding gonadotropins

Abstract

The gonadotropin hormone family consists of luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) produced by the gonadotrophic cells of the anterior pituitary gland, as well as of human chorionic gonadotropin which (unlike LH and FSH), is produced by the placenta during the prenatal period. FSH and LH play a key role in the regulation of reproductive functions in both men and women. Follicle-stimulating hormone is essential for the production of estradiol and for spermatogenesis. Luteinizing hormone is in turn necessary for appropriate development of male secondary sexual characteristics and for maturation in men, whereas in women it is responsible for ovulation, luteinization and creation of the luteum and for production of progesterone. Human chorionic gonadotrophin supports the maintenance of corpus luteum function and the production of progesterone during pregnancy.

Mutations in genes encoding gonadotropic hormones (*LHB*, *FSHB*, *CGB*, *CGA*) are extremely rare, but their presence may be associated with the onset of symptoms such as infertility, amenorrhea and hypogonadotropic hypogonadism. The consequences of the mutations depend on their character (activating and inactivating) and on the sex of the person in whom the mutation occurs.

The aim of this study is to discuss the so far discovered mutations in genes encoding gonadotropic hormones and to explain their impact on the phenotype observed in patients.

Keywords: gonadotropins, LH, FSH, hCG, mutations.

Optymalizacja metody przedwczesnej kondensacji chromatyny w kontekście wpływu różnych czynników na radiowrażliwość pacjentów

1. Wprowadzenie

Od kilku lat w Instytucie Fizyki Jądrowej im. Henryka Niewodniczańskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie prowadzone są badania, których celem jest zwiększenie skuteczności leczenia chorób nowotworowych przy zastosowaniu wiązki protonów o energii 60 MeV wytwarzanych w cyklotronach AIC-144 oraz Proteus C-235. Na potrzeby optymalizacji tego procesu analizuje się skutki wywołane przez promieniowanie zarówno na poziomie komórkowym, jak i całego organizmu. Należy także uwzględnić indywidualną radiowrażliwość pacjentów oraz czynniki mające na nią wpływ [1]. W tym celu wykorzystywane są m. in. różne techniki obrazowania, metody biologiczne oraz metody z zakresu retrospektywnej dozymetrii biologicznej.

Uwzględnienie radiowrażliwości pacjentów w radioterapii jest trudnym zadaniem, ponieważ zarówno komórki nowotworowe, jak i prawidłowe tych samych narządów wśród różnych pacjentów wykazują różnice w odpowiedzi na promieniowanie oraz może się ona zmieniać w toku radioterapii [2]. Aby osiągnąć największą efektywność w minimalizacji skutków ubocznych wymagana jest zindywidualizowana terapia [1].

Celem niniejszej pracy było przeprowadzenie przeglądu literatury na temat wpływu różnych czynników na radiowrażliwość pacjentów, oraz opisanie metod stosowanych w dozymetrii biologicznej, w tym szczególnie metody PCC (przedwczesnej kondensacji chromatyny) ze względu na to, że można ją stosować do oceny odpowiedzi komórek zarówno na niskie, jak i wysokie dawki promieniowania. Wśród czynników wpływających na radiowrażliwość uwzględniono czynniki fizyczne, chemiczne i biologiczne. Autorka ma na uwadze fakt, że niniejsza praca może nie uwzględniać wszystkich czynników, niemniej jednak starano się nakreślić ich podstawowe grupy oraz wskazać złożoność tej dziedziny. Lista czynników wpływających na radiowrażliwość wciąż pozostaje otwarta, jak również mechanizmy w nią zaangażowane [3].

¹ karolina.rychtyk@student.uj.edu.pl, Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej, Uniwersytet Jagielloński, Zakład Fizyki Doświadczalnej Układów Złożonych, Instytut Fizyki Jądrowej im. H. Niewodniczańskiego PAN.

² justyna.miszczuk@ifj.edu.pl, Zakład Fizyki Doświadczalnej Układów Złożonych, Instytut Fizyki Jądrowej im. H. Niewodniczańskiego PAN.

2. Ocena radiowrażliwości pacjentów z wykorzystaniem metod z zakresu retrospektywnej dozymetrii biologicznej

Istnieje wiele metod służących do oceny wywołanych skutków biologicznych na poziomie komórkowym oraz całego organizmu. Zastosowanie takich metod pozwala również na ocenę radiowrażliwości komórkowej i osobniczej. Wśród takich metod można wymienić: analizę częstości chromosomów dicentrycznych – test DC (ang. *dicentric analysis*), analiza częstości translokacji z wykorzystaniem metody FISH (ang. *fluorescent in situ hybridization*), analiza częstości występowania mikrojąder – test MN (ang. *micronucleus test*) oraz analiza nadmiarowych fragmentów chromosomów w komórkach – test PCC (ang. *premature chromosome condensation*) [3].

Test DC uważany jest za tzw. „złoty standard” metod biodozymetrycznych, ponieważ jest on najbardziej specyficznym oraz wrażliwym indykatorem dawki w przypadku napromieniowania [4]. Ze względu na to, że chromosomy dicentryczne znajdują się we krwi przez stosunkowo długi czas (średnio 3,5-5 lat) możliwe jest oszacowanie otrzymanej dawki nawet kilka lat po napromieniowaniu [5]. Ocenę radiowrażliwości przeprowadza się w oparciu o analizę częstości występowania aberracji chromosomowych, a następnie sporządza się krzywą dawka – efekt [6].

Fluorescencyjną hybrydyzację *in situ* stosuje się głównie w celu detekcji translokacji. W metodzie tej stosuje się specyficznie wyznakowane sondy molekularne, czyli sekwencje kwasów nukleinowych związane z fluoroforami. Takie sondy stosuje się w celu związania do poszukiwanego komplementarnego odcinka DNA [3].

W teście MN analizuje się częstość występowania mikrojąder, które mogą powstawać po ekspozycji na różne czynniki, m.in. promieniowanie jonizujące. Częstość występowania mikrojąder zwiększa się wraz ze wzrostem dawki promieniowania, dlatego ten test jest stosowany w celu badania radiowrażliwości komórkowej [7]. W teście CBMN (ang. *cytokinesis-block micronucleus assay*) używa się substancji hamującej cytokinezę – cytochalazynę-B, w ten sposób możliwe jest zobrazowanie komórek dwujądrowych, a w nich charakterystycznych mikrojąder [6].

3. Przedwczesna kondensacja chromatyny

Metoda PCC polega na pobudzeniu do kondensacji chromatyny w komórkach znajdujących się w różnych fazach cyklu komórkowego. Ze względu na niski indeks mitotyczny niektórych napromienionych komórek metoda PCC jest bardzo skutecznym narzędziem używanym w biodozymetrii, gdyż możemy analizować uszkodzenia komórek znajdujących się we wszystkich fazach, oprócz fazy S [8]. Znane są dwie wersje tej metody: poprzez fuzję z komórkami CHO (ang. *chinese hamster ovary* – linia komórkowa uzyskana z komórek jajników chomika chińskiego) oraz chemiczna, które zostaną scharakteryzowane poniżej.

3.1. Fuzja mitotyczna z użyciem komórek CHO

W metodzie fuzji mitotycznej wykonuje się fuzję komórek, w których chcemy wywołać kondensację chromatyny z komórkami znajdującymi się w fazie mitozy, najczęściej stosuje się komórki CHO. Stosuje się również czynnik ułatwiający fuzję komórek, czyli PEG (ang. *polyethylene glycol* – glikol polietylenowy).

Badania naukowe wykazały, że wiele związków chemicznych ma kluczową rolę w mechanizmie PCC, jednak dokładny mechanizm tej metody nie jest znany. Jednym z nich jest kompleks MPF (ang. *mitosis/maturation promoting factor* – czynnik indukujący mitozę/dojrzwianie), który jest enzymem indukującym mechanizm PCC, pełni on również ważną rolę w regulacji cyklu komórkowego oraz kontroluje wzrost komórki. Aktywacja kompleksu rozpoczyna się na etapie mitozy, a akumulacja powoduje przedwczesną kondensację chromatyny. Zastosowanie PEG oraz komórek znajdujących się w fazie mitozy powoduje to, że jądro znajdujące się w interfazie cyklu komórkowego jest narażone na działanie zaktywowanej formy kompleksu MPF, co w konsekwencji doprowadza do rozpuszczenia otoczki jądrowej i przedwczesnej kondensacji chromatyny [9].

3.1.1. PCC indukowane chemicznie

Przedwczesna kondensacja chromatyny może zostać uzyskana przez zastosowanie związków chemicznych takich jak kalikulina-A oraz kwas okadajowy, które można wyizolować z gąbek morskich, odpowiednio *Discodermia calyx* oraz *Hali-chondria melanodocia* [9]. Dokładny mechanizm przebiegu przedwczesnej kondensacji chromatyny indukowanej chemicznie nie jest znany, ale prawdopodobnie bierze w nim udział kompleks MPF oraz białko kontroli cyklu komórkowego cdc25, które odpowiedzialne jest za regulację rozpoczęcia mitozy. Cdc25 jest fosfatazą tyrozynową, która aktywuje kompleks MPF poprzez fosforylację reszty tyrozynowej. Kwas okadajowy oraz kalikulina-A są specyficznymi inhibitorami PP1 oraz PP2A, czyli odpowiednio fosfatazy białkowej 1 i 2, które są wrażliwe na aktywność białka cdc25. Mogą one mieć wpływ na aktywność białka cdc25 oraz kompleksu MPF i ostatecznie sprzyjać przedwczesnemu zajściu mitozy. Zaktywowany kompleks MPF może wpływać na rozpoczęcie przedwczesnej kondensacji chromatyny [10].

4. Czynniki wpływające na radiowrażliwość pacjentów

4.1. Czynniki fizyczne

4.1.1. Liniowy transfer energii

W radioterapii stosuje się różnego typu promieniowanie, np. promieniowanie X, γ (^{60}Co , ^{137}Cs), lekkie cząstki: np. protony oraz ciężkie cząstki: np. jony węgla. Lekkie i ciężkie cząstki powodują większy efekt biologiczny niż promieniowanie X i gamma [7]. Różnice w jonizacji cząstek na jednostkę przebytej drogi opisuje LET (ang. *linear energy transfer* – liniowy transfer energii). Ciężkie cząstki charakteryzują się wysokimi wartościami LET, deponowaniem energii w „dyskretnych paczkach”, oraz tym że jonizują środowisko w sposób nieprzypadkowy, w odróżnieniu od promieniowania o niskim LET [6].

4.1.2. Moc dawki

Moc dawki definiuje się jako ilość podanej dawki na jednostkę czasu. Jest ona kluczowym czynnikiem determinującym wywołany efekt na komórki. Większa moc dawki powoduje zwiększenie uszkodzeń komórek [11]. W przypadku mniejszej mocy dawki głównymi obserwowalnymi uszkodzeniami są pojedyncze zerwania nici DNA, dlatego też istnieje większe prawdopodobieństwo ich naprawy. Natomiast dla

dużych mocy dawek naprawa uszkodzeń jest trudna, ponieważ jonizacja następuje częściej, a uszkodzenia DNA są bardziej złożone [11]. Badania wykazały, że zastosowanie frakcjonowanej dawki powoduje to, że wywołany efekt będzie zredukowany w porównaniu do efektu od dawki podanej w jednej frakcji [12]. Efekt ten można wytłumaczyć tym, że pomiędzy frakcjami uszkodzenia DNA są naprawiane.

4.1.3. Typ stosowanego promieniowania

Indywidualna radiowrażliwość zależy również od typu stosowanego promieniowania. Istnieje różnica w radiowrażliwości i odpowiedzi komórek pochodzących od pacjentów naświetlanych jonami węgla C-13 oraz promieniowaniem gamma [12]. W przypadku uszkodzeń wywołanych jonami węgla istnieje mniejsze prawdopodobieństwo ich naprawy w porównaniu z uszkodzeniami utworzonymi po ekspozycji na taką samą dawkę promieniowania gamma, ponieważ występują one w postaci tzw. klastrów DSB. Z kolei badania dotyczące wpływu wiązki protonowej oraz promieniowania rentgenowskiego na przeżywalność komórek wykazały, że wiązka protonowa powoduje większą śmiertelność komórek niż promieniowanie X w zakresie dawek 0,3-4 Gy [13].

Stosowanie wiązki protonowej w radioterapii wymaga precyzyjnego pozycjonowania wiązki, jak również optymalizację dawki promieniowania. Maksymalna jonizacja w miejscu znajdowania się nowotworu oraz skuteczna ochrona prawidłowych komórek otaczających jest możliwa dzięki temu, że strata energii cząstki poruszającej się w ośrodku jest opisana krzywą Bragga, na której widoczny jest charakterystyczny pik zwany pikiem Bragga – w tym miejscu strata energii cząstki poruszającej się coraz wolniej jest największa.

4.1.4. Temperatura

Inkubacja badanego materiału w niskich temperaturach jest powszechną procedurą stosowaną m.in. w biologii molekularnej. W niskich temperaturach zahamowana jest m.in. naprawa DNA, synteza białek oraz cykl komórkowy [14]. W literaturze wprowadza się pojęcie tzw. „efektu temperaturowego”, który ochrania komórki przed skutkami wywołanymi ekspozycją na promieniowanie. W limfocytach krwi obiegowej efekt temperaturowy został zaobserwowany w przypadku mikrojąder, jednak nie zaobserwowano go w przypadku badania stopnia uszkodzenia DNA innymi testami z zakresu cytogenetyki [15]. Kolejnym parametrem wpływającym na radiowrażliwość jest konformacja chromatyny, która zależy od temperatury. Wykazano, że regiony w chromosomach posiadające bardziej skondensowaną strukturę chromatyny są mniej wrażliwe na promieniowanie gamma, niż regiony charakteryzujące się luźną strukturą chromatyny (wysoka ekspresja genów) [16].

Wiele badań wykazało również, że komórki nowotworowe charakteryzują się wyższą radiowrażliwością w wysokich temperaturach niż komórki prawidłowe [17]. W radioterapii stosuje się hipertermię komórek (zakres 39-45°C), w celu zwiększenia jej efektywności [18]. Zastosowanie wysokiej temperatury nie powoduje bezpośrednio powstania podwójnych uszkodzeń nici DNA, lecz zahamowanie systemu związanego z naprawą uszkodzeń DNA, m.in. wywołanych promieniowaniem jonizującym. Badania kliniczne wykazały również to, że hipertermia może działać jako czynnik powodujący zwiększenie skuteczności radioterapii oraz chemioterapii

[19]. Jedną z hipotez wyjaśniających ten efekt jest taka, że hipertermia powoduje zwiększony przepływ krwi w komórkach nowotworowych, czyli skutkiem tego jest dotlenienie komórek, a to powoduje zwiększenie zasięgu działania promieniowania oraz chemioterapeutyków stosowanych w chemioterapii [20].

4.2. Czynniki chemiczne

4.2.1. Efekt tlenowy

Tlen jest ważnym czynnikiem chemicznym, który powoduje zwiększenie wrażliwości komórek na promieniowanie, co powoduje modyfikację odpowiedzi komórek. Komórki, które zawierają różną ilość tlenu, w warunkach zmniejszonej lub zwiększonej zawartości tlenu reagują w odmienny sposób na promieniowanie. Skutkiem tego są różnice w powstałych uszkodzeniach materiału genetycznego.

Efekt ten tłumaczy się tak zwaną „hipotezą utrwalenia tlenowego”, dotyczącą tego, że tlen oraz CRP (ang. chemical radioprotectors – chemiczne związki chroniące przed promieniowaniem) – np. cysteina, konkurują o DNA• (rodnik), które jest produktem radiolizy. Jeżeli tlen z powodzeniem wyprze CRP to w rezultacie powstanie zmieniona cząsteczka DNA, a uszkodzenie będzie utrwalone [21]. Gdy koncentracja tlenu w komórce zwiększy się, stanie się ona bardziej radiowrażliwa. Jest to ważny aspekt w planowaniu radioterapii, ponieważ pomiędzy frakcjami dawek podczas napromieniowania można utleniać komórki, aby stały się one bardziej radiowrażliwe [22].

4.2.2. Związki modyfikujące radiowrażliwość

Wyróżnia się kilka grup związków, które powodują zwiększenie wrażliwości na promieniowanie. Jedną z takich grup są nitroimidazole, do których należy m.in. 2-nitroimidazol. Główną cechą takich związków jest to, że wykazują podobne zachowanie do tlenu. Mogą zatem dyfundować przez naczynia krwionośne, a dzięki występowaniu pierścienia węglowodorowego docierają dalej niż tlen. Powoduje to, że więcej cząsteczek może znaleźć się w pobliżu niedotlenionych komórek nowotworowych [23].

Kolejną grupą związków są związki chroniące przed promieniowaniem. Stosuje się je w celu ochrony prawidłowych komórek przed uszkodzeniami radiacyjnymi. Do takich związków należą m.in. tiole, do których należy m.in. cysteamina. Dzięki temu, że w strukturze tioli występuje wolny atom siarki to konkurują one z tlenem cząsteczkowym o związanie wolnych rodników utworzonych w procesie radiolizy wody. Jeżeli tiol wyprze tlen to produktem reakcji z wolnymi rodnikami będą nieszkodliwe związki chemiczne takie jak siarka, azot i węgiel. W taki sposób nie dojdzie do powstania bardzo reaktywnego tlenu singletowego ($^1\text{O}_2$), który powoduje powstanie dużej ilości uszkodzeń komórek. Badania wykazały, że tiole wykazują większą ochronę przed promieniowaniem o niskim LET [23].

4.3. Czynniki biologiczne

4.3.1. Uszkodzenia i naprawa DNA

Uszkodzenia DNA mogą być spowodowane przez wiele czynników, nie tylko wskutek ekspozycji na promieniowanie, czy przez reaktywne formy tlenu, ale również przez zaburzenia mechanizmów służących do naprawy DNA. Skuteczne działanie systemów naprawczych powoduje zachowanie integralności genomu [24]. Występowanie jakichkolwiek defektów zaburzających działanie systemu może mieć wpływ na predyspozycje komórek do transformacji w komórki nowotworowe oraz na radiowrażliwość komórek [25].

Większość uszkodzeń DNA np. uszkodzenia zasad, bądź zerwanie pojedynczego łańcucha jest skutecznie naprawiane. Problemem są złożone uszkodzenia DNA tzw. klastry jonizacyjne. Jeżeli krótki łańcuch DNA zostanie „zaatakowany” przez kilka rodników to skutkiem tego może być powstanie kilku złożonych uszkodzeń DNA – złożone DSB (ang. double strand break – podwójne przerwanie nici) [7]. Wśród mechanizmów służących do naprawy podwójnych uszkodzeń nici (DSB) można wymienić: rekombinację homologiczną (ang. *homologous recombination*, HR), niehomologiczne łączenie końców (ang. *non-homologous end joining*, NHEJ) i dopasowanie pojedynczych nici DNA (ang. *single strand annealing*, SSA) [26]. Natomiast wśród mechanizmów służących do naprawy pojedynczych pęknięć nici (SSB) można wyróżnić naprawę usuniętej zasady (ang. *base excision repair*, BER), naprawę niekomplementarnego doboru zasad (ang. *mismatch repair*, MMR) oraz naprawę przez wycięcie nukleotydu (ang. *nucleotide excision repair*, NER).

4.3.2. Faza w cyklu komórkowym oraz rodzaj nowotworu

Radiowrażliwość komórek zależy również od fazy cyklu komórkowego. Badania wykazały, iż faza M i G2 są najbardziej wrażliwe, natomiast faza S i wczesna faza G1 najmniej [12]. Zwiększona przeżywalność komórek w fazie S jest związana z tym, że w tej fazie struktura chromatyny jest rozluźniona oraz występuje zwiększona naprawa za pomocą homologicznej rekombinacji, ponieważ jest wtedy obecna chromatyda siostrzana. Natomiast w przypadku fazy G1 nie występuje chromatyda siostrzana, dlatego naprawa DNA następuje na drodze homologicznej rekombinacji i uszkodzenia występują częściej [22].

Radiowrażliwość zależy również od typu tkanki, dlatego komórki nowotworowe będą wykazywały różną radiowrażliwość w zależności od tkanki jaką budują. W 1906 roku Bergonie i Tribondeau odkryli, że wrażliwość komórek na promieniowanie jest proporcjonalna do stopnia proliferacji oraz odwrotnie proporcjonalna do stopnia zróżnicowania komórek. Niezróżnicowane komórki posiadają wysoką zdolność do podziałów mitotycznych, dlatego są bardziej radiowrażliwe, dlatego tkanki bogate w aktywnie dzielące się komórki zazwyczaj wykazują wysoką radiowrażliwość. Przykładem tkanek i narządów charakteryzujących się wysoką radiowrażliwością są gruczoły płciowe, tkanka limfatyczna oraz tkanki płodu, natomiast małą radiowrażliwością – kości, tkanka tłuszczowa, tkanka mięśniowa [27].

Komórki nowotworowe charakteryzują się zaburzeniami w proliferacji i różnicowaniu komórek oraz zaburzeniami organizacji chromosomów i genomu. Wszystkie te czynniki wpływają na rozwój nowotworu oraz różny stopień odpowiedzi na

zastosowane leczenie w porównaniu do komórek prawidłowych [28]. Radiowrażliwość nowotworów nie zależy wyłącznie od typu histopatologicznego, ale również od stopnia zawartości tlenu w komórkach nowotworu, mechanizmów naprawczych DNA, fazy cyklu komórkowego w jakiej znajdują się komórki, a także od wielu innych czynników oraz mechanizmów nie poznanych do tej pory [27].

5. Podsumowanie

Wiele czynników biologicznych, fizycznych oraz chemicznych wpływa na zróżnicowaną odpowiedź organizmów na promieniowanie jonizujące, dlatego ważne jest stosowanie wielu metod z różnych dziedzin nauki w celu zrozumienia złożoności oddziaływania promieniowania na poziomie komórkowym, jak również całego organizmu. Jedną z takich metod jest PCC, która może być pomocna do oceny indywidualnej radiowrażliwości komórkowej oraz osobniczej w przypadku zastosowania niskich, bądź wysokich dawek promieniowania, jak również umożliwia skuteczne rozróżnienie struktury komórek znajdujących się w różnych fazach cyklu komórkowego po ekspozycji na promieniowanie jonizujące [3].

Zebrane i podsumowane dane literaturowe będą wykorzystywane w procesie opracowania i optymalizacji procedury PCC dla różnych scenariuszy zastosowań. Ponadto niniejszy artykuł pozwala na szersze podejście do problemu radiowrażliwości oraz opisuje najważniejsze czynniki mające na nią wpływ. W związku z tym, że prowadzonych jest wiele badań mających na celu zwiększenie skuteczności radioterapii oraz diagnostyki nowotworów autorzy starali się nakreślić złożoność problematyki, co może również przyczynić się w przyszłości do skuteczniejszej interpretacji uzyskanych wyników. Należy również podkreślić, iż niniejszy artykuł oraz praca [1] są jednymi z nielicznych, które zawierają szereg istotnych informacji na temat czynników wpływających na radiowrażliwość pacjentów oraz mechanizmów w nią zaangażowanych.

W przyszłości planuje się, aby uzyskane dane na temat radiowrażliwości komórkowej i osobniczej były wykorzystywane w planowaniu i przeprowadzaniu terapii protonowej w Centrum Cyklotronowym Bronowice w Krakowie.

6. Podziękowania

Praca powstała w ramach projektu: „Opracowanie i optymalizacja metody PCC dla potrzeb stosowania na stanowisku radioterapii protonowej Centrum Cyklotronowego Bronowice”, umowa nr UMO- 2013/09/D/NZ7/00324 do wniosku nr 2013/09/D/NZ7/00324 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki (NCN), konkurs SONATA na lata 2014-2017.

Literatura

1. Rychtyk K., *Opracowanie metody PCC (Przedwczesnej Kondensacji Chromatyny) w kontekście wpływu różnych czynników na radiowrażliwość pacjentów*, Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, 2017.
2. Wang W., Lang J., *Strategies to optimize radiotherapy based on biological responses of tumor and normal tissue (Review)*, *Experimental and Therapeutic Medicine*, t. 4, nr 2, (2012), s. 175-180.
3. Miszczak J., Burkat A., Rawojć K., *Przedwczesna kondensacja chromatyny i inne wybrane metody oceny radiowrażliwości komórkowej i osobniczej, Zastosowanie*

wybranych nowoczesnych metod w biologii i medycynie – spojrzenie młodych naukowców, [w:] Karkowska-Kuleta J. i Miszczyk J. (red.), Creativetime, Kraków, 2017, s. 31-38.

4. Romm H., Oestreicher U., Kulka U., *Cytogenetic damage analysed by the dicentric assay*, *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, t. 45, nr 3, (2009), s. 251-259.
5. National Research Council, *Evaluation of Portsmouth Naval Shipyard Cytogenetics and Spermatogenesis Protocol*, The National Academies Press, Waszyngton, DC, 1982.
6. IAEA, *Cytogenic Dosimetry: Applications in preparedness for and response to radiation emergencies*, Wiedeń, 2011.
7. Joiner M. i Kogel A., *Basic Clinical Radiobiology Fourth Edition*, CRC Press, Abingdon, s. 375, 2009.
8. Miszczyk J., *Opracowanie metody PCC (Przedwczesnej Kondensacji Chromatyny) dla potrzeb radiobiologii, terapii i badania układów złożonych*, *Zagadnienia poruszane przez młodych naukowców*, t. 8, (2016), s. 87-88.
9. Hatzi V., Terzoudi G., Paraskevopoulou C., Makropoulos V., Matthopoulos D., Pantelias G., *The use of premature chromosome condensation to study in interphase cells the influence of environmental factors on human genetic material*, *The Scientific World Journal*, t. 6, (2006), s. 1174-1190.
10. Gotoh E., *Premature Chromosome Condensation (PCC): Tools in chromosome and cytogenetic research*, *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, t. 17, nr 11, (2013), s. 791-798.
11. Saha G., *Physics and Radiobiology of Nuclear Medicine*, Springer, Nowy Jork, 2006, s. 320.
12. Hall E., Giaccia A., *Radiobiology for the Radiologist*, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, 2012, s. 546.
13. Miszczyk J., Panek A., Rawojć K., Swakoń J., Prassana P., Rydgier M., Gałaś A., *Effects of 60 MeV Protons and 250 kV X-Rays on Cell Viability*, *Acta Physica Polonica A*, t. 129, nr 2, (2016), s. 222-225.
14. Fujita J., *Cold shock response in mammalian cells*, *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, t. 1, nr 2, (1999), s. 243-255.
15. Brzozowska K., Johannes C., Obe G., Hentschel R., Morand J., Moss R., Wittig A., Sauerwein W., Liniecki J., Szumiel I., Wojcik A., *Effect of temperature during irradiation on the level of micronuclei in human peripheral blood lymphocytes exposed to X-rays and neutrons*, *International Journal of Radiation Biology*, t. 85, nr 10, (2009), s. 891-899.
16. Falk M., Lukášová E., Kozubek S., *Chromatin structure influences the sensitivity of DNA to γ -radiation*, *Biochimica et Biophysica Acta*, t. 1783, nr 12, (2008), s. 2398-2414.
17. Dewey W., Hopwood L., Sapareto S., Gerweck L., *Cellular Responses to Combinations of Hyperthermia and Radiation*, *Radiology*, t. 123, nr 2, (1977), s. 463-474.
18. Hurwitz M. i Stauffer P., *Hyperthermia, radiation and chemotherapy: the role of heat in multidisciplinary cancer care*, *Department of Radiation Oncology Faculty Papers*, t. 69, 2014.
19. Kaur P., Hurwitz M., Krishnan S., Asea A., *Combined hyperthermia and radiotherapy for the treatment of cancer*, *Cancers*, t. 3, nr 4, (2011), s. 3799-3823.
20. Griffin R., Dings R., Jamshidi-Parsian A., Song C., *Mild temperature hyperthermia and radiation therapy: role of tumor vascular thermotolerance and relevant physiological factors*, *International Journal of Hyperthermia*, t. 26, nr 3, (2010), s.256-263.
21. Bertout J., Patel S., Simon M., *The impact of O₂ availability on human cancer*, *Nature Reviews Cancer*, t. 8, nr 12, (2008), s. 967-975.

22. Brehwens K., *In vitro and in vivo aspects of intrinsic radiosensitivity*, Department of Molecular Biosciences, The Wenner-Gren Institute, Sztokholm, 2014.
23. Washington C., Leaver D., *Principles and practice of radiation therapy*, Elsevier, 2016.
24. Iyama T. i Wilson D., *DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells*, DNA Repair, t. 12, nr 8, (2013), s. 620-636.
25. McKinnon P., Caldecott K., *DNA Strand Break Repair and Human Genetic Disease*, Annual Review of Genomics and Human Genetics, t. 8, nr 1, (2007), s. 37-55.
26. Popławski T., Błasiak J., *Naprawa DNA przez niehomologiczne łączenie końców*, Postępy biochemii, t. 51, nr 3, (2005), s. 328-338.
27. Hayabuchi N., *Radiocurable Tumors and Non-Radiocurable Tumors*, Japan Medical Association – Journal, t. 47, nr 2, (2004), s. 79-83.
28. El-Awady R., Dikomey E., Dahm-Daphi J., *Radiosensitivity of human tumour cells is correlated with the induction but not with the repair of DNA double-strand breaks*, British Journal of Cancer, t. 89, (2003), s. 593-601.

Optymalizacja metody przedwczesnej kondensacji chromatyny w kontekście wpływu różnych czynników na radiowrażliwość

Streszczenie

Radiobiologia jest interdyscyplinarną dziedziną nauki, która jest ściśle związana z szeregiem nauk, w tym fizyką medyczną, biologią i medycyną, oraz korzysta z wielu metod badawczych wykorzystywanych w tych dziedzinach w celu zwiększenia efektywności leczenia pacjentów z chorobą nowotworową. Zastosowanie promieniowania jonizującego w radioterapii pacjentów jest często stosowaną i efektywną metodą służącą do zniszczenia komórek nowotworowych, dlatego ważne jest scharakteryzowanie czynników wpływających na oddziaływanie promieniowania z materiałem biologicznym. Przeprowadzenie efektywnej radioterapii wiąże się z analizowaniem odpowiedzi organizmu człowieka na zastosowaną dawkę, zarówno przed, jak i w trakcie radioterapii. W celu zindywidualizowania radioterapii można wykorzystać szereg metod, natomiast materiałem wykorzystanym do badań mogą być limfocyty krwi obiegowej. Wśród metod służących do oceny skutku biologicznego stosowanego promieniowania uznaje się test DCA, FISH, CBMN oraz PCC. Celem niniejszej pracy jest scharakteryzowanie najważniejszych czynników mających wpływ na radiowrażliwość komórkowa i osobniczą pacjentów. Wśród takich czynników wyróżniono czynniki fizyczne, chemiczne oraz biologiczne. Zebrane dane będą wykorzystane w procesie opracowania i optymalizacji metody PCC dla różnych scenariuszy zastosowań oraz w planowaniu i przeprowadzaniu radioterapii protonowej Centrum Cyklotronowego Bronowice.

Słowa kluczowe: radiowrażliwość, radioterapia, metody cytogenetyczne, metoda PCC.

The optimization of PCC method (premature chromosome condensation) in context of different factors influenced radiosensitivity

Abstract

Radiobiology is an interdisciplinary field of science that is closely related to a number of sciences, including medical physics, biology and medicine, and uses many research methods that are used in these fields in case of increasing the effectivity of patient's treatment with cancer. The use of ionizing radiation in radiotherapy is the frequently used and effective method, therefore, it is important to characterize factors affecting the interaction of radiation with biological material. Individualized radiotherapy involves analyzing the response of the human body to the applied dose, both before and during radiotherapy. Among the methods used to assess the biological effect of the used radiation are: DCA, FISH, CBMN and PCC test. The aim of this study is to characterize the most important factors affecting the cellular and individual radiosensitivity of patients. Physical, chemical and biological factors were distinguished among such factors. The collected data will be used in the process of developing and optimizing the PCC method for various application, as well as in planning and performing proton radiotherapy at the Bronowice Cyclotron Center.

Keywords: radiosensitivity, radiotherapy, cytogenetic methods, PCC method.

Próby terapii genowej reumatoidalnego zapalenia stawów

1. Wprowadzenie

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) jest to przewlekła układowa choroba o podłożu autoimmunologicznym, dotykająca ok. 1% populacji światowej. Cechą charakterystyczną tej jednostki chorobowej jest przetrwałe, nieswoiste, symetryczne zapalenie błony maziowej stawów oraz liczne zmiany pozastawowe, prowadzące do niepełnosprawności, inwalidztwa, a nawet przedwczesnej śmierci. W wyniku choroby dochodzi do destrukcji stawu i kości oraz wielu powikłań narządowych. Najbardziej typowym objawem RZS jest narastający ból, sztywność poranna oraz obrzęki małych stawów, to wszystko wpływa na zdecydowane pogorszenie jakości życia chorych [1].

Niestety do dzisiaj nie poznano przyczyny reumatoidalnego zapalenia stawów. Wobec tego, dane piśmiennictwa coraz częściej koncentrują się na samej patogenezie RZS. Kładzie się nacisk na mechanizmy autoimmunizacyjne, gdzie główną rolę mają odgrywać aktywowane limfocyty T, makrofagi i komórki dendrytyczne, stanowiące źródło cytokin prozapalnych. Istotne znaczenie przypisuje się też limfocytom B jako bezpośrednio odpowiedzialnym za syntezę m.in. jednego z markerów immunologicznych RZS, czyli czynnika reumatoidalnego oraz pojawienie się specyficznych przeciwciał anty-cytrulinowych [1-5]. Niewątpliwie ważną rolę w rozwoju choroby odgrywają także czynniki genetyczne, ustalono, że ryzyko zachorowania na RZS jest kilkukrotnie wyższe u osób z ekspresją antygenów układu zgodności tkankowej klasy II (zwłaszcza HLA-DR1B). Wskazuje to, że zakażenia wirusowe i bakteryjne mogą w drodze reakcji krzyżowej uruchomić proces autoimmunizacji u predysponowanych genetycznie osób [1-5].

Postępy w zrozumieniu patofizjologii RZS doprowadziły do opracowania nowych strategii terapeutycznych, które jednak wciąż nie są wystarczająco efektywne. Mimo stosowania agresywnego leczenia konwencjonalnego, podawania przeciwzapalnych glikokortykosteroidów (GKS), innych leków immunosupresyjnych, leków modyfikujących przebieg choroby (LMPCh) w tym niebiologicznych i biologicznych nie udaje się skutecznie powstrzymać postępujących zmian stawowych, aż do całkowitego zniszczenia stawów [6]. Co więcej, standardowe podejścia terapeutyczne skutkują licznymi objawami ubocznymi. Chlorochina powoduje np. ciężkie zaburzenia czynności wątroby i narządu wzroku, może indukować łuszczycę lub upośledzać czynność

¹ ewelina.wedrowska@gmail.com Zakład Genoterapii, wydział lekarski, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy UMK w Toruniu

² mmch94@gmail.com Koło Naukowe Genoterapii, wydział lekarski, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy UMK w Toruniu

³ arkadiusz_goede@wp.pl Zakład Genoterapii, wydział lekarski, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy UMK w Toruniu

⁴ joanna.golinska@gmail.com Zakład Genoterapii, wydział lekarski, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy UMK w Toruniu

nerek [7]. Cyklosporyna prowadzi do nadciśnienia tętniczego, niewydolności nerek, a jej interakcji z innymi lekami często nie udaje się przewidzieć [8]. Leflunomid daje ciężkie zaburzenia odporności z infekcjami, zaburzeniami czynności szpiku, często prowadzi do pojawienia się lub zaostrzenia choroby śródmiąższowej płuc [9, 10]. Podobnie działa Metotreksat (MTX) z tym, że zmiany w dolnych drogach oddechowych pojawiają się bardzo często. Szkada posterydowa jest powszechnie znana i nie wymaga dłuższego opisu [8, 11]. Co istotne, podano tu wyłącznie wybrane przykłady, gdyż lista ubocznych działań tych bardzo silnie działających leków jest długa i niezbędne są prace nad nowymi terapeutykami, które wreszcie znacząco wpłyną na poprawę stanu pacjentów. Terapia genowa, wydaje się być obiecującą alternatywą.

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie najważniejszych przykładów zastosowania terapii genowej w przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów. Obecnie prowadzonych jest wiele obiecujących badań, wykorzystujących eksperymentalną terapię w leczeniu RZS, a zastosowanie celowanych technik genoterapii daje nowe możliwości i szansę na uzyskanie długotrwałych, zadowalających efektów.

2. Metody przeglądu

W niniejszej pracy, zaprezentowano współczesne trendy dotyczące prób eksperymentalnych terapii reumatoidalnego zapalenia stawów. Najwięcej publikowanych badań związanych jest z oddziaływaniem na równowagę pomiędzy cytokinami pro- i przeciwzapalnymi, inne skupiają się na zapobieganiu rozrostowi łuszczyki stawowej.

Przeglądu dokonano na podstawie szczegółowej analizy publikacji z kilku ostatnich lat, w tym artykułów eksperymentalnych, przeglądowych oraz informacji zamieszczonych na stronach internetowych dotyczących terapii reumatoidalnego zapalenia stawów. Materiały źródłowe wyszukiwano w języku polskim i angielskim w bazach PubMed, NCBI, Web of Science oraz w przeglądarce internetowej Google, posługując się następującymi słowami kluczowymi w obu językach: reumatoidalne zapalenie stawów, terapia genowa, cytokiny.

3. Terapia genowa

Terapia genowa polega na wyleczeniu lub poprawie stanu pacjenta przez wprowadzenie odpowiedniego materiału genetycznego do komórek docelowych. Można wprowadzać sekwencje kodujące brakujące geny tzw. technika suplementacyjna lub hamujące ekspresję niepożądanych genów – technika supresyjna [12-14]. W badaniach dotyczących RZS zastosowanie znajdują obie techniki. Istnieje wiele sposobów wprowadzania genów do komórek. W skrócie, odbywa się to najczęściej za pomocą odpowiednich nośników np. wektorów wirusowych, w tym retrowirusów, lentiwirusów i adenowirusów oraz wirusów adenosatelitarnych (AAV). Z powodzeniem stosowane są też nośniki niewirusowe np. lipidy i liposomy kationowe [12-16]. Terapię genową możemy zastosować *in vivo* lub *ex vivo*. Metoda *in vivo* zakłada bezpośrednie (np. dostawowe) wprowadzenie terapeutycznego genu do organizmu chorego. Najczęściej wykorzystuje się wektory wirusowe, czasami nośniki liposomowe. Strategia *ex vivo* obejmuje kilka etapów takich jak: pobranie komórek błony maziowej ze stawu chorego, prowadzenie hodowli *in vitro* i transfekcja, a po selekcji odpowiednio zmodyfikowane komórki ponownie podaje się choremu [15, 16].

Najważniejsze dla każdej planowanej terapii genowej jest ustalenie odpowiedniej sekwencji terapeutycznej, wybór wektora i opracowanie najefektywniejszej techniki wprowadzenia go do komórek docelowych.

Terapia może być prowadzona miejscowo (np. iniekcja do stawu) lub systemowo (np. dożylnie). Systemowa terapia genowa może też obejmować transfer genów do komórek, które syntetyzują produkt danego genu i wydzielają go do krążenia. Zaletą tego podejścia jest działanie ogólnoustrojowe i możliwość uzyskania efektu leczniczego w wielu stawach jednocześnie. Z kolei, wadą jest ryzyko niespecyficznego oddziaływania produktów terapeutycznych genów na niezmiennione chorobowo tkanki. Ekspozycja systemowa może również prowadzić do supresji immunologicznej w niespecyficzny sposób, zwiększając podatność na infekcję [12, 15].

W próbach terapii genowej reumatoidalnego zapalenia stawów badacze skupiają się na dwóch podstawowych podejściach, które mają na celu utrzymanie balansu pomiędzy cytokinami prozapalnymi i przeciwzapalnymi oraz hamowaniu przerostu inwazyjnej łuszczyki stawowej.

3.1. Utrzymanie równowagi cytokinowej

Cytokiny należą do najistotniejszych czynników zapalenia w przebiegu chorób o podłożu autoimmunologicznym. Nadprodukcja cytokin prozapalnych takich jak: czynnik martwicy nowotworów- α (TNF- α), interleukina-6 (IL-6) czy interleukina-1 (IL-1) czy interferon- γ (IFN- γ), wpływa na nasilenie miejscowej odpowiedzi immunologicznej, z kolei wytwarzanie cytokin przeciwzapalnych np. interleukina-4 (IL-4), interleukina-10 (IL-10), interferon- β (IFN- β) może ograniczać negatywne skutki przebiegu reakcji zapalnej i uszkodzenia stawów. Wiadomo więc, że niepohamowane wytwarzanie cytokin prozapalnych lub niedostateczna ilość białek przeciwzapalnych skutkuje zaburzeniem równowagi i prowadzi do nieprawidłowej nadaktywności układu immunologicznego, a w konsekwencji do rozwoju przewlekłego zapalenia stawów ze wszystkimi tego skutkami klinicznymi [3, 17].

Liczne badania wskazują na możliwość zastosowania technik terapii genowej w hamowaniu cytokin prozapalnych w przebiegu RZS. Najczęściej badacze próbują blokować ekspresję TNF- α , produkowanego przez aktywowane monocyty/makrofagi, synowioocyty typu A i B, neutrofile, a także reaktywne limfocyty T i B. Działa przez połączenie z receptorami typu I lub II. W RZS, TNF- α stymuluje proliferację limfocytów T i B, sekrecję cytokin typu Th1, produkcję metaloproteinaz (MMP), proteoglikanów, zwiększa cytotoksyczność komórek NK przyczyniając się do rozwoju zapalenia, hiperplazji synowium i degradacji chrząstki oraz pobudza neoangiogenezę. Ponadto wykazano, że TNF- α działając synergistycznie z IL-17 indukuje nadekspresję genu Amigo-2 – uznanego inhibitora apoptozy, promującego przeżywalność synowioocytów [3, 17].

Mimo, że immunoterapia blokująca TNF- α jest powszechnie stosowana, nie jest w pełni skuteczna (być może względu na farmakokinetykę leku i skutki uboczne długotrwałego przyjmowania).

Nowe rozwiązania wskazują badacze, którzy na modelu zwierzęcym RZS zastosowali wektor adenosatelitarny (AAV) kodujący rozpuszczalną formę receptora TNF typu II (sTNFR II) oraz elektortransfer plazmidowego DNA również

kodującego sTNFR^{II} i wstrzyknęli go bezpośrednio do stawów myszy doświadczalnych uzyskując w każdym nastrzykniętym stawie redukcję objawów zapalenia [18].

Pozytywne wyniki doświadczeń przedklinicznych umożliwiły podjęcie prób na ludziach i tak w badaniu klinicznym u 191 pacjentów z RZS zastosowano *in vivo* iniekcje dostawowe wektora AAV kodującego sekwencję genu fuzyjnego receptora TNFR^{II} i fragmentu Fc immunoglobuliny IgG1. Działanie terapeutyczne tak zaprojektowanej terapii polegało na utrzymaniu stabilnej ekspresji białka fuzyjnego w synowocytach i kompetycyjnym hamowaniu połączenia TNF- α z jego powierzchniowymi receptorami komórkowymi (TNFR), pozostawiając TNF- α biologicznie nieaktywnym. Ostatecznie uzyskano zadowalającą poprawę stanu zdrowia u ok. 40% badanych w porównaniu z chorymi otrzymującymi placebo [19].

Podobnie do TNF- α działa IL-1, która jest uważana obok TNF- α i IL-6 za główną prozapalną cytokinę w RZS bezpośrednio przyczyniając się do degradacji chrząstki i kości przez stymulację synowocytów fibroblastopodobnych i limfocytów do wytwarzania liganda receptora aktywującego jądrocy czynnik NF-KB (RANKL) oraz M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor), które bezpośrednio stymulują osteoklastogenezę. Badania wykazują, że blokowanie funkcji biologicznych IL-1 za pomocą wektora adenowirusowego kodującego rozpuszczalną formę receptora typu I dla IL-1 spowalnia procesy destrukcji stawu i ogranicza nacieki leukocytarne [20, 21].

W badaniu klinicznym zastosowano terapię genową *ex vivo*, polegającą na pobraniu komórek błony maziowej, transformowaniu ich retrowirusem kodującym antagonistę receptora IL-1 (IL-1Ra), który hamuje działanie IL-1 przez szybsze związanie do jej receptora. Następnie, tak przygotowane komórki z powrotem wstrzyknięto do stawów pacjentom z RZS. Zaobserwowano, zwiększone stężenie IL-1Ra, obniżone poziomy metaloproteinaz i IL-1 oraz odnotowano zmniejszenie ogólnych objawów zapalenia z stawach [22]. Taki sam zadowalający efekt uzyskano stosując terapię *in vivo* z użyciem wektora AAV kodującego IL-1Ra w szczurzym modelu reumatoidalnego zapalenia stawów [23].

Dodatkowo, wykazano, że zablokowanie interleukiny-17 i -18 za pomocą wektorów adenowirusowych zapobiegało lub znacznie opóźniało wystąpienie objawów RZS, a w mysim modelu wyeliminowało je całkowicie [24, 25].

Poza technikami wirusowymi z sukcesem przeprowadzono też próby blokowania cytokin prozapalnych: TNF- α , IL-1, IL-6, IL-18 na zwierzęcych modelach RZS stosując niewirusowe techniki transferu genów. Wykorzystano m.in. siRNA (small interfering RNA) czyli małe ok. 23nt dsRNA, które są komplementarne do mRNA blokowanych cytokin. siRNA wykorzystuje naturalny proces interferencji RNA w komórkach i hamuje ekspresję cytokin na etapie posttranskrypcyjnym, dzięki aktywności kompleksu enzymatycznego RISC degradującego związane mRNA. W celu dostarczenia cząsteczek siRNA do komórek posłużono się nośnikami w postaci lipidów kationowych. Efekty wyciszenia ekspresji prozapalnych cytokin w RZS były zadowalające jedynie przy zastosowaniu razem wszystkich 4 rodzajów siRNA, ponadto efekt terapeutyczny utrzymywał się stosunkowo krótko. Generalnie metody niewirusowe, w tym metody z wykorzystaniem siRNA, charakteryzują się słabszą wydajnością transfekcji i niższą krótkotrwałą ekspresją, ale za to zwykle nie są obciążone powikłaniami [12, 16, 26].

Innym podejściem do przywrócenia równowagi cytokinowej są strategie suplementujące cytokiny przeciwzapalne.

Przeprowadzono wiele prób, przede wszystkim na mysich modelach RZS uzyskując bardzo dobre wyniki w redukcji stanu zapalnego. Wykorzystywano m.in. wektory adenowirusowe kodujące: IL-4, IL-10 i IL-13 w monoterapii lub skojarzeniu, podawane zarówno dostawowo jak i dożylnie. Najlepsze wyniki uzyskiwano po transfekcji kilkoma wektorami jednocześnie, wskazywano na przesunięcie balansu cytokin na korzyść przeciwzapalnych, redukcję obrzęków i erozji chrzęstno-kostnych [27-30].

Duże nadzieje wiąże się z najnowszym badaniem klinicznym RZS opierającym się na suplementacji IFN- β . Działanie tej cytokiny jest wielowymiarowe. Po pierwsze, hamuje produkcję cytokin prozapalnych, takich jak: IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF- α , IL-1 (przez limfocyty pomocnicze Th1), pobudzając jednocześnie produkcję cytokin działających przeciwzapalnie, np. IL-10, IL-4 (przez limfocyty pomocnicze Th2). Po drugie, zmniejsza adhezję aktywowanych limfocytów T i ich migrację przez śródbłonek naczyń (przez obniżenie ekspresji MMP-9) oraz stymuluje supresorowe limfocyty CD8 $^{+}$, hamując nadmierną aktywność limfocytów pomocniczych CD4 $^{+}$ oraz makrofagów [31, 32].

Rekrutacja do badania klinicznego rozpoczęła się w lipcu 2017 r. Terapia polega na dostawowej iniekcji wektora adenosatelitarnego kodującego gen IFN- β pacjentom z RZS. Wcześniej opublikowano bardzo obiecujące wyniki przeprowadzonego w Holandii badania przedklinicznego na 24 małpach Rhesus (makak królewski) z zapaleniem stawów wyindukowanym kolagenem, którym do stawu wstrzykiwano pojedynczą dawkę wektora AAV-IFN- β lub placebo. Po 4 tygodniach dokonano oceny histopatologicznej i odnotowano wysoką ekspresję IFN- β , stabilizację lub zmniejszenie obrzęku, zatrzymanie destrukcji chrzęstno-kostnych i obniżenie stężeń cytokin prozapalnych [31, 32].

3.2. Hamowanie rozrostu łuszczyki stawowej

W przebiegu RZS, z czasem dochodzi do postępującego przerostu błony maziowej i powstaje tzw. łuszczyka stawowa, czyli ziarnina składająca się z nacieków komórek zapalnych i licznych nowopowstałych, drobnych naczyń [18, 33]. Utworzona łuszczyka może być przyczyną destrukcji sąsiadujących chrząstek i kości powodując dalszą deformację stawów.

Fizjologicznie warstwę powierzchniową błony maziowej stanowią tzw. synowioocyty o fenotypie fibroblastów i makrofagów [33]. Obecne są one także w zapalnej maziówce, ale wówczas mają znacznie wyższy potencjał proliferacyjny, większą inwazyjność i odporność na apoptozę [3].

Dlatego coraz częściej próbuje się wykorzystywać w leczeniu RZS zarówno antyangiogenną jak i proapoptotyczną terapię genową.

Podjęto próby terapii indukującej apoptozę synowioocytów w króliczym modelu RZS. Królikom (rasy nowozelandzki biały) w celu wyindukowania reumatoidalnego zapalenia stawów wstrzyknięto dostawowo uprzednio pobrane od nich i transformowane synowioocyty, tak że stale wytwarzały prozapalną IL-1 β (dowodzony czynnik rozwoju RZS). W stawach zwierząt rozwinęła się silna reakcja zapalna, która odzwierciedlała ludzki RZS włączając w to hiperplazję błony maziowej i powsta-

wanie łuszczyki, oraz leukocytozę w płynie stawowym. Do wyleczenia królików zastosowano wektory adenowirusowe kodujące ligandy aktywujące receptory śmierci: TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand* – związany z TNF ligand indukujący apoptozę) i FasL. Podanie wektorów bezpośrednio do stawów zwierząt wywoływało apoptozę synowocytów, hamowało nacieki leukocytowe i stymulowało syntezę białek chrząstki stawowej [34, 35].

Zarówno TRAIL jak i FasL to ligandy posiadające potencjalną zdolność aktywacji apoptozy po połączeniu z receptorem zawierającym tzw. domenę śmierci, należy jednak zaznaczyć, że nie wszystkie receptory z tej grupy zawierają domeny śmierci. Niektóre receptory dla TRAIL np. TRAIL-R3, TRAIL-R4, DcR2 (ang. decoy receptor 2) mają tylko zewnątrzkomórkowe domeny przyłączające ligand, bez wewnątrzkomórkowych domen śmierci. Są to tzw. receptory pułapkowe. Przyłączenie czynnika TRAIL przez te receptory nie powoduje aktywacji szlaku apoptozy komórek tworzących łuszczykę [15].

W badaniu przeprowadzonym przez turecki zespół na liniach pierwotnych synowocytów pobranych od ośmiu chorych z RZS wykazano bardzo wysoki poziom ekspresji receptora pułapkowego DcR2 dla TRAIL, który korelował z opornością tych komórek na apoptozę indukowaną TRAIL. W związku z tym badacze transfekowali komórki maziówki wektorem adenowirusowym kodującym TRAIL i dodatkowo siRNA anty-DcR2 indukując apoptozę synowocytów *in vitro*. Wyniki wskazują, że taka terapia genowa może stanowić atrakcyjny, bo nieinwazyjny mechanizm ograniczenia rozrostu błony maziowej stawów, a nawet wpływać na wzrost potencjału regeneracyjnego [36].

W celu zmniejszenia rozrostu łuszczyki stawowej stosuje się próbuje się przy pomocy metod terapii genowej hamować neowaskularyzację.

W różnych badaniach podawano wektory wirusowe zarówno retrowirusy, lentiwirusy jak i AAV kodujące inhibitory angiogenezy takie jak: angiostatyna, endostatyna (ze względu na zbyt krótki czas półtrwania standardowych form tych leków, lepsze jest podawanie ich na nośnikach wirusowych). Angiostatyna blokuje proliferację i rozprzestrzenianie się synowocytów, z kolei w wyniku działania endostatyny zmniejsza się napływ synowocytów i dochodzi do indukcji apoptozy. Po podaniu terapeutycznych wektorów dostawowo w mysim modelu RZS uzyskano redukcję stanu zapalnego i stabilizację łuszczyki, wskazano też na apoptozę synowocytów [37-39].

Inne doświadczenia skupiały się na zablokowaniu czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF), którego ekspresja koreluje z ciężkością RZS. VEGF zwiększa przepuszczalność naczyń krwionośnych i ich destabilizację oraz stymuluje degradację błony maziowej przez co dochodzi do inwazji, migracji i proliferacji synowocytów, makrofagów i limfocytów [40, 41]. Zastosowano więc wektor adenowirusowy, kodujący receptor pułapkowy VEGF (kompetycyjnie wiążący VEGF i niedopuszczający do aktywacji i połączenia z właściwym receptorem), który dostawowo wstrzyknięto myszom z RZS uzyskując zmniejszenie powierzchni łuszczyki, obrzęku i komórkowych parametrów zapalenia [42].

Kolejnym celem terapii stał się czynnik wzrostu hepatocytów (HGF), który indukuje angiogenezę poprzez stymulację proliferacji, migracji i adhezji komórek śródbłonna oraz pobudzanie synowocytów, makrofagów do produkcji czynników angiogennych. Zastosowano więc wektor adenowirusowy kodujący białko NK4 – antagonistę HGF, który hamuje odpowiedź angiogenną wywołaną przez podsta-

wowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF) i VEGF. Poza tym NK4 współzawodniczy z HGF o wiązanie do jego receptora c-Met i tym samym blokuje aktywację i działanie HGF. Wykazano, że wektor ekspresyjny Nk4, podawany dożylnie myszom z wyindukowanym RZS, umożliwił zahamowanie erozji chrząstki i proliferacji komórek maziowych oraz naciekania tkanek stawowych przez komórki jednojądrzaste i neutrofile a także wpłynął na znaczne obniżenie ekspresji cytokin prozapalnych [43].

4. Podsumowanie

Pomimo szybkiego rozwoju metod leczenia RZS, zwłaszcza wprowadzenia nowych leków biologicznych, nadal istotna grupa chorych nie odpowiada na leczenie lub jest ono źle tolerowane. Szansy na rozwiązanie tego problemu w niedalekiej przyszłości upatruje się wśród opisanych wyżej metod terapii genowej, które są wycelowane w swoiste molekularne patomechanizmy RZS i skutecznie oddziałują na rozregulowany układ immunologiczny.

Obecnie prowadzonych jest bardzo wiele badań z wykorzystaniem technik terapii genowej w leczeniu RZS, a ich wyniki są bardzo obiecujące.

W przeważającej części badacze wykorzystywali do transferu genów wektory wirusowe, głównie adenowirusowe, w tym najczęściej do hamowania ekspresji cytokin prozapalnych, suplementowania cytokin przeciwzapalnych, indukowania apoptozy agresywnych komórek błony maziowej i hamowania neoangiogenezy w objętych zapaleniem stawach. Z uwagi na bardzo różne cele nowatorskich podejść leczniczych oraz wnioski płynące z badań można przypuszczać, że terapia genowa przyniesie poprawę stanu tych pacjentów, którym standardowe leczenie nie służy.

Co istotne, większość opisywanych wyżej eksperymentalnych terapii jest stosowana miejscowo (dostawowo), co z jednej strony zapewnia działanie dokładnie w miejscu zapalenia, a z drugiej pozwala na uniknięcie ewentualnych skutków ubocznych, spowodowanych systemowym leczeniem immunosupresyjnym.

Pozytywne wyniki większości prac zachęcają do kontynuowania badań i poszukiwania nowych celów dla terapii genowej reumatoidalnego zapalenia stawów. Jednak, aby takie eksperymentalne metody mogły zostać na stałe wprowadzone do standardowego protokołu leczenia RZS należy zwrócić szczególną uwagę na poprawę: bezpieczeństwa, w tym obniżenia immunogenności wektorów wirusowych, wydajności ekspresji transgenów oraz efektywności dostarczania terapeutycznego materiału genetycznego do odległych obszarów aktywności choroby. Ponadto, pożądane byłoby opracowanie strategii wpływających jednocześnie na różne cele, co z pewnością przyspieszyłoby osiągnięcie trwałej remisji choroby.

Niewątpliwie terapia genowa jest dobrze rokującą alternatywą dla klasycznego leczenia reumatoidalnego zapalenia stawów, a dynamiczny rozwój nauki daje szansę na wyeliminowanie w krótkim czasie wszelkich niedoskonałości tej metody.

Literatura

1. Okada Y., Wu D., Trynka G., Raj T., Terao C., Ikari K., Graham RR., *Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery*. *Nature*, 506, (2014), s. 376-381.
2. Jia Z., He J., *Paeoniflorin ameliorates rheumatoid arthritis in rat models through oxidative stress, inflammation and cyclooxygenase 2*, *Experimental and therapeutic medicine*, 11, (2016), s. 655-659.
3. Darrieutort-Laffite C., Boutet M. A., Chatelais M., Brion R., Blanchard F., Heymann D., Le Goff B., *IL-1 β and TNF α promote monocyte viability through the induction of GM-CSF expression by rheumatoid arthritis synovial fibroblasts*, *Mediators of Inflammation*, 2014, (2014), s. 1-10.
4. van Venrooij W.J., van Beers J.J., Pruijn GJ. *Anti-CCP Antibody, a Marker for the Early Detection of Rheumatoid Arthritis*. *Ann NY Acad Sci.*, 1143, (2008), s. 268-285.
5. Steiner G., Smolen J., *Autoantibodies in rheumatoid arthritis and their clinical significance*, *Arthritis Researches.*, 4, (2002) s. 1-5.
6. Wilsdon T.D., Hill C.L. *Managing the drug treatment of rheumatoid arthritis*, *Aust. Prescr.*, 40, (2017), s. 51-58.
7. Singal VK, Chaturvedi VP, Brar KS. *Efficacy and Toxicity Profile of Methotrexate Chloroquine Combination in Treatment of Active Rheumatoid Arthritis*, *Med J Armed Forces India*, 61, (2005), s. 29-32.
8. Kisiel B., Kruszewski R., Juszkievicz A, Raczkiewicz A., Bachta A, Tłustochowicz M., Staniszewska-Varga J., Klos K., Duda K., Bogusławska-Walecka R., Płoski R., Tłustochowicz W., *Methotrexate, Cyclosporine A, and Biologics Protect against Atherosclerosis in Rheumatoid Arthritis*, *J Immunol Res.* 2015, (2015), s. 1-8.
9. Keng L. Lin M., Huang H., Chung K., *Diffuse alveolar damage in a patient with rheumatoid arthritis under prolonged leflunomide treatment*, *Medicine*, 95, (2016), s. e4044.
10. Hodkinson B., Magomero K.S., Tikly M., *Combination leflunomide and methotrexate in refractory rheumatoid arthritis: a biologic sparing approach*, *Ther Adv Musculoskelet Dis.*, 8, (2016), s. 172-179.
11. Wiela-Hojeńska A., Łapiński Ł., *Niepożądane działania leków – rodzaje, podział, przyczyny i skutki ekonomiczne*, *Farm. Pol.*, 66, (2010), s. 275-288
12. Szala S., *Terapia Genowa*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003, s. 1-34.
13. Chira S., Jackson CS., Oprea I., Ozturk F., Pepper MS., Diaconu I., Braicu C., Raduly LZ., Calin GA., Berindan-Neagoe I., *Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors*, *Oncotarget*, 13, (2015), s. 30675-30703.
14. Jakóbiśiak M., *Perspektywy terapii genowej*, *Pneumonol. Alergol. Pol.* 77, (2009), s. 289-293.
15. Wędrowska E., Wandtke T., Dyczek A., Woźniak J., *Viral transfer of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in gene therapy*, *Postepy Hig Med Dosw.* 69, (2015), s. 1411-1422.
16. Wędrowska E., Gawroński M., Wandtke T., Goede A., Wędrowski M., Piskorska E., *Niewirusowy transfer genów do komórek skóry – wybrane metody*, *Journal of Education, Health and Sport.* 6, (2016), s. 157-170.
17. Venkatesha S. H., Dudics S., Acharya B., Moudgil K. D., *Cytokine-modulating strategies and newer cytokine targets for arthritis therapy*, *International Journal of Molecular Sciences*, 16, (2014), s. 887-906.
18. Mease PJ., Hobbs K., Chalmers A., El-Gabalawy H., Bookman A., Keystone E., *Local delivery of a recombinant adenoassociated vector containing a tumour necrosis factor alpha antagonist gene in inflammatory arthritis: a phase 1 dose-escalation safety and tolerability study*, *Ann Rheum Dis.*, 68, (2009), s. 1247-1254.
19. Mease PJ., Wei N., Fudman EJ., Kivitz AJ., Schechtman J., Trapp RG., *Safety, tolerability, and clinical outcomes after intraarticular injection of a recombinant adeno-*

- associated vector containing a tumor necrosis factor antagonist gene: results of a phase ½, Study J Rheumatol., 37, (2010), s. 692-703.
20. Wei S. T., Sun Y. H., Zong S. H., Xiang Y. B., *Serum Levels of IL-6 and TNF-α May Correlate with Activity and Severity of Rheumatoid Arthritis*, Med Sci Monit., 21, (2015), s. 4030-4038.
 21. Dayer J. M., *The pivotal role of interleukin-1 in the clinical manifestations of rheumatoid arthritis*, Rheumatology, 42, (2003), s. 3-10.
 22. Wehling P., Reinecke J., Baltzer AW., Granrath M., Schulz KP., Schultz C., *Clinical responses to gene therapy in joints of two subjects with rheumatoid arthritis*. Hum Gene Ther., 20, (2009), s. 97-101.
 23. Pan RY., Chen SL., Xiao X., Liu DW., Peng HJ., Tsao YP., *Therapy and prevention of arthritis by recombinant adeno-associated virus vector with delivery of interleukin-1 receptor antagonist*, Arthritis Rheum. 43, (2000), s. 289-297.
 24. Smeets RL., van de Loo FA., Arntz OJ., Bennink MB., Joosten LA., van den Berg WB., *Adenoviral delivery of IL-18 binding protein C ameliorates collagen-induced arthritis in mice*, Gene Ther., 10, (2003), s. 1004-1011.
 25. Lubberts E., Koenders MI., Oppers-Walgreen B., van den Bersselaar L., Coenen-de Roo CJ., Joosten LA., van den Berg WB., *Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion*, Arthritis Rheum., 50, (2004), s. 650-659.
 26. Khoury M., Escriou V., Courties G., Galy A., Yao R., Largeau C., *Efficient suppression of murine arthritis by combined anticytokine small interfering RNA lipoplexes*, Arthritis Rheum., 58, (2008), s. 2356-2367.
 27. Saidenberg-Kermanach N., Bessis N., Deleuze V., Bloquel C., Bureau M., Scherman D., Boissier MC., *Efficacy of interleukin-10 gene electrotransfer into skeletal muscle in mice with collagen-induced arthritis*, J. Gene Med., 5, (2003), s. 164-171.
 28. Saidenberg-Kermanach N., Bessis N., Lemeiter D., de Vernejoul MC., Boissier MC., Cohen-Solal M., *Interleukin-4 cellular gene therapy and osteoprotegerin decrease inflammation-associated bone resorption in collagen-induced arthritis*, J. Clin. Immunol., 24, (2004), s. 370-378.
 29. Neumann E., Judex M., Kullmann F., Grifka J., Robbins PD., Pap T., Gay RE., Evans CH., Gay S., Schölermerich J., Müller-Ladner U., *Inhibition of cartilage destruction by double gene transfer of IL-1Ra and IL-10 involves the activin pathway*, Gene Ther., 9, (2002), s. 1508-1519.
 30. Nabbe KC., van Lent PL., Holthuysen AE., Sloëtjes AW., Koch AE., Radstake TRDJ., van den Berg WB., *Local IL-13 gene transfer prior to immune-complex arthritis inhibits chondrocyte death and matrix-metalloproteinase-mediated cartilage matrix degradation despite enhanced joint inflammation*, Arthritis Res. Ther., 7, (2005), s. 392-401.
 31. Tak PP., *IFN-beta in rheumatoid arthritis*, Front Biosci., 9, (2004), s. 3242-3247.
 32. Evans C. H., Ghivizzani S. C., Robbins P.D., *Arthritis gene therapy and its tortuous path into the clinic*, Transl Res., 161, (2013), s. 205-216.
 33. Zaniewicz Kaniewska K., Sudoł Szopińska I., *Badanie ultrasonograficzne w diagnostyce ręki reumatoidalnej*, Journal of Ultrasonography, 13, (2013), s. 329-336.
 34. Yao Q., Glorioso JC., Evans CH., Robbins PD., Kovesdi I., Oligino TJ., *Adenoviral mediated delivery of FAS ligand to arthritic joints causes extensive apoptosis in the synovial lining*, J. Gene Med., 2, (2000), s. 210-219.
 35. Yao Q., Seol DW., Mi Z., Robbins PD., *Intra-articular injection of recombinant TRAIL induces synovial apoptosis and reduces inflammation in a rabbit knee model of arthritis*, Arthritis Res. Ther., 8, (2006), s. 1-16.
 36. Terzioglu E., Bisgin A., Sanlioglu AD., Ulker M., Yazisiz V., Tuzuner S., Sanlioglu S., *Concurrent gene therapy strategies effectively destroy synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis*, Rheumatology, 46, (2007), s. 783-789.

37. Kim JM., Ho SH., Park EJ., Hahn W., Cho H., Jeong JG., Lee YW., Kim S., *Angiostatin gene transfer as an effective treatment strategy in murine collagen-induced arthritis*, *Arthritis Rheum.*, 46, (2002), s. 793-801.
38. Kato K., Miyake K., Igarashi T., Yoshino S., Shimada T., *Human immunodeficiency virus vector-mediated intra-articular expression of angiostatin inhibits progression of collagen-induced arthritis in mice*, *Rheumatol. Int.* 25, (2005), s. 522-529.
39. Yin G., Liu W., An P., Li P., Ding I., Planelles V., Schwarz E. M., Min W., *Endostatin gene transfer inhibits joint angiogenesis and pannus formation in inflammatory arthritis*, *Mol. Ther.*, 5, (2002), s. 547-554.
40. Miotla J., Maciewicz R., Kendrew J., Feldmann M., Paleolog E., *Treatment with soluble VEGF receptor reduces disease severity in murine collagen-induced arthritis*, *Lab. Invest.*, 80, (2000), s. 1195-1205.
41. Mould AW., Tonks ID., Cahill MM., Pettit AR., Thomas R., Hayward NK., Kay GF., *VEGF β gene knockout mice display reduced pathology and synovial angiogenesis in both antigen-induced and collagen-induced models of arthritis*, *Arthritis Rheum.* 48, (2003), s. 2660-2669.
42. Tsai CY., Shiau AL., Chen SY., Cheng PC., Chang MY., Chen DH., Chou CH., Wang CR., Wu CL., *Amelioration of collagen-induced arthritis in rats by nanogold*, *Arthritis Rheum.*, 56, (2007), s. 544-54.
43. Tsunemi S., Iwasaki T., Kitano S., Matsumoto K., Takagi-Kimura M., Kubo S., Tamaoki T., Sano H., *Molecular targeting of hepatocyte growth factor by an antagonist, NK4, in the treatment of rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res Ther.*, 15, (2013), s. 1-9.

Próby terapii genowej reumatoidalnego zapalenia stawów

Streszczenie

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) jest jedną z najczęściej występujących przewlekłych chorób tkanki łącznej o charakterze autoimmunologicznym. Objawia się stanem zapalnym stawów i prowadzi do trwałego uszkodzenia i utraty ich funkcjonalności, a w rezultacie do niepełnosprawności chorego. W pracy przedstawiono metody terapii genowej RZS, będące w fazie badań przedklinicznych i klinicznych. Standardowe leczenie RZS opiera się głównie na postępowaniu objawowym, podawaniu biologicznych i syntetycznych leków modyfikujących przebieg choroby oraz rehabilitacji i chirurgicznemu leczeniu powikłań. Pomimo tego, nie udaje się uzyskać całkowitego wyleczenia. Niezbędne są prace nad nowymi terapeutykami, które wreszcie znacząco wpłyną na poprawę stanu pacjentów. Obecnie prowadzonych jest wiele obiecujących badań wykorzystujących terapię genową w leczeniu RZS. Część z nich związana jest z oddziaływaniem na balans pomiędzy cytokinami prozapalnymi i przeciwzapalnymi, inne skupiają się na zapobieganiu rozrostowi łuszczyki stawowej. Istnieje nadzieja, że opracowanie precyzyjnych i skutecznych metod terapii genowej przyniesie pacjentom z RZS długotrwałe i zadowalające efekty.

Słowa kluczowe: reumatoidalne zapalenie stawów, terapia genowa, cytokiny.

Gene therapy attempts for rheumatoid arthritis

Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is the most common connective tissue disease of autoimmune origin. The disease is characterized by chronic inflammation and can lead to permanent joint damage, loss of function and physical disability of the patient. In this review, gene therapy methods for RA currently under preclinical and clinical examination are described. Standard RA management is based on symptomatic treatment, taking biological and synthetic disease-modifying antirheumatic drugs, physiotherapy and surgical correction of articular complications. Despite this, it is not possible to achieve a complete cure. It is necessary to work towards making new therapies which will significantly improve the patients' condition.

Currently, there are several promising studies using gene therapy for RA. Some of them are related to restoration of the balance between proinflammatory and immunosuppressant cytokines, and others are associated with apoptosis induction and the inhibition of angiogenesis or erosive mediators preventing aggressive pannus formation. The hope is that development of precise and effective gene therapy approaches will bring long-term and satisfying effects to RA patients.

Keywords: rheumatoid arthritis, gene therapy, cytokines.

Wpływ dymu tytoniowego na symetrię podziałów komórkowych

1. Wstęp

Procesy odpowiedzialne za sterowanie podziałami komórek macierzystych leżą u podstaw, zarówno histogenezy i odnowy tkanek, jak i onkogenezy. Zaburzenia symetrii podziału komórkowego są powiązane z rozwojem części nowotworów wywodzących się z komórek prekursorowych [1] oraz z nowotworowych komórek macierzystych [2]. Charakterystyka tego procesu wymaga analizy przemian zachodzących w pojedynczej komórce i jej materiale genetycznym, m.in. powstających de novo mutacji przyczyniających się do transformacji nowotworowej, a także sygnałów działających na komórkę z zewnątrz. Źródłem bodźców egzogennych mogą być sąsiednie komórki oraz składniki macierzy pozakomórkowej. Odpowiednią reakcją komórek na działające z zewnątrz sygnały, zapewnia obecność receptorów i prawidłowo funkcjonujących szlaków transdukcji sygnałowej przekazujących informację od receptora do efektorów. Zaburzenia w funkcjonowaniu któregośkolwiek elementu ścieżki sygnalizacyjnej mogą prowadzić do nieprawidłowego podziału komórkowego, tym samym kierując komórkę na drogę onkogenezy. Poznanie mechanizmów molekularnych i regulacyjnych podziału komórkowego, udziału regulatorów oraz czynników zaburzających proliferację, jest niezwykle ważne z punktu widzenia m.in. zastosowania skutecznej celowanej terapii przeciwnowotworowej, a także medycyny regeneracyjnej.

Podstawowa klasyfikacja komórek macierzystych obejmuje: komórki występujące u dorosłych (ASC; ang. *Adult Stem Cells*), komórki embrionalne (hESC; ang. *human Embryonic Stem Cells*) oraz indukowane (iPSC; ang. *Induced Pluripotent Stem Cells*).

Komórki ASC występują w wielu narządach wśród zróżnicowanych komórek danej tkanki. Często pozostają w stanie uśpienia do momentu uszkodzenia tkanki, gdy wymagana jest jej regeneracja. Posiadają ograniczoną zdolność podziału, cechując się multipotencją lub unipotencją. Ich izolacja np. ze skóry, mięśni szkieletowych, kałek maziowych jest stosunkowo prosta, jednakże populacja uzyskiwana z tych tkanek jest mało liczna. Dobrym rezerwuarem ASC okazała się tkanka tłuszczowa [3]. Źródła te nie budzą kontrowersji moralno-etycznych co sprawia, że ASC mogą

¹ marcin.michalik@med.sum.edu.pl, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze Histologii i Embriologii, Wydział Lekarski, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl.

² pszmytkowska@sum.edu.pl, Zakład Cytofizjologii przy Katedrze Histologii i Embriologii, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl.

³ bogdan.dugiello@med.sum.edu.pl, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze Histologii i Embriologii, Wydział Lekarski, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl.

⁴ pcz@sum.edu.pl, Zakład Cytofizjologii przy Katedrze Histologii i Embriologii, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl.

być powszechnie stosowane w laboratoriach badawczych, a docelowo także w celach terapeutycznych.

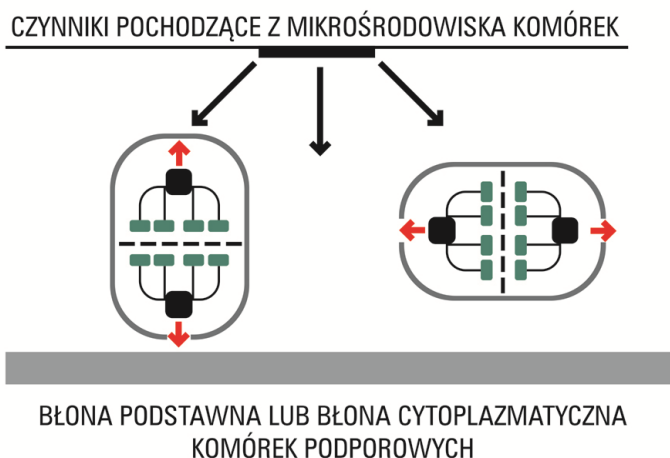
Embrionalne komórki macierzyste posiadają dużo większą zdolność podziału oraz różnicowania, cechują się najczęściej pluripotencją. Ich pozyskiwanie jest jednak trudniejsze i w przeciwieństwie do poprzednich niesie ze sobą kontrowersje etyczne. Wyeliminowanie ograniczeń związanych z użyciem hESC jest możliwe poprzez zastosowanie komórek macierzystych izolowanych z narządów okołopłodowych, w tym z owodni łożyska ludzkiego (hAC; ang. *human Amnion Cells*). Na komórkach owodniowych wykryto antygeny, znajdowane także na ludzkich komórkach macierzystych uzyskanych z krwi pępowinowej oraz na powierzchni hESC. Odkrycia te skłaniają naukowców do opracowania skutecznych metod izolacji, hodowli i różnicowania hAC do tkanek wszystkich listków zarodkowych [4].

Indukowane komórki macierzyste to komórki, w których cechy pluripotencji są wywołane sztucznie, na kilka różnych sposobów, np. poprzez transfer jądra komórkowego do oocytu, poprzez wprowadzenie do dojrzałej komórki somatycznej, np. fibroblastu, genów czynników transkrypcyjnych, np. OCT4, SOX2, NANOG czy LIN28, lub poprzez zastosowanie małych cząsteczek (ang. *Small-Molecule Compounds*) takich jak: Forskolina, D4476 lub 2-metylo-5-hydroksytryptamina [5]. Niezależnie od zastosowanej metody uzyskane komórki zyskują zdolność do nieograniczonych podziałów oraz różnicowania się w tkanki trzech listków zarodkowych. Ze względu na potencjalną tumorogenność, iPSC są wykorzystywane głównie w badaniach *in vitro*.

Istnieją jedynie nieliczne dowody naukowe opisujące wpływ dymu tytoniowego na komórki macierzyste lub macierzyste komórki nowotworowe – CSC (ang. *Cancer stem cells*). Dym tytoniowy wpływa na komórki macierzyste poprzez kilka mechanizmów. Przede wszystkim, ogranicza ich zdolność do proliferacji oraz różnicowania [6]. Ponadto indukuje apoptozę ludzkich komórek embrionalnych, poprzez aktywację kaspaz [7], działa cytotoksycznie, upośledza syntezę DNA oraz zdolność komórek do adhezji, a także zmienia ekspresję genów związanych z funkcjonowaniem ścieżek sygnalizacyjnych [8, 9].

2. Symetria podziału komórkowego

Komórki macierzyste mogą dzielić się na drodze podziału symetrycznego, w wyniku, którego powstają bądź dwie identyczne komórki o zachowanym fenotypie macierzystym, posiadające zdolność do dalszych podziałów, bądź dwie o zdefiniowanym charakterze. Drugim typem podziału jest podział asymetryczny, w wyniku, którego powstają dwie różne komórki: jedna o charakterze macierzystym, druga – częściowo zróżnicowana (Rys. 1).



Rysunek 1. Wpływ położenia płaszczyzny podziałowej wrzeciona mitotycznego (linia przerywana) na możliwości różnicowania się komórek potomnych. Po lewej: Płaszczyzna ułożona równoległe do błony podstawnej lub powierzchni komórki podporowej powoduje niejednakowy dostęp do czynników wpływających na różnicowanie. Powstająca komórka ‘górną’ traci kontakt z błoną podstawną lub komórką podporową, a ty samym możliwość bezpośredniej komunikacji. Ponadto ogranicza ona dostęp powstającej komórki ‘dolnej’ do czynników mikrośrodowiskowych. Po prawej: Płaszczyzna ułożona prostopadłe zapewnia jednakowy dostęp obu komórkom potomnym do składników mikrośrodowiska oraz jednakowy kontakt z błoną podstawną. Czerwone strzałki oznaczają kierunki rozejścia się komórek potomnych [opracowanie własne]

Zdolność komórek do kontrolowania symetrii podziału umożliwia regenerację tkanek z zachowaniem puli komórek macierzystych. Ten proces, określane jako samoodnawianie (ang. self renewal), zapewnia tkankom utrzymanie równowagi strukturalnej i potencjału regeneracyjnego.

Każda komórka realizuje określony w swoim kodzie genetycznym model rozwoju, który określa rodzaj, czas oraz liczbę podziałów. W trakcie kształtowania narządów, np. w procesie neurogenezy, komórki stosunkowo często zmieniają program podziałowy. Mysie komórki radialne gleju dzielą się wiele razy asymetrycznie w strefie komorowej, w celu utrzymania puli komórek macierzystych, a jednocześnie dając początek zewnętrznym komórkom radialnym gleju, które następnie migrują do strefy przykomorowej, gdzie tracą zdolności do podziałów asymetrycznych [10, 11]. Zmiana typu podziału komórkowego z symetrycznego na asymetryczny lub odwrotnie, może nastąpić także w wyniku uszkodzenia mechanizmu odpowiadającego za kontrolę podziału. Zmiany te obserwowane są często w komórkach nowotworowych i prowadzą do niekontrolowanych podziałów symetrycznych odpowiedzialnych za szybki przyrost masy komórkowej guza lub asymetrycznych prowadzących do różnorodności komórek nowotworowych [1].

3. Rola połączeń zwierających w podziale komórkowym

Mikrośrodowisko tkankowe determinuje losy komórek potomnych powstających po podziale komórki macierzystej. Wpływ niszy na losy komórek może być dwójaki. Może ona zarówno powodować utrzymanie charakteru macierzystego [12], jak i promować różnicowanie [13]. Sygnały z mikrośrodowiska mogą być odbierane z macierzy pozakomórkowej m.in. poprzez receptory integrynowe. W komunikacji

międzykomórkowej istotną rolę odgrywają też złącza zwierające, zamykające oraz metaboliczne.

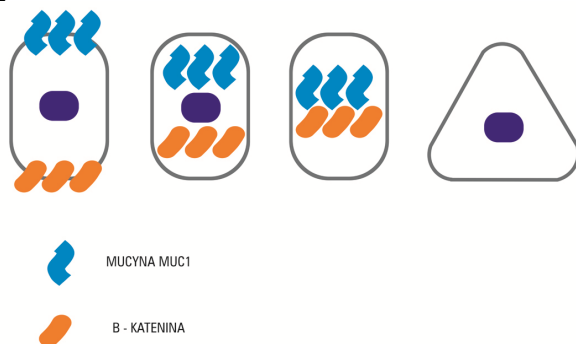
W budowę połączenia zwierającego (ang. *Adherens junction*) zaangażowane są błony komórkowe sąsiadujących komórek oraz białka spajające obie te błony. Licząc od strony szczeliny międzykomórkowej, należy do nich kadheryna, która jednym ze swoich końców łączy się z kadheryną sąsiedniej komórki, a drugim końcem przenika przez błonę cytoplazmatyczną do wnętrza komórki, gdzie łączy się z β -kateniną lub plakoglobiną, lecz nigdy z obydwoma jednocześnie. Do powstałego kompleksu przyłącza się białko α -katenina, przy pomocy, której kompleks łączy się z F-aktyną, reprezentującą cytoszkielet komórkowy. Skład białkowy połączeń zwierających może się nieznacznie różnić w zależności od tkanki [14]. Połączenia te nie są jedynie sztywnym, mechanicznym scaleniem sąsiednich komórek. Elementy je budujące posiadają zdolność interakcji między sobą, innymi elementami komórki oraz – poprzez czynniki transkrypcyjne – są zdolne do wpływania na ekspresję genów. Kadheryna posiada zdolność wiązania jonów wapniowych, dzięki czemu jest w stanie modulować stopień napięcia włókien aktynowych wewnątrz komórki i wpływać na wielkość szczeliny międzykomórkowej, co z kolei umożliwia regulację transportu międzykomórkowego. Ponadto, niektóre z białek budujących połączenia zwierające, aktywnie uczestniczą w przekazywaniu sygnałów do wnętrza komórki. Zaobserwowano, iż nasilenie przekazywania sygnałów poprzez połączenia zwierające jest wzmoczone w procesach regeneracji nabłonka dróg oddechowych oraz onkogenezy. Dochodzi wtedy do przemieszczenia β -kateniny do jądra komórkowego, gdzie łączy się ona z czynnikiem transkrypcyjnym TCF/LEF (ang. *T cell factor/lymphoid enhancer factor*), co doprowadza do aktywacji ścieżki sygnalizacyjnej β -katenina/TCF, zaangażowanej w cytotoksyczny efekt dymu tytoniowego na komórki nabłonka pęcherzyków płucnych [15].

Najlepiej przebadanym modelem badawczym, na którym wykazano wpływ połączeń zwierających na symetrię podziału komórkowego, są zarodkowe komórki macierzyste GSC (ang. *Germline Stem Cells*) jądra *D. melanogaster* [16]. W prawidłowych komórkach GSC, mechanizm podziału zależny od tych połączeń prowadzi do podziału symetrycznego w niszy nabłonkowej oraz asymetrycznego w niszy stromalnej. Po podziale asymetrycznym, powstała komórka potomna pozostaje w kontakcie z błoną podstawną za pośrednictwem połączeń zwierających, co skutkuje utrzymaniem jej niezróżnicowanego charakteru. Natomiast druga komórka potomna, która traci kontakt z błoną podstawną ulega różnicowaniu. Dzieje się tak, dlatego, że we wczesnej interfazie pojedynczy centrosom komórki macierzystej znajduje się na biegunie sąsiadującym z błoną podstawną lub błoną cytoplazmatyczną komórki podporowej. Po duplikacji, wspomniany centrosom pozostaje w tej lokalizacji. Natomiast centrosom potomny migruje do bieguna komórki, który nie posiada kontaktu z błoną podstawną lub komórką podporową. Za utrzymanie centrosomu matczynego w odpowiednim położeniu, w pobliżu błony podstawnej, odpowiada białko APC (ang. *Adenomatous Polyposis Coli*). Jego rolą jest łączenie części cytoplazmatycznej kompleksu budującego połączenie zwierające z pierwotnym centrosomem. Interakcja ta prowadzi do prostopadłego ułożenia osi wrzeciona podziałowego względem płaszczyzny przylegania komórka-błona podstawna/komórka podporowa, tym samym prowadząc do podziału asymetrycznego [16].

Modelem, który obrazuje wpływ dymu tytoniowego na połączenia zwierające, są komórki nabłonka drzewa oskrzelowego – HBE (ang. *Human bronchial epithelium*).

Nabłonek ten, w związku z pełnioną funkcją fizjologicznej bariery między środowiskiem zewnętrznym i wewnętrznym, cechuje się wyjątkowo dużą spistością i trwałością dzięki obecności na szczycie komórek – przezbłonowych glikoprotein, zwanych mucynami oraz dzięki obecności przyszczytowego kompleksu spajającego SJC (ang. *Subapical junctional complexes*), złożonego z połączeń zwierających i zamykających [17]. Dodatkową rolę kompleksów spajających jest wpływ na polarność komórki. SJC dzieli komórkę na dwa bieguny: szczytowy i przypadstawny. Znajdują się na nich charakterystyczne elementy, na biegunie szczytowym przezbłonowe mucyny MUC1, a w przypadstawnym – receptory EGFR (ang. *Epithelial growth factor receptor*) dla nabłonkowego czynnika wzrostu [18].

Badania wykazały, niezależnie od stosowanej metody, iż kluczowymi zmiennymi działania dymu tytoniowego wpływającymi na połączenia międzykomórkowe są: czas ekspozycji oraz stężenie dymu [19]. W ludzkich komórkach nabłonka dróg oddechowych, przy użyciu immunoblotingu i mikroskopii konfokalnej, wykazano znaczący spadek ilości białka E-kadheryny, skutkujący drastycznym, zależnym od stężenia dymu, spadkiem ilości powstałych kompleksów kadheryna-kenatyna, kluczowych dla stabilizacji wrzeciona komórkowego i utrzymania polarności podziału komórkowego. Dodatkowo, dym tytoniowy doprowadza do relokacji charakterystycznych elementów strukturalnych określających polaryzację komórki. Pod jego wpływem, mucyny MUC1 znajdujące się w szczytowej części komórki, zostają wchłonięte do cytoplazmy komórkowej, gdzie kierują się do jądra komórkowego (Rys. 2). Na przeciwległym biegunie również dochodzi do migracji białek. β -Katenina oraz katenina-p120, tworzące kompleksy p120ctn/E-cad/ β -ctn, budujące połączenia zwierające, przemieszczają się w kierunku jądra komórkowego, gdzie tworzą kompleksy z zinternalizowaną z części szczytowej mucyną. Powstałe kompleksy to: MUC1-CT/p120ctn oraz MUC1-CT/kenatyna, które prawdopodobnie mają zdolność do aktywacji ścieżek sygnalizacyjnych uczestniczących w nowotworzeniu, takich jak szlak Wnt, poprzez zwiększoną akumulację czynnika transkrypcyjnego Lef-1 [20].

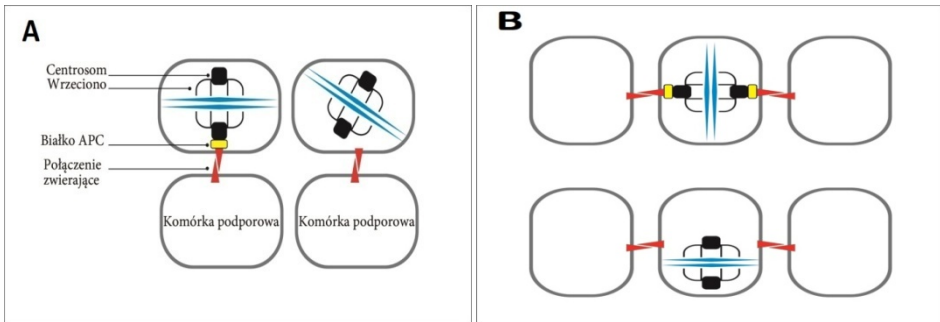


Rysunek 2. Połączenie zinternalizowanych białek doprowadzające do transformacji komórki.

Zinternalizowana w szczytowej części komórki mucyna MUC1 przemieszcza się w rejony jądra komórkowego, gdzie łączy się w kompleksy z β -kateniną oraz kateniną-p120 - wchłoniętymi do cytoplazmy w przypadstawnej części komórki. Powstałe kompleksy zaburzają działanie szlaków komórkowych, w wyniku czego może dojść do transformacji nowotworowej [opracowanie własne]

Nieprawidłowa budowa lub deficyt kompleksów e-kadheryna/ β -katenina uniemożliwia przyłączenie się do nich białka APC. Brak związku między tymi

trzema białkami hamuje przyłączanie mikrotubul wrzeciona podziałowego do tego kompleksu. Skutkuje to utratą stabilizacji wrzeciona podziałowego, doprowadzając do zaburzenia płaszczyzny podziału i jego orientacji przestrzennej (Rys. 3). Do analogicznych zaburzeń dochodzi w sytuacji nieprawidłowej ekspresji białka APC [21]. Te zjawiska mogą prowadzić do zmiany charakterystycznego dla danej komórki typu podziału. Oś wrzeciona zaczyna układać się prostopadle, równoległe lub przypadkowo w stosunku do błony podstawnej, co skutkuje kolejnymi niekontrolowanymi podziałami.



Rysunek 3. Destabilizacja wrzeciona podziałowego prowadzi do przemieszczenia osi podziału komórki. Zmiana budowy elementów strukturalnych połączenia zwierającego uniemożliwia przyłączenie się białka APC, co skutkuje zaburzeniem orientacji przestrzennej wrzeciona podziałowego. A – wrzeciono podziałowe komórek niszy stromalnej ulega destabilizacji, następuje zmiana symetrii podziału z asymetrycznego na losowy. B - wrzeciono podziałowe komórek niszy nabłonkowej traci stabilizację, następuje zmiana symetrii podziału z symetrycznego na losowy [opracowanie własne]

4. Rola połączeń zamykających w podziale komórkowym

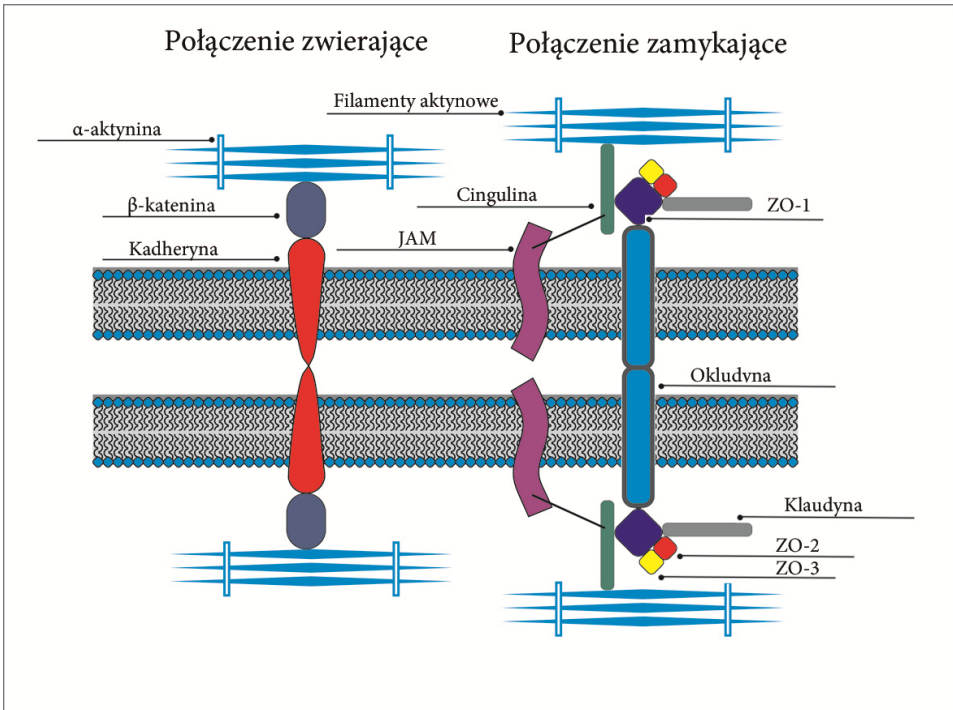
Połączenia zamykające (TJ; ang. *Tight junctions*) są najbardziej wytrzymałym, odpornym na działanie sił oraz najszczelniejszym typem złącz międzykomórkowych. Występują w największej ilości między komórkami nabłonków, w tym śródbłonka. Wykazano ich obecność również między fibroblastami, astrocytami oraz komórkami Schwanna [22]. W budowę połączeń zamykających zaangażowane są białka strukturalne oraz pomocnicze, znajdujące się w szczelinie międzykomórkowej oraz w cytoplazmie połączonych komórek (Tabela 1). Rolą białek strukturalnych jest zapewnienie szczelnego, trwałego i wytrzymałego połączenia między sąsiednimi komórkami, natomiast białka pomocnicze odpowiadają za połączenie elementów międzykomórkowych z cytoszkieletem komórkowym, oddziaływanie z połączeniami zwierającymi oraz przekazywanie informacji poprzez szlaki sygnalizacyjne, zaangażowane w proliferację komórek oraz odpowiadające za różnicowanie (Rys. 4).

Połączenia zamykające wchodzi w skład przyszczytowego kompleksu spajającego. Ich obecność sprawia, że komórki, głównie nabłonkowe, zyskują wyjątkową szczelność. Jednakże, nabłonki występujące w różnych organach cechują się różną przepuszczalnością w zależności od pełnionej funkcji. Dlatego też nabłonek pokrywający kosmki jelitowe cechuje się występowaniem połączeń zamykających niskooporowych umożliwiających absorpcję wody oraz składników odżywczych, natomiast nabłonek pęcherzyka żółciowego cechują połączenia zamykające wyskooporowe uniemożliwiające wydostanie się kwasów żółciowych [23]. Uszkodzenie połączeń zamykających może doprowadzić do rozszczelnienia komórek.

Tabela 1. Białka budujące połączenia zamykające oraz ich interakcje

Białko	Interakcje	Rola
Okludyna	ZO-1, ZO-2, ZO-3	Białko przezłonowe, jednym z końców łączy się w przestrzeni międzykomórkowej z okludyną sąsiedniej komórki, drugim natomiast za pośrednictwem białek ZO (ang. <i>Zonula Occludens Protein</i>) kotwiczony do cytoszkieletu aktynowego. Wyciszenie genu okludyny nie zaburza funkcjonowania bariery tworzonej przez połączenia zamykające.
Białka sfery zamykającej 1,2,3 (ang. <i>Zonula Occludens protein : 1,2,3</i>)	ZONAB, aktyna, cingulina, kładyna	Białka należące do rodziny kinaz guanylowych. Pośredniczą w przekazywaniu sygnałów z białek transłonowych na białka efektorowe. Za ich pośrednictwem sygnały płynące z zewnątrz są w stanie dotrzeć do jądra komórkowego. Ponadto białko ZO-1 oddziałuje z białkami budującymi połączenia zwierające: e-kadheryną oraz kateniną.
Kładyna	ZO-1, ZO-1, ZO-3	Białko transłonowe uczestniczące w adhezji komórkowej niezależnej od jonów wapnia. Pośrednio, dzięki białkom ZO oddziałuje z cinguliną oraz szkieletem aktynowym. Wytwarza połączenia z kładyną, zarówno w obrębie jednego połączenia TJ, jak i krzyżowo z innymi.
JAM (ang. <i>Junctional Adhesion Molecule</i>)	Cingulina, Par3	Należą do nadrodziny immunoglobulin, występują na komórkach nabłonkowych, trombocytach oraz leukocytach. Wydają się pełnić funkcję receptorów podobnych do integrzyn. Ich koniec C posiada domenę, dzięki której oddziałują z białkami wewnątrzcytoplazmatycznymi, m. in. kompleksem białkowym Par3, odpowiadającym za określenie polarności komórki.
Białko wiążące kwasy nukleinowe towarzyszące ZO1 (ZONAB; ang. <i>ZO-1-associated nucleic acid binding proteins</i>)	CDK4, białka Ras	Partner białka ZO-1. Jest czynnikiem transkrypcyjnym, migrującym do jądra komórkowego, gdzie łączy się z promotorem receptora naskórkowego czynnika wzrostu 2, regulując jego ekspresję. Ponadto oddziałuje z kinazą zależną od cyklin 4 (CDK4), zaangażowaną w wejście w fazę S cyklu komórkowego i regulującą proliferację. Niedawnym odkryciem jest fakt, iż ZONAB łączy się z białkami typu Ras zaangażowanymi w kontrolę cyklu komórkowego. ZONAB odpowiada również m.in. za modelowanie cytoszkieletu.
Cingulina	ZO-1,2,3, aktyna	Białko to jest kotwicą, dzięki której JAM bezpośrednio, a kładyna i okludyna pośrednio, łączą się z cytoszkieletem aktynowym.

Opracowano na podstawie [24-27]



Rysunek 4. Porównanie budowy połączeń zwierających i zamykających. Połączenie zamykające mimo swojej niezwykle sztywnej i szczelnej budowy, charakteryzują się złożoną konstrukcją. Białka towarzyszące połączeniu zamykającemu posiadają zdolność kontroli ekspresji wybranych genów [opracowanie własne]

Do dysfunkcji połączenia zamykającego może dojść w wyniku działania czynnika wewnętrznego oraz zewnętrznego. Czynnikiem wewnętrznym są mutacje genów kodujących białka składowe połączenia. Rodzinna pierwotna hipomagnezemia z hiperkalciurią i nefrokalcynozą jest chorobą o potwierdzonej etiologii na tle mutacji genów CLDN16 lub CLDN19 kodujących kładyny. W wyniku mutacji powstają dysfunkcyjne połączenia między komórkami nabłonka kanalików nerkowych doprowadzając do zaburzeń dyfuzji jonów wapnia oraz magnezu [23].

Natomiast jednym z czynników zewnętrznych jest nikotyna występująca wśród ponad 4000 zidentyfikowanych składników dymu tytoniowego. To ona w największym stopniu jest odpowiedzialna za efekt cholinergiczny oraz uzależniający papierosów. Z kolei kotynina jest jej głównym metabolitem. Oba związki doprowadzają do rozszczelnienia bariery krew-mózg [28]. Bariera, w warunkach fizjologicznych, poprzez selektywną przepuszczalność, umożliwia prawidłowe funkcjonowanie mózgu oraz chroni go przed szkodliwymi substancjami. Funkcja ta wynika, między innymi, z występowania między komórkami śródbłonka połączeń zamykających oraz braku fenestracji. Hawkins et al. [29] wykazali, iż ciągły, podskórny wlew 4,5 mg nikotyny u szczurów doprowadza do rozszczelnienia bariery krew-mózg, najprawdopodobniej w wyniku uszkodzenia połączeń zamykających w kilku różnych mechanizmach. Badanie ekspresji białka metodą immunoblotingu w komórkach budujących barierę krew-mózg szczurów, poddanych działaniu nikotyny, nie wykazało

obecności kładyny-1 w porównaniu z próbą nie poddaną działaniu toksyny. Pozostałe białka wchodzące w skład połączenia zamykającego zostały prawidłowo rozpoznane przez przeciwciała, co świadczyło o tym, iż nikotyna nie wpływa na ich ekspresję.

W celu ustalenia przyczyny zwiększonej przepuszczalności bariery krew-mózg przeprowadzono dalsze badania przy użyciu mikroskopii wysokiej rozdzielczości. Wykazały one, iż w komórkach poddanych działaniu nikotyny nie wszystkie białka budujące połączenia zamykające znajdują się w swojej naturalnej, przybłonowej lokalizacji. Pod wpływem nikotyny białko ZO-1 uległo przemieszczeniu i zostało wykryte w rejonach jądra komórkowego. Podobne zjawisko obserwowano już w komórkach poddanych działaniu niedotlenienia, toksyn bakteryjnych, cytokin i czynników wzrostu. Przemieszczenie to może w znaczący sposób utrudniać tworzenie sieci relacji między białkami strukturalnymi i pomocniczymi tworzącymi połączenie zamykające, doprowadzając tym samym do zwiększonej przepuszczalności substancji hydrofilowych przez barierę krew-mózg [29].

5. Kompleksy białkowe określające polarność komórki

Ważnym czynnikiem determinującym polarność komórki są cytoplazmatyczne kompleksy białkowe. W badaniach nad podziałem asymetrycznym neuroblastów *D. melanogaster* wykazano istotną rolę szeregu białek regulatorowych o aktywności enzymatycznej oraz kinaz. Kluczowym wydaje się białko Numb, które posiada kilka poznanych już funkcji regulatorowych. Dodatkowo, podczas podziału dochodzi do jego nierównomiernego rozdzielania do komórek potomnych, co przemawia za istotną funkcją w podziale asymetrycznym. Wraz ze swoimi białkami adaptorowymi PON (ang. *Partner of Numb*) oraz Miranda (Mira), odpowiada m.in. za hamowanie samoodnowy komórek oraz jest istotnym inhibitorem ścieżek sygnalizacyjnych Notch oraz Hedgehog. Wśród czynników rozdzielanych nierównomiernie należy wymienić również białko Prospero – odpowiedzialne za zmniejszenie ekspresji genów związanych z macierzystym charakterem komórek i białko Brat – promujące opuszczenie cyklu komórkowego [30].

Pomimo tego, iż nie ma bezpośrednich dowodów wpływu dymu tytoniowego na białka odpowiadające za polaryzację komórki możemy podejrzewać, że wywiera on również swoje negatywne działanie na tym poziomie. Analiza komórek niektórych nowotworów, w których patogenezie niewątpliwie istotną rolę odgrywa dym tytoniowy, wykazała mutację w genach białek odpowiedzialnych za polarność komórki. Znanymi mutacjami są: PARD6 (PAR6) w raku płuca, PARD3 (PAR3) również w raku płuca, nowotworach głowy i szyi, przełyku, prostaty i pęcherza moczowego oraz DLG2 w raku płuca i szyjki macicy. Nieprawidłowe funkcjonowanie choćby jednego białka, doprowadza do zaburzenia całej maszynerii komórkowej determinującej bieguny komórki. Jednakże mimo tych mutacji, badania prowadzone na genetycznie modyfikowanych myszach, wykazały, iż istnieją potencjalne metody naprawcze uszkodzonego DNA, które w przyszłości mogą mieć zastosowanie w terapii onkologicznej [31, 32].

Tabela 2. Funkcja białek oraz kompleksów białkowych w determinacji polarności komórki

Białko D. melanogaster	Rola
Baz	Wiązanie i aktywacja białka Rho z rodziny GTPaz – Cdc42, które aktywuje atypową kinazę białkową aPKC
Par6	Inhibicja atypowej kinazy białkowej aPKC
Inscuteable (Insc)	Wiązanie białka G, umożliwiające powstanie heterotrimerów G α i/G β γ oraz aktywacja szlaków przezbłonowych zależnych od białek G
Pins	Adaptor białka Insc
Kinaza Aurora A (AurA)	Fosforylacja Par6, tym samym aktywacja aPKC
Khc-73	Stanowi zakończenie powstających mikrotubul wrzeciona podziałowego
Disc large (Dlg)	Łączenie Pins oraz Khc-73 stabilizując wrzeciono podziałowe
Mud	Wiązanie się z centrosomem i łączenie mikrotubuli z kompleksem szczytowym poprzez interakcję z Pins
Pins/Mud	Stabilizacja wrzeciona podziałowego
Pins/G α i/Dlg/Khc-73	Stabilizacja wrzeciona i określanie polarności
Kinaza Polo	Kontrola prawidłowego przyłączenia mikrotubuli
Baz/Par6/aPKC	Sterowanie przypadkowym rozmieszczeniem białek Numb oraz Miranda

Źródło: Opracowano na podstawie [30]

Tabela 3. Mutacje genów kodujących białka odpowiedzialne za polarność i ich potencjalne metody leczenia

Gen	Występowanie w nowotworach	Wyniki badań prowadzonych na modyfikowanych myszach	Lit.
AURAK	Rak piersi, jajnika, żołądka, woreczka żółciowego, trzustki.	Potencjalna farmakoterapia za pomocą inhibitora.	[33, 34]
HUGL-2	Rak jelita grubego, piersi.	Wyindukowana ekspresja w raku piersi zmniejsza odsetek przerzutów.	[35]
MSI2	CML	Potencjalny marker zaawansowania CML.	[36]
PLK1	Rak płuca (niedrobno komórkowy), żołądka, jajnika, prostaty, pęcherza moczowego, nowotwory okolicy głowy i szyi oraz glejaki.	Hamowanie za pomocą leków, siRNA zwalnia podziały komórek.	[37, 38]
PRKCI	Rak płuca (niedrobno komórkowy), piersi, jajnika i pęcherza moczowego.	Inhibicja za pomocą siRNA zmniejsza rozrost guza.	[39, 40]
SCRIB1	Glejaki	Utrata homozygotyczności predysponuje do mutacji cMyc.	[41]

6. Integryny a symetria podziału komórkowego

Integryny są glikoproteinowymi receptorami błonowymi należącymi do rodziny immunoglobulin. Są one zbudowane z części zewnątrz-, śród- oraz wewnątrz-błonowej. Składają się z dwóch różnych podjednostek, większej – α oraz mniejszej – β . Ich ligandami są głównie nierozpuszczalne składniki macierzy pozakomórkowej: kolagen, fibronektyna oraz laminina. Odpowiadają za przekazywanie bezpośrednich sygnałów między sąsiednimi komórkami oraz między komórką a macierzą pozakomórkową (ECM; ang. Extracellular matrix) [42], dotyczących migracji komórek podczas embriogenezy, aktywacji i migracji limfocytów oraz krzepnięcia. Obie podjednostki budujące receptor integrynowy występują w kilku izoformach, wynikiem czego jest około 20 kombinacji połączonych podjednostek, a tym samym typów receptora. Przekazywanie sygnałów z ECM do komórki poprzez integryny może mieć wpływ na zmianę typu podziału z symetrycznego na asymetryczny i odwrotnie.

W nabłonku jelita *Drosophila* adhezja komórek do błony podstawnej z udziałem integryn powoduje nierównomierne rozmieszczenie w nich atypowej kinazy białkowej aPKC oraz jej inhibitora Par. Efektem tego jest prostopadłe ułożenie wrzeciona podziałowego względem błony podstawnej, prowadzące do podziału asymetrycznego [43]. Badania prowadzone na komórkach linii HeLa, wywodzącej się z komórek raka szyjki macicy, wykazały, iż pobudzenie podjednostki $\beta 1$ jest niezbędne do aktywacji kinazy 3-fosfoinozytoli (PI3K). Uaktywnienie tej kinazy odpowiada za produkcję przekaźnika drugorzędowego 3,4,5-trifosforanu fosfatydyloinozytoli (PIP3), który w efekcie ulega akumulacji i najprawdopodobniej przyczynia się do migracji dynaktyny do cytoszkieletu i powstania kompleksów dyneina-dynaktyna. Kompleksy oddziałują z mikrotubulami astralnymi wrzeciona podziałowego, zapewniając mu prawidłowe ułożenie w przestrzeni [44].

Receptory integrynowe, oprócz pośredniczenia w interakcji między komórkami a ECM, posiadają wiele dodatkowych funkcji, np. integryna $\alpha 5\beta 6$ przekształca nieaktywną formę TGF- β , w formę aktywną [45]. Komórki linii A549 poddane działaniu ekstraktu dymu tytoniowego wykazywały zwiększoną ekspresję obu podjednostek tego heterodimeru, zarówno $\alpha 5$ kodowanej przez gen ITG αV , jak i $\beta 6$ kodowanej przez ITG $\beta 6$. W hodowlach komórkowych poddanych działaniu dymu tytoniowego, z jednocześnie wyciszonym genem ITG αV , nie obserwowano wzrostu poziomu TGF- β . Na całkowity poziom TGF- β w komórce składają się dwie formy: utajona i aktywna. Ekstrakt dymu tytoniowego powoduje wzrost ilości aktywnej formy wewnątrz komórek, nie wpływając na poziom formy utajonej. Wzrost stężenia transformującego czynnika wzrostu typu β , stymuluje proliferację fibroblastów i może objawiać się, jako rozplem tkanki łącznej w płucach, m. in. w idiopatycznym włóknieniu płuc [46]. Kolejne badania komórek nabłonka pęcherzyków płucnych linii A549, poddanych działaniu ekstraktu dymu tytoniowego (CSE ang. *Cigarette smoke extract*), przy użyciu mikromacierzy, wykazały, iż CSE doprowadza do transformacji linii ludzkich komórek nabłonkowych płuc w komórki mezenchymalne [46]. Pod wpływem CSE w komórkach nabłonka płuc dochodzi do zwiększenia ekspresji genów kodujących wimetynę, kadherynę 2, fibronektynę oraz MMP-2, z jednoczesnym zmniejszeniem ekspresji MMP-9. Prawdopodobnym czynnikiem odpowiedzialnym za tę zmianę fenotypu komórek nabłonka jest transformujący

czynnik wzrostu – TGF- β . CSE doprowadza do zaburzenia działania ścieżek sygnalizacyjnych TGF- β oraz WNT, poprzez zwiększoną ekspresję genów takich jak TGF β 1, TGF β 2, receptora typu II dla TGF- β , Smad2, Smad3, receptora Frizzled oraz inhibitora aktywatora plazminogenu (PAI-1).

Wpływ dymu tytoniowego na receptory integrynowe zaznacza się nie tylko w płucach, ale i na wyższych piętach dróg oddechowych. Jest on silnym czynnikiem drażniącym delikatny nabłonek jamy ustnej, w związku z czym palenie tytoniu jest uznawane za czynnik wysokiego ryzyka rozwoju chorób przyzębia. Przyczyny rozwoju tej grup chorób upatrywane są we wpływie nikotyny na spadek adhezji międzykomórkowej. Podczas badań na ludzkich fibroblastach dziąsłowych (HGF; ang. *Human gingival fibroblasts*), były one traktowane koncentratem nikotyny, w stężeniu odpowiadającym ilości nikotyny w surowicy palacza pięciu paczek papierosów dziennie. Zaobserwowano spadek liczby komórek ludzkich fibroblastów dziąsłowych, tym samym zmniejszenie ilości ich produktów: fibronektyny i kolagenu, będących ligandami receptorów integrynowych. Pod wpływem nikotyny dochodzi również do zakłócenia przekazywania sygnałów na poziomie receptora integrynowego. Już przy stężeniu nikotyny 0,2 μ M, odpowiadającym stężeniu nikotyny w surowicy osoby wypalającej trzy paczki papierosów dziennie, dochodzi do spadku ilości podjednostki β 1 receptora na powierzchni błon HGF [47]

7. Szlaki sygnałowe odpowiedzialne za mechanizm podziału komórki

Szlaki transdukcji sygnałowej, takie jak Hedgehog, Notch i Wnt aktywują geny uczestniczące w procesach podziału komórkowego, dzięki czemu tkanki mogą rozwijać się prawidłowo. Szlaki te podlegają także negatywnemu działaniu substancji egzogennych o udowodnionym działaniu mutagennym, takich jak: benzen [48] i nikotyna [49], czy też na przykład promieniowania ultrafioletowego [50].

Aktywacja szlaku Hedgehog odpowiedzialnego za rozwój kończyn w życiu płodowym oraz proliferację dojrzałych komórek macierzystych zachodzi w momencie przyłączenia ligandu Hh do receptora błonowego składającego się z białka Patched (Ptch) związanego z nieufosforylowanym białkiem Smoothened (Smo) [51]. Przy braku aktywacji szlaku, Smo ulega endocytozie, a następnie degradacji w lizosomach. Natomiast w przypadku aktywacji Smo zostaje ono ufosforylowane. Proces przyłączenia ligandu do receptora ułatwiają białka Cdo oraz Boc [52]. Smo reguluje ekspresję czynników transkrypcyjnych Ci/GLI. Przy jego nieobecności, GLI2 zostaje całkowicie zdegradowane, natomiast GLI3 ufosforylowane i zmodyfikowane do formy represorowej przez kinazę β -TrCP. Po pojawieniu się Smo wzrasta stężenie GLI2 i GLI3 odpowiedzialnych za indukowanie transkrypcji genów [53].

Aktywacja ścieżki Wnt odpowiedzialnej za migrację, proliferację komórek oraz prawidłowy rozwój organów, takich jak serce, zachodzi w dwóch mechanizmach: kanonicznym – zależnym od β -kateniny i niekanonicznym – zależnym od jonów wapnia.

W mechanizmie kanonicznym, przy braku liganda receptor z rodziny Frizzled i koreceptor LRP5/LRP6 pozostają nieaktywne.

β -katenina tworzy kompleks z APC (ang. *adenomatous polyposis coli*) oraz AXIN należący do fosfataz białkowych, które najpierw ulegają fosforylacji dzięki GSK3B (kinaza syntezy glikogenu 3) i kinazie kazeinowej CKI. Postuluje się, że CKIa

fosforyluje β -kateninę, a CKIe – AXIN. Następnie zachodzi ubikwitynacja z udziałem BTRCP1 i BTRCP2 co umożliwia degradację β -kateniny w proteasomach umożliwiając przyłączenie się białka Groucho do TCF hamując w ten sposób transkrypcję genów.

W przypadku obecności liganda i aktywacji receptora proteina Dishevelled (DVL) przyłącza się do Frizzled, a AXIN i GSK3B do ufosforylowanego białka błonowego LRP (ang. *low density lipoprotein receptor-related protein*). W rezultacie β -katenina może indukować ekspresję genów tworząc kompleks z TCF oraz z białkami rodziny Legless (BCL9, BCL9L).

W ścieżce niekanonicznej po przyłączeniu liganda do receptora Frizzled wraz z jego koreceptorami ROR2 oraz RYK będącymi receptorowymi kinazami tyrozynowymi mogą zostać aktywowane dwie kaskady sygnałowe. W kaskadzie DVL-zależnej, białka G (RHOA, RHOU) uczestniczą w reorganizacji cytoszkieletu, a w Ca^{2+} -zależnej, przekaźnik IP_3 (trifosforan inozytolu) uwalnia jony wapnia, co prowadzi do reakcji, w których CAMKII (kinaza białkowa zależna od wapnia i kalmoduliny) aktywuje kinazę NLK (ang. *nemo-like kinase*) hamujące kompleks β -katenina/TCF.

Ścieżka sygnalizacyjna Notch odpowiedzialna za neurogenezę, angiogenezę oraz rozwój zastawek serca jest aktywowana w momencie, kiedy na jednej komórce receptory Notch (Notch1-4) łączą się z ligandami Delta (1-4) lub Jagged (1-2) obecnymi na drugiej. W konsekwencji metaloproteinaza ADAM i y-sekretaza (zawierająca nikastrynę, presenilinę APH-1 anterior-pharynx defective-1, PEN-2 presenilin enhancer 2) tną proteolitycznie receptor Notch, dzięki czemu dochodzi do uwolnienia NICD (ang. *notch intracellular domain*), która trafia do jądra komórkowego, gdzie heterodimeryzuje z RBP-J/CSL (ang. *recombining binding protein suppressor of hairless*) regulując ekspresję genów, takich jak Hes odpowiedzialny za neurogenezę, Hey regulujący angiogenezę, czy CD25 wpływający na poprawne funkcjonowanie limfocytów T [54, 55].

Badania naukowe dowodzą, że nikotyna aktywując ścieżki sygnalizacyjne przyczynia się pośrednio do rozwoju nowotworów. W raku podstawnkomórkowym skóry powoduje wzrost ekspresji $\text{TGF-}\beta$ niezbędnego w proliferacji komórek guza poprzez zwiększanie stężenia Smo regulującego transkrypcję genów w ścieżce Hedgehog, a w raku płuc – poprzez Gli1 oraz Gli2 – przyczynia się do przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT) [56, 57]. Prawdopodobnie aktywacja ścieżki Hedgehog przez nikotynę indukuje patologiczne zmiany w rozwoju motoneuronów [58]. Nikotyna zwiększa wydzielanie noradrenaliny i adrenaliny tym samym powodując proliferację oraz migrację macierzystych komórek nowotworowych trzustki (PCSC), w których stwierdzono mutacje SHH [59].

Okazało się również, iż nikotyna uczestniczy w modelowaniu nabłonka dróg oddechowych wpływając na ścieżkę Wnt i powodując przejście nabłonkowo-mezenchymalne EMT w komórkach nabłonkowych oskrzeli, co przyczynia się do produkcji włókniaka przez tkankę podnabłonkową i rozwój przewlekłej obturacyjnej choroby płuc [60]. Nikotyna przyczynia się do przekształcania fibroblastów leżących pomiędzy pęcherzykami AIF (ang. *Alveolar interstitial fibroblasts*) w miofibroblasty (MYF) poprzez zwiększenie aktywności kinazy proteinowej C (PKC) i tym samym

ścieżki Wnt oraz hamuje ekspresję PPAR (receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksydomów) prowadząc do chorób płuc [60].

Nikotyna, działając na receptory $\alpha 7$ -nAChR i ścieżkę sygnalizacyjną NOTCH, wpływa na zwiększenie populacji macierzystych komórek nowotworowych w guzie piersi typu MCF-7 [61]. Wykazano również, że wywołując stres oksydacyjny w komórkach bariery krew-mózg zaburza ich integralność zmniejszając liczbę receptorów NOTCH4. W ten sposób ułatwia przedostanie się szkodliwych cząsteczek do mózgu, co jest prawdopodobną przyczyną zespołu otępienia w przebiegu AIDS [62]. Nikotyna zmienia ilość ligandów ścieżki NOTCH w komórkach dendrytycznych oraz zmienia ich funkcjonowanie. Hamuje aktywowanie przez nie komórek Th1, ale zwiększa wpływ aktywacyjny na Th2 [63].

Oddziałując na receptory nAChR nikotyna indukuje rozwój komórek raka niedrobnokomórkowego płuc oraz angiogenezę poprzez wzrost aktywacji COX-2, prostacyklin, VEGFR-2, MMPs, uPA i e-NOS. Działając na $\alpha 7$ -nAChR, zwiększa produkcję fibronektyny uczestniczącej w migracji komórek raka okrężnicy [64, 65]

8. Podsumowanie

Dym tytoniowy wywiera wielopłaszczyznowe działanie na komórki budujące narządy, w tym na komórki macierzyste. Może on zaburzać funkcjonowanie wszystkich typów komórek macierzystych, w zależności od tego, kiedy pojawiło się narażenie na jego działanie – w trakcie organogenezy czy po niej. Niewątpliwie dym papierosowy jest czynnikiem ryzyka wielu nowotworów, a lista ta nieustannie się wydłuża, dzięki odkrywaniu nowych celów działania składników dymu tytoniowego. Wśród nich można wyróżnić: międzykomórkowe połączenia zwierające oraz zamykające, receptory inegrynowe, ścieżki sygnalizacyjne Hedgehog, Notch, Wnt oraz TGF- β , a także dzięki pośrednim dowodom – kompleksy białkowe determinujące polarność. W związku z powyższym wydaje się, iż zgłębienie wiedzy dotyczącej symetrii podziałów komórkowych oraz czynników zaburzających ten proces, może stanowić jeden z elementów układanki, która pozwoli rozwikłać problem onkogenezy.

Literatura

1. Knoblich J.A., *Asymmetric cell division: recent developments and their implications for tumour biology*. Nat Rev Mol Cell Biol, 11, (2010), s. 849-60.
2. Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman I.L., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. Nature, 414, (2001), s. 105-11.
3. Gimble J. and Guilak F., *Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential*. Cytotherapy, 5, (2003), s. 362-9.
4. Ilancheran S., Michalska A., Peh G., Wallace E.M., Pera M., Manuelpillai U., *Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential*. Biol Reprod, 77, (2007), s. 577-88.
5. Hou P., Li Y., Zhang X., Liu C., Guan J., Li H., Zhao T., Ye J., Yang W., Liu K., Ge J., Xu J., Zhang Q., Zhao Y., Deng H., *Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds*. Science, 341, (2013), s. 651-4.
6. Khaldoyanidi S., Sikora L., Orlovskaya I., Matrosova V., Kozlov V., Sriramarao P., *Correlation between nicotine – induced inhibition of hematopoiesis and decreased CD44 expression on bone marrow stromal cells*. Blood, 98, (2001), s. 303-312.
7. Lin S., Tran V., Talbot P., *Comparison of toxicity of smoke from traditional and harm-reduction cigarettes using mouse embryonic stem cells as a novel model for preimplantation development*. Hum Reprod, 24, (2009), s. 386-97.

8. Liszewski W., Ritner C., Aurigui J., Wong S.S., Hussain N., Krueger W., Oncken C., and Bernstein H.S., *Developmental effects of tobacco smoke exposure during human embryonic stem cell differentiation are mediated through the transforming growth factor-beta superfamily member, Nodal*. Differentiation, 83, (2012), s. 169-78.
9. Jedrzejewski M., Skowron K., Czekał P., *Stem cell niches exposed to tobacco smoke*. Przegl Lek, 69, (2012), s. 1063-73.
10. Noctor S.C., Martinez-Cerdeno V., Kriegstein A.R., *Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis*. J Comp Neurol, 508, (2008), s. 28-44.
11. Wang X., Tsai J.W., LaMonica B., and Kriegstein A.R., *A new subtype of progenitor cell in the mouse embryonic neocortex*. Nat Neurosci, 14, (2011), s. 555-61.
12. Aponte P.M. and Caicedo A., *Stemness in Cancer: Stem Cells, Cancer Stem Cells, and Their Microenvironment*. Stem Cells Int, 2017, (2017), s. 5619472.
13. Gattazzo F., Urciuolo A., Bonaldo P., *Extracellular matrix: a dynamic micro-environment for stem cell niche*. Biochim Biophys Acta, 1840 (2014), s. 2506-19.
14. Lampugnani M.G., Corada M., Caveda L., Breviario F., Ayalon O., Geiger B., Dejana E., *The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: differential association of plakoglobin, beta-catenin, and alpha-catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin)*. J Cell Biol, 129, (1995), s. 203-17.
15. Tian D., Zhu M., Li J., Ma Y., and Wu R., *Cigarette smoke extract induces activation of beta-catenin/TCF signaling through inhibiting GSK3beta in human alveolar epithelial cell line*. Toxicol Lett, 187, (2009), s. 58-62.
16. Yamashita Y.M., Mahowald A.P., Perlin J.R., and Fuller M.T., *Asymmetric inheritance of mother versus daughter centrosome in stem cell division*. Science, 315, (2007), s. 518-21.
17. Pohl C., Hermanns M.I., Uboldi C., Bock M., Fuchs S., Dei-Anang J., Mayer E., Kehe K., Kummer W., Kirkpatrick C.J., *Barrier functions and paracellular integrity in human cell culture models of the proximal respiratory unit*. Eur J Pharm Biopharm, 72, (2009), s. 339-49.
18. Knight D.A. and Holgate S.T., *The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease*. Respirology, 8, (2003), s. 432-46.
19. Chen Y.T., Gallup M., Nikulina K., Lazarev S., Zlock L., Finkbeiner W., McNamara N., *Cigarette smoke induces epidermal growth factor receptor-dependent redistribution of apical MUC1 and junctional beta-catenin in polarized human airway epithelial cells*. Am J Pathol, 177, (2010), s. 1255-64.
20. Zhang L., Gallup M., Zlock L., Basbaum C., Finkbeiner W.E., McNamara N.A., *Cigarette smoke disrupts the integrity of airway adherens junctions through the aberrant interaction of p120-catenin with the cytoplasmic tail of MUC1*. J Pathol, 229, (2013), s. 74-86.
21. Yamashita Y.M., *Regulation of asymmetric stem cell division: spindle orientation and the centrosome*. Front Biosci (Landmark Ed), 14, (2009), s. 3003-11.
22. Gonzalez-Mariscal L., Betanzos A., and Avila-Flores A., *MAGUK proteins: structure and role in the tight junction*. Semin Cell Dev Biol, 11, (2000), s. 315-24.
23. Marchiando A.M., Graham W.V., and Turner J.R., *Epithelial barriers in homeostasis and disease*. Annu Rev Pathol, 5, (2010), s. 119-44.
24. Saitou M., Furuse M., Sasaki H., Schulzke J.D., Fromm M., Takano H., Noda T., and Tsukita S., *Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands*. Mol Biol Cell, 11, (2000), s. 4131-42.
25. Furuse M., Fujita K., Hiiiragi T., Fujimoto K., Tsukita S., *Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin*. J Cell Biol, 141, (1998), s. 1539-50.
26. Frankel P., Aronheim A., Kavanagh E., Balda M.S., Matter K., Bunney T.D., Marshall C.J., *RalA interacts with ZONAB in a cell density-dependent manner and regulates its transcriptional activity*. EMBO J, 24, (2005), s. 54-62.

27. Shin K., Fogg V.C., Margolis B., *Tight junctions and cell polarity*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22 (2006), s. 207-35.
28. Abbruscato T.J., Lopez S.P., Mark K.S., Hawkins B.T., Davis T.P., *Nicotine and cotinine modulate cerebral microvascular permeability and protein expression of ZO-1 through nicotinic acetylcholine receptors expressed on brain endothelial cells*. *J Pharm Sci*, 91, (2002), s. 2525-38.
29. Hawkins B.T., Abbruscato T.J., Egleton R.D., Brown R.C., Huber J.D., Campos C.R., Davis T.P., *Nicotine increases in vivo blood-brain barrier permeability and alters cerebral microvascular tight junction protein distribution*. *Brain Res*, 1027, (2004), s. 48-58.
30. Gomez-Lopez S., Lerner R.G., and Petritsch C., *Asymmetric cell division of stem and progenitor cells during homeostasis and cancer*. *Cell Mol Life Sci*, 71, (2014), s. 575-97.
31. Oft M., Peli J., Rudaz C., Schwarz H., Beug H., Reichmann E., *TGF-beta1 and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells*. *Genes Dev*, 10 (1996), s. 2462-77.
32. Huber M.A., Kraut N., Beug H., *Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression*. *Curr Opin Cell Biol*, 17, (2005), s. 548-58.
33. D'Assoro A.B., Liu T., Quatraro C., Amato A., Opyrchal M., Leontovich A., Ikeda Y., Ohmine S., Lingle W., Suman V., Ecsedy J., Iankov I., Di Leonardo A., Ayers-Inglers J., Degnim A., Billadeau D., McCubrey J., Ingle J., Salisbury J.L., Galanis E., *The mitotic kinase Aurora--a promotes distant metastases by inducing epithelial-to-mesenchymal transition in ERalpha(+) breast cancer cells*. *Oncogene*, 33, (2014), s. 599-610.
34. Do T.V., Xiao F., Bickel L.E., Klein-Szanto A.J., Pathak H.B., Hua X., Howe C., O'Brien S.W., Maglaty M., Ecsedy J.A., Litwin S., Golemis E.A., Schilder R.J., Godwin A.K., Connolly D.C., *Aurora kinase A mediates epithelial ovarian cancer cell migration and adhesion*. *Oncogene*, 33, (2014), s. 539-49.
35. Kashyap A., Zimmerman T., Ergul N., Bosserhoff A., Hartman U., Alla V., Bataille F., Galle P.R., Strand S., Strand D., *The human Lgl polarity gene, Hugl-2, induces MET and suppresses Snail tumorigenesis*. *Oncogene*, 32, (2013), s. 1396-407.
36. Imai T., Tokunaga A., Yoshida T., Hashimoto M., Mikoshiba K., Weinmaster G., Nakafuku M., Okano H., *The neural RNA-binding protein Musashi1 translationally regulates mammalian numb gene expression by interacting with its mRNA*. *Mol Cell Biol*, 21, (2001), s. 3888-900.
37. Nogawa M., Yuasa T., Kimura S., Tanaka M., Kuroda J., Sato K., Yokota A., Segawa H., Toda Y., Kageyama S., Yoshiki T., Okada Y., Maekawa T., *Intravesical administration of small interfering RNA targeting PLK-1 successfully prevents the growth of bladder cancer*. *J Clin Invest*, 115, (2005), s. 978-85.
38. Maire V., Nemati F., Richardson M., Vincent-Salomon A., Tesson B., Rigai G., Gravier E., Marty-Prouvost B., De Koning L., Lang G., Gentien D., Dumont A., Barillot E., Marangoni E., Decaudin D., Roman-Roman S., Pierre A., Cruzalegui F., Depil S., Tucker G.C., Dubois T., *Polo-like kinase 1: a potential therapeutic option in combination with conventional chemotherapy for the management of patients with triple-negative breast cancer*. *Cancer Res*, 73, (2013), s. 813-23.
39. Ishiguro H., Akimoto K., Nagashima Y., Kojima Y., Sasaki T., Ishiguro-Imagawa Y., Nakaigawa N., Ohno S., Kubota Y., Uemura H., *aPKClambda/iota promotes growth of prostate cancer cells in an autocrine manner through transcriptional activation of interleukin-6*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, (2009), s. 16369-74.
40. Regala R.P., Weems C., Jamieson L., Copland J.A., Thompson E.A., Fields A.P., *Atypical protein kinase Ciota plays a critical role in human lung cancer cell growth and tumorigenicity*. *J Biol Chem*, 280, (2005), s. 31109-15.
41. Zhan L., Rosenberg A., Bergami K.C., Yu M., Xuan Z., Jaffe A.B., Allred C., Muthuswamy S.K., *Deregulation of scribble promotes mammary tumorigenesis and reveals a role for cell polarity in carcinoma*. *Cell*, 135, (2008), s. 865-78.

42. Hynes R.O., *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines*. Cell, 110, (2002), s. 673-87.
43. Goulas S., Conder R., Knoblich J.A., *The Par complex and integrins direct asymmetric cell division in adult intestinal stem cells*. Cell Stem Cell, 11, (2012), s. 529-40.
44. Toyoshima F. and Nishida E., *Spindle orientation in animal cell mitosis: roles of integrin in the control of spindle axis*. J Cell Physiol, 213, (2007), s. 407-11.
45. Munger J.S., Huang X., Kawakatsu H., Griffiths M.J., Dalton S.L., Wu J., Pittet J.F., Kaminski N., Garat C., Matthay M.A., Rifkin D.B., Sheppard D., *The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis*. Cell, 96, (1999), s. 319-28.
46. Checa M., Hagood J.S., Velazquez-Cruz R., Ruiz V., Garcia-De-Alba C., Rangel-Escareno C., Urrea F., Becerril C., Montano M., Garcia-Trejo S., Cisneros Lira J., Aquino-Galvez A., Pardo A., Selman M., *Cigarette Smoke Enhances the Expression of Profibrotic Molecules in Alveolar Epithelial Cells*. PLoS One, 11, (2016), s. e0150383.
47. Snyder H.B., Caughman G., Lewis J., Billman M.A., Schuster G., *Nicotine modulation of in vitro human gingival fibroblast beta1 integrin expression*. J Periodontol, 73, (2002), s. 505-10.
48. Bai W., Chen Y., Yang J., Niu P., Tian L., Gao A., *Aberrant miRNA profiles associated with chronic benzene poisoning*. Exp Mol Pathol, 96, (2014), s. 426-30.
49. Sudheer A.R., Muthukumaran S., Kalpana C., Srinivasan M., Menon V.P., *Protective effect of ferulic acid on nicotine-induced DNA damage and cellular changes in cultured rat peripheral blood lymphocytes: a comparison with N-acetylcysteine*. Toxicol In Vitro, 21, (2007), s. 576-85.
50. Lesiak A., Sobolewska-Sztychny D., Danilewicz M., Rogowski-Tylman M., Sysa-Jedrzejska A., Sobjanek M., Olejniczak-Staruch I., Narbutt J., *Sonic hedgehog pathway dysregulation in skin basal-cell carcinoma of a Polish population*. Folia Histochem Cytobiol, 51, (2013), s. 219-24.
51. Ming J.E., Roessler E., Muenke M., *Human developmental disorders and the Sonic hedgehog pathway*. Mol Med Today, 4 (1998), s. 343-9.
52. Allen B.L., Song J.Y., Izzi L., Althaus I.W., Kang J.S., Charron F., Krauss R.S., McMahon A.P., *Overlapping roles and collective requirement for the coreceptors GASI, CDO, and BOC in SHH pathway function*. Dev Cell, 20, (2011), s. 775-87.
53. Bhatia N., Thiyagarajan S., Elcheva I., Saleem M., Dlugosz A., Mukhtar H., Spiegelman V.S., *Gli2 is targeted for ubiquitination and degradation by beta-TrCP ubiquitin ligase*. J Biol Chem, 281, (2006), s. 19320-6.
54. Shih Ie M., Wang T.L., *Notch signaling, gamma-secretase inhibitors, and cancer therapy*. Cancer Res, 67, (2007), s. 1879-82.
55. Kopan R., Ilagan M.X., *The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism*. Cell, 137, (2009), s. 216-33.
56. Perrot C.Y., Javelaud D., Mauviel A., *Overlapping activities of TGF-beta and Hedgehog signaling in cancer: therapeutic targets for cancer treatment*. Pharmacol Ther, 137, (2013), s. 183-99.
57. Dasari V., Gallup M., Lemjabbar H., Maltseva I., and McNamara N., *Epithelial-mesenchymal transition in lung cancer: is tobacco the "smoking gun"?* Am J Respir Cell Mol Biol, 35, (2006), s. 3-9.
58. Svoboda K.R., Vijayaraghavan S., Tanguay R.L., *Nicotinic receptors mediate changes in spinal motoneuron development and axonal pathfinding in embryonic zebrafish exposed to nicotine*. J Neurosci, 22, (2002), s. 10731-41.
59. Al-Wadei M.H., Banerjee J., Al-Wadei H.A., Schuller H.M., *Nicotine induces self-renewal of pancreatic cancer stem cells via neurotransmitter-driven activation of sonic hedgehog signalling*. Eur J Cancer, 52, (2016), s. 188-96.

60. Sakurai R., Cerny L.M., Torday J.S., Rehan V.K., *Mechanism for nicotine-induced up-regulation of Wnt signaling in human alveolar interstitial fibroblasts*. *Exp Lung Res*, 37, (2011), s. 144-54.
61. Hirata N., Sekino Y., Kanda Y., *Nicotine increases cancer stem cell population in MCF-7 cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 403, (2010), s. 138-43.
62. Manda V.K., Mittapalli R.K., Geldenhuys W.J., Lockman P.R., *Chronic exposure to nicotine and saquinavir decreases endothelial Notch-4 expression and disrupts blood-brain barrier integrity*. *J Neurochem*, 115, (2010), s. 515-25.
63. Nouri-Shirazi M., Kahlden C., Nishino P., Guinet E., *Nicotine exposure alters the mRNA expression of Notch ligands in dendritic cells and their response to Th1-/Th2-promoting stimuli*. *Scand J Immunol*, 81, (2015), s. 110-20.
64. Dasgupta P., Rizwani W., Pillai S., Kinkade R., Kovacs M., Rastogi S., Banerjee S., Carless M., Kim E., Coppola D., Haura E., Chellappan S., *Nicotine induces cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a variety of human cancer cell lines*. *Int J Cancer*, 124, (2009), s. 36-45.
65. Wei P.L., Kuo L.J., Huang M.T., Ting W.C., Ho Y.S., Wang W., An J., Chang Y.J., *Nicotine enhances colon cancer cell migration by induction of fibronectin*. *Ann Surg Oncol*, 18, (2011), s. 1782-90.

Wpływ dymu tytoniowego na symetrię podziału komórkowego

Streszczenie

Komórki macierzyste mogą dzielić się na drodze podziału symetrycznego, w wyniku, którego powstają bądź dwie identyczne komórki o zachowanym fenotypie macierzystym, posiadające zdolność do dalszych podziałów, bądź dwie o zdefiniowanym charakterze. Drugim typem podziału jest podział asymetryczny, w wyniku, którego powstają dwie różne komórki: jedna o charakterze macierzystym i druga – częściowo zróżnicowana. Zaburzenia symetrii podziału komórkowego są powiązane z rozwojem części nowotworów wywodzących się z komórek prekursorowych oraz z nowotworowych komórek macierzystych. Mechanizm tych procesów jest zależny od wielu czynników m.in. charakterystyki połączeń międzykomórkowych, aktywności białek określających polarność komórki, receptorów integrynowych oraz wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych. Dym tytoniowy oraz indywidualnie, niektóre jego składniki wywierają wielokierunkowe działanie na symetrię podziału komórkowego. Dlatego też, dokładne poznanie mechanizmów molekularnych regulujących oraz zaburzających ten podział w warunkach działania ksenobiotyków, jest niezwykle ważne z punktu widzenia m.in. poznania patogenezы nowotworów oraz zastosowania skutecznej celowanej terapii przeciwnowotworowej. W niniejszej pracy dokonano podsumowania danych literaturowych na temat wpływu dymu tytoniowego na symetrię podziału komórkowego.

Słowa kluczowe: komórki macierzyste, symetria podziału, dym, tytoń, nikotyna.

The influence of tobacco smoke on symmetry of cell division

Abstract

Stem cells can divide by symmetrical division, resulting in either two identical cells with a preserved stem phenotype, having the ability to divide further, or two cells with a defined character. The second type of division is the asymmetrical division, resulting in two different cells: one with a stem character and another one - partially differentiated. Disorders connected with cell division symmetry can result in the development of some tumors originating from precursor cells or cancer stem cells. The mechanism of these processes depends on many factors, including characteristics of cell-cell connections, activity of proteins determining cell polarity, integrin receptors and intracellular signaling pathways. Tobacco smoke and some of its components individually, exert a multidirectional effect on the symmetry of cell division. Therefore, a thorough understanding of the molecular mechanisms regulating and disrupting cell division under the conditions of xenobiotic action is extremely important in term of, among others, cognition of cancer pathogenesis and the use of effective targeted anti-cancer therapy. This paper summarizes the literature data on the impact of tobacco smoke on cell division symmetry.

Keywords: stem cells, division symmetry, smoke, tobacco, nicotine.

Niektóre aspekty stosowania komórek macierzystych w medycynie

1. Wprowadzenie

Komórki macierzyste (ang. *stem cells*, SC) są niewyspecjalizowanymi komórkami, posiadającymi zdolność nieograniczonej proliferacji oraz różnicowania się w komórki innych typów [1]. W ostatnich latach cieszą się szczególnym zainteresowaniem naukowców, ze względu na możliwość szerokiego ich użycia w medycynie. Można przyjąć, że komórki macierzyste historycznie po raz pierwszy używane były do leczenia chorób wiążących się z koniecznością re-populacji szpiku, np. białaczek, anemii czy nowotworów układu limfatycznego.

Komórki macierzyste mogą dzielić się asymetrycznie lub symetrycznie. Podczas podziału asymetrycznego dochodzi do samo odnawiania (*self-renewal*) komórek macierzystych oraz powstania częściowo zróżnicowanej komórki progenitorowej. Podczas podziału symetrycznego powstają dwie komórki progenitorowe co kieruje je na drogę różnicowania zmniejszając tym samym pulę komórek macierzystych [2]. W zależności od pochodzenia komórek, różnią się one zdolnością do różnicowania.

Celem niniejszej pracy jest ukazanie niektórych możliwości zastosowania komórek macierzystych w medycynie.

2. Podział ze względu na zdolność do różnicowania

Biorąc pod uwagę kryterium zdolności do proliferacji i różnicowania możemy wyróżnić:

- Komórki totipotencjalne (*totipotent cells*), czyli mające zdolność do różnicowania w każdy typ komórek występujących w organizmie, łącznie z łożyskiem, owodnią czy sznurem pępowinowym. Pochodzą one z embrionu w ciągu pierwszych kilku dni od zapłodnienia (stadium blastomerów);
- Komórki pluripotencjalne (*pluripotent cells*), czyli mające zdolność do różnicowania w prawie każdy typ komórek występujących w organizmie (komórki

¹ balkam@tlen.pl, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Epidemiologii i Metodologii Badań Klinicznych Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, www.umlub.pl.

² martamiszal991@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Epidemiologii i Metodologii Badań Klinicznych Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, www.umlub.pl.

³ anna.mroczek94@wp.pl, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Epidemiologii i Metodologii Badań Klinicznych Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, www.umlub.pl.

⁴ halina.pieciewicz-szczesna@umlub.pl, Katedra i Zakład Epidemiologii i Metodologii Badań Klinicznych, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, www.umlub.pl.

⁵ agnieszka.sikora@umlub.pl, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, www.umlub.pl.

wielopotencjalne). Różnicują się w liczne linie komórkowe dające początek trzem listkom zarodkowym: ektodermie, endodermie i mezodermie;

- Multipotencjalne (*multipotent cells*), mogące różnicować się w kilka różnych typów komórek. Komórki multipotencjalne powstałe z jednego listka zarodkowego mogą dać początek tylko linii komórkowej pochodzącej z tego listka zarodkowego;
- Unipotencjalne (*unipotent cells*), będące wyspecjalizowanymi komórkami, mogące dawać początek komórkom tylko jednego typu [1, 3].

3. Podział ze względu na pochodzenie

Komórki macierzyste ze względu na ich pochodzenie można podzielić na embrionalne/zarodkowe komórki macierzyste (ang. *embryonic stem cells*, ESCs) oraz nieembrionalne komórki macierzyste, do których należą okołoporodowe komórki macierzyste (ang. *foetal stem cells*, FSCs) i komórki macierzyste dorosłego człowieka/komórki somatyczne (ang. *adult stem cells*, ASCs).

3.1. Embrionalne komórki macierzyste

Embrionalne komórki macierzyste to komórki pochodzące z embrionu mające zdolność do różnicowania się w niemal każdy typ komórek w organizmie [2]. Najczęściej pobranie ESCs wiązało się w przeszłości ze zniszczeniem embrionu co wywoływało dyskusje o kwestii etyczno-moralnej takiego zabiegu. W 2008 roku udało się pobrać z pojedynczej komórki pochodzącej ze stadium blastomerów ludzkie komórki macierzyste, nie powodując przy tym destrukcji embrionu [4]. Wadą komórek macierzystych pochodzenia embrionalnego jest częste tworzenie potworniaków po ich przeszczepie do organizmu [5].

3.2. Nieembrionalne komórki macierzyste

3.2.1. Łożyisko

Łożyisko jest strukturą usuwającą produkty przemiany materii, dostarczającą składniki odżywcze, tlen, pełni też funkcję immunomodulującą. Chroni również płód przed infekcjami oraz niektórymi substancjami toksycznymi.

Prawidłowy rozwój łożyska zależy od implantacji blastocysty i inwazji trofoblastu w głąb endometrium. Nieprawidłowe wykształcenie łożyska może predysponować do: stanu przedrzucawkowego, porodu przedwczesnego czy ograniczenia wzrostu płodu [6].

Komórki macierzyste pochodzące z łożyska cechują się dużymi możliwościami różnicowania [1]. Badania pokazują, że wraz z czasem trwania ciąży – w szczególności w trzecim trymestrze – zwiększa się liczba komórek macierzystych w łożysku, natomiast spada liczba tych krążących we krwi pępowinowej [1].

3.2.2. Komórki macierzyste pobrane z krwi pępowinowej

Przeszczepianie komórek macierzystych z krwi pępowinowej wykonuje się od 1988 roku na świecie oraz od 2000 roku w Polsce [7]. Komórki macierzyste pobrane z krwi pępowinowej są alternatywą dla takich źródeł jak krew obwodowa czy szpik kostny [8]. Z powodu niewielkiej immunogenności, mogą być wykorzystywane także w przeszczepach allogenicznych [7].

Około 0,02-1,42% komórek znajdujących się w krwi pępowinowej stanowią hematopoetyczne komórki macierzyste (ang. *hematopoietic stem cells*, HSCs). Są one prekursorami wszystkich linii hematopoety. Oznacza to, że mogą przekształcać się w takie komórki jak: megakariocyty, erytrocyty, limfocyty T, limfocyty B, komórki NK (*natural killer*), monocyty, makrofagi, neutrofile, bazofile czy eozynofile [2]. Markery powierzchniowe: CD34, CD45, CD38 oraz c-Kit są używane do ich izolacji. Dają one nadzieję dla pacjentów chorujących na choroby hematologiczne, którzy nie mogą znaleźć dawcy szpiku kostnego.

W badaniu z 2012 roku u dzieci zakwalifikowanych do przeszczepienia komórek krwiotwórczych krwi pępowinowej prawdopodobieństwo przeżycia 2-letniego wynosiło $0,409 \pm 0,133$ [7].

Innym typem komórek macierzystych możliwych do uzyskania z krwi pępowinowej są niehematopoetyczne mezenchymalne komórki macierzyste (ang. *mesenchymal stem cells* – MSCs). Ulegają one różnicowaniu w komórki pochodzenia mezodermalnego, takie jak: osteocyty, chondrocyty, adipocyty czy komórki mięśniowe. Badania pokazują, że mogą się również różnicować w kierunku komórek nerwowych [9, 10, 11] oraz kardiomiocytów [12, 13].

3.2.3. Płyn owodniowy

Płyn owodniowy bierze udział w utrzymaniu prawidłowej temperatury, wymianie substancji odżywczych oraz zapewnia ochronę płodu przed bodźcami zewnętrznymi. Ilość płynu owodniowego może być oszacowana za pomocą indeksu AFI (ang. *amniotic fluid index*). Zarówno jego nadmiar, jak i niedobór, może świadczyć o poważnych chorobach płodu. Wielowodzie występuje na przykład w sytuacji, gdy płód nie jest w stanie połykać płynu owodniowego z powodu chorób układu pokarmowego lub nerwowego. Małowodzie może być natomiast spowodowane zmniejszoną produkcją moczu przez płód. Płyn owodniowy można pobrać podczas zabiegu amniopunkcji [14]. Pobranie komórek macierzystych pochodzących z płynu owodniowego pozwala na użycie ich jeszcze przed porodem lub zaraz po porodzie. Na modelu zwierzęcym udało się wszczepić do płodu zastawki serca, które były wyhodowane z pobranych wcześniej komórek macierzystych pochodzących z płynu owodniowego [15].

3.2.4. Komórki macierzyste u osób dorosłych

Komórki macierzyste u dorosłej osoby są obecne w dość małej ilości w porównaniu z ogólną liczbą komórek w organizmie. Przykładowo mezenchymalne komórki macierzyste znajdują się w tkance tłuszczowej jedynie w ilości jedna na 150 tysięcy komórek [5]. Znajdują się w tak zwanej niszy komórek macierzystych (ang. *stem cells niche*) [16]. Odpowiadają one za naprawę uszkodzonej tkanki i produkcję nowych komórek w miejsce starych, zużytych. Somatyczne komórki macierzyste mogą dać początek tylko linii komórkowej pochodzącej z tego samego listka zarodkowego, bądź komórkom tylko jednego typu [5]. Ciekawym jest fakt, że w odpowiednich warunkach mogą z nich powstać komórki, które normalnie powstają z innego listka zarodkowego. Przykładowo możliwym jest wyhodowanie komórek nerwowych z komórek macierzystych pobranych ze szpiku kostnego [17, 18]. Może być to wykorzystane do leczenia chorób układu nerwowego [19].

4. Potencjalne wykorzystanie komórek macierzystych w medycynie

4.1. Choroby układu nerwowego

Autyzm jest zaburzeniem rozwoju charakteryzującym się zakłóceniem interakcji społecznych, zdolności do komunikowania uczuć, trudnością w integracji wrażeń zmysłowych wraz ze stereotypią zachowań zarówno werbalnych, jak i niewerbalnych [20]. Naukowcy poszukują etiologii autyzmu między innymi w nieprawidłowym funkcjonowaniu układu immunologicznego. Badania sugerują korelacje zaburzeń ze spektrum autyzmu (ang. *autism spectrum disorders*, ASD) z zapaleniem tkanki nerwowej i podwyższonym poziomem niektórych cytokin [21, 22].

W badaniu opublikowanym w 2013 roku naukowcy badali skuteczność przeszczepu komórek macierzystych pochodzących z krwi pępowinowej oraz z pępowiny w leczeniu autyzmu. Transplantacja polegała na cotygodniowych wlewach komórek macierzystych, przez okres 4 tygodni. Infuzje były wykonywane dożylnie oraz do kanału kręgowego. W grupie, która otrzymywała komórki jednojądrzaste oraz mezenchymalne komórki macierzyste wraz z rehabilitacją wynik w skali CARS (Childhood Autism Rating Scale) polepszył się z 45.11 ± 4.31 do 28.00 ± 6.18 w ciągu 24 tygodni. W grupie kontrolnej otrzymującej leczenie tylko rehabilitacją wynik w skali CARS zmniejszył się jedynie z 43.15 ± 4.38 do 37.23 ± 3.42 [23].

Porażenie mózgowe jest chorobą wynikającą z uszkodzenia centralnego układu nerwowego. Przyczyną zazwyczaj jest wewnątrzmaciczne bądź okołoporodowe uszkodzenie mózgu wynikające na przykład z niedotlenienia czy krwotoku. Według niedawno opublikowanego badania autologiczny przeszczep komórek macierzystych z krwi pępowinowej polepsza funkcję mózgu i sprawność ruchową dzieci z porażeniem mózgowym [24].

Komórki macierzyste są również wykorzystywane do leczenia choroby Alzheimera. W badaniu przeprowadzonym w Korei Południowej przeszczep komórek macierzystych polepszył funkcje poznawcze oraz zahamował apoptozę neuronów powodowaną przez β -amyloid [25]. Podobne wyniki można znaleźć w innym badaniu, w którym komórki macierzyste zwiększały oczyszczanie mózgu z β -amyloidu [26].

4.2. Ortopedia

Tkanka chrzęstna, składająca się z komórek chrzęstnych zwanych chondrocytami oraz macierzy zewnątrzkomórkowej bogatej w proteoglikany zapewnia płynny, bezbolesny ruch w stawie. Niestety z wiekiem staje się ona coraz cieńsza (w wyniku procesu zwanego chondromalacją) przysparzając pacjentom dolegliwości bólowych [27, 28].

Możemy wyróżnić trzy rodzaje tkanki chrzęstnej: szklistą, włóknistą oraz sprężystą. Dominującą w organizmie człowieka jest tkanka chrzęstna szklista, która pokrywa powierzchnie stawowe [28]. Tkanka chrzęstna bardzo słabo regeneruje się [29]. Komórki macierzyste dają więc nowe nadzieje dla pacjentów z jej uszkodzeniami.

Badania pokazują, że użycie mezenchymalnych komórek macierzystych jest skuteczne w odbudowie tkanki chrzęstnej [30, 31]. W badaniu przeprowadzonym przez *Giannini* i wsp. objęto 48 pacjentów ze zmianami kości skokowej o powierzchni ponad $1,5 \text{ cm}^2$ w wieku od 15 do 50 lat. Wykonano u nich przeszczep

komórek macierzystych pochodzących ze szpiku kostnego w miejsce zmiany. Osiągnięte efekty mierzono za pomocą skali AOFAS (ang. *American Orthopaedic Foot and Ankle Society*). Kontrola po okresie około 2 lat pokazała istotną poprawę w skali AOFAS (64.4 ± 14.5 przed zabiegiem do 91.4 ± 7.7 podczas kontroli). Aż 94% pacjentów powróciło do uprawiania sportu [29].

4.3. Okulistyka

W 2014 roku udała się transplantacja siatkówki powstałej z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych. Zabieg trwający dwie godziny przeszła siedemdziesięcioletnia kobieta cierpiąca na zwyrodnienie plamki żółtej związane wiekiem. Jest to dość częsta przypadłość, która może prowadzić do ślepoty. Pobrane ze skóry pacjentki dojrzałe komórki zostały wyindukowane do komórek pluripotencjalnych, następnie były różnicowane do komórek nabłonka barwnikowego siatkówki. Podczas operacji nie wystąpiły żadne komplikacje, a rok po zabiegu przeszczepiony arkusz komórek był w nienaruszonym stanie, a wzrok pacjentki się nie pogorszył [32].

W 2017 roku naukowcy z Japonii dokonali pierwszej w historii transplantacji siatkówki oka z wykorzystaniem indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych zróżnicowanych następnie do komórek nabłonka barwnikowego siatkówki, które nie pochodziły od pacjenta poddanemu zabiegowi. Były one pobrane od anonimowego dawcy ze skóry [33]. Wykorzystanie komórek macierzystych w okulistyce pozwoli zatrzymać utratę wzroku u podobnych pacjentów, u których normalnie pogorszyłaby się rok po roku [34].

4.4. Kardiologia

Choroby sercowo-naczyniowe są najczęstszą przyczyną zgonów na świecie, a ich skutki są bardzo poważne. Zawał mięśnia sercowego to martwica komórek mięśnia sercowego spowodowana ich niedokrwieniem [35].

W randomizowanym badaniu z podwójnie ślepą próbą przeprowadzonym w Stanach Zjednoczonych zbadano skuteczność niehematopoetycznych mezenchymalnych komórek macierzystych (hMSCs, ang. *human Mesenchymal Stem Cells*) pochodzących ze szpiku kostnego w leczeniu skutków zawału mięśnia sercowego. Zaobserwowano, że pacjentów z grupy badawczej cechuje lepsza funkcja lewej komory serca oraz mniejsza skłonność do arytmii. Zaburzenia rytmu serca wśród pacjentów w grupie badawczej przyjmujących dożylnie hMSCs występowały czterokrotnie rzadziej (8.8%) w porównaniu do grupy placebo (36.8%). Frakcja wyrzutowa lewej komory (LVEF, ang. *Left Ventricular Ejection Fraction*) zwiększyła się w ciągu pierwszych 3 miesięcy w grupie, która otrzymała hMSCs o $5.9 \pm 1.8\%$. Natomiast nieco mniejszy wzrost LVEF, o $4.4 \pm 1.8\%$ obserwowano w grupie kontrolnej. Zastosowanie komórek macierzystych wykazało również korzystny wpływ na układ oddechowy. U pacjentów z grupy badawczej zaobserwowano większy przyrost natężonej objętości wydechowej pierwszosekundowej (FEV1, ang. *forced expiratory volume in 1 second*) w porównaniu z grupą placebo. W badaniu nie zanotowano różnic w pomiarach grubości ściany serca oraz ocenie jej ruchów między pacjentami z grupy badawczej a kontrolnej. Dodatkowo wykazano, że metoda ta jest bezpieczna i skuteczna u chorych po ostrym zawałe mięśnia sercowego.

Terapia hMSCs pozbawiona jest występowania znacznych skutków ubocznych, a obecność działań niepożądanych podczas badania obserwowano z porównywalną częstością w obu grupach. [36].

Kolejne badanie naukowe opublikowane w czasopiśmie *The American Journal of Cardiology* wykazało podobne rezultaty. U pacjentów, którzy po zabiegu przez-skórnej interwencji wieńcowej otrzymali mezenchymalne komórki macierzyste (BMSCs, ang. *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*) do tętnic wieńcowych zanotowano znaczące polepszenie się funkcji lewej komory serca. U chorych z grupy badanej zaobserwowano większy wzrost frakcji wyrzutowej lewej komory oraz znaczne poprawę szybkości ruchów ściany w miejscu zawału w porównaniu z grupą placebo [37].

4.5. Hematologia

Krew pępowinowa jest pozyskiwana po porodzie poprzez nakłucie tętnicy pępowinowej. Może być pobierana przy każdym porodzie bez ryzyka dla matki i dziecka, gdyż jest to zabieg bezinwazyjny. Dlatego, że jest mało immunogenna, jest możliwa jej transplantacja nawet gdy dawca i biorca są ze sobą nie spokrewnieni [7].

Pierwszy przeszczep krwi pępowinowej na świecie odbył się w 1988 roku w Paryżu, u chłopca cierpiącego na anemię typu Fanconiego. Z badania, które było opublikowane 8 lat później wynikało, że porcja krwi pępowinowej pobranej przy porodzie jest w stanie odbudować szpik kostny, a jej wykorzystanie wiąże się z mniejszym ryzykiem odrzucenia przeszczepu, niż w przypadku przeszczepiania szpiku kostnego [38].

β -talasemia jest wrodzoną chorobą czerwonych krwinek. Spowodowana jest wrodzonym defektem biosyntezy łańcuchów globiny co skutkuje zaburzoną produkcją hemoglobiny. Choroba może nie dawać żadnych symptomów, ale może też być bardzo groźna w skutkach. Często pacjenci wymagają do życia regularnych transfuzji krwi. W jej leczeniu naukowcy próbują zastosować komórki macierzyste pochodzące z krwi pępowinowej [39-41].

Trwają również badania nad wykorzystaniem komórek macierzystych w leczeniu niedoborów odporności. Zespół Wiskotta-Aldricha (ang. *Wiskott-Aldrich syndrome*, WAS) jest dziedzicznym, recesywnym zespołem chorobowym sprzężonym z chromosomem X. Wiąże się z mutacją w genie WAS, który koduje białko WASP. Objawami choroby mogą być: trombocytopenia, egzema oraz niedobory odporności. W leczeniu tej choroby stosuje się przeszczep hematopoetycznych komórek macierzystych. Dla pacjentów, którzy nie mogą znaleźć dawcy zgodnego w układzie HLA (ang. *Human Leucocyte Antigen system*), skuteczną alternatywą jest przeszczep komórek macierzystych pochodzących z krwi pępowinowej od dawcy niespokrewnionego [42, 43].

Komórki macierzyste pochodzące z krwi pępowinowej niespokrewnionego dawcy są wykorzystywane również w terapii nowotworów. W 2015 roku naukowcy udowodnili, że przeszczep komórek macierzystych pochodzących z krwi pępowinowej jest tak samo skuteczny w repopulacji szpiku, co przeszczep szpiku kostnego pochodzącego od rodzeństwa [44]. Daje to nowe nadzieje dla pacjentów nie mających rodzeństwa i nie mogących znaleźć dawcy identycznego w układzie HLA [45].

Podobne wyniki można znaleźć biorąc pod uwagę białaczki u dorosłych. Łatwo dostępne komórki macierzyste pochodzące z krwi pępowinowej okazały się skuteczną

metodą repopulacji szpiku w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej u dorosłych pacjentów. Uczestnicy badania (14 mężczyzn oraz 12 kobiet) otrzymali transplantację jednej jednostki krwi pępowinowej. Kondycjonowanie mieloablacyjne było prowadzone przy użyciu, takich leków jak: Tiotepa, Busulfan, Cyklofosfamid, Fludarabina czy Anti-Thymocyte Globulin. W ciągu ośmioletniej obserwacji żaden z obserwowanych pacjentów nie miał wznowy choroby [46].

5. Podsumowanie

Komórki macierzyste cieszą się w ostatnich latach szczególnym zainteresowaniem naukowców, ze względu na to, że mają szerokie zastosowanie w medycynie. Można je wykorzystywać między innymi w takich dziedzinach jak ortopedia, okulistyka, kardiologia, hematologia oraz w chorobach układu nerwowego. Liczne badania dowodzą, że są bezpieczne w stosowaniu, zarówno u osób dorosłych jak i u dzieci. Naukowcy pokładają w nich nadzieję na skuteczniejsze niż dotychczas leczenie wielu chorób. Potrzebne są dalsze prace nad nowymi zastosowaniami komórek macierzystych.

Literatura

1. Piskorska-Jasiulewicz M. M., Witkowska-Zimny M., *Perinatal sources of stem cells*, Postępy Hig Med Dosw, (2015); 69:, s. 327-334.
2. Roszek K., Komoszyński M., *Regulation and direction of umbilical cord blood stem cells differentiation and their therapeutic application*, Postępy Hig Med Dosw., (2008); 62, s. 660-667.
3. Volarevic V, Ljubic B, Stojkovic P, Lukic A, Arsenijevic N, Stojkovic M., *Human stem cell research and regenerative medicine--present and future*, Br Med Bull, (2011); 99, s. 155-68
4. Chung Y., Klimanskaya I., Becker S., Li T., Maserati M., Lu S-J., Zdravkovic T., Ilic D., Genbacev O., Fisher S., Krtolica A., Lanza R., *Human embryonic stem cell lines generated without embryo destruction*, Cell Stem Cell, (2008); 2, s. 113-117.
5. Gliński Z., Luft-Deptuła D., *Komórki macierzyste – korzyści i zagrożenia*, Życie Weterynaryjne, (2015), 90(3).
6. Ganguly, A., Tamblyn, J. A., Finn-Sell, S., Chan, S. Y., Westwood, M., Gupta, J. Hewison, M., *Vitamin D, the placenta and early pregnancy: effects on trophoblast function*, Journal of Endocrinology (2017) 236(2):JOE-17-0491.
7. Styczyński J., Kałwak K., Ussowicz M., Owoc-Lempach J., Chybicka A., Pieczonka A., Dębski R., Krenska A., Drabko K., Kowalczyk J., Boruczkowski D., Wysocki M., Wachowiak J., *Cord blood transplantations in Polish pediatric centers: report of the Polish Pediatric Group for Hematopoietic Stem Cell Transplantation*, Acta Haematol. Pol., (2012); 43, s. 265-270.
8. Stolarek M., Myśliwski A., *Stem cells of cord blood*, Postępy biologii komórki Tom 32 nr 2, (2005), s. 375-390.
9. Buzañska L, Jurga M, Domańska-Janik K., *Neuronal differentiation of human umbilical cord blood neural stem-like cell line*, Neurodegener Dis., (2006);3(1-2):19-26.
10. Kim, Jae-Jun, *Direct Conversion of Human Umbilical Cord Blood into Induced Neural Stem Cells with SOX2 and HMGA2.*, International Journal of Stem Cell, 10.2 (2017), s. 227-234.
11. Jablonska A. *Short-Lived Human Umbilical Cord-Blood-Derived Neural Stem Cells Influence the Endogenous Secretome and Increase the Number of Endogenous Neural*

- Progenitors in a Rat Model of Lacunar Stroke*, *Molecular Neurobiology* 53.9 (2016), s. 6413-6425.
12. Maioli M. *Amniotic Fluid Stem Cells Morph into a Cardiovascular Lineage: Analysis of a Chemically Induced Cardiac and Vascular Commitment*, *Drug Design, Development and Therapy* 7 (2013), s. 1063-1073.
 13. Prat-Vidal C, Roura S, Farré J, Gálvez C, Llach A, Molina CE, Hove-Madsen L, Garcia J, Cinca J, Bayes-Genis A., *Umbilical cord blood-derived stem cells spontaneously express cardiomyogenic traits*, *Transplant Proc.*, (2007), Sep;39(7), s. 2434-7.
 14. Lord M, Bhimji SS., *Amniotic Fluid Index (AFI)*, StatPearls Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; (2018) Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441881/>
 15. Weber B, Emmert MY, Behr L, Schoenauer R, Brokopp C, Drögemüller C, Modregger P, Stampanoni M, Vats D, Rudin M, Bürzle W, Farine M, Mazza E, Frauenfelder T, Zannettino AC, Zünd G, Kretschmar O, Falk V, Hoerstrup SP., *Prenatally engineered autologous amniotic fluid stem cell-based heart valves in the fetal circulation*, *Biomaterials.*, (2012), Jun;33(16), a. 4031-43.
 16. Kretschmar K, Clevers H., *Organoids: Modeling Development and the Stem Cell Niche in a Dish*, *Dev Cell.*, (2016), Sep 26;38(6), s. 590-600.
 17. Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM., *From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice*, *Science.*, (2000), Dec 1;290(5497), s. 1775-9.
 18. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR., *Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow*, *Science.*, (2000), Dec 1;290(5497), s. 1779-82.
 19. Valenzuela M, Sidhu K, Dean S, Sachdev P., *Neural stem cell therapy for neuropsychiatric disorders*, *Acta Neuropsychiatr.*, (2007), Feb;19(1), s. 11-26.
 20. Toro R, Konyukh M, Delorme R, Leblond C, Chaste P, Fauchereau F, Coleman M, Leboyer M, Gillberg C, Bourgeron T., *Key role for gene dosage and synaptic homeostasis in autism spectrum disorders*, *Trends Genet.*, (2010) Aug;26(8), s. 363-72.
 21. Onore C, Careaga M, Ashwood P., *The role of immune dysfunction in the pathophysiology of autism*, *Brain Behav Immun.*, (2012), Mar;26(3), s. 383-92.
 22. Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA., *Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism*, *Ann Neurol.*, (2005), Jan;57(1), s. 67-81.
 23. Lv, Yong-Tao, *Transplantation of Human Cord Blood Mononuclear Cells and Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells in Autism*, *Journal of Translational Medicine* 11, (2013), s. 196.
 24. Sun J. M., *Effect of Autologous Cord Blood Infusion on Motor Function and Brain Connectivity in Young Children with Cerebral Palsy: A Randomized, Placebo-Controlled Trial*, *Stem Cells Translational Medicine* 6.12 (2017), s. 2071-2078.
 25. Lee HJ, Lee JK, Lee H, Shin JW, Carter JE, Sakamoto T, Jin HK, Bae JS., *The therapeutic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in Alzheimer's disease*, *Neurosci Lett.* 2010 Aug 30;481(1), s. 30-5.
 26. Shin, Jin Young, *Mesenchymal Stem Cells Enhance Autophagy and Increase B-Amyloid Clearance in Alzheimer Disease Models*, *Autophagy* 10.1 (2014), s. 32-44.
 27. Yamagata K, Nakayamada S, Tanaka Y., *Use of mesenchymal stem cells seeded on the scaffold in articular cartilage repair*, *Inflamm Regen.*, (2018) Mar 12;38:4.
 28. Dziedzic K., Zalewski M.z, Gądek A. , Drukała J., *Chondrocytes application in regenerative medicine*, *Przegląd Lekarski*, 71,6, (2014), s. 334-339.
 29. Giannini S. et al., *One-Step Bone Marrow-Derived Cell Transplantation in Talar Osteochondral Lesions*, *Clinical Orthopaedics and Related Research* 467.12, (2009), s. 3307-3320.

30. Sadlik B. et al. *Cartilage Repair in the Knee Using Umbilical Cord Wharton's Jelly –Derived Mesenchymal Stem Cells Embedded Onto Collagen Scaffolding and Implanted Under Dry Arthroscopy*, *Arthroscopy Techniques* 7.1 (2018), e57-e63.
31. Saw KY, Anz A, Siew-Yoke Jee C, Merican S, Ching-Soong Ng R, Roohi SA, Ragavanaidu K., *Articular cartilage regeneration with autologous peripheral blood stem cells versus hyaluronic acid: a randomized controlled trial*, *Arthroscopy.*, (2013), Apr;29(4), s. 684-94.
32. Mandai M, Kurimoto Y, Takahashi M., *Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration*, *N Engl J Med.* (2017) Aug 24;377(8), s. 792-793.
33. Cyranoski D., *Japanese man is first to receive 'reprogrammed' stem cells from another person*, *Nature* | 03. 28. 2017 DOI: 10.1038/nature.2017.21730.
34. Peng Y, Baulier E1, Ke Y, Young A, Ahmedli NB, Schwartz SD, Farber DB., *Human embryonic stem cells extracellular vesicles and their effects on immortalized human retinal Müller cells*, *PLoS One.* 2018 Mar 14;13(3), s. e0194004.
35. Rodrigo, Ramón et al., *The Effectiveness of Antioxidant Vitamins C and E in Reducing Myocardial Infarct Size in Patients Subjected to Percutaneous Coronary Angioplasty (PREVEC Trial): Study Protocol for a Pilot Randomized Double-Blind Controlled Trial*, *Trials* 15 (2014), s. 192.
36. Hare J.M., *A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Dose-Escalation Study of Intravenous Adult Human Mesenchymal Stem Cells (Prochymal) After Acute Myocardial Infarction*, *Journal of the American College of Cardiology* 54.24 (2009), s. 2277-2286.
37. Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, Zhang JJ, Chunhua RZ, Liao LM, Lin S, Sun JP., *Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction*, *Am J Cardiol.*, (2004) Jul 1;94(1), s. 92-5.
38. Bielec B., Stojko R., *Stem cells of umbilical blood cord – therapeutic use*, *Postepy Hig Med Dosw.* (2015); 69, s. 853-863.
39. Li, Xin-Yu et al. *Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Children with β -Thalassemia Major: Multicenter Experience in China*, *World Journal of Pediatrics* 14.1 (2018), s. 92-99.
40. Jianpei Fang Shaoliang Huang Chun Chen Dunhua Zhou, *Unrelated Umbilical Cord Blood Transplant for β -thalassemia Major*, *Journal of Tropical Pediatrics*, Volume 49, Issue 2, 1 April 2003, Pages, s. 71-73.
41. Huang K, Zhou DH, Li Y, Xu HG, Que LP, Chen C, Xue HM, Guo HX, Weng WJ, Huang SL, Fang JP., *Modified conditioning regimen improves outcomes of unrelated donor peripheral blood stem cell transplantation for β -thalassaemia major patients*, *Pediatr Blood Cancer.* 2018 Mar 7., doi: 10.1002/pbc.27026.
42. Jaing TH, Tsai BY, Chen SH, Lee WI, Chang KW, Chu SM., *Early transplantation of unrelated cord blood in a two-month-old infant with Wiskott-Aldrich syndrome*, *Pediatr Transplant.* 2007 Aug;11(5), s. 557-9.
43. Shekhovtsova, Zhanna et al., *A Risk Factor Analysis of Outcomes after Unrelated Cord Blood Transplantation for Children with Wiskott-Aldrich Syndrome*, *Haematologica* 102.6 (2017), s. 1112-1119.
44. Tang X, Chen J, Fang J, Sun X, Qin MQ, Li J, Zhu Y, Luan Z., *Similar outcomes of allogeneic hematopoietic cell transplantation from unrelated donor and umbilical cord blood vs. sibling donor for pediatric acute myeloid leukemia: Multicenter experience in China*, *Pediatr Transplant.* 2015 Jun;19(4), s. 413-21.

45. Lou X, Zhao C, Chen H. *Unrelated donor umbilical cord blood transplant versus unrelated hematopoietic stem cell transplant in patients with acute leukemia: A meta-analysis and systematic review*. Blood Rev. 2018 May;32(3), s. 192-202.
46. Sanz J, Montesinos P, Saavedra S, Lorenzo I, Senent L, Planelles D, Larrea L, Martín G, Palau J, Jarque I, Martínez J, de la Rubia J, Moscardó F, Martínez D, Gómez I, López M, Sanz MA, Sanz GF., *Single-unit umbilical cord blood transplantation from unrelated donors in adult patients with chronic myelogenous leukemia*, Biol Blood Marrow Transplant., (2010), Nov;16(11), s. 1589-95.

Niektóre aspekty stosowania komórek macierzystych w medycynie

Streszczenie

Komórki macierzyste są niewyspecjalizowanymi komórkami, posiadającymi zdolność proliferacji oraz różnicowania w różne typy dojrzałych komórek. W zależności od pochodzenia, różnią się one zdolnością do różnicowania. Możemy wyróżnić komórki totipotentjalne, pluripotentjalne, multipotentjalne oraz unipotentjalne. Są wykorzystywane w wielu dziedzinach medycyny w leczeniu chorób, takich jak autyzm, porażenie mózgowie, choroba Alzheimera, choroby tkanki chrzęstnej, choroby siatkówki oka, zawał mięśnia sercowego, białaczka, anemia, β -talasemia oraz niedobór odporności. Publikowane badania dowodzą ich bezpieczeństwa oraz skuteczności. Komórki macierzyste dają nowe możliwości lepszego niż dotychczas leczenia chorób, dlatego potrzebne są dalsze badania nad ich nowymi zastosowaniami.

Słowa kluczowe: komórki macierzyste, biotechnologia.

Some medical aspects of the application of stem cells

Abstract

Stem cells are non-specialised cells with the ability to proliferate and differentiate between different types of mature cells. Depending on their origin, they vary in their ability to differentiate. We can distinguish between totipotent, pluripotent, multipotent and unipotent cells. They are used in many fields of medicine to treat diseases such as autism, cerebral palsy, Alzheimer's disease, cartilage diseases, retinal diseases, myocardial infarction, leukaemia, anaemia, β -thalasemia and immunodeficiency. Published studies prove their safety and effectiveness. Stem cells offer new opportunities for better treatment of diseases than before and further research is needed into their new applications.

Keywords: stem cells, biotechnology.

Znaczenie nowotworowych komórek macierzystych w leczeniu glejaka wielopostaciowego

1. Wstęp

Glejak wielopostaciowy (GBM, ang. *Glioblastoma*) jest najbardziej rozpowszechnionym i śmiertelnym, pierwotnym nowotworem mózgu [1]. Według Światowej Organizacji Zdrowia ma IV, najwyższy stopień złośliwości [2]. Budujące go komórki mogą w szybkim czasie szeroko rozprzestrzenić się w obrębie mózgu, nie dając przy tym przerzutów do innych narządów. Charakteryzuje się szczególnie wysoką inwazyjnością, częstymi nawrotami, gwałtownym rozrostem, uszkadzając przylegające tkanki. Dodatkowym problemem w przypadku leczenia tego nowotworu jest jego umiejscowienie. Obecność bariery krew-mózg w znacznym stopniu utrudnia dobranie odpowiedniej dawki chemioterapeutyków, aby zachowały swoją skuteczność jednocześnie nie powodując wzmożonej toksyczności dla całego organizmu [3]. Standardowe leczenie glejaka wielopostaciowego koncentruje się na uzyskaniu maksymalnej chirurgicznej resekcji, a następnie równoczesnej radioterapii z Temozolomidem (TMZ, doustnie dostępnej chemioterapii) oraz dodatkowej adiuwantowej terapii TMZ. Nie gwarantuje ono całkowitego wyleczenia, ale poprawia jakość i przedłuża czas przeżycia chorego. GBM to jeden z najszerzej scharakteryzowanych pod względem genetycznym typem nowotworu, co pozwala na rozpoznawanie jego grup zdefiniowanych profilami transkrypcyjnymi (proneuralnymi, neuralnymi, klasycznymi czy mezenchymalnymi), genetycznymi (mutacje w IDH1) czy epigenetycznymi (CpG [CIMP]) [4].

Glejaki wielopostaciowe stanowią 10-18% wszystkich guzów wewnątrzczaszkowych i 50-60% nowotworów gleju gwiaździstego [5, 6]. Roczna zapadalność na GBM wynosi około 5 przypadków na 100 tys. osób [3]. Częstość występowania u dorosłych wzrasta z wiekiem, a najwyższa zachorowalność przypada na 5. i 6. dekadę życia [3, 7]. Jednak niezależnie od stosowania optymalnego, dostępnego leczenia, rokowanie w tym nowotworze nie jest dobre. Większość pacjentów przeżywa jedynie kilkanaście miesięcy, mediana przeżycia określana jest na 11-12 miesięcy. Najczęściej chorzy umierają po około 15 miesiącach od ustalenia rozpoznania [3, 8]. Badania pokazują, że tylko 3-8% chorych żyje dłużej niż 3 lata [3, 9].

Od wielu lat prowadzone są badania mające na celu lepsze zrozumienie powstawania glejaka wielopostaciowego, mechanizmów odpowiadających za regulację tworzących go komórek oraz potencjalnych sposobów ich eliminacji. Coraz większe znaczenie w świecie medycyny zyskuje teoria istnienia nowotworowych komórek macierzystych. Po raz pierwszy zostały one zdefiniowane przez Johna Dicka w ostrej

¹ ewa027@op.pl, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Biochemii i Biologii Molekularnej, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, www.umlub.pl.

² danuta.h.dh@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Biochemii i Biologii Molekularnej, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, www.umlub.pl.

białacze szpikowej pod koniec lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku. W swojej pracy przedstawił dowody, iż komórki w ludzkiej ostrej białacze szpikowej zorganizowane są w hierarchii i pochodzą z prymitywnej komórki krwiotwórczej [10]. Co ciekawe, istnienie nowotworowych komórek macierzystych, które mogłyby tłumaczyć zjawisko heterogenności w obrębie nowotworów i co za tym idzie trudności w skutecznym leczeniu, podejrzewano już 40 lat temu. Jednak stan wiedzy oraz ograniczone możliwości dostępnych metod badawczych uniemożliwiało przeprowadzenie bardziej szczegółowych analiz [11].

2. Cel pracy

Celem pracy był przegląd najnowszych doniesień naukowych dotyczących możliwości wykorzystania nowotworowych komórek macierzystych do opracowania innowacyjnych metod terapii glejaka wielopostaciowego.

3. Materiał i metody

Metodę badawczą stanowi analiza dostępnej literatury naukowej z zakresu znaczenia i wykorzystania nowotworowych komórek macierzystych w potencjalnym leczeniu glejaka wielopostaciowego.

4. Pochodzenie i charakterystyka nowotworowych komórek macierzystych

4.1. Komórki macierzyste

Komórki macierzyste są niewyspecjalizowanymi komórkami posiadającymi zdolność do różnicowania się w wiele odmiennych typów komórek, które tworzą tkanki i organy. Po zapłodnieniu, już podczas wczesnego etapu rozwoju zarodkowego, rozpoczyna się ich proces tworzenia. W blastocystyce komórki wężła zarodkowego oraz pierwotnej ektodermy są w stanie różnicować się do każdego typu komórek; nazywane są totipotencjalnymi. W kolejnych etapach rozwoju zarodka następuje podział na linię komórek płciowych oraz somatycznych [12]. Grupa somatycznych komórek macierzystych, które są zdolne do samoodnawiania i nieskończonej proliferacji, występuje we wszystkich tkankach dojrzałego organizmu pełniąc rolę swoistego systemu naprawczego, co umożliwia zastąpienie martwych komórek nowymi [13, 14].

4.2. Nowotworowe komórki macierzyste

Nowotworowe komórki macierzyste (CSCs, ang. *cancer stem cells* lub w przypadku glejaków GCS, ang. *glioma stem cells*) są populacją niezróżnicowaną, definiowaną przez kryteria funkcjonalne, które obejmują:

- długotrwały proces samoodnowy;
- ciągłą proliferację;
- możliwość inicjowania guza.

Natomiast cechy powszechnie występujące, ale nie do końca sprecyzowane to częstotliwość występowania tych komórek w guzie, możliwość różnicowania się w wiele linii komórkowych oraz ekspresja markerów komórek macierzystych. Jednak do dziś nie udało się określić jednego markera, którego obecność jednoznacznie

wskazywała by na CSCs. W wielu badaniach do ich identyfikacji stosowane są markery, takie jak: CD133, SOX2 oraz OLIG2. Niestety ich ekspresja nie daje stu procentowej pewności czy dana subpopulacja komórek to nowotworowe komórki macierzyste [15].

Możliwe jest zastosowanie dodatkowo innych metod oznaczenia CSC wykorzystując ich zdolność do wzrostu jako neurosfery oraz zastosowanie barwników fluorescencyjnych, które pozwalają na identyfikację poszukiwanych antygenów. Wielu badaczy wykorzystuje hodowlę neurosfer do selekcji komórek progenitorowych w prawidłowych i nowotworowych komórkach macierzystych. Pozwala to na wybranie niewielkiej populacji komórek nowotworowych, które mają tendencję do funkcji progenitorowej oraz ekspresję receptora nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR) i receptora czynnika wzrostu fibroblastów (FGFR) opartego na czynnikach wzrostu (EGF i FGF) dodanych uprzednio do pożywki [16]. Za pomocą tej metody wybierane są komórki, które mogą rosnąć w podłożu przeznaczonym do hodowli komórek macierzystych; jednakże, wybór CSC w oparciu o metody hodowlane nie rekapitułuje heterogenności pierwotnego guza *in vivo*, jak oceniono za pomocą histologicznej morfologii, zróżnicowanej linii komórkowej i ekspresji genu [17].

Nowotworowe komórki macierzyste wykazują w porównaniu z innymi komórki nowotworowymi zwiększoną zdolność do onkogenezy oraz przerzutowania [18]. Ponadto komórki nowotworowe posiadają bardzo ograniczoną lub nawet brak możliwości samoodnowienia, co może wskazywać na to, że to populacja CSC jest odpowiedzialna za wzrost i rozpowszechnianie się guza. Rzucą to nowe światło na diagnozę i skuteczne leczenie większości chorób nowotworowych [14]. Co więcej, konwencjonalna chemioterapia stosowana do walki z GBM niszczy głównie odróżnicowane lub różnicujące się komórki budujące guz, dlatego też CSCs są odporniejsze na leczenie i następnie mogą dawać kolejne wznovy [19].

Na nowotworowe komórki macierzyste wpływa przede wszystkim sześć różnych mechanizmów, takie jak: czynniki genetyczne, epigenetyczne, metaboliczne, jak również zewnętrzne czynniki niszy, mikrośrodowisko komórkowe oraz układ odpornościowy gospodarza [15]. To pokazuje na jak wielu płaszczyznach możliwe jest potencjalne oddziaływanie na CSC oraz poszukiwanie skutecznych metod ich eliminacji.

5. Przegląd najnowszych doniesień naukowych

5.1. MELK

MELK (ang. *Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase*) to macierzysta zarodkowa kinaza posiadająca motyw suwaka leucynowego. Jest ona zaangażowana w kontrolę cyklu komórkowego, proliferacji, apoptozy, migracji i odnowy komórkowej [20]. Badania na mysich macierzystych komórkach neuronalnych (NPC) wykazały zwiększony poziom ekspresji MELK [20, 21], co sugeruje jej udział we wczesnych stadiach rozwoju i embriogenezy. Zwiększony poziom ekspresji MELK udokumentowano w kilku nowotworach występujących u ludzi, w tym w glejaku wielopostaciowym [22]. Przymuszcza się, że może ona odgrywać kluczową rolę w przeżyciu i utrzymaniu potencjału macierzystości komórek nowotworowych [23].

MELK jako kinaza wpływa na regulację aktywności innych białek. Jednym z nich jest czynnik transkrypcyjny FOXM1 kodowany przez jednoimienny gen – proto-onkogen. Co istotne ekspresję tego czynnika, podobnie jak MELK, stwierdzono we wczesnych stadiach zarodkowych (szczególnie w neuronalnych komórkach progenitorowych), podczas gdy w dojrzałej tkance mózgowej jej poziom był prawie niewykrywalny. Wykazano również, że ekspresja FOXM1 jest 200-krotnie wyższa w obszarach nowotworzenia niż w normalnej tkance mózgowej [23]. Aktywność MELK reguluje fosforylację i samo-aktywację FOXM1. Dzieje się to poprzez utworzenie białkowego kompleksu w którym FOXM1 jest substratem dla MELK. Dzięki temu aktywowany czynnik transkrypcyjny oddziałuje na poziomie genomu prowadząc do zwiększonej ekspresji genów mitotycznych w GSC [23].

Okazało się, że FOXM1 wpływa następnie na VEGF, metaloproteinazę 2 (MMP-2) i β -kateninę [24-26]. FOXM1 wchodząc w reakcję z VEGF odpowiada za angiogenezę, a więc pośrednio rozwój guza i jego progresję [27], a połączenie FOXM1 z β -kateniną nasila zdolności do samoodnowy CSC [25]. MELK może również odgrywać rolę w oporności guza na terapię. przypadku GBM i innych glejakach eksperymentalna radioterapia powodowała wzrost ekspresji MELK [25, 23], a blokowanie tego procesu za pomocą wyciszania za pośrednictwem siRNA i hamowanie MELK inhibitorem kinazy C1 powodowało zwiększoną apoptozę komórek, podczas gdy nadekspresja MELK sprzyjała rozrostowi komórek nowotworowych [20, 29].

Daje to możliwość rozwijania potencjalnych terapii ukierunkowanych na zmniejszanie ekspresji MELK, co może przyczynić się do lepszej odpowiedzi na leczenie, jednak wymagane są dokładniejsze badania w tym kierunku.

5.2. STAT 3

Innym celem terapeutycznym, który jest istotny dla funkcjonowania komórek macierzystych glejaka jest STAT 3 [30]. Jego aktywacja przez fosforylację jest odpowiedzialna m.in. za namnażanie komórek i hamowanie apoptozy, progresję nowotworu przez promowanie angiogenezy oraz utrzymywanie potencjału nowotworowych komórek macierzystych do samoodnawiania [31-33]. Zdolność STAT 3 do ingerencji w te procesy wynika z łączenia się z promotorami genów biorących udział w regulacji apoptozy (Bcl-2, Bcl-xL) oraz cyklu komórkowego (p21) [30,34].

W normalnych komórkach istnieją wewnętrzne czynniki hamujące nadmierną aktywność STAT 3. Jednakże w GSC na skutek nabycia mutacji dochodzi do jego przetrwałej aktywacji [33], skutkując dezintegracją przewodzenia sygnałów w dalszych etapach.

Aby ustalić jaką rolę odgrywa STAT 3 w GSC pozyskano 2 linie komórek macierzystych GBM: GS7-2 oraz GS6-22. Obie linie pochodziły z GBM pozyskanych od pacjentów [32]. Stosując metody barwienia immunohistochemicznego określono, że 98% komórek GS6-22 i 94% komórek GS7-2 wykazywało ekspresję CD133. Podczas hodowania tych linii na pożywce zawierającej składniki warunkujące różnicowanie komórek obie linie GSC zaczynały wykazywać morfologię zgodną z morfologią astrocytów i neuronów. W warunkach różnicowania ekspresja markerów nerwowych komórek macierzystych CD133, Nestyny i Olig2 w komór-

kach GS6-22 i GS7-2 zmniejszyła się, a wzrosła ekspresja markerów charakterystycznych dla zróżnicowanych astrocytów (GFAP) oraz neuronów (β III-tubulina) [32].

Wszczepienie już około tysiąca komórek linii GS7-2 myszom z zespołem upośledzenia odporności implikuje powstanie guza. Wykorzystując immunoblotting wykazano, że w obu liniach komórkowych STAT3 był fosforylowany (fosforylacja tyrozyny i seryny), a zainicjowanie różnicowania w obrębie komórek macierzystych prowadziło do spadku poziomu fosforylacji. Aby ocenić funkcję STAT3 w GSC zastosowano dwa inhibitory wiązania Stat3 z DNA (STA-21 i S3I-201). Częsteczki te zmniejszyły zdolność wiązania STAT3 do DNA w komórkach GS7-2 oraz GS6-22 [32].

Wykazano również, że stosując inhibitory STAT 3 (STA-21, S3I-201) w hodowlach komórkowych, zaobserwowano mniejszy potencjał do proliferacji i tworzenia neurosfer. Hamowanie STAT 3 powodowało również indukcję apoptozy w „niemacierzystych” komórkach glejaka (ale nie GSC). Mimo, że GSC nie ulegały apoptozie to znacząco spadła ekspresja markerów komórek macierzystych, a ekspresja β III-tubuliny nieznacznie wzrosła co mogłoby warunkować utratę multipotencji, jednak mimo zaobserwowanych zmian komórki traktowane STA-21 i S3I-201 nadal przypominały komórki niezróżnicowane. Pokazuje to, że samo hamowanie STAT 3 nie jest wystarczające do indukowania całkowitego różnicowania komórek macierzystych glejaka. Niemniej jednak zahamowanie aktywacji STAT 3 może być potencjalnym celem terapeutycznym ponieważ w badaniach na liniach komórkowych udowodniono, że zastosowanie inhibitorów STAT 3 (STA-21, S3I-201) spowodowało zmniejszenie potencjału rozrostowego GSC oraz tworzenia sfer nowopowstałych komórek nowotworowych [32].

5.3. miRNA

miRNA są zaangażowane w negatywną regulację ekspresji genów podczas rozwoju. Przyłączenie się miRNA do komplementarnej sekwencji nici mRNA w czasie translacji blokuje ją (przecina mRNA na 2 części) oraz przyspiesza deadenylację ogona poliA, co skutkuje z kolei szybszą degradacją cząsteczki mRNA [35, 36]. miRNA wpływają na stabilność i translację mRNA. Mają także duże znaczenie w takich procesach jak rozwój, różnicowanie czy utrzymanie potencjału macierzystości komórek [37] oraz kontrolują ekspresję niektórych onkogenów oraz genów supresorowych [38]. To dzięki ich regulacyjnym właściwościom cząsteczki te są przedmiotem badań m. in. w kierunku rozwoju terapii glejaka wielopostaciowego. Istnieje wiele typów miRNA, ukierunkowanych na różne cele. W tej części zostanie opisane miR-128 gdyż jak się okazało jego poziom jest znacząco zmniejszony w GBM.

Do badań nad rolą miR-128 użyto 3 linii komórkowych glejaka: U87MG, U251MG i U373MG oraz komórek OHG02 pochodzących ze świeżo wyciętych próbek glejaka ludzkiego, które później poddano transfekcji miR-128 [39].

Wykazano znaczny spadek ekspresji miR-128 w komórkach GBM, a także ich korelację z gorszym rokowaniem i progresją choroby. Po porównaniu profili ekspresji miRNA w glejaku z sąsiadującą normalną ludzką tkanką mózgową, stwierdzono, że poziom miR-128 był nadzwyczaj obniżony w glejakach [39].

Zbadano również, czy nadekspresja miR-128 będzie miała wpływ na fenotyp hodowanych komórek glejaka. Stabilna transdukcja z wektorem lentiwirusowym

zawierającym główny transkrypt miR-128 (pri-miR-128-1) wytworzyła wysokie poziomy dojrzałego miR-128 w komórkach glejaka U87 i U251. Transdukowane komórki miR-128 wykazywały zmniejszoną proliferację w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Wzrost krotności ekspresji miR-128 w eksperymentach transfekcji był podobny do różnicy w ekspresji obserwowanej pomiędzy próbkami guza pacjenta a otaczającym normalnym mózgiem, co wskazuje, że efekty mają znaczenie fizjologiczne. Wykazano także znaczący spadek odsetka komórek glejaka w fazie S po transfekcji miR-128, bez znaczących zmian w populacji apoptotycznej sub-G0. Po wszczępieniu komórek do myszy pozbawionych grasicy, wzrost komórek U87 z pri-miR-128-1 był znacząco zmniejszony. Guzy wykazujące ekspresję miR-128 były o 50% mniejsze niż kontrole. Tak więc miR-128 znacząco hamowało proliferację komórek glejaka zarówno w hodowli, jak i *in vivo* [39].

Dowiedziano, że miejscem docelowym działania miRNA-128 jest onkogen Bmi-1, który odgrywa rolę m. in. w regulacji odnowy komórek macierzystych [39-42]. Wykazano, że w glejaku obserwuje się zwiększenie regulacji Bmi-1 (równocześnie ze znacznie zmniejszonym poziomem miR-128) w przeciwieństwie do normalnego mózgu, co wspiera model regulacji Bmi-1 przez miR-128. Równocześnie ze zwiększeniem ekspresji miRNA-128 w hodowli komórek OHG02 poziom ekspresji Bmi-1 ulegał zmniejszeniu. Ponadto zaobserwowano również znaczący spadek liczby i objętości tworzonych przez te komórki neurosfer, czyli nowych kolonii komórek nowotworowych [39].

Badania te wskazują, że można dążyć do sposobów leczenia z wykorzystaniem dostarczania genu miR-128 lub kwasów nukleinowych podobnych do miR-128 w celu ukierunkowania na samoodnawiającą się populację komórek glejaka [39].

5.4. IFN

Kolejnym krokiem w poszukiwaniu nowych środków terapeutycznych skierowanych przeciw GSCs są badania nad wpływem interferonu. Pierwotną funkcją interferonów jest modulacja odpowiedzi immunologicznej w odpowiedzi na zakażenie wirusowe, aczkolwiek ostatnio poddaje się także analizom ich właściwości przeciwnowotworowe. Ich mechanizm działania obejmuje hamowanie proliferacji komórek [43, 44] i regulację odpowiedzi komórkowych na czynniki proapoptotyczne [43, 45].

Interferony wiążą się z receptorami na powierzchni komórek i wywołują efekty biologiczne przez zmianę ekspresji genów (szlak JAK-STAT). Konkretnie interferon typu I oddziałuje poprzez STAT 1 i 2. STAT następnie wiąże się z promotorami genów stymulowanych przez IFN (ISG) indukując ich transkrypcję [46-48]. W badaniach przedklinicznych stwierdzono, że ISG regulują oporność na chemioterapię i promieniowanie [49, 50].

W badaniu nad wpływem IFN typu I na proliferację GSC użyto 2 linii komórkowych (GBM6 oraz JX12) pozyskanych od pacjentów z glejakiem. Komórki te zostały potraktowane różnymi stężeniami rekombinowanego ludzkiego IFNa. Okazało się, że hamował on proliferację GSC zarówno z GBM6 jak i z JX12 w sposób zależny od dawki. GSC JX12 były jednak bardziej wrażliwe na antyproliferacyjne działanie IFN (z efektem obserwowalnym przy 10-krotnie niższym stężeniu niż w przypadku GSC GBM6). Może być to związane z tym, że IFN indukował także ekspresję genu

ISG15 (przy czym wyższe poziomy ekspresji ISG15 zauważono w GSC JX12 w porównaniu do GBM6), zgodnie z wyższą czułością JX12 GSC do antyproliferacyjnego działania IFN. Ponadto komórki traktowane IFN tworzyły mniejsze i mniej liczne kolonie. Wyniki te wskazują, że IFN może hamować zarówno proliferację GSC, jak i zdolność utrzymania potencjału macierzystości [43].

Podsumowując, wyniki te sugerują, że IFN może być skuteczny w zwalczaniu GSCs, które są odpowiedzialne za oporność na terapię i nawrót choroby [43].

5.5. BRM270

Potencjalnym źródłem substancji przeciwnowotworowych mogą być również naturalne ekstrakty z roślin. Obecnie leki przeciwnowotworowe nie są selektywne co do komórek guza lecz wpływają także na prawidłowe komórki proliferujące, co prowadzi do działań niepożądanych. Naturalne związki roślinne mogą stać się dobrą alternatywą w terapii nowotworów a ich działanie przeciwnowotworowe zaobserwowano m. in. w raku sutka [51], oraz w raku jelita grubego [52].

Ekstrakty roślinne hamują kilka szlaków sygnałowych, które są charakterystyczne dla komórek macierzystych, takich jak STAT 3, czynnik jądrowy – kappa B (NF- κ B), c-MYC i szlaki Wnt [53-56].

BRM270 jest związkiem pochodzącym z naturalnych ekstraktów roślinnych, wykazującym działanie przeciwnowotworowe na komórki kostniakomięsaka i gruczolakoraka płuca [47, 48].

Do oceny wpływu tej substancji na żywotność komórek w glejaku przeprowadzono badanie *in vitro* na komórkach MD13 GSCs oraz ludzkich astrocytach (ASCR) po potraktowaniu ich BRM270. Wyniki wykazały, że BRM270 hamował żywotność MD13 bardziej niż kontrolne ASCR w sposób zależny od dawki. GSC MD13 traktowane BRM270 tworzyły ponadto mniejsze guzy nowotworowe niż GSCs MD13 w próbie kontrolnej (bez BRM270). Nie stwierdzono natomiast różnic w liczbie i morfologii ASCR hodowanych w obecności czy też nieobecności BRM270. Wyniki te sugerują, że BRM270 silniej hamuje żywotność i wzrost GSC niż prawidłowych komórek. W badaniu tym wykazano również, że BRM270 promuje apoptozę GSC i tłumi markery komórek macierzystych oraz zdolność tworzenia guza przez GSC [59].

Co ważne, po wszczepieniu GSC MD13 myszom i leczeniu ich samym BRM270 (1g/kg masy ciała) nie zaobserwowano efektów uzyskanych *in vitro* tj. nie było znaczącej różnicy w przeżyciu między myszami traktowanymi zwykłym PBS a myszami leczonymi samym BRM270. Dla porównania efektów terapii obserwowano jeszcze grupę mysz leczonych tylko radiochemioterapią (CCRT), oraz połączeniem CCRT z BRM270 [59].

Badania te wykazały, że przeżycie mysz było istotnie zwiększone w grupie otrzymującej skojarzone leczenie BRM270 i CCRT w porównaniu z innymi grupami (tylko BRM, tylko CCRT lub PBS). Ponadto wszystkie myszy leczone samym CCRT doświadczyły nawrotu nowotworu, podczas gdy większość osobników leczonych równocześnie BRM270, jak i CCRT wykazywało całkowite zahamowanie wzrostu nowotworu. Wysłunięto więc wniosek, że CCRT sprzyja zatrzymaniu cyklu komórkowego i apoptozie namnażających się komórek nowotworowych, ale nie jest ukierunkowany na GSC, podczas gdy BRM270 tłumi utrzymywanie potencjału macierzystości i nasila apoptozę w GSC. Dlatego jest prawdopodobne, że kombinacja leczenia BRM270 z CCRT wykazuje efekty synergistyczne w zakresie eliminowania GSC [59].

5.6. SAHA

Deacetylazy histonów (HDAC) ulegają nadmiernej ekspresji w wielu różnych nowotworach [60], a ostatnie badania wykazały, że aktywność HDAC jest potrzebna do utrzymania CSC w raku piersi oraz guzach głowy i szyi [40,41]. Dlatego postuluje się wykorzystanie inhibitorów HDAC jako potencjalnego środka przeciwnowotworowego.

Udowodniono, że jeden z kwasów hydroksamowych (*Suberoylanilide hydroxamic acid* – SAHA), wykazuje cytotoksyczność w różnych typach komórek nowotworowych, takich jak chłoniak z komórek T [63], rak sutka [64], rak prostaty [65] i komórki glejaka [63].

Naukowcy postanowili jednak sprawdzić czy efekty te są obserwowane w przypadku rzadkiej populacji komórek jaką są GSC w glejaku. W badaniu nad wpływem SAHA na komórki macierzyste glejaka użyto dwóch linii komórkowych GBM: U87MG oraz U373MG. Okazało się, że dodanie do podłoża hodowlanego SAHA powodowało tłumienie proliferacji i żywotności zarówno w zakresie „komórek macierzystych” GBM jak zwykłych komórek nowotworowych (non-GSC). Mechanizm, dzięki któremu leczenie SAHA osłabia wzrost i żywotność GSC, związany jest z indukcją programowanej śmierci komórki (SAHA powodował gromadzenie aktywowanych kaspaz) [66].

Mimo, iż w kilku badaniach wykazano, że apoptoza zależna od kaspaz jest skuteczną strategią leczenia GBM, udowodniono, że złośliwe glejaki rozwijają mechanizmy przeciwdziałające apoptozie, aby uniknąć śmierci komórek nowotworowych [67,68]. Niemniej jednak w innym badaniu wykazano, że SAHA nie tylko indukował apoptotyczną śmierć komórek przy wyższych dawkach, ale także indukował starzenie się w GSC w niskich stężeniach (przy niskiej dawce prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego w GSC poprzez regulację w górę p21 i indukowało przedwczesne starzenie się poprzez aktywację szlaku p38/p53) [66].

Samoodnawianie w CSC stymuluje wzrost guza i zapewnia utrzymanie potencjału macierzystości [66, 69]. Jeśli leczenie terapeutyczne eliminuje tylko komórki nieodtworzące się samodzielnie, a nie oddziałuje CSC to w takim przypadku doprowadza to do zmniejszenia guza, lecz pozostałe CSC dają nawrót choroby, gdy terapia zostanie zatrzymana. Dlatego też zapobieganie oporności na leki i samoodnawianie się w GSC jest ważne, aby uniknąć wznowy GBM. Nowotworowe komórki macierzyste były hamowane po leczeniu SAHA, co sugeruje, że SAHA może przewyciężyć opór terapeutyczny w GBM przez celowanie w GSC. Ponad to marker Bmi1 jest ważnym czynnikiem dla samoodnowienia i utrzymania potencjału macierzystości CSC [70]. Sugeruje to, że celowanie w Bmi1 może być skutecznym sposobem zapobiegania nawrotom raka (marker Bmi1 był podwyższony w nowotworach opornych na TMZ w modelach heteroprzeszczepu). SAHA znacząco tłumilo ekspresję Bmi1 w sposób zależny od dawki, co oznacza, że SAHA hamuje GSC poprzez blokowanie mechanizmu samoodnawiania [66].

Wyniki te dają perspektywę celowania w GSC za pomocą SAHA i sugerują, że SAHA może być użyty jako środek do pokonania oporności na leki u pacjentów z GBM.

5.7. ALECSAT

Inną metodą walki z GBM jest immunoterapia, która obejmuje różne sposoby indukowania, wzmacniania czy przywracania układu odpornościowego pacjenta. Obecnie przeprowadzanych jest kilka badań klinicznych z wykorzystaniem tej metody terapeutycznej [71]. Uzasadnieniem zastosowania tej terapii jest związek pomiędzy podwyższoną liczbą naciekających komórek T w nowotworach GBM a lepszym rokowaniem [72]. Ponadto infuzja limfocytów T cytotoksycznych CD8+ (CTL) i komórek pomocniczych T CD4+ (T_h) myszom z guzami mózgu przedłużyła znacznie ich przeżycie [73]. Badania *in vitro* wykazały, że aktywowane komórki NK, które w przeciwieństwie do CTL nie są specyficzne względem antygeny, są wysoce skuteczne przeciwko CSC otrzymywanym z GBM [74] oraz iż komórki NK preferencyjnie atakują CSC [75].

Skuteczność i bezpieczeństwo leczenia immunologicznego zwanego ALECSAT (ang. *Autologous Lymphoid Effector Cells Specific Against Tumor Cells*) badane jest jako dodatkowa terapia obok radioterapii i temozolomidu w nowo zdiagnozowanym GBM w trwającym klinicznie randomizowanym II etapie wieloośrodkowego badania w Szwecji (NCT-02799238). ALECSAT jest oparty na typie immunoterapii znanym jako adoptywny transfer komórek, w tym przypadku autologiczne cytotoksyczne komórki NK i CTL są amplifikowane i aktywowane *ex vivo* z próbki krwi przed wstrzyknięciem. W przeprowadzonym badaniu przedklinicznym skuteczność tej terapii badana była na hodowlach komórkowych z guzów pobranych od pacjentów. Dla potwierdzenia obecności nowotworowych komórek macierzystych wykorzystano immunocytochemię stosując markery komórek macierzystych Nestyny i SOX2 oraz neuralny marker progenitorowy Wimentyne. Pacjenci otrzymywali radioterapię i TMZ zgodnie ze standardowym leczeniem oraz kilka dawek ALECSAT jako terapię dodatkową [76].

Wykazano wyraźną zależność dawka-odpowiedź ALECSAT od ilości CSC, co sugeruje, że liczba podawanych komórek ma znaczenie. Ponadto działanie ALECSAT *in vitro* na CSC korelowało istotnie z liczbą limfocytów T (Th) u pacjenta, co wskazuje na potencjalną korzyść ze zbierania komórek do wytwarzania ALECSAT na jeszcze wcześniejszym etapie, gdy pacjenci mają na ogół lepsze parametry krwi. Te wyniki pokazują, że ALECSAT ma silny i szeroki efekt cytotoksyczny skierowany na CSC otrzymane z GBM i w przyszłości może stać się standardową metodą wspomagającą konwencjonalną terapię tego nowotworu [76].

6. Podsumowanie

Obecnie prowadzonych jest wiele badań opartych na celowaniu w CSC w terapii glejaka wielopostaciowego. Przytoczone zostały tylko niektóre z nich. Wszystkie z opisanych prac przeprowadzone były na liniach komórkowych bądź na myszach. Potrzebne są dalsze analizy i badania w kierunku skuteczności tych potencjalnych środków terapeutycznych. Konieczne jest ustalenie czy efekty uzyskane *in vitro* mają także znaczenie *in vivo*. Niemniej trudno oceniać szanse na skuteczność tych terapii bez przeprowadzenia randomizowanych prób klinicznych.

BRM270 wydaje się być środkiem mającym szanse na powodzenie, chociażby z powodu braku toksyczności. Nie należy jednak zapominać, że wszystkie z tych

badań to próby przedkliniczne. Nie wiadomo, jak zareagowałyby na leczenie człowiek. Problem stanowi także ustalanie dawek terapeutycznych i drogi podania leku. Nie oceniono też, czy blokada jednego szlaku nie uruchomi innych zastępczych dróg sygnalizacji. Wszystkie te wątpliwości muszą zostać rozwiązane nim dojdzie do jakichkolwiek badań klinicznych. Obecnie pozostaje nam czekać na nowe doniesienia z tego zakresu.

Podziękowania

Pragniemy serdecznie podziękować Panu mgr inż. Adrianowi Odrzywolskiemu za wsparcie merytoryczne i cenne wskazówki, które znacząco przyczyniły się do powstania tej pracy.

Literatura

1. Stupp R., Hegi ME., Mason WP., van den Bent MJ., Taphoorn MJ., Janzer RC., Ludwin SK., Allgeier A., Fisher B., Belanger K., Hau P., Brandes AA., Gijtenbeek J., Marosi C., Vecht CJ., Mokhtari K., Wesseling P., Villa S., Eisenhauer E., Gorlia T., Weller M., Lacombe D., Cairncross JG., Mirimanoff RO.; *European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial.* *Lancet Oncol*, 10(5), (2009), s. 459-466.
2. Louis D., Perry A., Reifenberger G., von Deimling A., Figarella-Branger D., Cavenee WK., Ohgaki H., Wiestler OD., Kleihues P., Ellison DW. *The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary.* *Acta Neuropathol*, 131(6), (2016), s. 803-20.
3. Pan W., Ferguson S., Lam S. *Patient and treatment factors associated with survival among adult glioblastomas patients: a USA population-based study from 2000-2010.* *J. Neurosci*, 22(10), (2015), s. 1575-1581.
4. Weller M., Pfister SM., Wick W., Hegi ME., Reifenberger G., Stupp R. *Molecular neuro-oncology in clinical practice: a new horizon.* *Lancet Oncol*, 14(9), (2013), s. e370-e379.
5. Ejma M., Waliszewska-Prosół M., Hofman A., Bładowska J., Zub LW., Podemski R. *Rare clinical form of glioblastoma multiforme.* *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 68, (2014), s. 316-324.
6. Ortega A., Nuño M., Walia S., Mukherjee D., Black KL., Patil CG. *Treatment and survival of patients harboring histological variants of glioblastoma.* *J. Clin. Neurosci*. 21(10), (2014), s. 1709-1713.
7. Liebert W., Szymaś J., Majewski T. i wsp. *Long-term survival of a patients with glioblastoma multiforme.* Case report. *Neuroskop*, 9, (2007), s. 44-50.
8. Krex D., Klink B., Hartmann Ch., von Deimling A., Pietsch T., Simon M., Sabel M., Steinbach JP., Heese O., Reifenberger G., Weller M., Schackert G.; German Glioma Network. *Long-term survival with glioblastoma multiforme.* *Brain*, 130(Pt 10), (2007), s. 2596-2606.
9. Rojek A., Zub W.L., Waliszewska-Prosół M., Bładowska J., Obara K., Ejma M. *Wieloletnie przeżycie chorych z glejakiem wielopostaciowym – opisy przypadków.* *Polski Przegląd Neurologiczny*, 12 (2), (2015), s. 107-115.
10. Bonnet D., Dick JE. *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell.* *Nat Med*, 3(7), (1997), s. 730-737.

11. Wang J.C., Dick J.E. *Cancer stem cells: lessons from leukemia*. Trends Cell Biol., 15(9), (2005), s. 494-501.
12. Kruczyńska K.(red), Zienkiewicz I.(red), *Wczesny rozwój zarodkowy. W: Ssaki transgeniczne*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, (2001), s. 45-48.
13. Stem Cell Information: *The National Institutes of Health resource for stem cell research*. <http://stemcells.nih.gov/info> (15.02.2012).
14. Wiczczyński K., Niewiarowska J. *Nowotworowe komórki macierzyste. Cancer stem cells*. Postepy Hig Med Dosw, 66, (2012), s. 629-636.
15. Lathia J.D., Mack S.C., Mulkearns-Hubert E.E., Valentim C.L., Rich J.N. *Cancer stem cells in glioblastoma*. Genes Dev. 29(12), (2015), s. 1203-1217.
16. Pas trana E, Silva-Vargas V, Doetsch F. *Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells*. Cell Stem Cell, 8(5), (2011), s. 486-498.
17. Lee J., Kotliarova S., Kotliarov Y., Li A., Su Q., Donin NM., Pastorino S., Purow BW., Christopher N., Zhang W., Park JK., Fine HA. *Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines*. Cancer Cell, 9(5), (2006), s. 391-403.
18. Alison MR., Lim SM., Nicholson LJ. *Cancer stem cells: problems for therapy?* J. Pathol., 223(2), (2011), s. 147-161.
19. Dylla S.J., Bevilgia L., Park I., Chartier C., Raval J., Ngan L., Pickell K., Aguilar J., Lazetic S., Smith-Berdan S., Clarke M.F., Hoey T., Lewicki J., Gurney A.L. *Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy*. PLoS One.,3(6), (2008), s. e2428.
20. Ganguly R., Mohyeldin A., Thiel J., Kornblum H., Beullens M., Nakano I. *MELK—a conserved kinase: functions, signaling, cancer, and controversy*. Clinical and Translational Medicine, 4, (2015), s. 11.
21. Nakano I., Paucar AA., Bajpai R., Dougherty JD., Zewail A., Kelly TK., Kim KJ., Ou J., Groszer M., Imura T., Freije WA., Nelson SF., Sofroniew MV., Wu H., Liu X., Terskikh AV., Geschwind DH., Kornblum HI. *MELK regulates multipotent neural progenitor proliferation*. J Cell Biol. 170(3), (2005), s. 413-27.
22. Nakano I., Masterman-Smith M., Saigusa K., Paucar AA., Horvath S., Shoemaker L., Watanabe M., Negro A., Bajpai R., Howes A., Lelievre V., Waschek JA., Lazareff JA., Freije WA., Liao LM., Gilbertson RJ., Cloughesy TF., Geschwind DH., Nelson SF., Mischel PS., Terskikh AV., Kornblum HI. *Maternal embryonic leucine zipper kinase is a key regulator of the proliferation of malignant brain tumors, including brain tumor stem cells*. 2008, J Neurosci Res. 86(1), (2008), s. 48-60.
23. Joshi K., Banasavadi-Siddegowda Y., Mo X., Kim SH., Mao P., Kig C., Nardini D., Sobol RW., Chow LM., Kornblum HI., Waclaw R., Beullens M., Nakano I. *MELK-dependent FOXM1 phosphorylation is essential for proliferation of glioma stem cells*. Stem Cells, 31(6), (2013), s. 1051-63.
24. Bhat UG., Halasi M., Gartel AL. *Thiazole antibiotics target FoxM1 and induce apoptosis in human cancer cells*. Plos One. 4(5), (2009), s. e5592.
25. Zhang N., Wei P., Gong A., Chiu WT., Lee HT., Colman H., Huang H., Xue J., Liu M., Wang Y., Sawaya R., Xie K., Yung WK., Medema RH., He X., Huang S. *FoxM1 promotes beta-catenin nuclear localization and controls Wnt target-gene expression and glioma tumorigenesis*. Cancer Cell. 20(4), (2011), s. 427-42.
26. Wang Z., Ahmad A., Banerjee S., Azmi A., Kong D., Li Y., Sarkar FH. *FoxM1 is a novel target of a natural agent in pancreatic cancer*. Pharm Res. 27(6), (2010), s. 1159-68.

27. Zhang Y., Zhang N., Dai B., Liu M., Sawaya R., Xie K., Huang S. *FoxM1B transcriptionally regulates vascular endothelial growth factor expression and promotes the angiogenesis and growth of glioma cells*. Cancer Res. 68(21), (2008), s. 8733-8742.
28. Gu C., Banasavadi-Siddegowda YK., Joshi K., Nakamura Y., Kurt H., Gupta S., Nakano I. *Tumor-specific activation of the C-JUN/MELK pathway regulates glioma stem cell growth in a p53-dependent manner*. Stem Cells. 31(5), (2014), s. 870-81.
29. Minata M., Gu C., Joshi K., Nakano-Okuno M., Hong C., Nguyen CH., Kornblum H., Molla A., Nakano I. *Multi-Kinase Inhibitor C1 Triggers Mitotic Catastrophe of Glioma Stem Cells Mainly through MELK Kinase Inhibition*. PLoS One. 9(4), (2014), s. e92546.
30. Kanno H., Miyake S., Nakanowatari S. *Signaling Pathways in Glioblastoma Cancer Stem Cells: A Role of Stat3 as a Potential Therapeutic Target*. Austin J Cancer Clin Res. 2(2), (2015), s. 1030.
31. Brantley EC., Benveniste EN. *Signal transducer and activator of transcription-3: a molecular hub for signaling pathways in gliomas*. Mol Cancer Res. 6(5), (2008), s. 675-84.
32. Sherry MM., Reeves A., Wu JK., Cochran BH. *STAT3 is required for proliferation and maintenance of multipotency in glioblastoma stem cells*. Stem Cells. 27(10), (2009), s. 2383-92.
33. Kim J.E., Patel M., Ruzevick J., Jackson Ch., Lim M. *STAT3 Activation in Glioblastoma: Biochemical and Therapeutic Implications*. Cancers, 6(1), (2014), s. 376-395.
34. Bowman T., Garcia R., Turkson J., Jove R. *STATs in oncogenesis*. Oncogene, 19(21), (2000), s. 2474-88.
35. Bartel DP. *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions*. Cell. 136(2), (2009), s. 215-33.
36. Fabian MR., Sonenberg N., Filipowicz W. *Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs*. Annual Review of Biochemistry. 79, (2010), s. 351-79.
37. Kloosterman WP., Plasterk RH. *The diverse functions of microRNAs in animal development and disease*. Dev Cell, 11(4), (2006), s. 441-50.
38. Esquela-Kerscher A., Slack FJ. *Oncomirs – microRNAs with a role in cancer*. Nat Rev Cancer, 6(4), (2006), s. 259-69.
39. Godlewski J., Nowicki MO., Bronisz A., Williams S., Otsuki A., Nuovo G., Raychaudhury A., Newton HB., Chiocca EA., Lawler S. *Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal*. Cancer Res, 68(22), (2008), s. 9125-30.
40. Sparmann A., van Lohuizen M. *Polycomb silencers control cell fate, development and cancer*. Nat Rev Cancer, 6(11), (2006), s. 846-56.
41. Zencak D., Lingbeek M., Kostic C., Tekaya M., Tanger E., Hornfeld D., Jaquet M., Munier F. L., Schorderet D. F., van Lohuizen M., Arsenijevic Y. *Bmi1 loss produces an increase in astroglial cells and decrease in neural stem cell population and proliferation*. J Neurosci, 25(24), (2005), s. 5774-83.
42. Fasano C.A., Dimos J.T., Ivanova N.B., Lowry N., Lemischka I.R., Temple S. *shRNA knockdown of Bmi-1 reveals a critical role for p21-Rb pathway in NSC self-renewal during development*. Cell Stem Cell, 1(1), (2007), s. 87-99.
43. Du Z., Cai C., Sims M., Boop F.A., Davidoff A.M., Pfeffer L.M. *The effects of type I interferon on glioblastoma cancer stem cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 491(2), (2017), s. 343-348.
44. Tanabe T., Kominsky S.L., Subramaniam P.S., Johnson H.M., Torres B.A. *Inhibition of the glioblastoma cell cycle by type I IFNs occurs at both the G1 and S phases and*

- correlates with the upregulation of p21(WAF1/CIP1)*. J Neurooncol., 48(3), (2000), s. 225-32.
45. Wang R., Davidoff A.M., Pfeffer L.M. *Bortezomib sensitizes human glioblastoma cells to induction of apoptosis by type I interferons through NOXA expression and Mcl-1 cleavage*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 478(1) (2016), s. 128–134.
 46. Larner A.C., Jonak G., Cheng Y.S., Korant B., Knight E., Darnell J.E., Jr. *Transcriptional induction of two genes in human cells by b interferon*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 81(21), (1984), s. 6733–6737.
 47. Friedman R.L., Manly S.P., McMahon M., Kerr I.M., Stark G.R. *Transcriptional and post-transcriptional regulation of interferon-induced gene expression in human cells*, Cell, 38(3), (1984), s. 745-755.
 48. Darnell J.E.Jr., Kerr I.M., Stark G.R. *Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins*. Science, 264(5164), (1994), s. 1415-21.
 49. Khodarev N.N., Beckett M., Labay E., Darga T., Roizman B., Weichselbaum R.R. *STAT1 is overexpressed in tumors selected for radioresistance and confers protection from radiation in transduced sensitive cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(6), (2004), s. 1714-9.
 50. Khodarev N.N., Minn A.J., Efimova E.V., Darga T.E., Labay E., Beckett M., Mauceri H.J., Roizman B., Weichselbaum R.R., *Signal transducer and activator of transcription 1 regulates both cytotoxic and prosurvival functions in tumor cells*, Cancer Research, 67(19), (2007), s. 9214-20.
 51. Bishayee A., Ahmed S., Brankov N., Perloff M. *Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer*. Front Biosci (Landmark Ed) 16, (2011), s. 980-96.
 52. Pan M.H., Lai C.S., Wu J.C., Ho C.T. *Molecular mechanisms for chemoprevention of colorectal cancer by natural dietary compounds*. Mol Nutr Food Res 55(1), (2011), s. 32-45.
 53. Adan A., Baran Y. *The pleiotropic effects of fisetin and hesperetin on human acute promyelocytic leukemia cells are mediated through apoptosis, cell cycle arrest, and alterations in signaling networks*. Tumour Biology, 36(11), (2015), s. 8973-84.
 54. Diaz L., Diaz-Munoz M., Garcia-Gaytan A.C., Mendez I. *Mechanistic effects of calcitriol in cancer biology*. Nutrients, 7(6), (2015), s. 5020-50.
 55. Vallianou N.G., Evangelopoulos A., Schizas N., Kazazis C. *Potential anticancer properties and mechanisms of action of curcumin*. Anticancer Research 35(2), (2015), s. 645-51.
 56. Xiong M., Wang L., Yu H.L., Han H., Mao D., Chen J., Zeng Y., He N., Liu Z.G., Wang Z.Y., Xu S.J., Guo L.Y., Wang Y.A. *Ginkgetin exerts growth inhibitory and apoptotic effects on osteosarcoma cells through inhibition of STAT3 and activation of caspase-3/9*. Oncol Rep. 35(2), (2016), s. 1034-40.
 57. Mongre R.K., Sodhi S.S., Ghosh M., Kim J.H., Kim N., Park Y.H., Kim S.J., Heo Y.J., Sharma N., Jeong D.K. *The novel inhibitor BRM270 downregulates tumorigenesis by suppression of NFkappaB signaling cascade in MDR-induced stem like cancerinitiating cells*. Int J Oncol, 46(6), (2015), s. 2573-85.
 58. Mao P., Joshi K., Li J., Kim S.H., Li P., Santana-Santos L., Luthra S., Chandran U.R., Benos P.V., Smith L., Wang M., Hu B., Cheng S.Y., Sobol R.W., Nakano I. *Mesenchymal glioma stem cells are maintained by activated glycolytic metabolism*

- involving aldehyde dehydrogenase 1A3*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110(21), (2013), s. 8644-9.
59. Jeon H.Y., Park C.G., Ham S.W., Choi S.H., Lee S.Y., Kim J.Y., Seo S., Jin X., Kim J.K., Eun K., Kim E.J., Kim H. *BRM270, a Compound from Natural Plant Extracts, Inhibits Glioblastoma Stem Cell Properties and Glioblastoma Recurrence*. J Med Food, 20(9), (2017), s. 838-845.
 60. Zhang Y., Zhang N., Dai B., Liu M., Sawaya R., Xie K., Huang S. *FoxM1B transcriptionally regulates vascular endothelial growth factor expression and promotes the angiogenesis and growth of glioma cells*. Cancer Research, 68(21), (2008), s. 8733-42.
 61. Pathania R., Ramachandran S., Mariappan G., Thakur P., Shi H., Choi J.H., Manicassamy S., Kolhe R., Prasad P.D., Sharma S., Lokeshwar B.L., Ganapathy V., Thangaraju M. *Combined inhibition of DNMT and HDAC blocks the tumorigenicity of cancer stem-like cells and attenuates mammary tumor growth*. Cancer Research 76 (11), (2016), s. 3224-35.
 62. Giudice F.S., Pinto Jr D.S., Nor J.E., Squarize C.H., Castilho R.M. *Inhibition of histone deacetylase impacts cancer stem cells and induces epithelial-mesenchyme transition of head and neck cancer*. PLoS One, 8(3), (2013), s. e58672.
 63. Barazzuol L., Jeynes J.C., Merchant M.J., Wera A.C., Barry M.A., Kirkby K.J., Suzuki M. *Radiosensitization of glioblastoma cells using a histone deacetylase inhibitor (SAHA) comparing carbon ions with X-rays*. Int J Radiat Biol. 91(1), (2015), s. 90-8.
 64. Lee Y.J., Won A.J., Lee J., Jung J.H., Yoon S., Lee B.M., Kim H.S. *Molecular mechanism of SAHA on regulation of autophagic cell death in tamoxifen-resistant MCF-7 breast cancer cells*. Int J Med Sci. 9(10) (2012), s. 881-93.
 65. Lakshmikanthan V., Kaddour-Djebbar I., Lewis R.W., Kumar M.V. *SAHAsensitized prostate cancer cells to TNFalpha-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): mechanisms leading to synergistic apoptosis*. Int J Cancer. 119(1), (2006), s. 221-8.
 66. Che-Chia Hsu Wen-Chang Chang, Tsung-I Hsu, Jr-Jiun Liu, Shiu-Hwa Yeh, Jia-Yi Wang, Jing-Ping Liou, Chiung-Yuan Ko, Kwang-Yu Chang, Jian-Ying Chuang. *Suberoylanilide hydroxamic acid represses glioma stem-like cells*. J Biomed Sci. 23, (2016), s. 81.
 67. Bertrand J., Begaud-Grimaud G., Bessette B., Verdier M., Battu S., Jauberteau M.O. *Cancer stem cells from human glioma cell line are resistant to Fas induced apoptosis*. Int J Oncol. 34(3), (2009), s. 717-27.
 68. Ziegler D.S., Kung A.L., Kieran M.W. *Anti-apoptosis mechanisms in malignant gliomas*. J Clin Oncol. 26(3), (2008), s. 493-500.
 69. O'Brien C.A., Kreso A., Jamieson C.H. *Cancer stem cells and self-renewal*. Clin Cancer Res. 16(12), (2010), s. 3113-20.
 70. Park I.K., Morrison S.J., Clarke M.F. *Bmi1, stem cells, and senescence regulation*. J Clin Invest. 113(2), (2004), s. 175-9.
 71. Tivnan A., Heilinger T., Lavelle E.C., Prehn J.H. *Advances in immunotherapy for the treatment of glioblastoma*. J Neuro-Oncol. 131(1), (2017), s. 1-9.
 72. Lohr J., Ratliff T., Huppertz A., Ge Y., Dictus C., Ahmadi R., Grau S., Hiraoka N., Eckstein V., Ecker R.C. *Effector T-cell infiltration positively impacts survival of glioblastoma patients and is impaired by tumor-derived TGF-beta*. Clin Cancer Res. 17(13), (2011), s. 4296-308.
 73. Hoepner S., Loh J.M., Riccadonna C., Derouazi M., Maroun C.Y., Dietrich P.Y., Walker P.R. *Synergy between CD8 T cells and Th1 or Th2 polarised CD4 T cells for adoptive immunotherapy of brain tumours*. PLoS One. 8(5), (2013), s. e63933.

74. Castriconi R., Daga A., Dondero A., Zona G., Poliani P.L., Melotti A., Griffero F., Marubbi D., Spaziant R., Bellora F. *NK cells recognize and kill human glioblastoma cells with stem cell-like properties*. J Immunol. 182(6), (2009), s. 3530-3539.
75. Ames E., Canter R.J., Grossenbacher S.K., Mac S., Chen M., Smith R.C., Hagino T., Perez-Cunningham J., Sckisel G.D., Urayama S. *NK Cells Preferentially Target Tumor Cells with a Cancer Stem Cell Phenotype*. J Immunol. 195, (2015), s. 4010-9.
76. Wenger A., Werlenius K., Hallner A., Thorén F.B., Farahmand D., Tisell M., Smits A., Rydenhag B., Jakola A.S., Carén H. *Determinants for Effective ALECSAT Immunotherapy Treatment on Autologous Patient-Derived Glioblastoma Stem Cells*. Neoplasia. 20(1), (2018), s. 25-31.

Znaczenie nowotworowych komórek macierzystych w leczeniu glejaka wielopostaciowego

Streszczenie

Glejaki wielopostaciowe (ang. *Glioblastoma*, GBM) to najczęstszy i najbardziej złośliwy nowotwór mózgu, wykazujący oporność na standardowe metody leczenia. Charakteryzuje się rozległą inwazyjnością, wysokim unaczynieniem i nawrotami miejscowymi. Obecnie rekomendowaną strategią postępowania w glejaku wielopostaciowym jest resekcja chirurgiczna oraz jednoczesne zastosowanie radiochemioterapii z następową chemioterapią uzupełniającą. Mimo początkowej odpowiedzi na leczenie, średnie przeżycie pacjentów wynosi około 15 miesięcy. Istotną rolę w oporności GBM na terapię odgrywają nowotworowe komórki macierzyste, tzw. CSC (ang. *cancer stem cells*). Jest to populacja niezróżnicowanych, samoodnawiających się komórek odpowiadająca za progresję i wznowę nowotworu. Podejmowane są próby opracowania terapii celowanej skierowanej przeciw CSC m.in. poprzez ingerencję w szlaki przekazywania sygnałów (MELK, Stat3) czy zastosowanie małych, niekodujących RNA (miRNA). Ich celem jest doprowadzenie do zahamowania proliferacji i indukcji apoptozy komórek macierzystych glejaka, z uwzględnieniem koncepcji medycyny personalizowanej. Celem pracy był przegląd najnowszych doniesień naukowych dotyczących możliwości wykorzystania nowotworowych komórek macierzystych do opracowywania innowacyjnych metod terapii glejaka wielopostaciowego.

Słowa klucze: glejak wielopostaciowy, GBM, nowotworowe komórki macierzyste, CSC.

The role of cancer stem cells in the treatment of glioblastoma

Abstract

Glioblastoma (GBM) is the most prevalent and malignant primary brain tumor, displaying resistance to standard treatment methods. It is characterized by extensive invasiveness, high vascularity and local recurrences. Currently, the recommended strategy for the management of glioblastoma is surgical resection and concomitant use of chemoradiation followed by complementary chemotherapy. Despite the initial response to treatment, the average survival of patients is about 15 months. An important role in the resistance of GBM to therapy is played by cancer stem cells, called CSC (cancer stem cells). It is a population of undifferentiated, self-renewing cells responsible for the progression and recurrence of cancer. Attempts are being made to develop targeted therapy against CSC, including by interfering with the signaling pathways (MELK, Stat3) or the use of small, non-coding RNAs (miRNAs). Their goal is to inhibit the proliferation and induction of glioblastoma stem cell apoptosis, including the concept of personalized medicine. The aim of that manuscript was to review the latest scientific reports on the possibility of using cancer stem cells to develop innovative methods of glioblastoma therapy.

Keywords: glioblastoma, GBM, cancer stem cells, CSC.

CRISPR i jej potencjalne zastosowania w biomedycynie

1. Wprowadzenie

CRISPR (ang. *Clustered Regularly-Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR and associated proteins*; pol. Zgrupowane, regularnie poprzedzielane, krótkie palindromiczne sekwencje powtórzone oraz powiązane z nimi białka) jest prokariotycznym adaptacyjnym systemem odporności używanym przez większość bakterii oraz archeony [1-4]. Zapewnia on ochronę przed obcymi elementami materiału genetycznego (np. wirusy, plazmidy) [1-4]. Macierze CRISPR przechowują w genomie fragmenty egzogenego DNA, pozyskiwanego np. w trakcie infekcji wirusowej. W przypadku wykrycia w przyszłości takiej sekwencji przez system CRISPR-Cas, następuje zdegradowanie egzogenego materiału genetycznego za pomocą enzymów tnących nić DNA. CRISPR po raz pierwszy został opisany w 1987 r. przez Yoshizumi Ishino z Uniwersytetu Osakijskiego i wsp. [5]. Późniejsze badania nad CRISPR i genami cas, oraz coraz większy poziom wiedzy na temat mechanizmu ich działania, umożliwiły w 2014 roku pierwszą edycję genomu z wykorzystaniem CRISPR-Cas. Hsu i wsp. dokonali wtedy manipulacji genetycznej bakterii *Streptococcus salivarius* ssp. *Thermophilus*, poprzez modyfikację przechowujących informację genetyczną separatorów w materiale genetycznym macierzy CRISPR, których sekwencja była komplementarna do sekwencji kodowanych w materiale genetycznym faga. W ten sposób możliwym było uzyskanie odporności bądź podatności na zakażenie fagiem [6]. Badanie to potwierdziło, że system CRISPR-Cas umożliwia programowalne przecinanie nici DNA, co stanowi główny potencjał tego systemu dla prób manipulacji genetycznej w kontekście np. terapii genowej. Niestety mimo że sama technika CRISPR-Cas wydawała się obiecująca, wykonane rok później pierwsze próby kontrolowanej zmiany materiału genetycznego w embrionach ludzkich dowiodły, że istnieje bardzo daleka droga do jakiegokolwiek zastosowania klinicznego [7]. Niemniej jednak porównując CRISPR-Cas z innymi nukleazami stosowanymi podczas prób edytowania genów wykazuje wyższą skuteczność. System CRISPR-Cas z powodzeniem może umożliwić bardzo szybką i prostą korekcję uszkodzeń w materiale genetycznym, włączać i wyłączać ekspresję genów zarówno w komórkach jak i całych organizmach. Może również przyczynić się do szybkiego i prostego tworzenia zwierzęcych modeli chorób genetycznych i umożliwić dogłębne poznanie funkcjonowania wybranych genów.

¹ arkadiusz_goede@wp.pl; Zakład Genoterapii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, <http://www.cm.umk.pl>.

² ewelina.wedrowska@gmail.com; Zakład Genoterapii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, <http://www.cm.umk.pl>.

³ joanna.golinska@gmail.com; Zakład Genoterapii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, <http://www.cm.umk.pl>.

⁴ mmch94@gmail.com; Zakład Genoterapii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, <http://www.cm.umk.pl>.

2. Mechanizm działania

System CRISPR-Cas w naturalnym środowisku jest systemem obronnym bakterii przed wirusami a jego działanie można podzielić na trzy etapy. Pierwszy etap polega na uzyskaniu nowych separatorów. Kiedy obcy DNA dostaje się do bakterii, białka Cas (głównie Cas1 i Cas2) wiążą się z obcym materiałem genetycznym i przecinają go tworząc krótkie fragmenty o długości 17-84 pz. Pierwsze powtórzenie rozdzielane jest na dwie osobne nici. Pomiędzy powstałe w ten sposób jednoniciowe odcinki materiału genetycznego wprowadzany zostaje odcinek obcego DNA. Następnie uzupełniane są brakujące drugie nici. W ten sposób w macierzy CRISPR przechowywana jest informacja genetyczna o obcym DNA. Drugi etap to ekspresja i przetwarzanie crRNA (CRISPR RNA). Koniec sekwencji wiodącej może zawierać promotor transkrypcji CRISPR. Sekwencja macierzy CRISPR zostaje transkrybowana na prekursorowy crRNA (pre-crRNA). Następnie pre-crRNA zostaje pocięty na pojedyncze crRNA, które po związaniu z białkami efektorowymi systemu tworzą crRNP (rybonukleoproteina crRNA-Cas). Trzeci etap to proces wykonawczy CRISPR-Cas, w którym kompleks efektorowy wyszukuje sekwencji komplementarnych do tej kodowanej poprzez crRNA. W przypadku pozytywnego rozpoznania DNA jest degradowane [8, 9]. Wyszczególniono różne klasy i typy systemu CRISPR-Cas. Spośród wszystkich typów typ II może wywierać swoją aktywność katalityczną wyłącznie przez białko Cas9 z obecnością RNazy III. Dwuniciowy RNA, złożony z pre-crRNA i tracrRNA (trans-komplementarny aktywator crRNA), jest substratem dla RNazy III. Hydroliza wiązań w obrębie obu nici RNA następuje tylko w obecności Cas9. Dojrzałe cząsteczki crRNA pozostając związane z tracrRNA wraz z nukleazą Cas9 tworzą kompleks uczestniczący w rozpoznawaniu i degradacji przez Cas9 obcych DNA. Hydroliza DNA przez Cas9 wymaga obecności motywu PAM ulokowanego bezpośrednio za targetowaną sekwencją (sekwencją targetowaną określamy nieć DNA identyczną z sgRNA). Sekwencje PAM pełnią niezwykle istotną funkcję dla bakterii w naturalnym środowisku, gdyż pozwalają na rozpoznanie własnego lub obcego materiału genetycznego, zapobiegają tym samym samoistnemu zniszczeniu sekwencji stanowiących pamięć mechanizmu CRISPR-Cas.

3. Cas9

Miejsce docelowego działania Cas9 wybierane jest na podstawie komplementarności zasad (RNA-DNA) do dwudziestu nukleotydów końca 5' gRNA. Miejsce przeznaczone do rozszczepienia musi leżeć natychmiast po 5' sekwencji PAM, co zapewnia najlepszą wydajność [10-12]. Aktywność nukleazową białka Cas9 zapewniają mu 2 domeny: RuvC tnąca pierwszą oraz HNH tnąca drugą nieć. Normalne działanie białka Cas9 powoduje powstanie podwójnych pęknięć w nici DNA. Indukowane przez działanie Cas9 dwuniciowe pęknięcia DNA (DSB) są naprawiane poprzez scalanie niehomologicznych końców DNA – NHEJ (*Non Homologous End Joining*), lub homologiczną rekombinację – HDR (*Homologous Directed Repair*), w której dostarczony jednoniciowy oligonukleotyd stanowi matrycę do naprawy. NHEJ jest częściej wykorzystywanym mechanizmem naprawy w komórkach ssaków. Naprawa endogennego DNA poprzez NHEJ może powodować mutacje (niewielkie delecje lub insercje) w miejscach naprawy podwójnych

pęknięć nici DNA. W takim wypadku często dochodzi do przesunięcia ramki odczytu w obrębie regionu kodującego gen, przedwczesne powstanie kodonu stop i w konsekwencji całkowite wyłączenie genu. Alternatywnie, gdy dostarczany jest szablon naprawy w postaci jednoniciowego oligodeoksynukleotydu (ssODN), jak w przypadku HDR, zapewniona jest bardzo wysoka dokładność i precyzyjna edycja materiału genetycznego na podstawie dostarczonej matrycy [13-16].

Wprowadzenie mutacji w RuvC lub HNH hamuje wybraną aktywność nukleazową, co w konsekwencji objawia się przecięciem tylko jednej wybranej nici DNA. Tak zmodyfikowany enzym (ang. *Nickase*), daje kontrolę nad wyborem trawionej nici i może być wysoce użyteczny podczas napraw poprzez homologiczną rekombinację oraz prób edycji genomu [17]. Inaktywacja obu domen nukleazowych prowadzi do powstania nieaktywnej formy dCas9, która może zostać wykorzystana jako transportująca do danego *locus* domena specyficznie wiążąca DNA [18]. Modyfikacje białka Cas umożliwiają wykorzystanie systemu CRISPR-Cas do licznych zastosowań praktycznych.

4. Zastosowanie CRISPR-Cas

4.1. Wyciszanie Genów

Specjalnie zmodyfikowane białko Cas9 bez aktywności nukleazy w połączeniu z sgRNA może stanowić dobre narzędzie dla prób wyciszania ekspresji genów. Potwierdza to badanie z zastosowaniem komórek ludzkich w których obniżono ekspresję EGFP o 46%. Antysensowe RNA, siRNA i wyciszanie genów za pośrednictwem Cas9-sgRNA mogą różnić się wydajnością i swoistością, ale są użytecznymi narzędziami do badań genetycznych [18, 19].

4.2. Zwalczenie infekcji wirusowych

CRISPR-Cas9 pochodzi z adaptacyjnej odporności bakteryjnej, więc może być stosowany w celu wyłączania genomów patogenów podczas leczenia chorób zakaźnych.

W 2013 r. po raz pierwszy eksperymentalnie zbadano potencjał terapii genowej systemu CRISPR-Cas9. Dokonano modyfikacji sekwencji długich końcowych powtórzeń (LTR) wirusa HIV-1 *in vitro*, czego wynikiem było usunięcie zintegrowanego prowirusowego DNA z części komórek gospodarza i znaczny spadek ekspresji wirusa [27]. Niedawno w innym niezależnym badaniu wykorzystano CRISPR-Cas9 do mutowania regionu LTR U3 HIV-1 i uzyskano podobne wyniki [28].

Przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby typu B jest jedną z najczęstszych chorób zakaźnych na całym świecie, która może prowadzić do marskości wątroby i nowotworzenia [29]. Utrzymywanie się zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu B (HBV) wynika z obecności trudnych do usunięcia, wewnątrzwątrobowych, kowalencyjnie zamkniętych kolistych DNA (cccDNA), które służą jako rezerwuar reaktywacyjny wirusa. Badanie przeprowadzone przez Seeger'a i Sohn'a wykazało, że w komórkach HepG2 ekspresyjnym HBV, wprowadzenie systemu CRISPR-Cas9 nakierowanego na cccDNA spowodowało zarówno zmniejszenie ekspresji wirusowych genów, jak i zmutowanych cccDNA [29].

4.3. Korygowanie zaburzeń monogenowych

Choroby monogenowe są wynikiem defektów pojedynczego genu. W porównaniu z chorobami poligenicznymi, takimi jak nowotwory, zaburzenia monogenowe są bardziej podatne na terapie genowe. Obecnie korekcja zaburzeń monogenowych jest najprostszą dziedziną terapii genowej, gdzie można z powodzeniem zastosować system CRISPR-Cas9.

Dystrofia mięśniowa Duchenne'a (DMD) jest monogenową chorobą sprzężoną z chromosomem X. Prowadząc badania nad korekcją genetyczną mysiego modelu tej jednostki chorobowej i wprowadzając zmianę genetyczną za pośrednictwem CRISPR-Cas9 w linii płciowej, uzyskano mozaikę genetyczną z 2-100% komórek somatycznych z poprawną formą genu [30].

Inny przykład może stanowić badanie Wu i wsp. nad zaćmą. Delecja eksonu 3 genu Crygc (krystalina gamma C) u myszy powoduje mutację przesunięcia ramki odczytu i fenotyp zaćmy. Dzięki zastosowaniu systemu CRISPR-Cas dokonano manipulacji w linii płciowej i skorygowano zmutowany gen. Z 22 żywych potomków 10 przeszło modyfikacje genu powodującego chorobę (wydajność edycji wynosiła 45,45%) przez HDR (n=4) albo przez NHEJ (n=6). Korekcja genetyczna na podstawie dostarczonej matrycy podczas HDR odtworzyła prawidłowe ramki odczytu u wszystkich 4 osobników. Modyfikacja genetyczna poprzez NHEJ spowodowała odnowę ramek odczytu jedynie u dwóch z sześciu potomstwa dzięki indukowanym mutacjom indel. Te wyniki podkreślają znaczenie HDR w korekcji genetycznej [31, 32].

Technologia CRISPR-Cas9 może również pośredniczyć w somatycznych korektach genów u dorosłych zwierząt, omijając manipulacje zarodków. Yin i wsp. dostarczyli czynniki CRISPR-Cas9 i homologiczną matrycę dawcy (w celu zwiększenia poziomu HDR) dorosłym myszom z dziedziczną tyrozynią powodując korekcję genetyczną w 33,5% komórek wątroby [33].

4.4. Korekcja genów w ludzkich komórkach macierzystych oraz indukowanych pluripotencjalnych komórkach macierzystych

CRISPR-Cas9 może wywierać działanie terapeutyczne w ludzkich komórkach macierzystych oraz indukowanych pluripotencjalnych komórkach macierzystych (iPSC). W ludzkich jelitowych komórkach macierzystych pobranych od pacjentów z mukowiscydozą, naprawiono gen CFTR poprzez rekombinację homologiczną podczas edycji z wykorzystaniem systemu CRISPR-Cas9. iPSC stanowi idealne narzędzie komórkowe dla terapii genowej, ponieważ pochodzące od pacjenta iPSC mogą być modyfikowane genetycznie *in vitro*, a następnie różnicowane w celu późniejszego terapeutycznego autologicznego przeszczepienia [34, 35]. Dzięki CRISPR-Cas9, z powodzeniem przeprowadzono korekty genów w iPSC pochodzących od pacjentów z β -talasemią i DMD [36, 37]. Wymienione wyżej zaburzenia monogenowe są spowodowane mutacjami powodującymi utratę funkcji genów. W monogenowych zaburzeniach, które wynikają z duplikacji genów (np. Ataksja Friedreicha) lub w autosomalnych zaburzeniach dominujących, CRISPR-Cas9 ma także potencjał terapeutyczny, biorąc pod uwagę jego zdolność do powodowania delecji genów i ich inaktywacji [38-40].

4.5. Indukcja mutacji terapeutycznych i ochronnych

CRISPR-Cas9 może być wykorzystany w leczeniu chorób niegenetycznych lub polietiologicznych poprzez indukowanie terapeutycznych lub ochronnych mutacji w tkankach somatycznych. Stosując technologię CRISPR-Cas9 wprowadzono mutacje w genie CCR5 (gen receptora chemokiny 5) w komórkach iPSC powodując tym samym ich odporność na zakażenie wirusem HIV-1 [41, 42].

Spontaniczne mutacje genu PCSK9 powodujące utratę jego funkcji mają związek z niższym stężeniem lipoprotein o małej gęstości (LDL). Dowiedziono że za pomocą CRISPR-Cas9 możliwym jest wprowadzenie mutacji dezaktywującej gen PCSK9, w wyniku czego dochodzi do obniżenia poziomu cholesterolu w osoczu, co stwarza możliwość potencjalnego zastosowania w przypadku prób leczenia hipercholesterolemii [43, 44].

4.6. Terapia genowa nowotworów

Bardzo często karcynogeneza jest wynikiem wcześniejszych zakażeń wirusowych. Wirusy takie jak HBV czy wirus zapalenia wątroby typu C mogą prowadzić do raka wątroby, wirus Epsteina-Barra (EBV) do raka nosogardzieli a wirus brodawczaka ludzkiego (HPV) może mieć swój udział w indukcji raka szyjki macicy. Inaktywacja tych onkogennych wirusów może przerwać, a nawet odwrócić proces nowotworzenia. System edycji CRISPR-Cas9 wywodzi się z naturalnego systemu odpornościowego bakterii i dlatego może być niezwykle pomocny podczas usuwania infekcji wirusowych. Za pośrednictwem CRISPR-Cas9 uzyskano działanie antywirusowe i antyproliferacyjne w linii komórkowej raka szyjki macicy HPV-dodatniej [45] i linii komórkowej chłoniaka Burkitta z dodatnim wynikiem EBV [46]. Zhen i wsp. donieśli, że transfekcja Cas9 i sgRNA skierowanych przeciwko HPV16 E6 lub E7 do linii komórkowej raka szyjki macicy HPV-16-dodatniej powodowały hamowanie proliferacji komórek rakowych zarówno *in vitro* jak i w modelu mysim [45]. Podobnie, w linii komórkowej chłoniaka Burkitta z utajonym zakażeniem EBV, leczenie CRISPR-Cas9 hamowało proliferację komórek [46]. Zatem, inaktywacja za pośrednictwem CRISPR-Cas9 lub usuwanie onkogenego wirusa stanowi obiecującą i opłacalną opcję zapobiegania i leczenia nowotworów związanych z wirusami.

Nowotwory można postrzegać jako choroby genetyczne powstałe z powodu nagromadzenia mutacji. CRISPR-Cas9 jest wszechstronnym narzędziem do edycji genomu, więc za jego pomocą można korygować genomowe aberracje onkogenne. CRISPR-Cas9 może korygować mutacje genetyczne, jak wykazano w chorobach monogenicznych [32, 33, 37] oraz modulować zmiany epigenetyczne zaangażowane w inicjację i progresję nowotworzenia [17, 47-50]. Inaktywowana dCas9 może wiązać się z elementami DNA i tłumić ich aktywność transkrypcyjną w procesie zwanym CRISPRi [47, 48]. Ponadto dCas9 może być wykorzystywany jako specyficzna lokalnie domena wiążąca DNA i połączona z modyfikatorami epigenetycznymi [17, 47-50]. Dzięki sgRNA, dCas9 z modyfikatorami epigenetycznymi może dotrzeć do miejsc docelowych i wprowadzić niezbędne regulacje epigenetyczne. Taka strategia została już zastosowana w szeroko zakrojonym badaniu przesiewowym w którym poszukiwano mutacji odpowiedzialnych za lekooporność czerniaka [50].

Cas9 i sgRNA wykorzystano również podczas prób leczenia raka pęcherza moczowego. W komórkach nowotworowych Cas9 i sgRNA ulegały ekspresji, gdzie doprowadzały do mutacji genu LacI. W ten sposób możliwym było zniesienie wywołanej przez nowotwór supresji na genie efektorowym. W tym badaniu genami efektorowymi były p21, E-kadheryna i Bax, odpowiedzialne za hamowanie wzrostu, tłumienie migracji i apoptozę komórek nowotworowych. Teoretycznie efektor może być dowolnym supresorem lub genem samobójczym, który powoduje zahamowanie lub zniszczenie guza [51].

Z zastosowaniem CRISPR-Cas9 w leczeniu nowotworów wiążą się pewne ograniczenia i niedogodności. Nowotwory są chorobami poligenowymi i heterogennymi. Profile aberracji genomowej są różne u poszczególnych pacjentów i w poszczególnych nowotworach, zależą również od stadiów nowotworu jak i umiejscowienia w ciele pacjenta. O ile w przypadku chorób monogenowych nawet niewielka skuteczność korekcji genów daje obiecujące rezultaty o tyle w przypadku nowotworów manipulacja genomu powinna cechować się wysoką skutecznością edycyjną. Nieedytowane komórki zachowują nieredukowalną złośliwość, szybko proliferują, co znacząco obniża skuteczność terapii genowej. Niestety wysoka efektywność edycji genowej w przypadku chorób nowotworowych jest wciąż poza zasięgiem obecnej technologii CRISPR-Cas9 [32, 33].

Onkologiczna wirusoterapia jest jedną z najbardziej obiecujących dziedzin terapii genowej nowotworów. Niektóre wirusy można modyfikować genetycznie, aby w sposób wybiórczy infekowały i replikowały się w komórkach nowotworowych, zabijając je poprzez cytotoksyczność lub poprzez wzmocnioną przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną. CRISPR-Cas9 może odgrywać rolę w onkolitycznej wirusoterapii na kilka sposobów: może w prosty sposób umożliwić dodanie promotora specyficznego dla danego nowotworu do genów niezbędnych do replikacji wirusa, lub indukować mutacje w genomie wirusowym, którego defekty mogą być uzupełnione przez metabolity specyficzne dla raka [52, 53].

Obecnie duże nadzieje wiąże się z modyfikacjami komórek gospodarza które zwiększałyby poziom przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej, lub wzbudzały odporność na chemio- i radiotoksyczność. Terapia adoptywna limfocytów T, polega na zastosowaniu genetycznie zmodyfikowanych limfocytów T, które po modyfikacji ponownie podaje się pacjentom. W badaniach klinicznych wykazano zwiększoną przeżywalność pacjentów po zastosowaniu tego typu terapii. Komórki T modyfikowano poprzez zastosowanie CRISPR-Cas9 więc nie ulega wątpliwości że system ten może odgrywać znaczącą rolę w modulacji immunologicznej oraz terapii immunologicznej nowotworów [54-56].

5. CRISPR-Cas – wyzwania

Główną wadą systemu CRISPR-Cas jest niższa specyficzność niż ta osiągnięta podczas stosowania ZFN oraz TALEN. Obniżona specyficzność jest wynikiem sprawdzania komplementarności jedynie niewielkiego regionu przed cięciem enzymatycznym za pomocą Cas9. Dodatkowo w komórkach ludzkich system CRISPR-Cas może przecinać miejsce, w którym występują niewielkie nieściśności w komplementarności par zasad. Dodatkowo Cas9 może w niektórych przypadkach wiązać się z DNA częściowo komplementarnym do gRNA ale go nie przecinać,

wywierając tym samym szereg nieprzewidywalnych skutków epigenetycznych [47, 48, 57].

Ograniczenie wynikające z obecności sekwencji PAM stanowi główny problem dla edycji niektórych genów, dlatego też system CRISPR-Cas nie jest uniwersalny i istnieją geny, których nie można edytować za jego pomocą [58-60].

6. CRISPR-Cas w odniesieniu do ZFN i TALEN

CRISPR-Cas może stanowić lepszą alternatywę dla innych nukleaz stosowanych podczas prób edycji genów. Porównując skuteczność CRISPR (51-79%) i TALEN (0-34%) [20, 21], w tym samym loci i w tej samej linii komórkowej można dostrzec znaczną przewagę CRISPR. Niektóre z przeprowadzonych badań sugerują, iż wydajność Cas9/sgRNA jest pięciokrotnie wyższa od ZFN i 130 krotnie wyższa od TALEN. Należy jednak zauważyć, że te zestawienia liczbowe pochodzą z bardzo ograniczonych obserwacji wstępnych, a porównanie wydajności dwóch endonukleaz jest trudne i wymaga dużej liczby powtórzonych doświadczeń. Wiadomo już jednak, że dla określonego celu takie same rodzaje nukleaz mogą wykazywać różne wydajności [20, 21].

W przypadku stosowania CRISPR-Cas9, wymagane jest jedynie opracowanie komplementarnego do miejsca cięcia sgRNA (nukleaza Cas9 pozostaje taka sama we wszystkich przypadkach), co jest znacznie prostsze niż synteza *de novo* dużego składnika białkowego, jak w ZFN lub TALEN [22].

Podczas konstruowania modeli zwierzęcych z zaburzeniami poligenicznymi bardzo ważne jest jednoczesne wyeliminowanie wielu *loci* docelowych genów. CRISPR-Cas jest łatwiejszy w obsłudze, bardziej elastyczny podczas jednoczesnego badania wielu *loci* w porównaniu do ZFN i TALEN [14, 16]. Ta zaleta jest niezwykle ważna w badaniach, które wymagają edycji więcej niż jednego miejsca w genomie w tym samym czasie. Główną wadą wprowadzenia kilku nokautów genetycznych jest większe ryzyko powstania niepożądanych efektów.

CRISPR-Cas zmniejsza trudność w manipulowaniu genetycznym i rozszerza zakres ewentualnych zastosowań. ZFN i TALEN można również stosować podczas tworzenia zwierząt modelowych, ale jest to związane ze sporymi trudnościami szczególnie w przypadku prób konstrukcji modeli z zaburzeniami poligenicznymi gdzie wymagany jest jednoczesny nokaut wielu genów.

Zarówno CRISPR-Cas jak i TALEN umożliwiają modyfikacje genomu w krótkim czasie (kilka tygodni) oszczędzając tym samym koszt. CRISPR-Cas TALEN i ZFN umożliwiają manipulacje genetyczną bez względu na gatunek, jednakże cele CRISPR-Cas są ograniczone ze względu na wymagana obecność sekwencji PAM oraz konkretnego nukleotydu jakim jest guanina na końcu 5'. Jeżeli chodzi o TALEN to jedynym ograniczeniem jest wymagana obecność tyminy na końcu 5', co oznacza, że TALEN może celować w więcej miejsc w genomie niż CRISPR-Cas9 [23]. Częściowo dzięki heterodimerycznej konstrukcji nukleazy FokI, TALEN powoduje również mniej efektów niepożądanych w stosunku do CRISPR-Cas9 [24, 25]. Co więcej, TALEN może zostać poddany modyfikacji w celu namierzenia i rozszczepienia zmutowanego mitochondrialnego DNA w komórkach pochodzących od pacjenta, co pozostaje obszarem niezbadanym pod względem wykorzystania w tym celu systemu CRISPR-Cas [23, 25, 26].

7. CRISPR-Cas – poprawa specyficzności

Opracowano kilka rozwiązań aby ograniczyć niespecyficzne działanie CRISPR-Cas. Struktura jak i skład gRNA mają wpływ na specyficzność systemu [61]. Wybór miejsca docelowego, które nie ma sekwencji homologicznej w całym genomie, jest praktycznym sposobem ograniczenia możliwości niespecyficznego połączenia się gRNA. Dodatkowo zastosowanie zmutowanych wersji Cas9, z nieaktywnymi domenami RuvC lub HNH w celu zainicjowania cięcia obu nici w żądanym miejscu ogranicza możliwość wystąpienia niepożądanych efektów, gdyż przypadkowe niecelowe pojedyncze cięcia DNA są wiernie naprawione [62]. Szacuje się, że strategia wykorzystująca Cas9 z nieaktywnymi domenami RuvC lub HNH może zwiększyć specyficzność względem miejsca docelowego o około 1500 razy [16]. Krótsza sekwencja sgRNA ma zmniejszoną tolerancję na niedopasowanie dlatego też skraca się sgRNA o 2-3 nt [63]. Dodatkowo możliwe jest połączenie CRISPR-Cas9 z inną nukleazą. Tsai i wsp. donieśli, że łączenie nukleazy FokI z dCas9 wytwarza dimeryczną nukleazę FokI kierowaną przez RNA, która cechuje się większą specyficznością w porównaniu z układem CRISPR-Cas typu dzikiego [64].

8. CRISPR-Cas – transfer do komórek

Wydajność transdukcji oraz transfekcji jak i efektywność edycji genetycznej jest niezwykle istotna dla terapii genowej, szczególnie w przypadku prób leczenia nowotworów. Terapia genowa nowotworów wymaga wysokiej wydajności edycji, która jest nadal poza zasięgiem obecnych technologii CRISPR-Cas9 [65, 66, 67]. Rozwiązaniem tego problemu może być opracowanie wydajniejszych wektorów transportujących, bardziej stabilnego sgRNA, który bardziej specyficznie rozpoznawałby miejsce cięcia DNA oraz skuteczniejszego enzymu Cas9. Wektory związane z adenowirusami (AAV) są powszechnie używanymi narzędziami w celu dostarczenia genów ze względu na ich skuteczność i bezpieczeństwo stosowania [68]. Niestety powszechnie stosowany gen Cas9 pochodzący ze *Streptococcus pyogenes* jest zbyt duży, by mógł być przenoszony przez AAV typu dzikiego, ze względu na ograniczoną pojemność tego wektora. Zastosowanie mniejszych homologów Cas9 pochodzących z innych drobnoustrojów lub zastosowanie zmodyfikowanych AAV w celu zwiększenia ich pojemności może realnie zwiększyć wydajność dostarczania [68, 69]. Dostarczenie do komórek ludzkich (*in vitro*) oczyszczonego rekombinowanego białka Cas9 zamiast genu Cas9, umożliwia osiągnięcie wydajności edycji sięgającej 79% [70]. Niestety najwyższa optymalna wydajność edycji jaką udało się uzyskać dostarczając CRISPR-Cas9 stosując peptydy penetrujące komórki (CPP) plasowała się na poziomie poniżej 20% [69, 70]. Co ciekawe aby zwiększyć efektywność dostarczania do komórek opracowano nowy nośnik w postaci nanonici powleczonej dodatkowo naładowanym materiałem, takim jak lipidy lub polimery, który może rozerwać membranę endosomalną [71]. W tym przypadku proces wprowadzania do komórki polega na wchłonięciu nanonici do komórki drogą endocytozy. Następnie kompleksy CRISPR-Cas9 oddzielają się od struktury nośnika i docierają do jądra gdzie rozpoczynają edycję genów [72].

9. CRISPR-Cas – HDR i NHEJ

Podwójne pęknięcia DNA będące wynikiem działania systemu CRISPR-Cas9 są później naprawiane przez NHEJ lub HDR. HDR najczęściej powoduje wyłącznie pożądane modyfikacje genetyczne, podczas gdy NHEJ bardzo często doprowadza do niepożądanych zmian w materiale genetycznym. Badania przeprowadzone przez Wu i wsp. wśród myszy genetycznie zmodyfikowanych poprzez zastosowanie systemu CRISPR-Cas9 wykazują, iż wszystkie edycje z udziałem HDR korygowały defekt genetyczny podczas gdy tylko niewielka część edycji za pośrednictwem NHEJ była udana. W związku z powyższym w celu poprawienia wydajności oraz niezawodności terapii genowej, z wykorzystaniem CRISPR-Cas9, należy dążyć do zwiększenia poziomu napraw DNA za pośrednictwem HDR [32]. Wybór pomiędzy naprawą NHEJ a HDR zależy od kilku czynników. HDR zachodzi głównie w fazach S i G2 cyklu komórkowego ze względu na dostępność chromatyd siostrzanych jako szablonów do naprawy [73]. Poziom HDR można zwiększyć poprzez odpowiednie zsynchronizowanie z cyklem komórkowym. Lin i współpracownicy dostarczając białka Cas9 i kompleksy sgRNA do ludzkich komórek i uzyskali współczynnik HDR do 38%. Autorzy wykazali również, że dłuższe ramię homologiczne i jednoniciowa matryca oligonukleotydów DNA (w porównaniu z matrycami DNA o podwójnej nici) mogą zwiększać współczynnik HDR [74]. Zastosowany wektor jest kolejnym czynnikiem wpływającym na współczynnik HDR. W badaniu Holkers i wsp. dostarczyli CRISPR-Cas9 i donor DNA przez wektor adenowirusowy co dawało wyższy poziom HDR w porównaniu do wektora lentiwirusowego oraz wektorów niewirusowych [75].

Bakteria *Deinococcus radiodurans* może naprawić swój genom z setek krótkich fragmentów DNA powstałych w wyniku egzogenicznych uszkodzeń. Postuluje się konieczność dokładnego zbadania tego wysoce wydajnego systemu naprawy DNA jaki występuje w mikrobach. Umożliwiłoby to jego późniejsze wykorzystanie w przyszłości w celu zwiększenia poziomu HDR w komórkach eukariotycznych [76].

10. Podsumowanie

CRISPR-Cas9 jako narzędzie służące do edycji genomu ma wiele zalet w porównaniu do TALEN i ZFN. Wykazano potencjał terapeutyczny tego systemu dla chorób zakaźnych, monogenowych, czy nowotorów, zarówno w przypadku linii komórkowych jak i modeli zwierzęcych. Niemniej jednak zanim CRISPR-Cas trafi do zastosowań klinicznych musi przezwyciężyć kilka wyzwań. Wysoka specyficzność docelowych *loci* i mała częstość niespecyficznych produktów są podstawowymi wymaganiami dotyczącymi terapii genowej. W przypadku klinicznego zastosowania terapii genowej CRISPR-Cas zwiększone muszą zostać specyficzność oraz udział HDR w naprawie przecinanego DNA. Dzięki szybkiemu postępowi w technologii CRISPR-Cas9 można nadal przewidywać, że w przyszłości ta metoda wprowadzania zmian w materiale genetycznym może zrewolucjonizować badania nad terapią genową i stać się wygodnym i wszechstronnym narzędziem w praktyce terapii genowej człowieka.

Literatura

1. Wiedenheft B., Sternberg S.H., Doudna J.A. *RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea*, *Nature.*, 482 (2012), s. 331-38.
2. Fineran P.C., Charpentier E. *Memory of viral infections by CRISPR-Cas adaptive immune systems: acquisition of new information*, *Virology.*, 434 (2012), s. 202-9.
3. Horvath P., Barrangou R. *CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea*, *Science.*, 327 (2010), s. 167-70.
4. Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D.A., Horvath P. *CRISPR provides acquired resistance against viruses in Prokaryotes*, *Science.*, 315 (2007), s. 1709-12.
5. Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A. *Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product*, *Journal of Bacteriology.*, 169 (1987), s. 5429-33.
6. Hsu P.D., Lander E.S., Zhang F. *Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering*, *Cell.*, 157 (2014), s. 1262-78.
7. Liang P., Xu Y., Zhang X., Ding C., Huang R., Zhang Z., Lv J., Xie X., Chen Y. *CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human trippronuclear zygote*, *Protein Cell.*, 6 (2015), s. 363-72.
8. Rath D., Amlinger L., Rath A., Lundgren M. *The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications*, *Biochimie.*, 117 (2015), s. 119-28.
9. Garneau J.E., Dupuis M.È., Villion M., Romero D.A., Barrangou R., Boyaval P., Fremaux C., Horvath P., Magadán A.H., Moineau S. *The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA*, *Nature.*, 468 (2010), s. 67-71.
10. Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pírzada Z.A., Eckert M.R., Vogel J., Charpentier E. *CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III*, *Nature.*, 471 (2011), s. 602-7.
11. Sander J.D., Joung J.K. *CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes*, *Nature Biotechnology.*, 32 (2014), s. 347-55.
12. Jiang W., Bikard D., Cox D., Zhang F., Marraffini L.A. *RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems*, *Nature Biotechnology.*, 31 (2013), s. 233-9.
13. Ran F.A., Hsu P.D., Wright J., Agarwala V.7, Scott D.A., Zhang F. *Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system*, *Nature Protocols.*, 8 (2013), s. 2281-308.
14. Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. *Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems*, *Science.*, 339 (2013), s. 819-23.
15. Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., DiCarlo J.E., Norville J.E., Church G.M. *RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9*, *Science.*, 339 (2013), s.823-26.
16. Doudna J.A., Charpentier E. *Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9*, *Science.*, 346 (2014), s. 1258096.
17. Ran F.A., Hsu P.D., Lin C.Y., Gootenberg J.S., Konermann S., Trevino A.E., Scott D.A., Inoue A., Matoba S., Zhang Y., Zhang F. *Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity*, *Cell.*, 154 (2013), s. 1380-9.
18. Qi L.S., Larson M.H., Gilbert L.A., Doudna J.A., Weissman J.S., Arkin A.P., Lim W.A. *Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression*, *Cell.*, 152 (2013), s. 1173-83.
19. Nakashima N., Miyazaki K. *Bacterial cellular engineering by genome editing and gene silencing*, *International Journal of Molecular Sciences.*, 15 (2014), s. 2773-93.

20. Ding Q., Regan S.N., Xia Y., Oostrom L.A., Cowan C.A., Musunuru K. *Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs*, Cell Stem Cell., 12 (2013), s. 393-4.
21. Montague T.G., Cruz J.M., Gagnon J.A., Church G.M., Valen E. *CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing*, Nucleic Acids Research., 42 (2014), s. 401-7.
22. Wyman C., Kanaar R. *DNA double-strand break repair: all's well that ends well*, Annual Review of Genetics., 40 (2006), s. 363-83.
23. Gaj T., Gersbach C.A., Barbas C.F. *ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering*. Trends in Biotechnology., 31 (2013), s. 397-405.
24. Kim Y., Kweon J., Kim A., Chon J.K., Yoo J.Y., Kim H.J., Kim S., Lee C., Jeong E., Chung E., Kim D., Lee M.S., Go E.M., Song H.J., Kim H., Cho N., Bang D., Kim S., Kim J.S. *A library of TAL effector nucleases spanning the human genome*, Nature Biotechnology., 31 (2013), s. 251-8.
25. Wei C., Liu J., Yu Z., Zhang B., Gao G., Jiao R. *TALEN or Cas9 - rapid, efficient and specific choices for genome modifications*, Journal of Genetics and Genomics., 40 (2013), s. 281-9.
26. Li M., Suzuki K., Kim N.Y., Liu G.H., Izpisua Belmonte J.C. *A cut above the rest: targeted genome editing technologies in human pluripotent stem cells*, Journal of Biological Chemistry., 289 (2014), s. 4594-9.
27. Ebina H., Misawa N., Kanemura Y., Koyanagi Y. *Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus*, Scientific Reports., (2013), s. 2510.
28. Hu W., Kaminski R., Yang F., Zhang Y., Cosentino L., Li F., Luo B., Alvarez-Carbonell D., Garcia-Mesa Y., Karn J., Mo X., Khalili K. *RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection*, Proceedings of the National Academy of Sciences of USA., 111 (2014), s. 11461-6.
29. Seeger C., Sohn J.A. *Targeting Hepatitis B Virus With CRISPR/Cas9*, Molecular Therapy Nucleic Acids Journal., 3 (2014), s. 216.
30. Long C., McAnally J.R., Shelton J.M., Mireault A.A., Bassel-Duby R., Olson E.N. *Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA*, Science., 345 (2014), s. 1184-1188.
31. Wu Y., Zhou H., Fan X., Zhang Y., Zhang M.I., Wang Y., Xie Z., Bai M., Yin Q., Liang D., Tang W., Liao J., Zhou C., Liu W., Zhu P., Guo H., Pan H., Wu C., Shi H., Wu L., Tang F., Li J. *Correction of a genetic disease by CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells*, Cell Research., 25 (2015), s. 67-79.
32. Wu Y., Liang D., Wang Y., Bai M., Tang W., Bao S., Yan Z., Li D., Li J. *Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9*, Cell Stem Cell., 13 (2013), s. 659-62.
33. Yin H., Xue W., Chen S., Bogorad R.L., Benedetti E., Grompe M., Kotliansky V., Sharp P.A., Jacks T., Anderson D.G. *Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype*, Nature Biotechnology., 32 (2014), s. 551-3.
34. Schwank G., Koo B.K., Sasselli V., Dekkers J.F., Heo I., Demircan T., Sasaki N., Boymans S., Cuppen E., van der Ent C.K., Nieuwenhuis E.E., Beekman J.M., Clevers H. *Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients*, Cell Stem Cell., 13 (2013), s. 653-8.
35. Yui S., Nakamura T., Sato T., Nemoto Y., Mizutani T., Zheng X., Ichinose S., Nagaishi T., Okamoto R., Tsuchiya K., Clevers H., Watanabe M. *Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5⁺ stem cell*, Nature Medicine., 18 (2012), s. 618-23.

36. Xie F., Ye L., Chang J.C., Beyer A.I., Wang J., Muench M.O., Kan Y.W. *Seamless gene correction of β -thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyback*, Genome Research., 24 (2014), s. 1526-33.
37. Li H.L., Fujimoto N., Sasakawa N., Shirai S., Ohkame T., Sakuma T., Tanaka M., Amano N., Watanabe A., Sakurai H., Yamamoto T., Yamanaka S., Hotta A. *Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9*, Stem Cell Reports., 4 (2015), s. 143-54.
38. Maddalo D., Machado E., Concepcion C.P., Bonetti C., Vidigal J.A., Han Y.C., Ogradowski P., Crippa A., Rekhman N., de Stanchina E., Lowe S.W., Ventura A. *In vivo engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system*, Nature., 516 (2014), s. 423-7.
39. Xue W., Chen S., Yin H., Tammela T., Papagiannakopoulos T., Joshi N.S., Cai W., Yang G., Bronson R., Crowley D.G., Zhang F., Anderson D.G., Sharp P.A., Jacks T. *CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver*, Nature., 514 (2014), s. 380-4.
40. Sánchez-Rivera F.J., Papagiannakopoulos T., Romero R., Tammela T., Bauer M.R., Bhutkar A., Joshi N.S., Subbaraj L., Bronson R.T., Xue W., Jacks T. *Rapid modelling of cooperating genetic events in cancer through somatic genome editing*, Nature., 516 (2014), s. 428-31.
41. Ye L., Wang J., Beyer A.I., Teque F., Cradick T.J., Qi Z., Chang J.C., Bao G., Muench M.O., Yu J., Levy J.A., Kan Y.W. *Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5 Δ 32 mutation confers resistance to HIV infection*, Proceedings of the National Academy of Sciences of USA., 111 (2014), s. 9591-6.
42. Tebas P., Stein D., Tang W.W., Frank I., Wang S.Q., Lee G., Spratt S.K., Surosky R.T., Giedlin M.A., Nichol G., Holmes M.C., Gregory P.D., Ando D.G., Kalos M., Collman R.G., Binder-Scholl G., Plesa G., Hwang W.T., Levine B.L., June C.H. *Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV*, The New England Journal of Medicine., 370 (2014), s. 901-10.
43. Cohen J., Pertsemlidis A., Kotowski I.K., Graham R., Garcia C.K., Hobbs H.H. *Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9*, Nature Genetics., 37 (2005), s. 161-5.
44. Ding Q., Strong A., Patel K.M., Ng S.L., Gosis B.S., Regan S.N., Cowan C.A., Rader D.J., Musunuru K. *Permanent alteration of PCSK9 with in vivo CRISPR-Cas9 genome editing*, Circulation Research., 115 (2014), s. 488-92.
45. Zhen S., Hua L., Takahashi Y., Narita S., Liu Y.H., Li Y. *In vitro and in vivo growth suppression of human papillomavirus 16-positive cervical cancer cells by CRISPR/Cas9*, Biochemical and Biophysical Research Communications., 450 (2014), s. 1422-6.
46. Wang J., Quake S.R. *RNA-guided endonuclease provides a therapeutic strategy to cure latent herpesviridae infection*, Proceedings of the National Academy of Sciences of USA., 111 (2014), s. 13157-62.
47. Gilbert L.A., Horlbeck M.A., Adamson B., Villalta J.E., Chen Y., Whitehead E.H., Guimaraes C., Panning B., Ploegh H.L., Bassik M.C., Qi L.S., Kampmann M., Weissman J.S. *Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation*, Cell., 159 (2014), s. 647-61.
48. Gilbert L.A., Larson M.H., Morsut L., Liu Z., Brar G.A., Torres S.E., Stern-Ginossar N., Brandman O., Whitehead E.H., Doudna J.A., Lim W.A., Weissman J.S., Qi L.S. *CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes*, Cell., 154 (2013), s. 442-51.

49. Zalatan J.G., Lee M.E., Almeida R., Gilbert L.A., Whitehead E.H., La Russa M., Tsai J.C., Weissman J.S., Dueber J.E., Qi L.S., Lim W.A. *Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds*, *Cell.*, 160 (2015), s. 339-50.
50. Konermann S., Brigham M.D., Trevino A.E., Joung J., Abudayyeh O.O., Barcena C., Hsu P.D., Habib N., Gootenberg J.S., Nishimasu H., Nureki O., Zhang F. *Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex*, *Nature.*, 517 (2015), s. 583-8.
51. Liu Y., Zeng Y., Liu L., Zhuang C., Fu X., Huang W., Cai Z. *Synthesizing AND gate genetic circuits based on CRISPR-Cas9 for identification of bladder cancer cells*, *Nature Communications.*, 5 (2014), s. 5393.
52. Russell S.J., Peng K.W., Bell J.C. *Oncolytic virotherapy*, *Nature Biotechnology.*, 30 (2012), s. 658-70.
53. Yu W., Fang H. *Clinical trials with oncolytic adenovirus in China*, *Current Cancer Drug Targets.*, 7 (2007), s. 141-8.
54. Hinrichs C.S., Rosenberg S.A. *Exploiting the curative potential of adoptive T-cell therapy for cancer*, *Immunological Reviews.*, 257 (2014), s. 56-71.
55. Couzin-Frankel J. *Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy*, *Science.*, 342 (2013), s.1432-3.
56. Meissner T.B., Mandal P.K., Ferreira L.M., Rossi D.J., Cowan C.A. *Genome editing for human gene therapy*, *Methods in Enzymology.*, 546 (2014), s. 273-95.
57. Wu X., Scott D.A., Kriz A.J., Chiu A.C., Hsu P.D., Dadon D.B., Cheng A.W., Trevino A.E., Konermann S., Chen S., Jaenisch R., Zhang F., Sharp P.A. *Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells*, *Nature Biotechnology.*, 32 (2014), s. 670-6.
58. Westra E.R., Semenova E., Datsenko K.A., Jackson R.N., Wiedenheft B., Severinov K., Brouns S.J. *Type I-E CRISPR-cas systems discriminate target from non-target DNA through base pairing-independent PAM recognition*, *PLoS Genetics.*, 9 (2013), s. 1003742.
59. Levy A., Goren M.G., Yosef I., Auster O., Manor M., Amitai G., Edgar R., Qimron U., Sorek R. *CRISPR adaptation biases explain preference for acquisition of foreign DNA*, *Nature.*, 520 (2015), s. 505-10.
60. Horvath P., Romero D.A., Coûté-Monvoisin A.C., Richards M., Deveau H., Moineau S., Boyaval P., Fremaux C., Barrangou R. *Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus**, *Journal of Bacteriology.*, 190 (2008), s. 1401-12.
61. Cho S.W., Kim S., Kim Y., Kweon J., Kim H.S., Bae S., Kim J.S. *Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases*, *Genome Research.*, 24 (2014), s. 132-41.
62. Ghezraoui H., Piganeau M., Renouf B., Renaud J.B., Sallmyr A., Ruis B., Oh S., Tomkinson A.E., Hendrickson E.A., Giovannangeli C., Jasin M., Brunet E. *Chromosomal translocations in human cells are generated by canonical nonhomologous end-joining*, *Molecular Cell.*, 55 (2014), s. 829-42.
63. Fu Y., Sander J.D., Reyon ., Cascio V.M., Joung J.K. *Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs*, *Nature Biotechnology.*, 32 (2014), s. 279-84.
64. Tsai S.Q., Wyvekens N., Khayter C., Foden J.A., Thapar V., Reyon D., Goodwin M.J., Aryee M.J., Joung J.K. *Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing*, *Nature Biotechnology.*, 32 (2014), s. 569-76.
65. Manjunath N., Yi G., Dang Y., Shankar P. *Newer gene editing technologies toward HIV gene therapy*, *Viruses.*, 5 (2013), s. 2748-66.
66. Ibraheem D., Elaissari A., Fessi H. *Gene therapy and DNA delivery systems*, *International Journal of Pharmaceutics.*, 459 (2014) s. 70-83.
67. Bartel M.A., Weinstein J.R., Schaffer D.V. *Directed evolution of novel adeno-associated viruses for therapeutic gene delivery*, *Gene Therapy.*, 19 (2012), s.694-700.

68. Kotterman M.A., Schaffer D.V. *Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy*, Nature Reviews Genetics., 15 (2014), s. 445-51.
69. Esvelt K.M., Mali P., Braff J.L., Moosburner M., Yaung S.J., Church G.M. *Orthogonal Cas9 proteins for RNA-guided gene regulation and editing*, Nature Methods., 10 (2013), s. 1116-21.
70. Kim S., Kim D., Cho S.W., Kim J., Kim J.S. *Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins*, Genome Research., 24 (2014), s. 1012-9.
71. Yin H., Kauffman K.J., Anderson D.G. *Delivery technologies for genome editing*, Nature Reviews Drug Discovery., 16 (2017), s. 387-399.
72. Sun W., Ji W., Hall J.M., Hu Q., Wang C., Beisel C.L., Gu Z. *Self-assembled DNA nanoclews for the efficient delivery of CRISPR-Cas9 for genome editing*, Angewandte Chemie International Edition., 54 (2015), s. 12029-33.
73. Heyer W.D., Ehmsen K.T., Liu J. *Regulation of homologous recombination in eukaryotes*, Annual Review of Genetics., 44 (2010), s. 113-39.
74. Lin S., Staahl B.T., Alla R.K., Doudna J.A. *Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery*, Elife., 3 (201), s. 04766.
75. Holkers M., Maggio I., Henriques S.F., Janssen J.M., Cathomen T., Gonçalves M.A. *Adenoviral vector DNA for accurate genome editing with engineered nucleases*, Nature Methods. 11 (2014), s. 1051-7.
76. Zahradka K., Slade D., Bailone A., Sommer S., Averbek D., Petranovic M., Lindner A.B., Radman M. *Reassembly of shattered chromosomes in Deinococcus radiodurans*, Nature., 443 (2006), s. 569-73.

CRISPR i jej potencjalne zastosowania w biomedycynie

Streszczenie

CRISPR-Cas jest naturalnym systemem obronnym bakterii oraz archeonów, który rozpoznaje sekwencje obcego materiału genetycznego, przechowuje o nim informacje oraz niszczy go. Dzięki swoim zdolnościom wprowadzania podwójnych pęknięć DNA w miejscu rozpoznawanej sekwencji komplementarnej system CRISPR-Cas9 został zaadaptowany w celu selektywnego nokautowania genów oraz edycji genomu w komórkach eukariotycznych. W odniesieniu do ZFN i TALEN technologia CRISPR-Cas wykazuje wyższą skuteczność, jest prostsza, szybsza, bardziej elastyczna, pozwala na edycję więcej niż jednego miejsca w genomie. System CRISPR-Cas pokazał swój potencjał i możliwość zastosowania w przypadku wyciszania genów, zwalczania infekcji wirusowych (HIV, HBV, HPV, EBV), korekcji zaburzeń monogenowych (DMD, Mukowiscydoza), terapii genowej nowotworów. Ograniczenie nadal stanowi sekwencja PAM, trudność z wyborem nośnika transportującego do komórek, oraz specyficzność, która powinna zostać poprawiona aby móc wykorzystywać system CRISPR-Cas na potrzeby prób klinicznych.

Słowa kluczowe: CRISPR, Cas9, DNA, mutacja, gRNA.

CRISPR and its potential applications in biomedicine

Abstract

CRISPR-Cas is a natural defensive system of bacteria and archaea that recognizes sequences of foreign genetic material, stores information about it and destroys it. Due to its ability to introduce double DNA breaks at the site of the recognized complementary sequence, the CRISPR-Cas9 system has been adapted to selectively knock out genes and to edit the genome in eukaryotic cells. With regard to ZFN and TALEN, CRISPR-Cas has a higher efficiency, is simpler, faster, more flexible, and allows editing more than one place in the genome. The CRISPR-Cas system showed its potential and applicability in the case of gene silencing, combating viral infections (HIV, HBV, HPV, EBV), correction of monogenic disorders (DMD, Cystic Fibrosis), gene therapy of tumors. The system limitation is still the PAM sequence, the difficulty with the choice of transporting vector to the cells, and the specificity that should be improved in order to be able to use the CRISPR-Cas system for clinical trials.

Keywords: CRISPR, Cas9, DNA, mutation, gRNA.

Rola białek szoku termicznego w patogenezie i terapii przeciwnowotworowej

1. Wstęp

Białka szoku termicznego, zwane również białkami szoku cieplnego (ang. HSP – *Heat Shock Proteins*), czy białkami opiekuńczymi (ang. *molecular chaperones*), znane są przede wszystkim ze swojej silnie konserwatywnej ewolucyjnie struktury aminokwasowej, współtworząc jeden z najstarszych ochronnych mechanizmów komórki [1]. Odkryte przypadkowo w 1962 roku przez włoskiego genetyka Ferruccio Ritossę u muszki owocowej *Drosophila* sp. jako wynik działania podwyższonej temperatury w inkubatorze, w którym były hodowane. Analizowane przez Ritossę komórki gruczołów ślinowych owadów poddanych działaniu podwyższonej temperatury czy 2,4-dinitrofenolu (2,4-DNP) pozwoliły na zaobserwowanie tworzących się „pufów” – zgrubień w chromosomach politenicznych [2]. Dwanaście lat później w wyniku badań prowadzonych przez Tissieresa i wsp., wykazano, że tworzące się zgrubienia pod wpływem stresu, są wynikiem nasilenia się procesów transkrypcji kilku genów, które później zidentyfikowano jako loci genów szoku cieplnego [3].

Obecność białek HSP wykazano we wszystkich żyjących organizmach, zarówno w organizmach prokariotycznych (archeonów i bakterii) jak również eukariotycznych (zwierząt i roślin). Główną rolą białek HSP jest utrzymanie prawidłowej homeostazy komórek poddanych działaniu różnym szkodliwym czynnikiem. Biorą udział w wielu procesach w komórce, w tym wspomagają proces samodzielnego zwijania się nowopowstałych łańcuchów polipeptydowych, zapobiegają przypadkowej ich agregacji, kierują do odpowiedniego organellum komórkowego, wpływają na renaturację do właściwej konformacji uszkodzonym polipeptydom. Dodatkowo, tworząc kompleksy z nieodwracalnie uszkodzonymi białkami, kierują je na drogę degradacji proteasomalnej, bądź degradacji z udziałem lizosomów [4-6]. Białka HSP mogą wpływać na regulację aktywności czynników transkrypcyjnych i kinaz białkowych. Uczestniczą także w stymulacji odpowiedzi immunologicznej oraz wpływają na reakcję zapalną. W warunkach prawidłowych, białka HSP ulegają w komórce niezależnej od temperatury konstytutywnej ekspresji (na poziomie 5-10% wszystkich

¹ grzegorz.adamczuk3@wp.pl, Samodzielna Pracownia Biologii Medycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie.

² ewelina.humeniuk@vp.pl, Samodzielna Pracownia Biologii Medycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie.

³ kamila.szymanska@umlub.pl, Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie.

⁴ martaostrowska@umlub.pl, Katedra i Zakład Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie.

⁵ a.korga@interia.pl, Samodzielna Pracownia Biologii Medycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie.

białek) [4]. Na wzrost ekspresji HSP w komórce, wpływa wiele szkodliwych czynników zarówno egzo- jak i endogennych. Do wspomnianych czynników zalicza się m.in. promieniowanie, w tym UV oraz magnetyczne, zmiany temperatury, trucizny metaboliczne, niedobór substancji odżywczych, wolne rodniki, metale ciężkie, alkohole, niedotlenienie, infekcje bakteryjne, czy wirusowe. Nadekspresja HSP obserwowana jest również w przypadku wielu nowotworów, chorób neurodegeneracyjnych, chorób serca oraz nerek. Ze względu na funkcje jakie w komórce pełnią HSP, uważa się, że są aktywnie zaangażowane zarówno w proliferację, inwazję, różnicowanie oraz apoptozę komórek nowotworowych [4-7].

2. Klasyfikacja, budowa, rola w karcenogenezie

Białka HSP klasyfikowane są głównie na podstawie swojej masy cząsteczkowej, przy czym większość z nich należy do podrodzin: HSP27, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, i dużych HSP (HSP110, GRP170- glucose – regulated protein 170) [8].

Lokalizacja HSP uwarunkowana jest przez funkcje jakie pełnią odpowiednie białka w komórce oraz od powinowactwa do danej struktury komórkowej. Obserwuje się ich obecność w cytoplazmie, jądrze komórkowym, mitochondriach oraz w miejscu ich syntezy, siateczce śródplazmatycznej. Dodatkowo, oprócz lokalizacji wewnątrzkomórkowej, gromadzą się na powierzchni błony komórkowej oraz w przestrzeni międzykomórkowej [9].

Pod wpływem działania czynnika stresogenego dochodzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego HSF1 (ang. *Heat Shock Factor 1*), który przyczynia się do indukcji ekspresji białek HSP. W warunkach prawidłowych, HSF1 zlokalizowany jest w cytoplazmie w postaci nieaktywnej jako monomer, gdzie tworzy kompleksy z białkami HSP90 i HSP70. Kompleksy białek HSP z HSF1 blokują jego fosforylację oraz trimeryzację do postaci aktywnej, uniemożliwiając jego translokację do jądra komórkowego i wiązanie się z DNA. HSF1 wiążąc się ze specyficzną sekwencją DNA, występującą w obszarze promotorów genów HSP, zwaną również elementem szoku cieplnego (ang. HSE – *Heat Shock Element*), przyczynia się do aktywacji transkrypcji genów kodujących HSP. Do zahamowania aktywności HSF1 przyczynia się zarówno wysoki poziom HSP, poprzez wiązanie się do jego monomerów lub trimerów oraz ustanie działania czynnika stresogenego [6, 9-11].

2.1. HSP 27

HSP27 należy do rodziny białek szoku cieplnego o małej masie cząsteczkowej tzw. small HSP-sHSP (12-43 kDA). Charakterystyczna budowa HSP27 oraz białek należący do sHPS, umożliwia im pełnienie wielu funkcji w komórkach, co zawdzięcza się możliwości ich oligomeryzacji. W budowie domenowej HSP27, wyróżniamy region C-końcowy, domenę α -krystalinową oraz zmienną N-końcową. Region C-końcowy jest odpowiedzialny za rozdzysocjowanie oligomerów, dimeryzację oraz pełnienie funkcji opiekuńczych. Na wielkość tworzonych oligomerów HSP27 wpływa konserwatywna domena α -krystalinowa, zbudowana z około 90 aminokwasów, identyczna z α -krystaliną obecną w soczewce oka ssaków. N-końcowy region zawiera region WDPF, który wymagany jest do oligomeryzacji HSP27. Ze względu na występowanie w tym regionie 3 miejsc fosforylacji (Ser-15, Ser-78, Ser-82), możliwa jest aktywność HSP27. Pod wpływem działania czynników stresogennych,

dochodzi do fosforylacji reszt seryny przez kinazy białkowe aktywowane kinazą białkową aktywowaną mitogenem (ang. MAPKAPK – *MAP kinase-activated protein kinase*) 2 i 3, która regulowana jest przez bezpośrednią fosforylację przez kinazę p38 MAP. Fosforylacja HSP27 przyczynia się do rozdysocjowania białka na mniejsze oligomery, często na dimery czy tetrametry, umożliwiając oddziaływanie z innymi białkami [12, 13].

Główną funkcją opiekuńczą z jakiej znane są HSP27, jest ich zdolność w warunkach stresowych do ochrony białek przed agregacją, nieodwracalną denaturacją oraz ułatwienie procesu prawidłowego fałdowania uszkodzonych białek. Pośredniczą w kierowaniu uszkodzonych białek na drogę naprawy przy udziale innych kompleksów HSP, ze względu na brak domeny ATP-azowej w HSP27. Wykazują także silną aktywność antyoksydacyjną oraz antyapoptotyczną. Odpowiedzialne są również za stabilizację białek cytoszkieletu, wzrost, różnicowanie komórek oraz progresję nowotworu. Białka HSP27 przyczyniają się do spadku poziomu reaktywnych form tlenu, powstałych pod wpływem działania stresu oksydacyjnego, poprzez rosnące stężenie wewnątrzkomórkowego glutationu oraz obniżenie stężenia wewnątrzkomórkowego żelaza. HSP27 posiada właściwości przeciapoptotyczne, wpływa zarówno na zewnątrz jak i wewnątrz szlak apoptozy. HSP27 wiążąc się z Daxx, niemożliwia jego translokację do błony komórkowej, a następnie aktywowanie apoptozy za pośrednictwem receptora Fas (ang. *Fas-mediated apoptosis*). Zapobiega, także późniejszemu wiązaniu Ask1 przez DAXX. HSP27 współdziała z BAX i cytochromem c, zapobiegając w ten sposób apoptozie na szlaku wewnątrzpochodnym. HSP27 zaangażowane jest również w hamowanie apoptozy zależnej od kaspaz – kaspazy 3, 9 [12-16].

Ze względu na ilość kluczowych procesów w komórce, za które odpowiada HSP27, zarówno w warunkach fizjologicznych jak i pod wpływem działania czynników stresogennych, przypisuje się mu znaczącą rolę w procesie karcinogenezy. Wpływa m.in., na rozwój, progresję czy przerzutowanie nowotworu ale, także na programowaną śmierć komórki czy oporność danego nowotworu na dostępne leczenie. HSP27 przyczynia się do adaptacji komórek nowotworowych do panujących warunków stresowych – komórki nowotworowe stale poddawane są warunkom stresogennym, w tym niedotlenieniu, niskiemu pH mikrośrodowiska, ekspozycji na środki cytotoksyczne, promieniowaniu, czy niestabilność genomu. Według ostatnich doniesień, zwiększony poziom HSP27 obserwuje się w wielu typach nowotworów m.in. jajników, piersi, prostaty, żołądka, wątroby. Nadekspresja HSP27 odgrywa istotną rolę w postępie choroby, jest negatywnym czynnikiem prognostycznym i zwykle wiąże się z gorszym rokowaniem. Dodatkowo, odpowiedzialna jest za oporność na chemioterapię np. w raku sutka na doksorubicynę oraz jest związana z nabywaniem fenotypów lekoopornych [12, 17, 18].

2.2. HSP40

Rodzina białek HSP40, znana jest także pod nazwą DNAJ. Jest najliczniejszą grupą białek HSP, która obecnie liczy ponad 45 białek [8]. Odpowiedzialne są w komórce za wiele funkcji życiowych. Ze względu na swoją liczebność mogą być zlokalizowane w różnych organellach komórkowych, wliczając w to jądro komórkowe, mitochondrium, cytoplazmę, retikulum endoplazmatyczne oraz rybosomy

i endosomy [5, 19, 20]. Za aktywność białek HSP40 odpowiada ich charakterystyczna budowa, w której możemy wyróżnić m.in. domenę J. Domena ta pozwala na wiązanie się z białkami HSP70, determinując ich aktywność w komórce oraz stabilizując wiązanie z białkami substratowymi. Dlatego też HSP40 określane są jako chaperony białek HSP70. W jej budowie możemy wyróżnić konserwatywne reszty histydy, proliny i kwasu asparaginowego. Poprzez regulację aktywności ATP-azowej w HSP70, wpływają na szereg procesów, w tym: translacji, translokacji, zwijaniu, rozwijaniu oraz agregacji i degradacji białek. Ze względu na różnice w budowie strukturalnej białek HSP40, można je podzielić na trzy podrodziny: DNAJA, DNAJB, DNAJC. W przypadku DNAJB, oprócz domeny J obserwujemy również region bogaty w glicynę/fenyloalaninę. W DNAJA oprócz wspomnianych domen, wyróżniamy także motyw palca cynkowego. Zaś w podrodzynie DNAJC domena J, może być zlokalizowana w dowolnym miejscu w obrębie białka, w przeciwieństwie do innych podrodziny HSP40 [13, 20].

Pomimo liczebności oraz różnorodności HSP40, niewiele wiadomo na temat ich roli w karcenogenezie. Do najbardziej poznanych oraz przypuszczalnie mogących modulować rozwój nowotworu zaliczamy białka: DNAJA3 (Tid1), DNAJB4 (HLJ1), DNAJB6 (MRJ), DNAJB1, DNAJC6. Białko DNAJB1 poprzez ubikwitynację, a następnie degradację białka PDCD5, hamuje apoptozę zależną od białka p53 w wielu typach nowotworów. DNAJC6 wpływa na indukcję tranzycji epitelialno-mezenchymalnej przyczyniając się do progresji nowotworu m.in. raka wątrobowo-komórkowego. Białka DNAJA3, DNAJB4 oraz DNAJB6 są przykładem białek HSP40, które pełnią funkcje supresorowe w stosunku do nowotworu. W badaniach *in vitro* ekspresja DNAJB4, odwrotnie koreluje ze zdolnością do inwazji i proliferacji komórek nowotworowych, co zarazem koreluje z ekspresją e-kadheryn. Hamuje cykl komórkowy niezależnie do p53 oraz interferonu poprzez szlak STAT1/ P21 (WAF1), któremu dodatkowo towarzyszy spadek ekspresji cykliny D1. Nadekspresja DNAJA3 w nowotworach głowy i szyi, odpowiada za hamowanie wzrostu guza. W badaniach *in vitro* hamuje również proliferację i inwazję komórek nowotworowych oraz prowadzi do indukcji apoptozy (czerniak, kostniakomięsak i nowotwory głowy i szyi). Reguluje aktywność NF- κ B. W raku szyjki macicy zmniejsza aktywność HER2/ERBB2. Nadekspresja DNAJB6 w raku piersi zarówno w badaniach *in vivo* i *in vitro* poprzez częściowe odwrócenie fenotypu mezenchymalnego komórek, zmniejsza złośliwość nowotworu. DNAJB6 jest zdolne do supresji przejścia epiteliano-mezenchymalnego oraz przerzutowania nowotworu, dzięki możliwości hamowania szlaku sygnałowego Wnt/ β -katenina [13, 20-23].

2.3. HSP60

HSP60 zlokalizowane są głównie w mitochondrium, gdzie oddziałując z HSP10, bądź HSP70 (mortalina) tworzą mitochondrialne kompleksy opiekuńcze. Odgrywają kluczową rolę w prawidłowym fałdowaniu białek mitochondrialnych oraz ich naprawie i degradacji. Dodatkowo, odpowiedzialne są za transport białek z cytoplazmy do mitochondrium. W budowie HSP60 wyróżniamy trzy domeny: podrównikową, środkową oraz wierzchołkową. Domena środkowa posiada aktywność ATP-azową. Za konformacyjne zmiany HSP60 w trakcie fałdowania polipeptydów odpowiedzialna jest domena środkowa. Zaś domena wierzchołkowa zawiera miejsca wiążące kofak-

tor oraz łańcuch polipeptydowy. Obecność HSP60 wykazano również w cytoplazmie, na powierzchni komórek (prawidłowych i nowotworowych), przestrzeni pozakomórkowej oraz krwi obwodowej, co w przyszłości może stanowić istotny czynnik w diagnostyce chorób nowotworowych [4, 9, 13].

Jako jedyne białka z podrodziny HSP wykazują zarówno właściwości pro- i antyapoptotyczne. HSP60 zlokalizowane w cytoplazmie, zapobiega translokacji proapoptotycznego białka BAX do mitochondriów hamując apoptozę. Podczas gdy wewnątrzkomórkowe HSP60 odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy białek. Wykazano, że HSP60 związane z błoną komórkową oraz zewnątrzkomórkowe działają jako silne stymulatory odpowiedzi immunologicznej. Pełnią rolę antygeny dla limfocytów T i B oraz wiążą się z kilkoma receptorami na powierzchni komórki, w tym CD14, CD40 i receptorami Toll-podobnymi (TLR), takimi jak TLR-2 i TLR-4. HSP60 oddziałuje z wieloma czynnikami zaangażowanymi w zaprogramowaną śmierć komórki i regulację cyklu komórkowego. Ich nadekspresję obserwuje się w licznych nowotworach m.in. prostaty, szyjki macicy, piersi, jelita grubego, pęcherza moczowego. Dodatkowo, nadekspresja HSP60 wpływa na przetrwanie bodźców apoptotycznych oraz proliferację. HSP60 poprzez interakcję z β -kateniną w komórkach nowotworowych wpływa na przerzutowanie nowotworu. Wysoki poziom HSP60 koreluje z progresją nowotworu i wskaźnikiem złego rokowania w przypadku nowotworów żołądka, okrężnicy, płuc, głowy i szyi, raku płuc, prostaty i jelita grubego [13, 22, 24, 25].

2.4. HSP70

Obecnie podrodzina HSP70 liczy 13 białek. Posiadają one wysoce konserwatywną sekwencję aminokwasową [8, 9]. W budowie łańcucha polipeptydowego możemy wyróżnić: N-końcową domenę wiążącą nukleotydy (ang. *NBD/ABD-nucleotide binding domain/ATPase binding domain*), elastyczny środkowy region łączący, wrażliwy na działanie proteaz, domenę wiążącą substrat (ang. *PBD/SBD-peptide binding domain/substrate binding domain*) oraz domenę C-końcową. Domena NBD charakteryzuje się zdolnością do hydrolizy ATP. Region PBD bogaty jest w glicynę/prolinę, dzięki czemu możliwe są oddziaływania hydrofobowe między łańcuchami polipeptydowymi. W C-końcowej domenie, cztery ostatnie aminokwasy tworzą sekwencje EEVD (oznaczenia aminokwasów) – motyw wiązania białek współpikujących, zdolnych do interakcji z m.in. HSP90, HSP40, BAG-1 (ang. *BAG family molecular chaperone regulator-1, Bcl-2-associated athanogene 1*) oraz białkiem HOP i CHIP. W warunkach fizjologicznych dzięki aktywności ATP-azowej, funkcjonują one jako molekularne chaperony. Aktywność ATP-azowa HSP70 stymulowana jest przez białka podrodziny HSP40. Funkcje, w jakich pośredniczą HSP70, zależą od ich lokalizacji zarówno w komórce, jak i poza nią. Wewnątrzkomórkowe HSP70 wykazują działanie cytoprotekcyjne, chroniąc komórki przed uszkodzeniami wywołanymi stresem, wspierają fałdowanie, transport nowo syntetyzowanych łańcuchów polipeptydowych, przywracanie natywnej konformacji białek nieprawidłowych. Dodatkowo, umożliwiają tworzenie kompleksów wielobiałkowych. Zewnątrzkomórkowe HSP70 posiadają właściwości immunomodulujące. Aktywują wrodzoną (nieswoistą) i nabytą (swoistą) odpowiedź immunologiczną oraz uczestniczą w prezentacji antygenów i produkcji przeciwciał [4, 9, 13, 18, 26, 27].

Obecnie najlepiej poznanym pięciu białkom HSP70 przypisuje się bezpośredni wpływ na proces karcenogenezy. Zaliczamy do nich HSP71 (HSPA1), HSP70B' (HSPA6), HSC70 (HSPA8), mortalina (HSPA9, GRP75), HSPA5 (GRP75). Pierwsze dwa HSP70, zlokalizowane są głównie w cytoplazmie, a ich ekspresja indukowana jest stresem. HSC70, mortalina, HSPA5 konstytutywnie ekspresjonowane w komórce oraz zlokalizowane są kolejno w: cytoplazmie, mitochondrium, siateczce śródplazmatycznej. Dodatkowo, część przedstawicieli tej podrodziny może ulegać ekspresji w sposób zróżnicowany komórkowo oraz tkankowo. HSP70 wpływa na wiele szlaków mających wpływ na proces nowotworzenia. Zdolne są do supresji apoptozy zarówno na drodze wewnątrz- jak i zewnątrzpochodnej. Odpowiedzialne są za wiązanie BAX, hamując jego translokację do mitochondrium oraz APAF-1 i prokaspazy-9 uniemożliwiając utworzenie apoptosmu. Dodatkowo wpływają na apoptozę, hamując aktywność kinaz zaangażowanych w przekazywanie sygnałów stresowych (np. ASK1, JNK, p38 MAPK) oraz czynnika indukującego apoptozę (ang. AIF – *Apoptosis Inducing Factor*). HSP70 hamuje zarówno zależne (PI3K) i niezależne od p53 (ras/ERK) drogi starzenia się komórek. Lokalizując się na błonie lizosomów, stabilizują ją, promując autofagię. Poprzez współpracę z HSP90 regulują aktywność HER2, AKT oraz CRAF [9, 13, 18, 22, 27-29]

Nadekspresję HSP70 obserwuje się w wielu nowotworach m.in. raku jelita grubego, endometrium, piersi, żołądka, czerniaku i ostrej białaczki szpikowej, gdzie stanowi marker zaawansowania choroby, ale również negatywnie wpływa na rokowanie jak i czas przeżycia pacjenta. Dodatkowo, może wiązać się z opornością na chemio- i radioterapię. Umożliwia identyfikację pacjenta we wczesnym stadium choroby, w przypadku raka prostaty oraz raka wątrobowokomórkowego. Wykazano, także dodatnią korelację pomiędzy dodatnim wynikiem Ki-67, a nadekspresją HSP70 w raku płuca oraz zwiększoną proliferacją, jak i wielkością guza w raku szyjki macicy [13, 18, 28, 30].

2.5. HSP90

Białka HSP90 są obecnie szczegółowo poznaną podrodziną HSP. Przypisuje się im największą rolę w procesie karcenogenezy. Stanowią około 2% wszystkich białek zawartych w komórce w warunkach fizjologicznych i są grupą najbardziej ekspresjonowanych białek spośród wszystkich HSP. Obecnie zidentyfikowano pięć ludzkich izoform HSP90, które różnią się m.in. lokalizacją w komórce, specyficznością substratową oraz strukturą domenową. Dwie z nich HSP90 α i HSP90 β zlokalizowane są w cytoplazmie, HSP90B1 (GRP94 – *Glucose Regulated Protein 94*) w retikulum endoplazmatycznym, HSP75/TRAP (*TNF Receptor-Associated Protein*) w matrix mitochondrialnym oraz HSP90N, niedawno zidentyfikowany wariant cytozolowy, związany z błoną komórkową. Dodatkowo, niewielka część HSP90 obecna jest również w jądrze komórkowym. W budowie strukturalnej tych białek możemy wyróżnić trzy charakterystyczne domeny. N-końcowy region odpowiedzialny jest za wiązanie i hydrolizę ATP. Domena środkowa (*middle domain* – MD) służy jako miejsce wiązania z resztą fosforanową w pozycji γ cząsteczki ATP, co wpływa na aktywność ATP-azową oraz możliwość przyłączenia się białek tzw. „klientów” HSP90. C-końcowy region umożliwia dimeryzację HSP90. Każda z domen posiada możliwość wiązania się z innymi białkami współopiekuńczymi. Zarówno region N-

i C-końcowy jest miejscem do którego przyłączają się małe cząsteczki, zwane inhibitorami HSP90 np. geldanamycyna, 17-AAG, nowobiocyna, cisplatyna, wpływając na aktywność HSP90. Dimeryzacja jest niezbędna dla prawidłowej funkcjonalności białek [4, 9, 13, 18, 30-32].

Główną rolę jaką przypisuje się HSP90 jest udział w prawidłowym fałdowaniu, dojrzewaniu, degradacji oraz transporcie białek. Reagują z wieloma cząsteczkami sygnałowymi, które odgrywają istotną rolę w wielu procesach komórkowych, m.in. w kontroli i regulacji cyklu komórkowego. W komórkach nowotworowych wzmagają proliferację oraz hamują apoptozę indukowaną stresem, w tym przed lekami cytostatycznymi i radioterapią. HSP90 oddziałują i stabilizują, wiele kluczowych czynników transformacji nowotworowej, w tym receptorów kinaz tyrozynowych (m.in. EGFR, HER2, c-KIT, MEK, VEGFR, FLT3, IGFR1), białek transdukcyjnych sygnału (m.in. BCR-ABL, ALK, BRAF, AKT), czynniki transkrypcyjne (m.in. receptory estrogenowe i androgenowe, HIF1 α , p53), białka regulatorowe cyklu komórkowego (m.in. CDK4, RB, cyklina D), białka antyapoptotyczne (m.in. BCL2, APAF-1) oraz telomeraza, FAK1, MMP2. Z tego względu HSP90 odgrywają ważną rolę w rozwoju nowotworu, regulując jego wzrost, starzenie się komórek, adhezję, przerzutowanie, apoptozę, czy angiogenezę. Nadekspresję białek HSP90 obserwuje się w szerokim zakresie nowotworów. W przypadku raka wątrobowokomórkowego oraz pęcherza, nadekspresja HSP90 wiąże się z zaawansowanym stadium nowotworu, stanowiąc czynnik prognostyczny. W raku piersi wspomniana nadekspresja, powiązana jest z ekspresją receptora estrogenu i HER2/ERBB2, co skutkuje złym rokowaniem i zmniejszoną przeżywalnością pacjentek. Podobnie w nowotworach głowy i szyi, wysoki poziom GRP94 w tkankach nowotworowych, znacząco korelował z zaawansowanymi stadiami nowotworu i słabym przeżyciem [6, 9, 13, 18, 30-35].

2.6. Duże HSP

Do podrodziny dużych HSP zalicza się m. in. HSP110 (HSP105) oraz GRP170, które indukowane są kolejno przez stres i niedobór glukozy. Uczestniczą w wielu procesach w komórce, poprzez tworzenie kompleksów z innymi białkami HSP jak, HSP27, HSP70 i HSP90 wpływając na ich funkcję. Struktura oraz rola jaką pełnią HSP110 oraz GRP170 są podobne. W budowie tych białek możemy wyróżnić trzy główne domeny: N-kończącą ATP-azową, PBP domenę oraz C-kończącą. W C-kończącym regionie dodatkowo zlokalizowana jest domena helikalna. Główną funkcją HSP110 jest ochrona innych białek przed denaturacją i agregacją. Wpływają na proces karcenogenezy regulując szlaki apoptozy komórek nowotworowych. W odniesieniu do nowotworów, oba te białka wykazują skuteczne właściwości immunostymulujące, które prowadzą do wzmocnienia immunogenności określonych antygenów. Z tego względu HSP110 i GRP170, wykorzystuje się do tworzenia nowych leków przeciwnowotworowych. Nadekspresję dużych HSP obserwuje się w wielu chorobach nowotworowych, gdzie stanowi niekorzystny czynnik prognostyczny dla pacjenta [4, 8, 9, 13].

3. Rola HSP w terapii przeciwnowotworowej

Białkom HSP przypisuje się kluczową rolę w procesie karcenogenezy. Regulują one wiele ważnych szlaków sygnałowych w komórce mających wpływ m.in. na proliferację, apoptozę, inwazję i przerzutowanie komórek nowotworowych [9, 13]. Odpowiedzialne są również za ich oporność na konwencjonalną chemio- bądź radioterapię [30, 36]. Z tego względu modulacja funkcji HSP, staje się idealnym celem dla nowych, bardziej selektywnych terapii przeciwnowotworowych. Obecnie opracowano wiele cząsteczek mających taką zdolność, tzw. inhibitorów HSP. Jednak na dzień dzisiejszy jedynie inhibitory HSP90 okazują się być obiecujące zarówno w badaniach przedklinicznych, jak i klinicznych, w stosunku do wielu typów nowotworów [30, 36].

Do pierwszych inhibitorów HSP90 zalicza się geldanamycynę (GA) – benzochinonowy antybiotyk ansamycynowy oraz radicicol (RD) – antybiotyk makrolidowy. Oba naturalne związki wykazują właściwości antyproliferacyjne oraz zdolność do wiązania się z N-końcową domeną HSP90, hamując tym samym aktywność ATP-azową oraz funkcję białka opiekuńczego. Zablockowanie tej aktywności przyczynia się do kierowania „klientów” HSP90 na drogę degradacji z wykorzystaniem szlaku ubiquityna/proteasom. Pierwszy z nich, GA, nie został dopuszczony do badań klinicznych w związku z wysoką hepatotoksycznością oraz słabą rozpuszczalnością. Zaś RD pomimo obiecującej aktywności *in vitro*, ze względu na niestabilność w surowicy, jest nieaktywny *in vivo*. Ze względu na dużą cytotoksyczność GA, konieczne stało się poszukiwanie jej analogów o mniejszej hepatotoksyczności, lepszym profilu bezpieczeństwa. Trzema najbardziej znanymi analogami GA, które badano są 17-AAG (tanespimycyn), 17-DMAG (alvespimycyn) oraz IPI-504 (retaspimycyn). Uważa się je za inhibitory HSP90 pierwszej generacji. 17-AAG był pierwszym inhibitorem HSP90 dopuszczonym do badań klinicznych. Jednak ze względu na słabą rozpuszczalność, biodostępność oraz hepatotoksyczność, badania te przerwano. Pomimo lepszej rozpuszczalności dwóch kolejnych analogów, nadal obserwuje się efekty uboczne ograniczające stosowaną dawkę [9, 13, 30, 37].

Skuteczne okazały się terapie skojarzone z innymi lekami chemioterapeutycznymi i radioterapią, o czym świadczą liczne badania kliniczne. Ogólnie, stosowanie inhibitorów HSP90 uwrażliwia komórki nowotworowe na toksyczne działanie zarówno chemioterapii, jak i radioterapii. Z tego powodu, pochodne GA stosowano w połączeniu m.in. z bortezomibem, doksorubicyną, transtuzumabem, docetakselem oraz inhibitorami kinaz tyrozynowych. Wykazano skuteczność takiego łączenia w wielu nowotworach zarówno w szpiczaku mnogim, raku piersi HER2-dodatnim, podścieliska przewodu pokarmowego (GIST), mięsakiach tkanek miękkich oraz niedrobnokomórkowym raku płuc. Obecnie powstaje coraz to więcej inhibitorów HSP90, np. pochodne RD, STA-9090 (Ganatespib), AT13387 (Onalespib), AUY922 (Luminespib) oraz analogi puryn PU-H71, PU-DZ8 i CNF2024 (BIIB021). Wiele z nich weszło do różnych faz badań klinicznych w stosunku do różnych typów chorób nowotworowych. Jednak, pomimo licznych prób, żaden inhibitor HSP nie został dopuszczony przez FDA (ang. Food and Drug Administration) do terapii przeciwnowotworowej. Problem na jaki się napotyka stosując inhibitory HSP90, związany jest z kompensacyjnym mechanizmem innych białek HSP (HSP27 i HSP70)

w komórkach nowotworowych, brakiem odpowiedniej skuteczności przeciwnowotworowej oraz często obserwowanej u pacjentów hepatotoksyczności. Patrząc na dużą liczbę badań klinicznych, w których stosuje się inhibitory HSP90 w monoterapii, bądź terapii skojarzonej, można śmiało stwierdzić, że jest to obiecująca grupa związków mogących mieć w przyszłości kluczowe znaczenie w terapii przeciwnowotworowej [9, 13, 30, 35-40].

4. Podsumowanie

Białka HSP są wyjątkowo liczną grupą białek opiekuńczych. Od lat 60 ubiegłego wieku stanowią centrum zainteresowania dla wielu naukowców. Odpowiedzialne są za wiele ważnych funkcji w komórce zarówno w warunkach fizjologicznych oraz w czasie zaistniałych warunków stresowych. Przypisuje się im szczególną rolę w procesie nowotworzenia. Obserwowana nadekspresja HSP w wielu nowotworach może służyć zarówno jako marker diagnostyczny, czynnik prognostyczny oraz predykcyjny. Dodatkowo, ich nadekspresja została powiązana z opornością pewnych nowotworów na leczenie. Wraz z rozwojem wiedzy na temat HSP oraz mechanizmów leżących u podłoża procesu karcinogenezy, stale poszukiwane są związki mogące modulować aktywność tych białek, przyczyniając się tym samym do powstania nowej grupy leków przeciwnowotworowych.

Literatura

1. Desai N.S., Agarwal A.A., Uplap S.S., *HSP: Evolved and conserved proteins, structure and sequence studies*. International Journal of Bioinformatics Research, 2, (2010), s. 67-87.
2. Ritossa F. *A new puffing pattern induced by temperature and DNP in Drosophila*. Experimentia, 18, (1962), s. 571-573.
3. Tissieres A, Mitchell HK, Tracy UM, *Protein synthesis in salivary glands of Drosophila melanogaster: relation to chromosome puffs*. Journal of Molecular Biology, 84, (1974), s. 389-398.
4. Wyżewski Z, Gregorczyk KP, Szulc-Dąbrowska L, Struzik J, Szczepanowska J, Niemiałtowski M. *Współdziałanie białek szoku cieplnego w organizowaniu struktury przestrzennej białek*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 68, (2014), s. 793-807.
5. Verbeke P, Fonager J, Clark BFC, Rattan SIS. *Heat shock response and ageing: Mechanisms and applications*. Cell Biology International, 25, (2001), s. 845-57.
6. Dubey A, Prajapati KS, Swamy M, Pachauri V. *Heat shock proteins: A therapeutic target worth to consider*. Veterinary World, 8, (2015), s. 46-51.
7. Goldstein MG, Li Z. *Heat-shock proteins In infection-mediated inflammation-induced tumorigenesis*. Journal of Hematology and Oncology, 2, (2009), s. 1-10.
8. Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA. *Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins*. Cell Stress Chaperones, 14, (2009), s. 105-11.
9. Kaźmierczuk A, Kiliańska ZM. *The pleiotropic activity of heat-shock proteins*. Postępy higieny i medycyny doświadczalnej, 63, (2009), s. 502-21.
10. Jolly C., Morimoto R.I. *Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death*, Journal of the National Cancer Institute, 92, (2000), s. 1564-1572.
11. Dai C, Whitesell L, Rogers AB, Lindquist S. *Heat Shock Factor 1 Is a Powerful Multifaceted Modifier of Carcinogenesis*, Cell, 130, (2007), s. 1005-1018.
12. Vidyasagar A, Wilson NA, Djamali A. *Heat shock protein 27 (HSP27): biomarker of disease and therapeutic target*. Fibrogenesis Tissue Repair, 5, (2012), 7.

13. Wu J, Liu T, Rios Z, Mei Q, Lin X, Cao S. *Heat Shock Proteins and Cancer*. Trends in Pharmacological Sciences, 38, (2017), s. 226-56.
14. Havasi A, Li Z, Wang Z, Martin JL, Botla V, Ruchalski K, Schwartz JH, Borkan SC, *Hsp27 inhibits Bax activation and apoptosis via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism*, Journal of Biological Chemistry, 28, (2008), s. 12305-12313.
15. Arrigo AP, Virost S, Chaufour S, Firdaus W, Kretz-Remy C, Diaz-Latoud C: *Hsp27 consolidates intracellular redox homeostasis by upholding glutathione in its reduced form and by decreasing iron intracellular levels*. Antioxid Redox Signal, 7, (2005), s. 414-422.
16. <http://hsp27.com/function-and-regulation/> accessed: 04.03.2018.
17. Hansen RK, Parra I, Lemieux P, Oesterreich S, Hilsenbeck SG, Fuqua SA. *Hsp27 overexpression inhibits doxorubicin-induced apoptosis in human breast cancer cells*. Breast Cancer Research Treatment, 56, (1999), s. 187-196.
18. Ciocca, DR. Calderwood, SK. *Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications*. Cell Stress Chaperones, 10, (2005), s. 86-103.
19. <http://hsp40.com/localization/> accessed: 04.03.2018
20. Mitra A, Shevde LA, Samant RS. *Multi-faceted role of HSP40 in cancer*. Clinical and Experimental Metastasis, 26, (2009), s. 559-567.
21. Cui X, Choi HK, Choi YS, Park SY, Sung GJ, Lee YH. *DNAJB1 destabilizes PDCD5 to suppress p53-mediated apoptosis*. Cancer Letters, 357, (2015), s. 307-315.
22. Lianos GD, Alexiou GA, Mangano A, Mangano A, Rausei S, Boni L. *The role of heat shock proteins in cancer*. Cancer Letters, 360, (2015), s. 114-118.
23. Yang T, Li XN, Li XG, Li M, Gao PZ. *DNAJC6 promotes hepatocellular carcinoma progression through induction of epithelial-mesenchymal transition*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 455, (2014), s. 298-304.
24. <http://hsp60.com/disease-relevance/> accessed: 06.03.2018.
25. Bajzert J, Stefaniak T. *Białka szoku cieplnego HSP60 i perspektywy ich wykorzystania jako antygenów szczepionkowych*, Postępy higieny i medycyny doświadczalnej, 69, (2015), s. 1149-1168.
26. Shevtsov M, Huile G, Multhoff G, Multhoff G. *Membrane heat shock protein 70: a theranostic target for cancer therapy*. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 373, (2018), 20160526.
27. Murphy ME. *The HSP70 family and cancer*. Carcinogenesis, 34, (2013), s. 1181-1188.
28. Sherman MY, Gabai VL. *Hsp70 in cancer: Back to the future*. Oncogene, 34, (2015), s. 4153-4161.
29. Rohde M, Daugaard M, Jensen MH, Helin K, Nylandsted J. *Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms*. Genes Development. 70, (2005), s. 570-582.
30. Chatterjee S, Burns TF. *Targeting heat shock proteins in cancer: A promising therapeutic approach*. International Journal of Molecular Sciences, 18, (2017), E1978.
31. Seigneuric R, Mjahed H, Gobbo J, Joly A-L, Berthenet K, Shirley S. *Heat Shock Proteins as Danger Signals for Cancer Detection*. Frontiers in Oncology, 1, (2011), s. 1-10.
32. Jackson SE, Jackson SE. *Hsp90 : Structure and Function*. Topics in Current Chemistry, 328, (2013), s. 155-240.
33. <http://hsp90.ca/disease-relevance/> accessed: 07.03.2018.
34. <http://hsp90.ca/mechanisms-interactions/> accessed: 08.03.2018.
35. Guttman DM, Koumenis C. *The heat shock proteins as targets for radiosensitization and chemosensitization in cancer*. Cancer Biology and Therapy, 12, (2011), s. 1023-1031.
36. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=inhibitor+hsp&cntry=&state=&city=&dist=> accessed: 15.03.2018.

37. Marszał MP. *Białka opiekuńcze – pomagają czy szkodzą?*, Farmacja Polska 66, (2010), s. 5-8.
38. Nahleh Z, Tfayli A, Sayed A El. *Heat shock proteins in cancer : targeting the “chaperones”*, Future Medicinal Chemistry, 4, (2012), s. 927-935.
39. Soo ETL, Yip GWC, Lwin ZINMAR, Kumar SD, Bay B. *Heat Shock Proteins as Novel Therapeutic Targets in Cancer*, In vivo, 22, (2008), s. 311-315.
40. <http://hsp90.ca/inhibitors/> accessed: 20.03.2018.

Rola białek szoku termicznego w patogenezie i terapii przeciwnowotworowej

Streszczenie

Białka szoku termicznego (ang. *Heat Shock Proteins* – HSP), znane również jako białka opiekuńcze, pełnią ważną rolę w utrzymaniu prawidłowej homeostazy komórki we wszystkich żywych organizmach. Można je sklasyfikować pod względem masy cząsteczkowej na sześć głównych rodzin: HSP27, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 i duże HSP (HSP110). Białka HSP produkowane są w komórce konstytutywnie, jednak po zadziałaniu czynnika stresogennego, np. podwyższonej temperatury, promieniowania UV, czy toksyn, ich ekspresja gwałtownie wzrasta. Nadekspresja HSP występuje także w wielu nowotworach wpływając na proliferację komórek, ich różnicowanie, apoptozę i odpowiedź immunologiczną. Wg ostatnich doniesień, nadekspresja białek HSP jest negatywnym czynnikiem prognostycznym, jak również predykcyjnym. Białka HSP biorą udział w fałdowaniu i stabilizacji wielu białek, w tym także białek, które przyczyniają się do rozwoju nowotworu, co czyni je nowym celem terapii przeciwnowotworowej. W związku z tym, opracowano nowe cząsteczki mające zdolność do modulowania ekspresji i / lub aktywności białek HSP. Inhibitory te okazują się być obiecujące zarówno w badaniach przedklinicznych, jak i klinicznych.

Celem pracy jest przybliżenie roli białek szoku termicznego w patogenezie rozwoju chorób nowotworowych oraz ich potencjału w terapii przeciwnowotworowej.

Słowa kluczowe: Białka Szoku Ciepłego, Białka Szoku Termicznego, HSP, Patogeneza, Karcinogeneza.

The role of heat shock proteins in pathogenesis and anticancer therapy

Abstract

Heat Shock Proteins (HSPs), also known as molecular chaperones, play an important role in maintaining the cell homeostasis in all living organisms. They are distinguished based on its molecular size into six families: HSP27, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 and large HSP (HSP110). HSP proteins are constitutively expressed in cells. However, their expression significantly increases after exposition on the stressful factor, e.g. elevated temperature, UV radiation or toxins. HSP overexpression also occurs in many cancers affecting on the cell proliferation, differentiation, apoptosis and immune response. According to recent reports, the overexpression of HSP proteins is a negative prognostic and predictive factor. HSP proteins are involved in folding and stabilization of many proteins, including proteins that contribute to the development of cancer, which makes HSP a new target for anticancer therapy. Therefore, new molecules having an ability to modulate the expression and/or activity of HSP proteins have been developed. These inhibitors turned out to be promising for both preclinical and clinical trials. The aim of our work is to approximate the role of heat shock proteins in pathogenesis of cancer diseases and their potential in anticancer therapy.

Keywords: Heat Shock Proteins, Thermal Shock Protein, HSP, Pathogenesis, Carcinogenesis.

Mniej znane inhibitory proteasomu w terapii przeciwnowotworowej

1. Wstęp

Kluczową rolę w utrzymaniu prawidłowego funkcjonowania oraz homeostazy komórki eukariotycznej pełni złożona i ściśle regulowana degradacja białek komórkowych [1]. Szacuje się, że około 80% białek komórkowych jest degradowanych poprzez szlak ubiquityna-proteasom (UPS). Układ ten okazał się główną drogą wewnątrzkomórkowej degradacji protein. Rozkładowi ulegają w nim białka pełniące ważną rolę w regulacji wielu kluczowych procesów takich jak: cykl komórkowy, apoptoza, transkrypcja, naprawa DNA oraz inne [2]. Pierwsze doniesienia o proteasomie powstały na początku lat 70. XX wieku kiedy został on opisany przez Harris'a [3]. Dopiero w późniejszym okresie odkryto, iż funkcją proteasomu jest zależna od ATP degradacja białek wewnątrz komórkowych znakowanych ubiquityną. Za to odkrycie Ciechanover, Hersho i Rose otrzymali nagrodę Nobla w dziedzinie chemii w 2004 roku [1, 4]. Ponadto poprzez UPS rozkładane są także białka o nieprawidłowej strukturze oraz białka wirusowe. Zapobiega on zatem gromadzeniu się wewnątrz komórki białek obarczonych różnymi defektami. W komórkach nowotworowych dochodzi do znacznej nadprodukcji nieprawidłowych białek, co jest wynikiem ich niestabilności genetycznej. Zablokowanie proteasomu przez związki nazywane inhibitorami proteasomu w takiej sytuacji doprowadzi do nagromadzenia się nieprawidłowych białek w komórce oraz w efekcie różnych procesów do jej śmierci. W ten sposób zaczęto wykorzystywać inhibitory proteasomów w leczeniu chorób nowotworowych [5]. Celem poniższej pracy przeglądowej jest przedstawienie oraz przybliżenie tematyki związanej z grupą inhibitorów proteasomu drugiej generacji, ich mechanizmów działania oraz aktualnie prowadzonych badań przedklinicznych oraz klinicznych.

¹ ewelina.humeniuk@vp.pl, Samodzielna Pracownia Biologii Medycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie.

² grzegorz.adamczuk3@wp.pl, Samodzielna Pracownia Biologii Medycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie.

³ kamila.szymanska@umlub.pl, Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie.

⁴ martaostrowska@umlub.pl, Katedra i Zakład Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie.

⁵ a.korga@interia.pl, Samodzielna Pracownia Biologii Medycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie.

2. System ubikwityna-proteasom (UPS)

2.1. Proteasom 26S

Proteasomy w komórkach eukariotycznych występują w dwóch postaciach: proteasomu 20S oraz proteasomu 26S. Proteasom 20S nie posiada aktywności ATP-azowej oraz nie uczestniczy w rozkładaniu białek znakowanych ubikwityną. Do degradacji tak oznaczonych białek są zdolne jedynie proteasomy 26S, które posiadają masę około 1500-2000 kDa [6].

Proteasom 26S składa się z rdzeniowego kompleksu katalitycznego 20S o masie około 700 kDa oraz dwóch cząstek regulatorowych o stałych sedymentacji 19S, położonych na dwóch końcach rdzenia. Katalityczny rdzeń 20S ma postać tuby zbudowanej z 4 pierścieni ułożonych jeden na drugim. Pierścienie liczą po 7 podjednostek. Pierścienie wewnętrzne tworzą różne podjednostki β , natomiast zewnętrzne różne podjednostki α . Aktywne enzymatycznie są jedynie podjednostki $\beta 1$, $\beta 2$ oraz $\beta 5$, które posiadają odpowiednio aktywności: kaspazopodobną, trypsynopodobną i chymotrypsynopodobną. Pozostałe podjednostki β oraz wszystkie α są nieaktywne. Katalityczny rdzeń 20S, dzięki posiadaniu kilku rodzajów aktywności peptydazowych wewnątrz jednej komory proteolitycznej, posiada zdolność do degradacji większości wiązań w łańcuchu peptydowym, czym wyróżnia się od typowych proteaz. Proteasom 26S pełni swoją funkcję także, dzięki posiadaniu kompleksów regulatorowych 19S. Cząstka regulatorowa 19S rozpoznaje ubikwitynowane białka oraz otwiera kanał do katalitycznego rdzenia 20S [5-8].

2.2. Ubikwitynacja

Jest to kilkietapowy proces, zaliczany do potranslacyjnych modyfikacji białek, polegający na przyłączeniu ubikwityny do białka przeznaczonego do degradacji w proteasomie. Ubikwityna (Ub) to niewielkie białko złożone z 76 aminokwasów o masie około 8,5 kDa. Ubikwitynacja wymaga użycia energii pochodzącej z ATP oraz aktywności wielu enzymów. Głównymi enzymami biorącymi udział w tym procesie są enzymy: E1 (aktywujący Ub), E2 (przyciągający Ub) oraz E3 (wiązący Ub) [9, 10].

Proces rozpoczyna się przy udziale enzymu E1, gdzie zachodzi reakcja transestryfikacji zależnej od ATP. Dochodzi do aktywacji ubikwityny i powstania wiązania pomiędzy glicyną na C-końcu Ub, a grupą -SH reszty cysteinowej enzymu E1. W kolejnym etapie Ub zostaje przeniesiona na enzym koniugujący E2. W ostatnim kroku, dzięki enzymowi E2 działającemu samodzielnie lub poprzez enzym E3, reszta Ub trafia na substrat. Powstaje wiązanie pomiędzy aktywowanym wcześniej C-końcem Ub, a ϵ -NH₂ jednej z reszt lizynowych w białku. Aby białko zostało rozpoznane przez proteasom, musi dojść do utworzenia łańcucha poliubikwitynowego, więc proces powtarza się. Dla enzymu E3 substratem staje się cząsteczką Ub przyłączona do białka. Łańcuch ten musi składać się z co najmniej 4 reszt Ub [11, 12].

2.3. Znaczenie systemu ubikwityna-proteasom

Szlak ubikwityna proteasom (UPS) pełni w komórce eukariotycznej niezwykle ważną funkcję, zapewniając jej odpowiednie funkcjonowanie oraz homeostazę. Pozwala on zachować równowagę w komórce, poprzez kontrolę poziomu różnych białek regulatorowych. Proteiny te biorą udział m.in. w transkrypcji, rozwoju, wzroście,

progresji cyklu komórkowego, ontogenezie, czy szlakach metabolicznych. Ponadto UPS odpowiada także za degradację inhibitora czynnika jądrowego NF- κ B, dzięki czemu kontroluje jego aktywację. Proteasom bierze też udział w prezentacji antygeny. Zakłócenie równowagi między białkami regulatorowymi, wynikające z uszkodzenia lub zaburzenia funkcji UPS, może powodować zahamowanie cyklu komórkowego w różnych jego fazach oraz programowaną śmierć komórki (apoptoza). UPS bierze także udział w degradacji supresorów nowotworowych [7, 10, 13]. Zaburzenia układu UPS mogą być przyczyną różnego rodzaju schorzeń. Należy jednak pamiętać, iż deregulacja proteasomu może obejmować zarówno wzrost, jak i zmniejszenie jego aktywności. Utrata prawidłowego funkcjonowania proteasomu jest związana z rozwojem różnych chorób zarówno dziedzicznych, jak i nabytych. Zwiększenie aktywności proteasomu występuje głównie w chorobach nowotworowych. Wymienia się wśród nich raka okrężnicy, jajnika, nerki, białaczkę mieloblastyczną. Obniżenie aktywności proteasomów występuje w chorobach neurodegeneracyjnych tj. choroba Alzheimera, Huntingtona, Parkinsona oraz ataksjach rdzeniowo-mózdkowych. Osłabienie UPS obecne jest także w chorobie Wilsona, anemii Fanconiego oraz zakażeniach wirusami HIV i HBV [14, 20].

3. Pierwszy inhibitor proteasomu – bortezomib

Początkowo inhibitory proteasomów opracowywano z myślą, by związki te zapobiegały rozwojowi kacheksji, która dotyka pacjentów z chorobami nowotworowymi. Związane było to z rolą UPS w obrocie białek w komórkach. Wiele badań przedklinicznych pokazało, że inhibitory proteasomu mogą indukować apoptozę w nowotworowych liniach komórkowych oraz modelach mysich. W ten sposób zapoczątkowano badania nad inhibitorami proteasomu jako nową grupą leków przeciwnowotworowych [15]. Ponadto, badania wykazały iż wysoka aktywność oraz proliferacja komórek nowotworów złośliwych powoduje ich większą podatność na inhibicję proteasomu, niż komórek prawidłowych. Prowadzono szereg badań, które potwierdziły iż proteasom stanowi ważny cel leczenia przeciwnowotworowego. Niestety dostępnym w tym czasie inhibitorom proteasomu brakowało swoistości [9]. Adams i wsp. zsyntetyzowali kilka pochodnych kwasu boronowego, które w bardzo swoisty sposób powodują inhibicję proteasomu. Przebadano je w obrębie panelu 60 nowotworowych linii komórkowych obecnych w Narodowym Instytucie Nowotworów (NCI). Większość ze stworzonych związków wykazało aktywność przeciwnowotworową, jednak ze względu na swoistość działania oraz efekt cytotoksyczny do dalszych badań klinicznych wybrano tylko bortezomib [16].

Bortezomib jest pierwszym inhibitorem proteasomu, który został wprowadzony do leczenia pacjentów z chorobą nowotworową. Jest to pochodna kwasu boronowego, posiadająca zdolność do szybkiego i odwracalnego wiązania się z proteasomem 26S, umożliwiając głównie zahamowanie jego aktywności chymotrypsynopodobnej, a w mniejszym stopniu aktywności kaspazo- oraz trypsynopodobnej. Aktualnie bortezomib jest dopuszczony do leczenia chorych z nawrotowym i/lub opornym szpiczakiem mnogim oraz od niedawna u pacjentów w nowo rozpoznanej chorobie. Bortezomib jest też stosowany w leczeniu pacjentów z chłoniakiem z komórek płaszczą. Imponująca aktywność przeciwnowotworowa, jaką wykazał bortezomib ponad dziesięć lat temu w leczeniu nawrotowego i/lub opornego szpiczaka mnogiego,

spowodowała, że lek z tą substancją czynną został szybko zarejestrowany w 2003 roku. Ponadto bortezomib stosowany jest także w terapii skojarzonej z talidomidem oraz deksametazonem oraz cyklofosfamidem i deksametazonem. Bortezomib wykazuje również aktywność przeciwnowotworową w wielu typach nowotworów indukując apoptozę w komórkach raka trzustki, stercza, jajnika oraz nowotworów głowy i szyi [5, 17-19].

Apoptoza indukowana przez bortezomib w komórkach nowotworowych jest związana z hamowaniem czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Zwiększona aktywność tego czynnika powoduje oporność komórek szpiczaka mnogiego na chemioterapię. NF- κ B obecny jest w cytoplazmie niemal wszystkich komórek. Reguluje on wzrost i apoptozę, ekspresję różnego rodzaju cytokin, cząsteczek adhezyjnych oraz ich receptorów. NF- κ B połączony jest z inhibitorem I- κ B. Po stymulacji komórek, aktywowane są kaskady sygnałów, które prowadzą do ubikwitynacji I- κ B oraz degradacji w proteasomie 26S. Wolny od inhibitora i aktywny NF- κ B wędruje do jądra, gdzie stymuluje transkrypcję odpowiednich genów. Bortezomib blokując proteasom 26S powoduje hamowanie NF- κ B. Odbywa się to poprzez zahamowanie degradacji I- κ B, co skutkuje zmniejszeniem ekspresji wielu czynników i cząsteczek, które sprzyjają wzrostowi i przeżyciu komórek nowotworowych. Dochodzi do wzrostu aktywności szlaków apoptotycznych oraz aktywacji kaspazy-9. Inhibicja NF- κ B w komórkach szpiczaka mnogiego powoduje m. in. obniżenie ekspresji białek adhezyjnych ICAM-1 oraz VCAM-1 w komórkach plazmatycznych szpiczaka oraz hamowanie wydzielanie IL-6. Ponadto bortezomib zmniejsza ekspresję insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 oraz jego receptora. Aktywuje on także N-końcową kinazę c-Jun, co w ostateczności prowadzi do aktywacji kaspazy-8 oraz kaspazy-3 [1, 21, 22].

Niestety, bortezomib posiada też szereg działań niepożądanych, które ograniczają jego skuteczność i możliwość podania. Najgroźniejszymi z nich są neuropatia obwodowa oraz trombocytopenia. Ponadto, bortezomib stosowany w monoterapii skutkuje rozwinięciem się oporności na tą substancję czynną w komórkach nowotworowych [5].

4. Inhibitory proteasomu drugiej generacji

Bortezomib odniósł ogromny sukces w praktyce klinicznej w leczeniu pacjentów z szpiczakiem mnogim. Spowodowało to zwiększone zainteresowanie grupą inhibitorów proteasomu. Optymalizacja dawek bortezomibu oraz jego skojarzenie z innymi lekami przeciwnowotworowymi zmniejszyły wywoływane przez niego działania niepożądane oraz częściowo stłumiły rozwijającą się oporność. Zaczęto poszukiwać nowych związków o podobnym mechanizmie działania jak bortezomib, ale mniejszej toksyczności w stosunku do komórek prawidłowych. Tak powstała grupa tzw. inhibitorów proteasomu drugiej generacji. Budzą one dużą nadzieję ze względu na korzyści związane ze zwiększeniem ogólnej skuteczności leczenia, zredukowanie efektów ubocznych oraz przywrócenie wrażliwości na bortezomib, co związane jest ze zróżnicowaną strukturą chemiczną, właściwościami biologicznymi, mechanizmem działania oraz możliwościami odwracalnego, bądź nieodwracalnego hamowania proteasomu [1, 23].

4.1. Pochodne kwasu boronowego

Do grupy pochodnych kwasu boronowego należących do inhibitorów proteasomu drugiej generacji należą iksazomib oraz delanzomib. Związki te hamują głównie aktywność chymotrypsynopodobną proteasomu, czyli podjednostkę $\beta 5$. W porównaniu z bortezomibem, czas tej inhibicji w tkance nowotworowej wydaje się być dłuższy. Hamują one aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, osteoklastogenezę oraz angiogenezę. Wykazują one aktywność przeciwnowotworową w stosunku do komórek szpiczaka mnogiego, ale także innych nowotworów, które wywodzą się z układu krwiotwórczego. Dodatkową ich cechą jest możliwość podawania doustnego [5].

4.1.1. Iksazomib

Iksazomib został wybrany z dużej grupy inhibitorów proteasomu zawierających w swojej strukturze atom boru na podstawie odmiennego od bortezomib profilu fizykochemicznego. Związek ten jest selektywnym, silnym oraz odwracalnym inhibitorem chymotrypsynopodobnej aktywności podjednostki $\beta 5$ katalitycznego rdzenia 20S [24, 25]. Przy zastosowaniu wyższych stężeń, iksazomib hamuje także aktywność trypsynopodobną oraz kaspazopodobną. W komórkach nowotworowych szpiczaka mnogiego iksazomib hamuje aktywność proteasomu przy $IC_{50} = 5nM$ [24, 26]. W 2015 roku został on zatwierdzony w USA jako pierwszy doustny inhibitor proteasomu stosowany w połączeniu z lenalidomidem oraz deksametazonem w leczeniu dorosłych pacjentów ze szpiczakiem mnogim, którzy otrzymali wcześniej przynajmniej jeden schemat terapii [27, 28]. Aktualnie jest on też stosowany w Europie oraz Japonii [29, 30].

Iksazomib jest doustnym, biodostępnym, drobnocząsteczkowym inhibitorem proteasomu. Jest podawany w postaci proleku, cytrynianu iksazomibu, który jest stabilnym estrem. W warunkach fizjologicznych ester ten ulega szybkiej hydrolizie do biologicznie aktywnej postaci iksazomibu [26].

Iksazomib posiada krótszy okres półtrwania niż bortezomib, oraz lepszy profil farmakodynamiczny oraz farmakokinetyczny. Siła i selektywność iksazomibu są podobne do działania bortezomibu, a okres jego półtrwania w proteasomie jest około sześciokrotnie krótszy niż bortezomibu, co poprawia dystrybucję substancji czynnej do tkanek [31].

Inhibicja proteasomu przez iksazomib powoduje akumulację ubikwitynowanych białek. Jest ona zależna od czasu oraz od podawanego stężenia związku. W indukcji apoptozy wywołanej przez iksazomib bierze udział wiele szlaków sygnałowych. Dochodzi do aktywacji kaspaz-8, -9 oraz -3, podwyższają się poziomy białek p53, p21, NOXA, PUMA oraz E2F, a także hamowany jest czynnik transkrypcyjny NF- κ B. W wywołaniu apoptozy bierze także udział odpowiedź na stres retikulum endoplazmatycznego oraz odpowiedź na nierozwinięte białka [26, 32].

W badaniach *in vitro* iksazomib wywoływał apoptozę w kilku ludzkich liniach szpiczaka mnogiego. Ponadto, wykazano zależną od dawki cytotoksyczność wobec komórek nowotworowych szpiczaka mnogiego od pacjentów, którzy mieli nawrót choroby po wcześniejszych terapiach np. bortezomibem, lenalidomidem i deksametazonem. W badaniach *in vitro* zaobserwowano także synergistyczny efekt kombinacji iksazomibu z deksametazonem, lenalidomidem oraz worinostatem, będącym inhibitorem deacetylazy histonowej. Wyniki otrzymane w badaniach *in vitro* zostały potwierdzone w badaniach *in vivo*, w których iksazomib wykazał aktywność

przeciwnowotworową w kierunku szeregu modeli szpiczaka mnogiego oraz chłoniaka [26, 33-35]. W badaniach przedklinicznych obejmujących ksenografy, icksazomib wykazał aktywność przeciwnowotworową w stosunku do guzów litych jak i nowotworów hematologicznych [31]. Ponadto icksazomib hamuje osteoklastogenezę oraz resorpcję osteoklastów *in vitro* oraz zapobiega, związanej ze szpiczakiem mnogim, utracie tkanki kostnej w modelach mysich [36].

Bardzo dużą przewagą icksazomibu nad bortezomibem jest możliwość jego podawania doustnego. Iksazomib po podaniu doustnym jest szybko wchłaniany, a mediana czasu w jakim osiąga maksymalne stężenie w osoczu wynosi 1h. Całkowita biodostępność dawki podawanej doustnie szacuje się na około 58%. Doustnie icksazomib należy przyjmować na czczo, ponieważ przyjmowanie go po wysokotłuszczowym posiłku powoduje obniżenie całkowitej ekspozycji organizmu na lek. Inhibitor ten silnie (99%) wiąże się z białkami osocza [26]. Uważa się, że liczne enzymy cytochromu P450, w tym CYP3A4 i CYP1A2 oraz inne enzymy nie należące do grupy CYP przyczyniają się do metabolizmu icksazomibu. Natomiast eliminacja odbywa się głównie poprzez wydalanie z moczem (około 62%) oraz kałem (22%) [37].

Jak wcześniej wspomniano, icksazomib w połączeniu z deksametazonem oraz lenalidomidem został wprowadzony przez FDA (*Food and Drug Administration*) do leczenia dorosłych pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym, którzy wcześniej otrzymali co najmniej jeden schemat leczenia w listopadzie 2015 roku. W Polsce oraz w całej Unii Europejskiej icksazomib został zarejestrowany w ramach procedury centralnej w listopadzie 2016 roku. W badaniach klinicznych III fazy TOURMALINE-MM1, w którym wzięło udział 722 pacjentów z nawrotowym lub opornym na leczenie szpiczakiem mnogim wykazano wydłużenie przeżycia wolnego od progresji u pacjentów przyjmujących icksazomib razem z deksametazonem oraz lenalidomidem w porównaniu do pacjentów leczonych samym deksametazonem oraz lenalidomidem [38].

Aktualnie trwają też badania III fazy (TOURMALINE-MM2) icksazomibu w połączeniu z deksametazonem oraz lenalidomidem u dorosłych pacjentów z nowozdiagnozowanym szpiczakiem plazmocytowym [39]. Wykonywane są także badania III fazy z użyciem samego icksazomibu w leczeniu podtrzymującym u pacjentów z nowo rozpoznany szpiczakiem mnogim nie kwalifikujących się do zabiegu autologicznego przeszczepienia komórek macierzystych (TOURMALINE-MM4) oraz w leczeniu podtrzymującym w grupie chorych z nowo rozpoznany szpiczakiem mnogim po terapii indukcyjnej oraz autologicznym przeszczepieniu komórek macierzystych (TOURMALINE-MM3) [38].

Połączenie icksazomibu z deksametazonem jest oceniane w badaniach III fazy (TOURMALINE-AL1) u pacjentów z układową amyloidozą łańcuchów lekkich [38].

Obecnie przeprowadzany jest też szereg badań I i II fazy oceniający działanie icksazomibu m. in. w chorobie przeszczep przeciw gospodarzowi oraz w połączeniu z deksametazonem oraz rituximabem w makroglobulinemii Waldenströma [40, 41].

Niestety, icksazomib, jak każdy lek, posiada skutki uboczne do których możemy zaliczyć biegunki, zaparcia, trombocytopenie, neuropatie obwodową, nudności, wymioty, a także ból pleców [26].

4.1.2. Delanzomib

Delanzomib to syntetyczna pochodna kwasu boronowego, wcześniej znana pod nazwą CEP-18770. Jest to odwracalny inhibitor podjednostki 20S należącej do proteasomu 26S. Siła hamowania proteasomu 20S przez delanzomib, jest porównywalna do bortezomibu. Jego inhibicja jest najsilniejsza w stosunku do aktywności chymotrypsynopodobnej związanej z podjednostką $\beta 5$, w mniejszym stopniu hamuje aktywność kaspazopodobną podjednostki $\beta 1$. Badania *in vitro* wykazały, że delanzomib skutecznie zmniejsza aktywność czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, posiada silną aktywność antyangiogenną oraz hamuje osteoklastogenezę [1]. Delanzomib, w przeciwieństwie do bortezomibu, charakteryzuje się aktywnością przy podaniu doustnym, co bardzo ułatwia jego dozowanie pacjentom [42]. Ponadto, w badaniach na nienowotworowych komórkach krwi oraz szpiku kostnego udowodniono, że delanzomib posiada mniejszą cytotoksyczność, niż bortezomib. Dodatkowo, delanzomib w I fazie badań klinicznych charakteryzował się brakiem neurotoksyczności oraz korzystnym profilem bezpieczeństwa. Posiada on także liniową farmakokinetykę w osoczu [43].

W przeprowadzonych badaniach *in vitro* na liniach nowotworowych szpiczaka plazmocytoowego porównano skuteczność delanzomibu z bortezomibem. Obydwa inhibitory proteasomu wykazały podobne działanie hamujące proteasom w liniach komórkowych. Natomiast badanie przedkliniczne *ex vivo* na mysim modelu ludzkiego szpiczaka mnogiego wykazało, że delanzomib wywołał lepszą odpowiedź w guzach szpiczaka mnogiego. Ponadto, wykazał aktywność przeciwko komórkom opornym na bortezomib [1]. Delanzomib w dalszych badaniach na komórkach nowotworowych szpiczaka mnogiego wykazał synergistyczne działanie w kombinacji z bortezomibem lub melfalanem. Kombinacje tych związków wykazują także dużą skuteczność w modelach mysich ksenograftów [43].

Ostatnie badania dowiodły, że delanzomib w kombinacji z deksametazonem i lenalidomidem hamuje wzrost oraz redukuje liczbę komórek nowotworowych szpiczaka mnogiego [44]. Rozpoczęte zostały badania kliniczne I i II fazy obejmujące leczenie nawrotowego lub opornego szpiczaka mnogiego delanzomibem w połączeniu z deksametazonem oraz lenalidomidem, zostały one jednak przerwane [45]. Przeprowadzono też badania kliniczne I fazy oceniające działanie delanzomibu u pacjentów z guzami litymi oraz chłoniakiem nieziarnicznym, jednak ich wyniki nie zostały dotąd opublikowane [46].

4.2. Epoksyketony peptydowe

Do klasy epoksyketonów peptydowych należą karfilzomib oraz oprozomib. Ta grupa inhibitorów proteasomu została odkryta w latach 90. XX wieku. Naturalne α' , β' -epoksyketony peptydowe zostały wyizolowane z dwóch gatunków promieniowców. Należą do nich epoksomycyna i eponemycyna. α , β -epoksyketony działają poprzez wytworzenie morfolinowego adduktu z resztą treoniny w miejscu aktywnym proteasomu. Związki należące do tej grupy nieodwracalnie hamują aktywność proteasomu 26S, co powoduje, że przywrócenie jego aktywności możliwe jest tylko poprzez syntezę nowych podjednostek. Są także wysoce specyficznymi inhibitorami proteasomu, które hamują głównie aktywność chymotrypsynopodobną. W badaniach przedklinicznych wykazano anaboliczne oraz antyresorpcyjne działanie karfilzomibu i oprozomibu, powiązane z mineralizacją kości oraz ich wytwarzaniem przez osteoblasty [6, 43, 47].

4.2.1. Karfilzomib

Karfilzomib, znany także pod nazwami PR-171 oraz nazwą handlową Kyprolis[®], jest syntetycznym tetrapeptydowym epoksyketonem będącym analogiem epokso-mycyny. W 2012 roku został pierwszym inhibitorem proteasomu drugiej generacji dopuszczonym przez FDA do leczenia pacjentów ze szpiczakiem mnogim. Jest selektywnym i nieodwracalnym inhibitorem katalitycznego rdzenia 20S proteasomu 26S. Nieodwracalne wiązanie się z proteasomem powoduje, iż odzyskanie jego funkcji jest możliwe tylko poprzez syntezę nowych podjednostek *de novo*. Karfilzomib silnie hamuje aktywność chymotrypsynopodobną podjednostki $\beta 5$ proteasomu [5, 48]. Przy stężeniu 10nM inhibicja sięga ponad 80% [43]. W wyższych stężeniach hamuje także aktywność trypsyno- oraz kaspazopodobną [49]. W porównaniu z bortezomibem, karfilzomib wykazuje wyższą specyficzność względem proteasomu, dzięki czemu poza działaniem na proteasom, posiada tylko niewielką aktywność. Z tego powodu karfilzomib nie hamuje proteaz serynowych, które mają działanie neuroprotekcyjne i nie powoduje polineuropatii obwodowej [5, 50].

W komórkach szpiczaka mnogiego poddawanego działaniu karfilzomibu zaobserwowano fragmentację DNA, zwiększoną aktywność zarówno wewnętrznego, jak i zewnętrznego szlaku indukującego apoptozę ze znacznym wzrostem stężenia kaspazy 3, 7, 8, i 9. Programowana śmierć komórki wiązała się także z aktywacją JNK (c-Jun N-terminal kinases), spadkiem potencjału błony mitochondrialnej oraz uwalnianiem cytochromu c. Ponadto zaobserwowano początkowy spadek fosforylowanego eIF2 (eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 2) w związku z obecnością stresu retikulum endoplazmatycznego, który jest indukowany poprzez akumulację nieprawidłowych białek oraz zwiększony poziom proapoptotycznego białka NOXA należącego do rodziny białek Bcl-2. Karfilzomib jest czynnikiem proapoptotycznym silniejszym od bortezomibu [1, 43]. *In vitro* karfilzomib może bezpośrednio hamować tworzenie osteoklastów i resorpcję kości oraz pobudza formowanie się kości bełczkowatych [51].

W badaniach *in vitro* wykazano, że karfilzomib indukuje apoptozę w szeregu linii nowotworowych szpiczaka mnogiego m. in. KAS-6/1, RPMI 8226, U266, ANBL-6, ale także w komórkach szpiczaka mnogiego opornego na bortezomib oraz inne standardowe terapie pobranych od pacjentów. Ponadto hamuje on proliferację pierwotnej ostrej białaczki szpikowej. W badaniach *in vivo* w modelach heteroprzeszczepów nowotworowych szpiczaka mnogiego, karfilzomib był dobrze tolerowany i wykazał silną aktywność przeciwnowotworową. Wyniki tych oraz szeregu innych badań przedklinicznych skłoniły do dalszego badania tego inhibitora proteasomu w badaniach klinicznych u pacjentów z nowotworami hematologicznymi [43, 50].

Sukcesy szeregu przeprowadzonych badań klinicznych doprowadziły w lipcu 2012 roku do wprowadzenia przez FDA karfilzomibu w monoterapii do leczenia pacjentów z nawrotowymi/ lub opornym szpiczakiem mnogim. Pacjenci ci otrzymali wcześniej co najmniej dwa schematy leczenia w tym leczenie bortezomibem oraz terapią lekami immunomodulującymi [52]. Na podstawie wyników z badań klinicznych III fazy ASPIRE karfilzomib w 2015 oraz 2016 roku FDA zaaprobowała karfilzomib w połączeniu z deksametazonem lub deksametazonem oraz lenalidomidem do leczenia pacjentów z opornym i/lub nawrotowym szpiczakiem mnogim,

którzy otrzymali jedną do trzech wcześniejszych schematów terapii. Ponadto, w 2016 roku FDA rozszerzyła możliwość monoterapii karfilzomibem o pacjentów którzy otrzymali jeden lub więcej schematów leczenia [53, 54]. W Europie karfilzomib został zarejestrowany przez EMA (European Medicines Agency) w 2015 roku w połączeniu z deksametazonem oraz lenalidomidem lub samym deksametazonem u dorosłych pacjentów z szpiczakiem mnogim, którzy otrzymali co najmniej schemat terapii [55].

W badaniach przedklinicznych na modelach zwierzęcych wykazano, że karfilzomib transportowany jest szybko i do wszystkich narządów, z wyjątkiem mózgu. Inhibitor ten nie przekracza bariery krew-mózg oraz silnie hamuje aktywność proteasomu po podaniu dożylnym. Jego okres półtrwania w surowicy wynosi od 15 do 30 minut. U badanych szczurów karfilzomib jest metabolizowany głównie poza wątrobą, a usuwany jest poprzez wydalanie z żółcią oraz nerki. Podczas metabolizmu karfilzomibu powstaje około 21 metabolitów, które nie są aktywne jako inhibitory proteasomu. Mniej niż 1% karfilzomibu wydalane jest w stanie nienaruszonym. W szybkiej eliminacji metabolizm przebiega poprzez trawienie peptydazą oraz hydrolizę epoksydów. *In vitro*, karfilzomib hamuje CYP3A w mikrosomach ludzkiej wątroby w sposób bezpośredni i zależny od czasu. Zmniejsza także ekspresję genu *CYP3A* i *IA2* [51].

Aktualnie przeprowadzany jest szereg badań klinicznych z użyciem karfilzomibu. W trakcie II fazy badań klinicznych badane jest połączenie karfilzomibu, cyklofosfamidu oraz deksametazonu a także karfilzomibu, deksametazonu i lenalidomidu u pacjentów z nowo zdiagnozowanym szpiczakiem mnogim [56, 57]. Ponadto, badana jest też jego skuteczność oraz bezpieczeństwo w leczeniu pacjentów z zaawansowanymi guzami neuroendokrynnymi [58]. Trwa także II faza badań klinicznych skuteczności działania oraz bezpieczeństwa stosowania karfilzomibu w opornym raku nerki, a także w leczeniu pacjentów z przewlekłą chorobą przeszczep przeciwko gospodarzowi [59, 60]. W trakcie jest także około 20 różnych badań I fazy [61].

4.2.2. Oprozomib

Oprozomib (ONX0912, Onyx Pharmaceuticals) jest kolejnym inhibitorem proteasomu 26S należącym do grupy epoksyketonów o działaniu przeciwnowotworowym. Jest to strukturalny tripeptydowy analog karfilzomibu. Oprozomib to wysoce selektywny, silny i nieodwracalny inhibitor aktywności chymotrypsynopodobnej podjednostki $\beta 5$ rdzenia katalitycznego 20S. Dużą przewagą tego epoksyketonu jest możliwość jego podawania pacjentom doustnie. Podanie doustne wymaga jednak wyższego stężenia, aby osiągnąć taką samą skuteczność hamowania proteasomu, jak karfilzomib podawany dożylnie. Ma on także możliwość aktywowania JNK oraz hamowania szlaków związanych z czynnikiem transkrypcyjnym NF- κ B [62].

Badania *in vitro* nad działaniem przeciwnowotworowym oprozomibu na liniach komórkowych szpiczaka mnogiego wykazały, że inhibitor ten hamuje wzrost oraz migrację komórek szpiczaka, a także indukuje ich apoptozę. Jego aktywność związana jest z aktywacją kaspazy 8, 9 oraz 3, a także polimerazy poli-ADP-rybozy (PARP). Podobnie jak karfilzomib, w badaniach *in vitro* oprozomib bezpośrednio hamuje różnicowanie i funkcję osteoklastów. Co ważne, nie wykazał on cytotok-

syczności w stosunku do prawidłowych komórek hematopoetycznych. Hamowanie wzrostu nowotworu przez podawanego doustnie oprozomibu jest równie efektywne, jak karfilzomibu. Oprozomib posiada także aktywność przeciwnowotworową w stosunku do linii komórkowych nowotworów głowy i szyi indukując w nich apoptozę. Ponadto, zwiększa ekspresję białek proapoptotycznych Bik [1, 42, 62]. Badania *in vitro* zostały potwierdzone w badaniach *in vivo* na myszach z ksenograftami szpiczaka mnogiego oraz chłoniaka. Powodował on wydłużenie życia myszy [42].

W badaniach *in vitro* na liniach komórkowych szpiczaka mnogiego oprozomib wykazuje synergizm z deksametazonem, lenalidomidem, bortezomibem oraz inhibitorem deacetylazy histonów (MS-275) [43]. Oprozomib testowany jest w szeregu badań klinicznych I fazy. Badane są jego kombinacje z różnymi chemioterapeutykami, między innymi w nawrotowym i/lub opornym szpiczaku mnogim, nowo zdiagnozowanym szpiczaku mnogim oraz raku wątrobowokomórkowym [63].

4.3. β -laktony

4.3.1. Marizomib

Marizomib (NPI-0052, salinosporamid A) jest to inhibitor proteasomu naturalnego pochodzenia, strukturalnie będący β -laktone. Jego odkrycie zostało ogłoszone w 2003 roku, a jest on otrzymywany ze szczepu morskiego promieniowca *Salinospora tropica*. Marizomib został włączony do badań klinicznych jako pierwszy naturalny inhibitor proteasomu. Chemicznie jest to β -laktone- γ -laktam. W przeciwieństwie do wszystkich innych inhibitorów proteasomu, nie zawiera on w swojej strukturze łańcucha peptydowego, dlatego jest strukturalnie odmienny zarówno od bortezomibu jak i karfilzomibu. W badaniach przedklinicznych na liniach komórkowych szpiczaka mnogiego wykazuje dużą aktywność przeciwnowotworową [1, 42, 64].

Marizomib jest silnym, aktywnym po podaniu doustnym, oraz nieodwracalnym inhibitorem wszystkich trzech aktywności: chymotrypsynopodobnej, trypsynopodobnej oraz kaspazopodobnej katalitycznego rdzenia 20S proteasomu. Tak szerokie hamowanie aktywności proteasomu jest możliwe dzięki obecności pierścienia β -laktoneowego. Ponadto, posiada grupę chloroetylową, która wpływa na siłę działania oraz selektywność marizomibu [42, 65, 66]. Marizomib hamuje szlaki powiązane z czynnikiem transkrypcyjnym NF- κ B, a w odróżnieniu od bortezomibu efekt apoptotyczny jest głównie związany z aktywacją szlaku zależnego od kaspazy-8, a w mniejszym stopniu kaspazy-9. Ponieważ mechanizm aktywacji kaspaz przez marizomib jest inny niż w przypadku bortezomibu i opiera się głównie na aktywacji kaspazy-8, pozwala to przewyciężyć oporność komórek szpiczaka mnogiego na apoptozę, również w komórkach posiadających mutację w genie *Bcl-2*, która prowadzi do jego nadmiernej ekspresji. Wykazano, że nadekspresja *Bcl-2* w komórkach szpiczaka mnogiego nadaje mu oporność na lek oraz częściowo chroni komórki szpiczakowe przed działaniem bortezomibu [1, 66].

W badaniach przedklinicznych *in vitro* posiada aktywność przeciwnowotworową w stosunku do komórek szpiczaka mnogiego, ale także innych nowotworów hematologicznych takich jak: makroglobulinemia Waldenströma, ostra białaczka szpikowa i limfatyczna, przewlekła białaczka limfatyczna, chłoniak Hodgkina,

chłoniak z komórek płaszczą oraz innych linii chłoniaków nieziarniczych. Aktywność wykazuje także w nowotworach trzustki i jelita grubego [67]. *In vivo* marizomib wpłynął na przedłużenie przeżycia w modelach zwierzęcych szpiczaka mnogiego, a także wykazał aktywność w mysim modelu białaczki. Marizomib wykazuje silne działanie synergistyczne z bortezomibem oraz lenalidomidem w stosunku do komórek szpiczaka mnogiego, co w przyszłości może być wykorzystane w jego terapii [68, 69]. Aktualnie zakończona została II faza badań klinicznych obejmujących leczenie pacjentów z nawrotowym i/lub opornym szpiczakiem mnogim, którzy we wcześniejszym schemacie terapii otrzymali karfilzomib, a następnie wystąpiła u nich progresja choroby [70].

5. Podsumowanie

Choroby nowotworowe stanowią ważny problem cywilizacyjny XXI wieku. Dlatego cały czas poszukuje się nowych leków, które posiadają dużą skuteczność przeciwnowotworową. Wiedza obejmująca mechanizm działania oraz rolę proteasomu w komórkach ugruntowała koncepcję inhibicji proteasomu jako podejścia terapeutycznego w nowotworach. Wynalezienie grupy inhibitorów proteasomu, jej pierwszego przedstawiciela bortezomibu oraz sukces terapeutyczny jaki osiągnął w praktyce klinicznej, było impulsem do dalszego badania oraz poszukiwania kolejnych związków o podobnym mechanizmie działania. Efektem tych poszukiwań było powstanie grupy inhibitorów drugiej generacji. Liczne badania nad lekami należącymi do tej grupy wykazały, iż w porównaniu z bortezomibem są bezpieczniejsze dla prawidłowych komórek, pokonują oporność na tradycyjną chemioterapię, ale także są cytotoksyczne dla komórek nowotworowych opornych na bortezomib. Ponadto, niektóre z opisanych wyżej związków posiadają możliwość podawania doustnego, co bardzo ułatwia ich dozowanie. Dwa z wymienionych wyżej inhibitorów proteasomu drugiej generacji, iksazomib oraz karfilzomib, dzięki satysfakcjonującym wynikom uzyskanym w badaniach klinicznych zostały już zarejestrowane przez FDA w leczeniu pacjentów ze szpiczakiem mnogim. Zarówno badania przedkliniczne, jak i szereg prowadzonych badań klinicznych oceniających działanie tych inhibitorów proteasomu, są bardzo obiecujące. Dodatkowo, możliwe jest skojarzenie inhibitorów proteasomu drugiej generacji z innymi chemioterapeutykami, co może znacznie poprawić efekt terapeutyczny. Grupa inhibitorów proteasomu drugiej generacji stanowi dużą szansę dla pacjentów chorych na szpiczaka mnogiego, ale także inne nowotwory.

Literatura

1. Kubickova L., Pour L., Sedlarikova L., Hajek R., Sevcikova S., *Proteasome inhibitors – molecular basis and current perspectives in multiple myeloma*, Journal of cellular and molecular medicine, 18(6) (2014), s. 947-961.
2. Konstantinova I.M., Tsimokha A.S., Mittenberg A.G., *Role of proteasomes in cellular regulation*. International review of cell and molecular biology, 267 (2008), s. 59-124.
3. Harris J.R., *The proteins released from intact erythrocyte ghosts' at low ionic strength*, The biochemical journal, 122 (5) (1971), s. 38P-40P.
4. Grzelakowska-Sztabert B., *Nagroda Nobla z chemii za 2004 rok – docenienie kontrolowanej, zależnej od ubikwityny, proteolitycznej degradacji białek*, Postępy Biologii Komórki, 32 (2005), s. 3-12.

5. Romaniuk W., Oldziej A.E., Zińczuk J., Kłoczko J., *Inhibitory proteasomów w terapii onkologicznej*, Postępy higieny i medycyny doświadczalnej, 69 (2015), s. 1443-1450.
6. Bury M., Niemierko A., *Proteasomalna degradacja białek komórkowych*, Postępy biologii komórki, 32 (2005), s. 435-448.
7. Sorokin A.V., Kim E.R., Ovchinnikov L.P., *Proteasome system*
8. *of protein degradation and processing*, Biochemistry, 74 (2009), s. 1411-1442.
9. Myung J., Kim K.B., Crews C.M., *The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors*, Medicinal research reviews, 21 (2001), s. 245-273.
10. Jurchyszyn A., Skotnicki A.B., *Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in neoplastic diseases*, Advances in clinical and experimental medicine, 15 (2006), s. 309-320.
11. Bubko I., Gruber B.M., Anuszevska E.L., *Rola proteasomu w terapii chorób nieuleczalnych*, Postępy higieny i medycyny doświadczalnej, 64 (2010), s. 314-325.
12. Nagy V., Dikic I., *Ubiquitin ligase complexes: from substrate selection to conjugational specificity*, Biological chemistry, 391 (2-3) (2010), s. 163-169
13. Li W., Tu D., Brunger A.T., Ye Y., *A ubiquitin ligase transfers preformed polyubiquitin chains from a conjugating enzyme to a substrate*, Nature, 446 (7133) (2007), s. 333-337.
14. Wu W.K., Cho C.H., Lee C.W., Wu K., Fan D., Yu J., Sung J.J., *Proteasome inhibition: a new therapeutic strategy to cancer treatment*, Cancer letters, 293 (1) (2010), s. 15-22.
15. Paul S., *Dysfunction of the ubiquitin-proteasome system in multiple disease conditions: therapeutic approaches*, Bioessays, 30 (11-12) (2008), s. 1172-1184.
16. Manasanch E.E., Orlowski R.Z., *Proteasome inhibitors in cancer therapy*, Nature reviews. Clinical oncology, 14 (7) (2017), s. 417-433.
17. Adams J., Palombella V.J., Sausville E.A., Johnson J., Destree A., Lazarus D.D., Maas J., Pien C.S., Prakash S., Elliott P.J., *Proteasome inhibitors: A novel class of potent and effective antitumor agents*, Cancer research, 59 (11) (1999), s. 2615-2622.
18. Richardson P.G., Mitsiades C., Schlossman R., Ghobrial I., Hideshima T., Munshi N., Anderson K.C., *Bortezomib in the front-line treatment of multiple myeloma*, Expert review of anticancer therapy, 8 (7) (2008), s. 1053-1072.
19. Robak T., Huang H., Jin J., Zhu J., Liu T., Samoilova O., Pylypenko H., Verhoef G., Siritanaratkul N., Osmanov E., Alexeeva J., Pereira J., Drach J., Mayer J., Hong X., Okamoto R., Pei L., Rooney B., van de Velde H., Cavalli F., LYM-3002 Investigators, *Bortezomib-based therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma*, The new england journal of medicine, 372 (10) (2015), s. 944-953 .
20. Hoy S.M., *Subcutaneous bortezomib: in multiple myeloma*, Drugs, 73 (1) (2013), s. 45-54.
21. Tylicka M., Matuszczak E., Karpńska M., Dębek W., *Znaczenie podwyższenia i obniżenia aktywności proteasomów w patomechanizmie wybranych schorzeń*, Postępy higieny i medycyny doświadczalnej, 70 (2016), s. 448-458.
22. Hideshima T., Chauhan D., Richardson P., Mitsiades C., Mitsiades N., Hayashi T., Munshi N., Dang L., Castro A., Palombella V., Adams J., Anderson K.C., *NF- κ B as a therapeutic target in multiple myeloma*, The Journal biological chemistry, 277 (19) (2002), s. 16639-16647.
23. Karin M., Yamamoto Y., Wang Q.M., *The IKK NF- κ B system: a treasure trove for drug development*, Nature reviews. Drug discovery, 3 (1) (2004), s. 17-26.
24. Lonial S., Mitsiades C.S., Richardson P.G., *Treatment options for relapsed and refractory multiple myeloma*, Clinical cancer research, 17 (6) (2011), s. 1264-1277.
25. Touzeau C., Moreau P., *Ixazomib in the management of relapsed multiple myeloma*, Future oncology, (2018) Feb.
26. Moreau P., Masszi T., Grzasko N., Bahlis N.J., Hansson M., Pour L., Sandhu I., Ganly P., Baker B.W., Jackson S.R., Stoppa A.-M., Simpson D.R., Gimsing P., Palumbo A.,

- Garderet L., Cavo M., Kumar S., Touzeau C., Buadi F.K., Laubach J.P., Berg D.T., Lin J., Di Bacco A., Hui A.-M., van de Velde H., and Richardson P.G., *Oral ixazomib, lenalidomide and dexamethasone for multiple myeloma*. The new England journal of medicine, 374 (17) (2016), s. 1621-1634.
27. Shirley M., *Ixazomib: First Global Approval*, Drugs, 76 (3) (2016), s. 405-411.
 28. Muz B., Ghazarian R.N., Ou M., Luderer M.J., Kusdono H.D., Azab A.K., *Spotlight on ixazomib: potential in the treatment of multiple myeloma*, Drug design, development and therapy, 10 (2016), s. 217-26.
 29. Millennium Pharmaceuticals Inc. US prescribing information for Ninlaro® (ixazomib) capsules, for oral use. 2015. <https://www.accessdata.fda.gov/>. Accessed 22 May 2017.
 30. European Medicines Agency. Ninlaro® (ixazomib) capsules: EU summary of product characteristics. 2016. <http://www.ec.europa.eu/>.
 31. Takeda Pharmaceutical Company Limited. Ninlaro® (ixazomib): Japanese prescribing information. 2017. <https://www.pmda.go.jp>.
 32. Kupperman E., Lee E.C., Cao Y., Bannerman B., Fitzgerald M., Berger A., Yu J., Yang Y., Hales P., Bruzzese F., Liu J., Blank J., Garcia K., Tsu C., Dick L., Fleming P., Yu L., Manfredi M., Rolfe M., Bolen J., *Evaluation of the proteasome inhibitor MLN9708 in preclinical models of human cancer*, Cancer research, 70 (5) (2010), s. 1970-1980.
 33. Al-Salama Z.T., Garnock-Jones K.P., Scott L.J., *Ixazomib: A Review in Relapsed and/or Refractory Multiple Myeloma*, Targeted oncology, 12 (4) (2017), s. 535-542.
 34. Chauhan D, Tian Z, Zhou B, Kuhn D., Orlowski R., Raje N., Richardson P., Anderson K.C., *In vitro and in vivo selective antitumor activity of a novel orally bioavailable proteasome inhibitor MLN9708 against multiple myeloma cells*, Clinical cancer research, 17 (16) (2011), s. 5311-5321.
 35. Lee E.C., Fitzgerald M., Bannerman B., Donelan J., Bano K., Terkelsen J., Bradley D.P., Subakan O., Silva M.D., Liu R., Pickard M., Li Z., Tayber O., Li P., Hales P., Carsillo M., Neppalli V.T., Berger A.J., Kupperman E., Manfredi M., Bolen J.B., Van Ness B., Janz S., *Antitumor activity of the investigational proteasome inhibitor MLN9708 in mouse models of B-cell and plasma cell malignancies*, Clinical cancer research, 17 (23) (2011), s. 7313-7323.
 36. Evens A., Dashnamoorthy R., Beheshti A., Abermil N., Sharma J., Coyle M., Kandela I., Mazar A., Hlatky L., Gartenhaus R.B., *Myc and Chk1 dependent cell death in T-cell lymphoma and Hodgkin lymphoma cells and human xenograft models with anti-proteasomal therapy*, Hematological oncology, 33 (2015), s. 239.
 37. Garcia-Gomez A., Quwaider D., Canavese M., Ocio E.M., Tian Z., Blanco J.F., Berger A.J., Ortiz-de-Solorzano C., Hernández-Iglesias T., Martens A.C., Groen R.W., Mateo-Urdiales J., Fraile S., Galarraga M., Chauhan D., San Miguel J.F., Raje N., Garayoa M., *Preclinical activity of the oral proteasome inhibitor MLN9708 in myeloma bone disease*, Clinical cancer research, 20 (6) (2014), s. 1542-1554.
 38. US FDA. Ninlaro (ixazomib) capsules: US prescribing information. 2015. http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2015/2084621bl.pdf. Accessed 16 Dec 2015.
 39. Iksazomib u chorych z nawrotowym lub opornym na leczenie szpiczakiem plazmocytowym Giannopoulos.
 40. ClinicalTrials.gov Identifier:NCT01850524 <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01850524>
 41. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02513498, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02513498?term=ixazomib&recrs=d&phase=1&rank=4>.
 42. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02400437, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02400437?term=ixazomib&recrs=d&phase=01&rank=11>.

43. Allegra A., Alonci A., Gerace D., Russo S., Innao V., Calabrò L., Musolino C., *New orally active proteasome inhibitors in multiple myeloma*, Leukemia research, 38 (1) (2014), s. 1-9.
44. Maliński M., Cichocki M., *Inhibicja aktywności proteasomu jako nowa strategia w terapii i chemioprewencji nowotworów*, Postępy higieny i medycyny doświadczalnej, 67 (2013), s. 90-106.
45. Sanchez E., Li M., Li J., Wang C., Chen H., Jones-Bolin S., Hunter K., Ruggeri B., Berenson J.R., *CEP-18770 (delanzomib) in combination with dexamethasone and lenalidomide inhibits the growth of multiple myeloma*, Leukemia research, 36 (11) (2012), s. 1422-1427.
46. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01348919
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01348919>.
47. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00572637
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00572637>.
48. Staszczak M., *Szlak ubikwityna-proteasom jako cel strategii terapeutycznych*, Postępy biochemii, 63 (4) (2017), s. 287-303.
49. Steiner R.E, Manasanch E.E., *Carfilzomib boosted combination therapy for relapsed multiple myeloma*, OncoTargets and therapy, 10 (2017), s. 895-907.
50. Accardi F., Toscani D., Bolzoni M., Palma B.D., Aversa F., Giuliani N., *Mechanism of Action of Bortezomib and the New Proteasome Inhibitors on Myeloma Cells and the Bone Microenvironment: Impact on Myeloma-Induced Alterations of Bone Remodeling*, BioMed Research International, (2015).
51. Andreu-Vieyra C., Berenson J.R., *Carfilzomib in multiple myeloma*, Expert opinion on biological therapy, 14 (11) (2014), s. 1685-1699.
52. Pautasso C., Brighen S., Cerrato C., Magarotto V., Palumbo A., *The mechanism of action, pharmacokinetics, and clinical efficacy of carfilzomib for the treatment of multiple myeloma*, Expert opinion on drug metabolism & toxicology, 9 (10) (2013), s. 1371-1379.
53. Food and Drug Administration. Carfilzomib. July 20, 2012. <https://www.drugs.com/newdrugs/fda-approves-kyprolis-patients-advanced-multiple-myeloma-3393.html>.
54. Food and Drug Administration. Carfilzomib Kyprolis. July 24, 2015. <https://www.drugs.com/newdrugs/fda-approves-kyprolis-carfilzomib-combination-patients-relapsed-multiple-myeloma-4238.html>.
55. Food and Drug Administration. Carfilzomib Kyprolis. January 21, 2016. <https://www.drugs.com/newdrugs/fda-approves-new-kyprolis-carfilzomib-combination-therapy-patients-relapsed-refractory-multiple-4329.html>.
56. European Medicines Agency. Kyprolis® Information. Available http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR-Product_Information/human/003790/WC500197692.pdf.
57. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01346787
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01346787?term=carfilzomib&recrs=d&phase=1&rank=5>.
58. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01402284 <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01402284?term=carfilzomib&recrs=d&phase=1&rank=9>.
59. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02318784 <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02318784?term=carfilzomib&recrs=d&phase=1&rank=2>.
60. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01775930 <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01775930?term=carfilzomib&recrs=d&phase=1&rank=3>.
61. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02491359 <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02491359?term=carfilzomib&recrs=d&phase=1&rank=7>.

62. Clinical Trials.gov https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=carfilzomib&recrs=d&age_v=&gndr=&type=&rslt=&phase=0&Search=Apply.
63. Chauhan D., Singh A.V., Aujay M., Kirk C.J., Bandi M., Ciccarelli B., Raje N., Richardson P., Anderson K.C., *A novel orally active proteasome inhibitor ONX 0912 triggers in vitro and in vivo cytotoxicity in multiple myeloma*, Blood, 116 (23) (2010), s. 4906-4915.
64. Clinical Trials.gov https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=oprozomib&age_v=&gndr=&type=&rslt=&Search=Apply.
65. Feling R.H., Buchanan G.O., Mincer T.J., Kauffman C.A., Jensen P.R., Fenical W., *Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus salinospora*, Angewandte chemie (International ed. in English), 42 (3) (2003), s. 355-357.
66. Groll M., Berkers C.R., Ploegh H.L., Ovaa H., *Crystal structure of the boronic acid-based proteasome inhibitor bortezomib in complex with the yeast 20S proteasome*, Structure. 14 (3) (2006), s. 451-456.
67. Chauhan D., Catley L., Li G., Podar K., Hideshima T., Velankar M., Mitsiades C., Mitsiades N., Yasui H., Letai A., Ovaa H., Berkers C., Nicholson B., Chao T.H., Neuteboom S.T., Richardson P., Palladino M.A., Anderson K.C., *A novel orally active proteasome inhibitor induces apoptosis in multiple myeloma cells with mechanisms distinct from Bortezomib*, Cancer Cell, 8 (5) (2005), s. 407-419.
68. Tsukamoto S., Yokosawa H.: *Inhibition of the ubiquitin-proteasome system by natural products for cancer therapy*, Planta medica, 76 (11) (2010), s. 1064-1074.
69. Dick L.R., Fleming P.E., *Building on bortezomib: second-generation proteasome inhibitors as anti-cancer therapy*, Drug discovery today, 15 (5-6) (2010), s. 243-249.
70. Chauhan D., Singh A.V., Ciccarelli B., Richardson P.G., Palladino M.A., Anderson K.C., *Combination of novel proteasome inhibitor NPI-0052 and lenalidomide trigger in vitro and in vivo synergistic cytotoxicity in multiple myeloma*, Blood, 115 (4) (2010), s. 834-845.
71. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00461045h
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00461045>.

Mniej znane inhibitory proteasomu w terapii przeciwnowotworowej

Streszczenie

Inhibitory proteasomu to stosunkowo nowa grupa leków przeciwnowotworowych, która zyskała rozgłos w 2003 roku dzięki wprowadzeniu bortezomibu do leczenia szpiczaka plazmocytoowego opornego na terapię. Aktualnie bortezomib używany jest również w terapii pacjentów z nowo rozpoznany szpiczakiem. Dzięki sukcesowi, jaki osiągnął w praktyce klinicznej zaczęto poszukiwać nowych związków posiadających podobny mechanizm działania, jednak o możliwie mniej nasilonych skutkach ubocznych. Badania te doprowadziły do utworzenia i opracowania nowej grupy związków tzw. inhibitorów proteasomu drugiej generacji.

Celem pracy jest przedstawienie oraz przybliżenie tematyki związanej z grupą inhibitorów proteasomu drugiej generacji, ich mechanizmów działania oraz aktualnie prowadzonych badań przedklinicznych oraz klinicznych.

Do grupy inhibitorów proteasomu drugiej generacji należą m.in. ixazomib i delanzomib, które tak jak bortezomib są pochodnymi kwasu boronowego, epoksyketony karfilzomib i oprozomib oraz β -lakton marizomib. Ixazomib oraz karfilzomib są jedynymi inhibitorami drugiej generacji zatwierdzonymi przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków w leczeniu pacjentów. Pozostałe inhibitory są w różnych fazach badań przedklinicznych lub klinicznych.

Aktualnie wiadomo, iż aktywność proteasomów w chorobach nowotworowych jest zwiększona, dlatego też tak ważnym stało się odnalezienie związków, których mechanizmem będzie hamowanie tych struktur. Nowe inhibitory proteasomu stanowią obiecujący temat, gdyż w badaniach wykazują m.in. mniejszą cytotoksyczność niż bortezomib oraz pozwalają na doustne podawanie leku. Dzięki temu mogą być szansą dla pacjentów chorych na nowotwory.

Słowa kluczowe: proteasom, inhibitory proteasomu drugiej generacji, ixazomib, karfilzomib, marizomib.

Less known proteasome inhibitors in anticancer therapy

Abstract

Proteasome inhibitors are a relatively new group of anticancer drugs that became more known after bortezomib approval for the treatment of patients with refractory multiple myeloma in 2003. Currently, bortezomib is also used in the treatment of patients with newly diagnosed myeloma. Based on success that bortezomib achieved in clinical practice, new compounds with a similar mechanism of action have been sought, but with possibly less serious side effects. These studies led to the creation and development of a new group of second-generation proteasome inhibitors.

The aim of the work is to present the group of second-generation proteasome inhibitors, their mechanisms of action and currently conducted preclinical and clinical trials.

The group of second-generation proteasome inhibitors include ixazomib and delanzomib, which, like bortezomib, are derivatives of boronic acid, epoxyketones carfilzomib and oprozomib and β -lactone marizomib. Ixazomib and carfilzomib are the only second-generation proteasome inhibitors approved by the U.S. Food and Drug Administration in patients treatment. The other second-generation proteasome inhibitors are in different phases of preclinical or clinical trials.

Currently, it is known that the activity of proteasomes in cancer cells is increased. That's why finding a new compounds with proteasome inhibition mechanism. The new proteasome inhibitors are a very promising topic because in the studies they show less cytotoxicity than bortezomib and allow for oral administration of the drug. Thanks to this, they can be a chance for treatment for cancer patients.

Keywords: proteasome, second-generation proteasome inhibitors, ixazomib, carfilzomib, marizomib.

Profilowanie metaboliczne aminokwasów jako metoda wykrywania i monitorowania chorób nowotworowych

1. Wstęp

Każda zmiana funkcjonalna komórki jest związana ze zmianami w jej metabolizmie, także w metabolizmie aminokwasów. Metabolizm komórek nowotworowych jest istotnie zmieniony z powodu genetycznych i epigenetycznych zmian i rearanżacji wielu enzymów uczestniczących w glikolizie, cyklu Krebsa, fosforylacji oksydacyjnej i dalszych zmian obejmujących metabolizm aminokwasów. To sprawia, że z jednej strony komórki nowotworowe mogą tworzyć nowe szlaki wytwarzania energii, aby zapewnić guzowi odpowiednią elastyczność, niezbędną by przetrwać i proliferować, z drugiej jednak strony stanowi potencjalne okno terapeutyczne. Komórki nowotworowe mogą stać się auktroficzne pod względem zapotrzebowania na aminokwasy endogenne czy względne endogenne takie jak asparagina czy arginina. Ponad to komórki te mogą przejawiać znacznie wyższą wrażliwość na zmniejszoną dostępność aminokwasów egzogennych, takich jak metionina, niż komórki normalne. Aby zrozumieć te procesy i móc jej wykorzystać w diagnostyce i terapii onkologicznej, niezbędne jest zastosowanie odpowiednio czułych i dokładnych metod wykrywania i oznaczania aminokwasów. Wśród wielu technik analitycznych najlepszymi wydają się metody chromatograficzne połączone z detekcją masową.

2. Metabolomika w onkologii

Metabolomika, nauka w biologii systemów, jest globalną oceną ilościową endogennych metabolitów w układzie biologicznym. Analizując pojedyncze metabolity czy też tworząc profile, wykrywanie metabolitów odbywa się w komórkach, tkankach lub płynach biologicznych za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) lub spektrometrii masowa (MS). Dostępne dane wskazują, że istnieje potencjał dla metabolomiki, dla jej zastosowania w onkologii, głównie dzięki możliwości wczesnego wykrywania i diagnozowania nowotworów [1].

Metabolomika jest narzędziem analitycznym stosowanym w połączeniu z odpowiednimi narzędziami statystycznymi i bioinformatycznymi umożliwiającym wykrywanie metabolitów i śledzenie zmian w obrębie ich profili w płynach biologicznych bądź tkankach. Dokładana liczba ludzkich metabolitów nie jest znana, szacuje się, że może być to nawet dziesiątki tysięcy różnych związków. Metabolomika to szeroki

¹ jaszka88@op.pl, Katedra i Zakład Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, www.cm.umk.pl/.

² pluskota.r@gmail.com, Katedra i Zakład Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, www.cm.umk.pl/.

³ ania.welz@gmail.com, Katedra i Zakład Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, www.cm.umk.pl/.

termin obejmujący analizy różnego typu, w tym profilowanie metaboliczne – badanie ilościowe grupy metabolitów związanych z określonym szlakiem metabolicznym.

Analiza metaboliczna może być prowadzona zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*, przy użyciu komórek, płynów lub tkanek. W odniesieniu do łatwości przygotowania próbek, najczęstszym typem wykorzystywanym w tego typu analizach są płyny biologiczne: osocze, surowica, mocz czy ślina. Większość dotychczasowych badań w przypadku badań onkologicznych skupia się głównie na surowicy i moczu. Wykorzystanie fragmentów tkanek wiąże się nie tylko z większym dyskomfortem dla pacjenta, ale także ze znacznie bardziej złożonymi procedurami przygotowania próbki, ze względu na niejednorodny materiał [1].

Mimo, że analizy metabolomiczne wydają się być niezwykle obiecujące dla szeroko pojętej diagnostyki, to mają one swoje ograniczenia, szczególnie dotyczące strony praktycznej. Główny problem stanowi nie tylko ogromna ilość metabolitów, otrzymanych danych, ale także koszt takich analiz. Aby wyeliminować te trudności postanowiono skupić się na mniejszej liczbie związków niż cały metabolom, do tych odgrywających istotną rolę w metabolizmie, jednocześnie będących związkami nieskomplikowanymi chemicznie. Wytyczne te doskonale spełniają aminokwasy, tym samym ich profilowanie wydaje się być potencjalnym kandydatem na biomarker w chorobach nowotworowych [1-3].

Biomarkery są szeroko stosowane w praktyce klinicznej jako narzędzie prognostyczne i diagnostyczne. Często jednej charakteryzują się niewystarczającą czułością i specyficnością. Stwarza to niszę do poszukiwania nowych znaczników biologicznych. Wielu badaczy skupia się na analizach metabolomu właśnie w tym kontekście. Metabolom poszczególnych typów nowotworów jest coraz lepiej poznany, jednak nadal istnieją pewne luki. Uzyskiwane profile różnią się pod względem wielu metabolitów: alaniny, cytrynianu, glicyny, mleczanu, nukleotydów, lipidów, przez co niezwykle trudno stawiać ogólne wnioski dotyczące wielu grup nowotworów [4].

3. Profilowanie metaboliczne aminokwasów

Zachorowalność na nowotwory stale wzrasta, wydaje się więc niezbędnym, znalezienie nowych metod umożliwiających szybką, efektywną i pewną diagnozę. Wielu autorów wskazuje na znaczący potencjał profilowania aminokwasów [2, 5-8]. Profilowanie metaboliczne jest nową dziedziną biologii systemów, która może mieć zastosowanie w leczeniu raka w celu badań przesiewowych, diagnostyki, typowaniu raka i monitorowaniu leczenia. Idealny biomarker nowotworowy powinien charakteryzować się wysoką specyficnością i czułością, niezawodnością, łatwością pomiaru i zdolnością wykrywania chorób na wczesnym etapie. Ponad to, analiza powinna być niedroga [9].

Aminokwasy pełnią podwójną rolę w metabolizmie komórkowym, nie tylko stanowią podstawę syntezy białek, ale także są pośrednimi cząsteczkami sygnałowymi pełniącymi istotną rolę w innych reakcjach biosyntezy. Zburzenia w obrębie obu typach procesów są obecne w komórkach nowotworowych. Wykazano, że poziom aminokwasów w płynach ustrojowych osób zdrowych i chorujących na nowotwory piersi, płuc, jajnika, głowy i szyi, żołądka, trzustki, jelita grubego, różnią się istotnie. Wskazuje to, że profilowanie aminokwasów w surowicy, osoczu czy próbce tkanki może stanowić użyteczne narzędzie wczesnego diagnozowania różnych typów

nowotworów. Co więcej, technika ta może stanowić znakomite uzupełnienie innych strategii wczesnego wykrywania chorób nowotworowych [10].

3.1. Przygotowanie i analiza próbki

Mimo stosunkowo wysokich kosztów zakupu i użytkowania, połączenie chromatografii cieczowej ze spektrometrem masowym staje się coraz częściej stosowaną metodą detekcji aminokwasów, ze względu na swoją wysoką czułość i dokładność. Odpowiednie pobranie próbki do tego typu analiz jest kluczowe. Konieczny jest pobór w godzinach porannych – ze względu na rytm dobowy i zmiany stężeń aminokwasów w ciągu dnia. Proces przygotowywania próbki powinien być odpowiedni dla wykrywanego analitu, oczekiwanego stężenia i składu matrycy. Matryce biologiczne takie jak surowica, osocze, pełna krew, mocz czy tkanki mogą zawierać fosfolipidy, tłuszcze czy białka, jednocześnie wymagają odpowiednio delikatnego traktowania ze względu na niskie stężenie analitu. Usunięcie białek stanowi niezbędny krok, jednocześnie będąc wyzwaniem. Jednym z najczęściej stosowanych związków do tego celu jest kwas sulfosalicylowy, jego alternatywą są różnego rodzaju rozpuszczalniki organiczne, takie jak acetonitryl i/lub metanol, najlepiej w połączeniu z ultrafiltracją. Jednakże składniki takie jak kwasy tłuszczowe czy fosfolipidy pozostaną w próbce. Usunięcie kwasów tłuszczowych jest możliwe przy prowadzeniu deproteinizacji w temperaturze 4°C przy ich niskim stężeniu, bądź przy zastosowaniu niepolarnego rozpuszczalnika takiego jak heksan, w przypadku wysokiego stężenia. Aby usunąć fosfolipidy można zastosować komercyjnie dostępne zestawy rozpuszczalników. Kolejnym krokiem przygotowania próbki jest jej oczyszczenie, do tego celu najczęściej stosuje się ekstrakcję do fazy stałej (SPE). Kolejny krok stanowi sama analiza próbki, a następnie opracowanie bioinformatyczne uzyskanych wyników [11].

4. Zastosowanie PFAA w przypadku różnych typów nowotworów

Analizy profili aminokwasów wśród pacjentów cierpiących na pięć typów nowotworów: płuc, żołądka, jelita grubego, piersi i prostaty, porównane z grupą kontrolną wskazują na znaczące różnice pomiędzy grupą kontrolną a pacjentami z grupy badanej. Różnice w poziomach PFAA (*plasma free amino acid*) były zauważalne w przypadku wszystkich analizowanych typów nowotworów, nawet tych we wczesnym stadium, nie dającym jeszcze jednoznacznych objawów. Analizy wykonano korzystając z HPLC-ESI-MS. Interpretacje uzyskanych danych wskazują wielki potencjał profilowania PFAA w onkologii, monitorowaniu i diagnostyce, a także poznawaniu procesu patogenezy. Metoda ta pozwoliła na wykrywanie różnych jednostek chorobowych korzystając z jednej próbki krwi, co z kolei pozwala na relatywnie prostą analizę i zmniejszenie dyskomfortu odczuwanego przez pacjenta, podczas wielokrotnego pozyskiwania materiału do badań innego typu, przy zastosowaniu innych metod stosowanych do tej pory [2].

PFAA u pacjentów z nowotworami płuc, jelita grubego i piersi różnią się istotnie od tych uzyskanych od pacjentów zdrowych. Te różnice mogą być wykorzystane jako biomarkery do diagnozy i monitorowania choroby. Istnieje wiele podobieństw między przedstawionymi wynikami badań w przypadkach różnych typów nowotworów. Zmiany w profilach PFAA w opisanych badaniach mogą być spowodowane różnymi metodami pomiarowymi lub różnicowaniem etapów choroby. Jako

powtarzalny wynik, w cytowanych badaniach, dotyczących chorych na raka płuc, obserwowano zwiększone stężenia Pro, He, Phe, Leu, Ser, Gly, Orn u pacjentów w porównaniu ze zdrową kontrolą [2,5]. Badania pacjentów z rakiem jelita grubego wykazały znaczący spadek stężenia aminokwasów, w tym Thr, Val, Ile, Leu, Lys w porównaniu do grupy kontrolnej [2, 12, 13]. Charakterystycznym wynikiem, przedstawionych badań u pacjentów z rakiem piersi jest zwiększone stężenie Pro, Ala, Thr i zmniejszona koncentracja Gln i His. W każdej z tych analiz znacząca część pacjentów znajdowała się we wczesnych stadiach choroby nowotworowej [2, 7, 8, 14].

4.1. Rak przełyku

Mimo znaczących postępów w badaniach chorób nowotworowych, badania dotyczące raka przełyku nie przynoszą oczekiwanych rezultatów. Aktualnie wykorzystywane biomarkery, takie jak antygen rakowo-płodowy (CEA) nie są wystarczająco czułe i specyficzne we wczesnych stadiach zaawansowania raka. Tworząc profile PFAA, korzystając z technik chromatograficznych (HPLC), istnieje możliwość zidentyfikowania markerów metabolicznych, które można wykorzystać w diagnostyce i monitorowaniu chorób nowotworowych. W analizach profili PFAA u pacjentów chorujących na raka przełyku (n=51) w porównaniu z grupą zdrowych dorosłych ludzi (n=60) wykazano znaczące różnice. Poziom Asp, Glu, Gly, His, Thr, Tau, Ala, Met, Ile, Leu, i Phe był obniżony w grupie badanej, jednak poziom Cys był wyższy niż w grupie kontrolnej. Stwierdzono, że istnieje silna korelacja pomiędzy profilem PFAA a charakterystyką kliniczno-patologiczną u pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem przełyku. Poziom wielu aminokwasów (Glu, Asp, Ser, Gly, Tau, Ala, Tyr, Val, Ile, Leu) był związany z oceną patologiczną, obecnością przerzutów do węzłów chłonnych i stadium klinicznym. Ponadto dzięki wielowymiarowej analizie profili możliwe jest rozróżnienie członków grupy kontrolnej od grupy badanej. Wyniki wskazują na wielki potencjał analizy profili PFAA nie tylko w diagnostyce, ale także monitorowaniu raka przełyku [13].

4.2. Rak płuca

Metoda analizy profili PFAA jest relatywnie prosta, oparta o analizę próbki osocza, co w bardzo niewielkim stopniu obciąża pacjenta i posiada duży potencjał usprawnienia procedur diagnostycznych wczesnego wykrycia raka płuc. Wykonane badania wskazują, że profilowanie PFAA jest odpowiednie do celów klinicznych. Wyniki były wysoce powtarzalne i jednoznacznie oddzielały pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem płuc od grupy kontrolnej, nawet tych we wczesnym stadium choroby. Znaczący wzrost stężenia i stosunku Pro i Orn oraz znaczący spadek His były obserwowane podczas porównania wyników w grupie kontrolnej i badanej. Proporcje wyraźniej odzwierciedlają zmiany w profilach PFAA niż wyłącznie stężenia – profile pięciu aminokwasów różniły się wskaźnikiem: Gln, Met i His były na niższym poziomie, natomiast Ile była podwyższona u pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem płuc, z kolei analizując wyłącznie stężenia, istotne zmiany zaobserwowano tylko w jednym przypadku. Konwencjonalne markery stosowane w praktyce klinicznej nie zawsze są użyteczne z powodu swojej niskiej specyficzności i niewystarczającej czułości. Z tego powodu korzystanie z kombinacji

kilku markerów wydaje się niezbędne. Wyniki analiz profili PFAA wskazują, że oparta o nie metoda diagnostyczna może być nowym wskaźnikiem ulepszającym niewystarczającą kliniczną wydajność stosowanych rutynowo markerów w diagnostyce raka płuc [8].

4.3. Rak szyjki macicy

Profile PFAA zostały wykorzystane, aby wykryć metaboliczne zmiany charakteryzujące wewnątrznaślónkową neoplazję szyjki macicy (CIN) i raka szyjki macicy. Dodatkowo oceniono potencjał diagnostyczny tych profili, a także możliwość wykorzystania uzyskanych wyników do usystematyzowania i poszerzenia wiedzy na temat metabolizmu raka szyjki macicy. Próbkę osocza pacjentów ze zdiagnozowanym CIN (n=26), rakiem szyjki macicy (n=22) i z grupy stanowiącej zdrową kontrolę (n=35) były analizowane za pomocą metod chromatograficznych (HPLC), a następnie poddane analizie statystycznej. W porównaniu z grupą kontrolną, profile pacjentów z CIN, i pacjentów z rakiem szyjki macicy charakteryzowały się niższym stężeniem aminokwasów. Poziom Arg i Thr był podwyższony w grupie pacjentów z CIN, ale obniżony u pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem szyjki macicy. Dodatkowo, poziomy grupy aminokwasów (Asx, Glu, Asn, Ser, Gly, His, tauryny, Tyr, Val, Met, Lys, Ile, Phe) stopniowo zmniejszały się od przypadków zdiagnozowanego CIN do raka szyjki macicy w stadium inwazyjnym. To odkrycie wskazuje na potencjał analiz profili PFAA w diagnostyce i monitorowaniu nowotworów tego typu, a także poszerzaniu wiedzy na temat patogenyzy choroby nowotworowej. Profile PFAA mogą pomóc w szybszym diagnozowaniu wcześniejszych stadiów raka, a nawet stanów go poprzedzających, przy skorzystaniu z pojedynczej próbki krwi [15].

5. Podsumowanie

Metabolizm komórek nowotworowych znacznie różni się od normalnego metabolizmu i nieprawidłowości dotyczące redystrybucji aminokwasów są charakterystyczną cechą białkowego metabolizmu dla tego typu komórek. Nowotwory charakteryzują się obecnością mutacji w obrębie genomu, a co za tym idzie także zmienioną ekspresją części genów. W konsekwencji również fenotyp jest zmieniony - zmiany dotyczą metabolizmu aminokwasów, nukleotydów czy lipidów. Sprawia to, że możliwe jest określenie biomarkerów dzięki analizie metabolomu.

Problemem dotyczącym stosowanych aktualnie w praktyce klinicznej biomarkerów (np. CEA) jest ich niewystarczająca specyficzność czy to pod względem narządu czy rodzaju choroby, ich stężenie nie zwiększa się w początkowej fazie choroby nowotworowej. Ponadto, badania przesiewowe wykonywane poza laboratorium diagnostycznym, takie jak kolonoskopia w raku jelita grubego, często są inwazyjne, niewygodne i zniechęcają pacjentów do badań przesiewowych, co powoduje późne wykrycie choroby [15]. Zaprezentowane badania potwierdzają potencjał profilowania aminokwasów w osoczu jako preferowaną technikę w wielu aspektach procesu diagnostycznego, w porównaniu do wcześniej znanych metod. Główne zalety, które wyróżniają profilowanie PFAA to: możliwość zaobserwowania znacznej zmiany na wczesnym, bezobjawowym etapie schorzeń, czułość, stosunkowo łatwa w przeprowadzaniu analiza, nieinwazyjność i mniejsza niedogodność dla pacjentów w porównaniu do najczęściej wykorzystywanych metod diagnostycznych [17].

Literatura

1. Spratlin J.L., Serkova N.J., Eckhardt S.G., *Clinical Applications of Metabolomics in Oncology: A Review*, Nature Reviews Cancer, 15, (2009), s. 431-440.
2. Miyagi Y., Higashiyama M., Gochi A., Akaike M., Ishikawa T., Takeshi M., Saruki N., Bando E., Kimura H., Imamura F., Moriyama M., Ikeda I., Chiba A., Oshita F., Imaizumi A., Yamamoto H., Miyano H., Horimoto K., Tochikubo O., Mitsushima T., Yamakado M., Okamoto N., *Plasma free amino acid profiling of five types of cancer patients and its application for early detection*, PLoS One, 6(9):e24143, (2011), doi:10.1371/journal.pone.0024143.
3. Simińska E., Koba M., *Amino acid profiling as a method of discovering biomarkers for early diagnosis of cancer*, Amino Acids, 48, (2016), s. 1339-1345.
4. Griffin J.L., Shockcor J.P., *Metabolic profiles of cancer cells*. Nature Reviews Cancer, 4, (2004), s. 551-61.
5. Maeda J., Higashiyama M., Imaizumi A., Nakayama T., Yamamoto H., Daimon T., Yamakado M., Imamura F., Kodama K., *Possibility of multivariate function composed of plasma amino acid profiles as a novel screening index for non-small cell lung cancer: a case control study*. BMC Cancer 10(690), (2010), 1-8, doi:10.1186/1471-2407-10-690.
6. Kim H.J., Jang S.H., Ryu J.S., Lee J.E., Kim Y.C., Lee M.K., Jang T.W., Lee S.Y., Nakamura H., Nishikata N., Mori M., Noguchi Y., Miyano H., Lee K.Y., *The performance of a novel amino acid multivariate index for detecting lung cancer: a case control study in Korea*, Lung Cancer, 4958, (2015), s. 1-6. doi:10.1016/j.lungcan.2015.10.006.
7. Gu Y., Chen T., Fu S., Sun X., Wang L., Lu Y., Ding S., Ruan G., Teng L., Wang M., *Perioperative dynamics and significance of amino acid profiles in patients with cancer*, Journal of Translational Medicine, 13(35), (2015), s. 1-14, doi:10.1186/s12967-015-0408-1.
8. Shingyoji M., Iizasa T., Higashiyama M., Imamura F., Saruki N., Imaizumi A., Yamamoto H., Daimon T., Tochikubo O., Mitsushima T., Yamakado M., Kimura H., *The significance and robustness of a plasma free amino acid (PFAA) profile based multiplex function for detecting lung cancer*, BMC Cancer 13:77, (2013), doi:10.1186/1471-2407-13-77.
9. Hadi N.I., Jamal Q. *"OMIC" tumor markers for breast cancer: a review*. Journal of the Medical Sciences, 31(5), (2015), s. 1256-1262
10. Tsun Z., Possemato R., *Amino acid management in cancer*, Seminars in Cell & Developmental Biology, 43, (2015), s. 22-32.
11. Manig F., Kuhne K., von Neubeck C., Schwarzenbolz C., Yu Z., Kessler B.M., Pietzsch J., Kunz-Schughart L.A., *The why and how of amino acid analytics in cancer diagnostics and therapy*, Journal of Biotechnology, 242, (2017), s. 30-54.
12. Qiu Y., Cai G., Su M., Chen T., Zheng X., Xu Y., Ni Y., Zhao A., Xu L.X., Cai S., Jia W., *Serum metabolite profiling of human colorectal cancer using GC-TOFMS and UPLC-QTOFMS*, Journal of Proteome Research, 8(10), (2009), s. 4844-4850, doi:10.1021/pr9004162.
13. Ma H., Hasim A., Mamtimin B., Kong B., Zhang H., Sheyhidin I., *Plasma free amino acid profiling of esophageal cancer using high-performance liquid chromatography spectroscopy*, World J Gastroenterol, 20(26), (2014), s. 8653-8659.
14. Poschke I., Mao Y., Kiessling R., Boniface J., *Tumor-dependent increase of serum amino acid levels in breast cancer patients has diagnostic potential and correlates with*

- molecular tumor subtypes*, Journal of Translational Medicine., 11(290), (2013), s. 1-9, doi:10.1186/1479-5876-11-290.
15. Hasim A., Aili A., Maimaiti A., Mamtimin B., Abudula A., Upur H., *Plasma-free amino acid profiling of cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia patients and its application for early detection*, Molecular Biology Reports, 40, (2013), s. 5853-5859.
 16. Leichtle A.B., Nuoffer J.M., Ceglarek U., Kase J., Conrad T., Witzigmann H., Thiery J., Fieldler G.M., *Serum amino acid profiles and their alterations in colorectal cancer*, Metabolomics 8(4), (2012), s.634–653, doi:10.1007/s11306-011-0357-5.
 17. Kim J.W., Lee G., Moon S.M., Park M.J., Hong S.K., Ahn J.H., Kim K.R., Paik M.J., *Metabolomic screening and star pattern recognition by urinary amino acid profile analysis from bladder cancer patient*. Metabolomics, 6, (2010), s. 202-206, doi:10.1007/s11306-010-0199-6.

Profilowanie metaboliczne aminokwasów jako metoda wykrywania i monitorowania chorób nowotworowych

Streszczenie

Aminokwasy, pełniące podwójną rolę w metabolizmie komórkowym, nie tylko stanowiące podstawę syntezy białek, ale także będące pośrednimi cząsteczkami sygnałowymi pełniącymi istotną rolę w innych reakcjach biosyntezy, wydają się być niezwykle obiecujące dla szeroko pojętej diagnostyki opartej o analizy metabolomiczne. Badania wskazują, że zaburzenia w obrębie obu typach procesów są obecne w komórkach nowotworowych. Wykazano, że poziom aminokwasów w płynach ustrojowych osób zdrowych i chorujących na nowotwory różnych typów i o różnym stopniu zaawansowania choroby, różnią się istotnie. Wskazuje to, że profilowanie aminokwasów w surowicy, osoczu czy próbce tkanki może stanowić użyteczne narzędzie wczesnego diagnozowania różnych typów nowotworów, a także monitorowania stopnia zaawansowania choroby. Co więcej, technika ta może stanowić znakomite uzupełnienie innych strategii wczesnego wykrywania chorób nowotworowych.

Słowa kluczowe: Metabolomika, Profilowanie aminokwasów, Nowotwory, Biomarker.

Amino acid profiling as a method of detecting and monitoring cancer

Abstract

Amino acids, play a dual role in cellular metabolism, not only being the basis for protein synthesis, but also being indirect signaling molecules that play an important role in other biosynthetic reactions, seem to be extremely promising for broadly understood diagnostics based on metabolomic analyzes. Research indicates that demolitions within both types of processes are present in cancer cells. It has been shown that the level of amino acids in body fluids of healthy and cancer patients of various types and at various stages of disease varies significantly. This indicates that amino acid profiling in serum, plasma or tissue sample can be a useful tool for early diagnosis of various types of cancer, as well as for monitoring the severity of the disease. What's more, this technique can be a great complement to other strategies for early detection of cancer.

Keywords: Metabolomics, Amino acid profiling, Cancer, Biomarker.

Immunosupresja a rak płuca

1. Wprowadzenie

Rak płuca jest jednym z najczęściej występujących nowotworów złośliwych na świecie i od wielu lat stanowi bardzo poważne wyzwanie terapeutyczne. Rocznie odnotowuje się blisko 2 miliony nowych przypadków raka płuca i ok. 1,5 miliona zgonów z powodu tego nowotworu [1, 2]. W Polsce ok. 33% zgonów u mężczyzn z powodu nowotworu, to osoby chorujące na raka płuca, u kobiet ten odsetek jest niższy i wynosi ok 10%. Choroba dotyczy przede wszystkim osób po 40 roku życia, a największy szczyt zachorowalności obserwuje się w wieku 70 lat [3]. Pomimo odkrycia i wprowadzenia do praktyki klinicznej nowych i bardziej skutecznych metod terapeutycznych, 5-letni wskaźnik przeżycia pacjentów z rakiem płuca nadal jest rozczarowujący i utrzymuje się na bardzo niskim poziomie ok. 10-17% [4-7].

Najczęstszym czynnikiem epidemiologicznym powodującym zachorowania na raka płuca jest palenie tytoniu [8]. Palacze są obciążeni wyższym ryzykiem zachorowania od osób niepalących, jednakże bierne palenie tytoniu (wdychanie dymu papierosowego) także zwiększa ryzyko zachorowania. Według szacunków rak płuca jako choroba powodowana wyłącznie nałogiem tytoniowym dotyczy ok. 90% mężczyzn i ok 80% kobiet [3]. Wczesne stadia raka płuca w większości przebiegają bezobjawowo, a jeśli objawy występują, są mało charakterystyczne i w większości przypadków są bagatelizowane przez samego chorego. Początkowe etapy zaawansowania raka płuca są rzadko diagnozowane i najczęściej dochodzi do nich przypadkowo. Częstość źródłem rozpoznania jest zdjęcie rentgenowskie klatki piersiowej, wykonywane z innych powodów, a nieprawidłowy wynik jest sygnałem do wszczęcia pogłębionej diagnostyki w kierunku raka płuca [9, 10]. Z kolei wystąpienie niepokojących dolegliwości ze strony układu oddechowego takich jak: chrypka, duszność, utrudnione połykanie, świadczą często o miejscowym wzroście guza i o nieoperacyjnym raku. W przebiegu tej choroby bardzo szybko dochodzi do powstania przerzutów, które mogą dotknąć każdego narządu, a ich objawy kliniczne nie są swoiste dla raka płuca. W większości przypadków dotyczą kości, wątroby, mózgu i nadnerczy [3].

Ogromna większość wszystkich przypadków raka płuca (80-85%) to niedrobnokomórkowy rak płuca (NDRP). Pozostałe 15-20% zdiagnozowanych przypadków to drobnokomórkowe raki płuca (DRP) [1, 2, 11]. Oba typy różnią się znacznie przebiegiem medycznym i odpowiedzią na leczenie. NDRP występuje w kilku

¹ arkadiusz_goede@wp.pl Zakład Genoterapii, wydział lekarski, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy UMK w Toruniu.

² ewelina.wedrowska@gmail.com Zakład Genoterapii, wydział lekarski, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy UMK w Toruniu.

³ joanna.golinska@gmail.com Zakład Genoterapii, wydział lekarski, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy UMK w Toruniu.

⁴ mmch94@gmail.com Koło Naukowe Genoterapii, wydział lekarski, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy UMK w Toruniu.

wariantach histologicznych: gruczolakorak, rak płaskonabłonkowy i rak wielkomórkowy. Najczęstszym typem histologicznym, również wśród osób niepalących, jest gruczolakorak (ok. 44%) [11-15].

Układ odpornościowy odgrywa kluczową rolę w kontrolowaniu wzrostu i postępu każdej zmiany nowotworowej. Unikanie nadzoru immunologicznego przez komórki raka wydaje się być kluczowym elementem przyczyniającym się do progresji choroby. W ostatnich latach wiele uwagi poświęcono temu zjawisku [16, 17].

Celem pracy jest przedstawienie najnowszych doniesień dotyczących zastosowania leczenia immunosupresyjnego raka płuca. Skupiono się przede wszystkim działaniu przeciwnowotworowym wybranych immunosupresantów, w tym przeciwciał monoklonalnych. Szerzej opisano metody immunoterapii nowotworów polegające na hamowaniu punktów kontrolnych układu immunologicznego m.in. receptorów PD-1 oraz CTLA-4, które wydają się być najbardziej obiecującymi.

2. Odpowiedź układu immunologicznego na raka płuca

Odpowiedź immunologiczna w mikrośrodkowisku guza jest bardzo skomplikowana i nadal, w dużym stopniu, pozostaje nie do końca poznana. Rozwój i inwazja nowotworu jest związana z typem komórek odpornościowych, które zostały zrekrutowane do mikrośrodkowiska guza i często wynikają z późniejszego braku równowagi w wytwarzaniu środków immunosupresyjnych w jego otoczeniu [18, 19]. W otaczającym nowotworze ważną rolę odgrywają makrofagi, neutrofile, komórki B i NK, a ich aktywność zależy od kontekstu mikrośrodkowiska i może być związana zarówno z mechanizmem pro- i przeciwnowotworowym [20-24].

Wszelkie reakcje zachodzące między (zdrowymi) komórkami gospodarza, a komórkami zmienionymi nowotworowo są złożone i dynamiczne. W chwili obecnej bardzo istotne jest poznanie mechanizmów oddziaływania między tymi komórkami i opracowanie przy ich pomocy nowoczesnych terapii, które umożliwią zwalczanie komórek nowotworowych. Rak płuca należy do guzów o niejednorodnej strukturze oraz wykazuje heterogeny charakter antygenowy. W dodatku odpowiedź przeciwnowotworowa jest stale modyfikowana przez środowisko płuc, gdzie ciągle dochodzi do zmian patologicznych wywołanych przez czynniki przenikające ze środowiska zewnętrznego, takich jak np. dym papierosowy [15, 25].

Sam nadzór układu immunologicznego w raku płuca jest złożonym procesem, który wraz z rozwojem choroby ulega osłabieniu. Komórki raka są zabijane przez granulocyty, makrofagi, limfocyty – działają enzymy proteolityczne, które są wydzielane przez obojętnochłonne i kwasochłonne granulocyty, przeciwciała pochodzące od limfocytów B, wolne rodniki itp. Komórki nowotworowe niszczone są na drodze apoptozy. Mechanizm cytotoksyczności limfocytów (właśnie w drodze apoptozy) związany jest z ziarnami cytolitycznymi (granzymami, perforynami) lub też z mechanizmem receptorowym, błonowym; uruchamiają go wymienione wyżej: ligand czynnika martwicy nowotworu (TRAIL, ang. *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*), TNF α , Ligand Fas (FasL, CD95L). Odpowiedź ulega modyfikacjom w samym mikrośrodkowisku guza, jak wcześniej wspomniano, komórki nowotworu uciekają spod nadzoru układu immunologicznego dzięki wykorzystaniu wielu mechanizmów, prowadzących do osłabienia reakcji cytotoksycznych [15].

2.1. Elementy osłabienia odpowiedzi immunologicznej przez nowotwór

Wraz z rozwojem raka i rozsiewem komórek guza po organizmie dochodzi do powstania tolerancji immunologicznej, co oznacza brak reakcji na neoantygeny [15].

Komórki TIL (ang. *tumor-infiltrating lymphocytes*), czyli limfocyty T izolowane z guza wydają się istotne klinicznie, gdyż potencjalnie niszczą komórki nowotworowe. W ich populacji dominują komórki Tc CD8+ (dawna nazwa: CTL); migrują one bezpośrednio do tkanki nowotworowej, dzięki wykorzystaniu złożonych interakcji z komórkami adhezyjnymi oraz pod wpływem czynników pochodzenia chemotaktycznego [26]. Tc doprowadzają do apoptozy komórek raka, np. w mechanizmie FasL:Fas [15]. Jednak zachodzi także reakcja odwrotna – otóż zaobserwowano znaczne zwiększenie wrażliwości limfocytów na apoptozę poprzez obecność na komórkach receptorów Fas [27]. Przymuszczalnie komórki raka (FasL+) mogą zabijać limfocyty i uciekać spod nadzoru immunologicznego [15].

Heterogenność raka płuca jest zarówno fenotypowa jak i morfologiczna [15]. Atak ze strony układu immunologicznego jest utrudniony, gdyż komórki raka płuca wykazują zmienną różnorodną ekspresję antygenów [28]. Często mają one, jak już wspomniano, zmniejszoną ekspresję lub też całkowity brak cząsteczek MHC, co utrudnia prawidłową prezentację neoantygenów limfocytom T. Kolejnym sposobem na ucieczkę przed odpowiedzią układu immunologicznego jest maskowanie antygenów powierzchniowych komórek guza poprzez przeciwciała blokujące, które hamują dostęp komórkom efektorowym [15]. Dodatkowo komórki nowotworowe mają możliwość uwalniania do przestrzeni zewnątrzkomórkowej antygenów, które są zdolne do blokowania receptorów (TCR, BCR) komórek efektorowych [29].

Jeszcze inną metodą na „oszukanie” układu immunologicznego jest brak lub też zaburzenia aktywności cząsteczek kostymulujących na powierzchni guza, a także na komórkach, które prezentują antygeny w środowisku nowotworowym. Jak to opisano wyżej, limfocyty T rozpoznają komórki raka dzięki APC i w tym procesie uczestniczą cząsteczki kostymulujące. By doszło do pełnej aktywacji limfocytów cytotoksycznych musi zajść interakcja między cząsteczką kostymulującą B7 (CD80 lub CD86) na powierzchni APC z ich receptorem (CD28) na powierzchni limfocytów. Cząsteczki B7 są w stanie przekazywać limfocytowi sygnał supresyjny, o ile na tym ostatnim, zamiast CD28, pojawi się alternatywny receptor CTLA-4; interakcja B7:CTLA-4 prowadzi do hamowania sygnału aktywacji przez TCR limfocytu T. CTLA-4 znajduje się na komórkach regulatorowych (w tym naturalnych limfocytach regulatorowych CD4+, nTreg) i bierze czynny udział w ich aktywacji [15, 30]. Komórki nowotworowe wydzielają chemokiny, cytokiny, także produkty metabolizmu. Wszystkie wydzielane związki w znacznym stopniu interferują z obroną przeciwnowotworową, a także z czynnością komórek dendrytycznych (DCs). Warunkiem stymulacji komórek immunosupresyjnych jest środowisko beztlenowe we wnętrzu guza. Poprzez wydzielanie przez nowotwór takich cytokin, jak IL-10 i VEGF – czynnik wzrostu naczyniowego śródbłonna dochodzi do zaburzenia funkcjonowania DCs, a także zmniejszenia ich liczebności [15]. Komórki DCs narażone na działanie tych czynników wykazują zmniejszoną ruchliwość, zdolność do aktywowania naiwnych limfocytów T, a także wykazują zmniejszoną ekspresję cząsteczek MHC, kostymulujących oraz adhezyjnych [26].

Komórki nowotworowe są zdolne do wytwarzania i wydzielania substancji, które hamują układ immunologiczny. Przykładem jest TGF- β – transformujący czynnik wzrostu beta (ang. *transforming growth factor β*), który stwierdza się w zwiększonych ilościach w guzach u pacjentów chorych na raka płuca. Funkcją tej cytokiny jest różnicowanie polaryzacji limfocytów Th w kierunku Th2, zahamowywanie czynności komórek cytotoksycznych i komórek NK, a także utrzymanie zróżnicowania nTreg. Same komórki nowotworowe są niewrażliwe na działanie TGF- β z powodu utraty receptorów dla tej cytokiny. Podobne działanie wykazują IL-10 oraz CTLA-4 [15]. IL-10 jest wydzielana przez komórki guza, ale także same limfocyty, co powoduje wzrost jej stężenia w środowisku guza. Wspomniana wyżej cząsteczka CTLA-4 wykazuje silne działanie zmniejszające polaryzację limfocytów (z wyjątkiem generowania komórek Treg), działa też supresyjnie na komórki dendrytyczne. Według niektórych autorów podobnie działa interelukina-2 (IL-2) [15]. Podsumowując, mechanizmy odpowiedzi układu opornościowego na nowotwór są złożone. Istotną rolę w dokładnym zrozumieniu genezy nowotworów stanowi poznanie mechanizmów odpowiedzi immunologicznej. Wiedza z zakresu tych mechanizmów pomaga w odpowiednim doborze leczenia, a w przyszłości pozwoli na opracowanie nowych metod terapeutycznych, w których atakowane będą „słabe punkty” komórek nowotworowych.

2.2. Immunosupresja

Immunosupresja to stan, w którym dochodzi do osłabienia lub zahamowania odpowiedzi immunologicznej. W efekcie zachodzi stałe lub przejściowe uszkodzenie mechanizmów odporności humoralnej lub komórkowej. Stan ten sprzyja zwiększeniu ryzyka powstania zakażeń wywołanych przez drobnoustroje chorobotwórcze i oportunistyczne [31, 32]. Efekt immunosupresyjny jest możliwy do osiągnięcia w wyniku działania chirurgicznego polegającego na wycięciu narządów układu immunologicznego np. grasic, czy też za pomocą czynników fizycznych takich jak np. wystawienie na działanie promieniowania rentgenowskiego lub przez zastosowanie środków chemicznych jakimi są cytostatyki lub glikokortykoidy [33]. Stan immunosupresji może być osiągnięty również przez inne czynniki, np. stres, zanieczyszczenie powietrza, temperaturę, czynniki biologiczne (grzyby, bakterie, wirusy), bądź też czynniki chemiczne w tym narkotyki, antybiotyki, obecność metali ciężkich czy niedobór witamin [32]. Ze względu na sposób oddziaływania środka immunosupresyjnego z układem immunologicznym wyróżnia się immunosupresję komórkową oraz humoralną [33]. Zmiany następujące w odpowiedzi typu humoralnego obejmują zwykle niedobór przeciwciał różnych klas w szczególności IgA, IgM oraz IgG [31]. W efekcie dochodzi do zablokowania syntezy przeciwciał oraz wielu cytokin, a w szczególności limfokin [32, 34]. Limfokiny są substancjami hormonopodobnymi, które są odpowiedzialne za przenoszenie informacji między poszczególnymi komórkami układu limfocytów za pomocą swoistych receptorów. Odpowiadają za regulację wzrostu, procesów metabolicznych, regenerację oraz eliminację niektórych komórek i tkanek w stanach zapalnych oraz w odpowiedzi immunologicznej. Immunosupresja komórkowa oznacza zwykle spadek liczby i/lub pośledzenie funkcji komórek T. Wzrasta zapadalność na choroby wirusowe, grzybicze,

gruźlicę, kiłę, niektóre bakterie, pasożyty wewnątrzkomórkowe. Efekt immunosupresyjny zależy w ostateczności od wielu czynników m.in. stanu pacjenta, czasu w jakim został podany preparat oraz od jego stężenia [35, 36]. Immunosupresję można osiągnąć poprzez blokadę szlaków przekazujących sygnał w procesie aktywacji limfocytów, eliminację limfocytów czy też blokadę krążenia limfocytów [32].

Immunosupresja znalazła także zastosowanie w zwalczaniu nowotworów. Choroby są te coraz bardziej powszechne i zyskały już miano cywilizacyjnych. Grupą leków immunosupresyjnych, które znalazły zastosowanie w leczeniu nowotworów są cytostatyki, czyli leki mające za zadanie blokadę cyklu komórkowego. Leki immunosupresyjne mają pozytywne działanie terapeutyczne, ale niestety mogą także wywoływać działania niepożądane. Ich szczególną wadą jest upośledzenie układu immunologicznego oraz ich niekorzystny wpływ na tkanki, np. kardiotoxycywność czy hepatotoksycywność. Kardiotoxycywność to niekorzystne działanie na układ sercowo-naczyniowy, mogące prowadzić do poważnych jego uszkodzeń. Zaburzenia często nie pojawiają się od razu po podaniu leku, lecz występują po dłuższym upływie czasu. Głównym skutkiem jest niewydolność serca. Natomiast hepatotoksycywność to zjawisko polegające na zaburzeniu prawidłowych funkcji komórek wątroby bądź całego narządu. Immunosupresja powinna być szczególnie ostrożnie podawane kobietą w ciąży bądź planujących zajście w ciążę, gdyż może mieć niekorzystny, często letalny wpływ na nienarodzone dziecko [31-36].

2.3. Leki immunosupresyjne a nowotwór

Leki immunosupresyjne to grupa niejednorodnych związków chemicznych oraz biologicznych, które wykazują różny mechanizm działania, lecz identycznie wpływają na organizm, hamując funkcjonowanie układu immunologicznego [33]. Preparaty immunosupresyjne są różnorodne co sprawia, że dzielimy je pod względem priorytetu działania. Wychodząc od ich naturalnych właściwości i wielkości cząsteczki substancji czynnej, leki dzielimy na: preparaty wykazujące charakter białkowy (np. inhibitory TNF- α), glikokortykoidy, antybiotyki [37]. Z kolei biorąc za punkt odniesienia mechanizm ich działania wyróżniamy substancje o działaniu immunosupresyjnym tj.: inhibitory kalcyneuryny, przeciwciała immunosupresyjne, azatiopryna [33]. W większości naturę i mechanizm działania preparatów immunosupresyjnych poddaje się podziałowi na następujące kategorie: leki cytotoxyczne, przeciwciała, glikokortykoidy, leki wykazujące działanie na immunofiliny i inne. Podstawowym celem stosowania preparatów immunosupresyjnych jest działanie na główne mechanizmy odpowiedzi układu odpornościowego, aby uzyskać pożądaną efekt terapeutyczny [38]. Działanie immunosupresantów ma także ciemną stronę w postaci osłabienia układu odpornościowego, a co za tym idzie powoduje wzrost zachorowań wywoływanych przez drobnoustroje chorobotwórcze, w tym oportunistyczne (np. atypowe prątki) [31, 35-38].

Dużą grupę leków działających immunosupresyjnie stanowią preparaty cytostatyczne. Jest to bardzo heterogenna grupa terapeutyków, a ich działanie opiera się głównie na hamowaniu podziałów komórkowych limfocytów T i limfocytów B [38, 39]. Większość tych substancji wykazuje działanie niezależne od cyklu komórkowego, ale są także preparaty swoiste dla danej fazy [33]. Ze względu na mecha-

nizm działania leków cytostatycznych możemy je podzielić na: antybiotyki cytotoksyczne, leki alkilujące oraz antymetabolity. Niektóre z tych leków znalazły swoje zastosowanie w onkologii. Najczęściej stosowanymi preparatami alkilującymi są chlorambucyl, pochodne platyny, cyklofosfamid (CTX) oraz pochodne nitromocznika [38]. Sposób w jaki działają preparaty alkilujące opiera się na wykorzystaniu reaktywnego jonu, który powoduje alkilację azotu łańcucha DNA. Azot ten znajduje się w pozycji N7 guaniny. Dochodzi do powstania wiązań krzyżowych lub też do pęknięcia nici DNA. Lekiem, który znalazł szerokie zastosowanie w onkologii jest cyklofosfamid [40]. Mechanizm działania tego preparatu polega na tworzeniu się błędnie sparowanych par zasad, czego skutkiem jest zahamowanie replikacji materiału genetycznego [33]. Lek ten jest podawany pacjentom w postaci doustnej (w tabletkach) lub dożylnie [31]. Osoby zażywające CTX wykazują wiele skutków ubocznych w postaci: biegunki, gorączki, wymiotów i wzrostu podatności na infekcje. Wysokie stężenia leku może powodować delecję wszystkich podstawowych elementów morfotycznych (erytrocytów, krwinek białych, płytek), także krwotoczne zapalenie pęcherza moczowego [33, 34, 41].

Zastosowanie w leczeniu nowotworów znalazły także antymetabolity. Substancje o strukturze odwzorowującej naturalnie występujące cząsteczki biologicznie czynne (metabolity), mają szczególne znaczenie m.in. w procesach naprawy DNA, syntezy DNA i RNA, dzięki podobieństwu do tych cząsteczek powodują zakłócenie procesów komórkowych zachodzących przy ich udziale [33]. Możemy wyróżnić następujące antymetabolity: analogi puryn, inhibitory syntezy białek oraz analogi kwasu foliowego [38]. Działanie tych grup leków opiera się generalnie na ingerencji w syntezę kwasu deoksyrybonukleinowego [34].

Antybiotyki cytostatyczne często nazywane są też antybiotykami hamującymi, ponieważ zahamowują one rozwój guza. Wykazują wielobiegunowe działanie, gdyż zaburzają syntezę materiału genetycznego, a także powodują generację wolnych rodników. Te z kolei uszkadzają DNA, a także upośledzają naprawę uszkodzeń materiału genetycznego. Do grupy tej zaliczamy: aktynomycyne D, mitramycynę, mitromycynę C, antracyklinę oraz bleomycynę [33, 38, 41]. Najchętniej stosowanym antybiotykiem w przypadku pacjentów onkologicznych jest antracyklina. Działanie antracykliny jest wielopoziomowe, gdyż obejmuje ono modyfikowanie struktury DNA, dzięki tworzeniu kompleksów interkalacyjnych; wpływa na zmniejszenie elastyczności helisy DNA. Podanie tego antybiotyku inicjuje proces apoptozy, gdyż wpływa on nie tylko na komórki w stanie aktywacji, ale także na te które są w fazach G0/G1 cyklu komórkowego [33, 42].

Nowym kierunkiem w poszukiwaniu leków o właściwościach immunosupresyjnych są przeciwciała monoklonalne. Przeciwciała takie często koniuguje się z odpowiednią toksyną. Przeciwciało jest więc transporterem toksyny, która pełni tu rolę czynnika terapeutycznego. Działanie takie zwiększa precyzję działania toksyny, chroni także przed uszkodzeniem przez czynnik terapeutyczny zdrowe komórki.

Oprócz głównych typów immunosupresantów, wyróżniamy również leki niesklasyfikowane, których ze względu na funkcje i strukturę nie przypisano do żadnych konkretnych grup. Przykład stanowią interferony wykazujące działanie przeciwnowotworowe, które wynika najprawdopodobniej z blokady syntezy białek,

pobudzenia układu immunologicznego przez wzrost aktywności fagocytarnej makrofagów, a także zwiększenia cytotoksyczności limfocytów Tc na komórki docelowe, a być może nawet z bezpośredniego hamowania niektórych onkogenów [38].

2.4. Hamowanie immunologicznych punktów kontroli

Zastosowanie przeciwciał skierowanych przeciwko immunologicznym punktom kontrolnym polega na ich zdolności do wzbudzenia reaktywności limfocytów T na antygeny guza. Limfocyty dostają wtedy wyłącznie sygnały aktywacyjne i ponownie potrafią niszczyć komórki nowotworowe. Takie podejście okazało się być bardzo skuteczne w przypadku niektórych typów nowotworów i całkowicie odmieniło dotychczasowe strategie immunoterapii. Przełom nastąpił dość szybko i po kilkunastu latach od przeprowadzenia pierwszych badań, przeciwciała monoklonalne anty-PD-1 tj. niwolumab, pembrolizumab i anty-CTLA-4 tj. ipilimumab, tremelimumab, są w końcowych fazach badań klinicznych lub są już rutynowo wykorzystywane w terapii chorych na nowotwory, w tym raka płuca [15, 43, 44].

PD-1 jest glikoproteiną, co jest charakterystyczne dla białek przezbłonowych typu 1. Za prawidłowe działanie receptora odpowiada ogon cytoplazmatyczny, a także dwa motywy tyrozynowe będące miejscem wiązania fosfatazy. Receptor PD-1 podlega ekspresji na aktywnych limfocytach B i T, komórkach dendrytycznych, monocytach oraz komórkach nowotworowych. Ekspresja tego białka indukowana jest przez szlak sygnałowy BCR i TCR i ulega podtrzymaniu, gdy limfocyt jest stymulowany swoistym antygenem. W miarę wydłużania się stymulacji rośnie ekspresja PD-1 na limfocytach T. Zjawisko to, opisywane jako wyczerpanie (ang. exhausted) limfocytów jest charakterystyczne dla przewlekłych infekcji. Taki stan jest odwracalny, jednak obserwowano także trwałą utratę cytotoksyczności przez limfocyty [8, 34, 44, 45].

Do aktywacji receptora PD-1 dochodzi w momencie przyłączenia jednego z dwóch ligandów: PD-L1 lub PD-L2. W wyniku aktywacji i przekazania tzw. negatywnego sygnału, dochodzi do zahamowania szlaku BCR lub TCR i w efekcie do spadku produkcji białek promujących przeżycie komórki. Innym skutkiem może być zmniejszenie wytwarzania cytokin lub zahamowanie działania IL-10. W konsekwencji następuje wyłączenie prawidłowej odpowiedzi immunologicznej. PD-L1 i PD-L2 konkurują ze sobą o wiązanie receptora, przy czym PD-L1 wykazuje większe właściwości immunoregulacyjne [8, 15, 45].

Ekspresja cząsteczek PD-L1, znajdujących się na powierzchni komórek nowotworowych, jest zapoczątkowana przez dwa różne mechanizmy – immunologicznie zależny (od aktywności układu odpornościowego, np. syntezy interferonu gamma), a także niezależny [43].

Innym sposobem zapoczątkowania ekspresji PD-1 jest zmiana jaka zachodzi w mikrośrodowisku nowotworu. W niemal 100% przypadków, gdy na powierzchni monocytów pojawi się PD-1, obserwuje się limfocyty naciekające na nowotwór. Wcześniej wykazano, że ekspresja PD-1 jest indukowana przez IFN- γ . Interferon gamma jest wytwarzany właśnie przez naciekające limfocyty. Te obserwacje udowodniły, że komórki nowotworowe wykazują aktywność w przypadku pojawienia się limfocytów cytotoksycznych. Wyraża się ona wzrostem ekspresji PD-1, który hamuje działanie limfocytów. Obecność naciekających limfocytów jest

korzystnym czynnikiem rokowniczym, gdyż świadczy o immunogenności nowotworu. Z drugiej jednak strony obecność tych limfocytów powoduje odpowiedź ze strony nowotworu w postaci ekspresji PD-1. Powoduje ona inhibicję limfocytów [43, 46, 47].

PD-1 w środowisku nowotworowym działa na kilka sposobów, doprowadza przede wszystkim do supresji komórek układu immunologicznego. Interakcja receptora PD-1 z limfocytami prowadzi do apoptozy, pojawienia się „wyczerpanych” limfocytów T, a nawet alergii. Komórki dendrytyczne związane z nowotworem, prowadzą do supresji katalizowanej przez IL-10 [43, 46].

Ekspresja PD-1 wytwarza na powierzchni komórek nowotworowych coś w rodzaju tarczy molekularnej, która ma za zadanie chronić ją przed działaniem limfocytów Tc. Ponadto zmniejsza autoreaktywność komórek NK, limfocytów B, generalnie zaliczany jest do receptorów hamujących [43].

Jak wspomniano wcześniej komórki nowotworowe nauczyły się oszukiwać układ immunologiczny poprzez generowanie sygnałów, które mają na celu upodobnienie się do zdrowych, prawidłowo funkcjonujących komórek. Wykazano, że para receptor:ligand (PD-1:PD-L) jest jednym z takich sygnałów, a zwiększona ekspresja ligandu na limfocytach działa hamująco na przeciwnowotworową odpowiedź układu immunologicznego. Takie zjawisko jest opisywane u chorych na raka płuca [15].

Pierwsze informacje o roli PD-1 i PD-L1, pełnionej w mikrośrodowisku nowotworu, a także ich blokowaniu pojawiły się już w 2002 roku, gdzie to blokowano ten receptora na modelu mysim [43]. Zaskakująco dobre wyniki zapoczątkowały prace nad nowymi metodami leczenia chorych onkologicznych z wykorzystaniem właściwości białka PD-1 [3, 43, 44].

Wyniki pierwszych prób klinicznych u chorych z niedrobnokomórkowym rakiem płuca, z użyciem przeciwciała monoklonalnego anty-PD-1 (nazwane później nivolumabem) były bardzo pomyślne. Dochodziło do znacznej poprawy stanu zdrowia, włącznie z przypadkami remisji. Wykazano, że w wyniku zastosowania przeciwciała przywracało pierwotną aktywność limfocytów T, utraconą wcześniej wskutek działania nowotworu. Obserwowano także generowanie efektorowych limfocytów pamięci. Dodatkowo, wskazano, że po zakończeniu leczenia odpowiedź przeciwnowotworowa układu immunologicznego pozostawała nadal aktywna i u większości chorych utrzymywała się na stałym poziomie przez co najmniej rok [3, 8, 43, 44].

Nivolumab (inhibitor receptora PD-1) jest pierwszym inhibitorem punktu kontrolnego zatwierdzonym do leczenia przerzutowej formy NDRP z progresją po wcześniejszej chemioterapii [47]. Agencja Żywności i Leków (FDA, (ang. Food and Drug Administration) zatwierdziła lek w dawce 3 mg/kg, podawany dożylnie co 2 tygodnie [15, 43]. Badania wykazały, że u chorych z co najmniej 5% ekspresją PD-L1 w tkance guza wystąpiła odpowiedź kliniczna na podawany lek. Przeprowadzono wiele badań klinicznych, w tym otwarte międzynarodowe badania kliniczne, do których zakwalifikowano 582 chorych w stadium IIIB lub IV nawracającego NDRP, wcześniej poddanych już standardowemu leczeniu tj. radioterapii, resekcji chirurgicznej. U chorych wystąpiła pożądana odpowiedź kliniczna na podawany lek (nivolumab). Obecnie zaleca się stosowanie nivolumabu jako terapii drugorzędowej dla zaawansowanego lub przerzutowego NDRP o etiologii płaskonabłonkowej lub

nieswoistej. Wciąż trwają jednak badania nad podniesieniem progu ekspresji PD-L1, aby można podawać go większemu odsetkowi chorych [8, 43-45].

Innym inhibitorem receptora PD-1 jest pembrolizumab. To drugi inhibitor punktu kontrolnego, który dostał zgodę FDA w leczeniu przerzutowego stadium chorych z NDRP, u których nowotwór wykazuje ekspresję PD-L1. FDA zatwierdził do leczenia chorych z postępującym nowotworem lub też po wykorzystaniu innych dostępnych metod leczenia. Dawkę leku ustalono na 2 mg/kg podawane dożylnie co 3 tygodnie. Zgody udzielono na podstawie wyników badań KEYNOTE-001, były to międzynarodowe badania I fazy, w których brało udział 495 pacjentów z zaawansowanym niedrobnokomórkowym rakiem płuca lub dodatkowo z jego przerzutami. Pacjenci zostali podzieleni na dwie grupy: jedna liczyła 182, a druga 313 osób (stwierdzono w niej co najmniej 50% poziom ekspresji PD-L1) [43, 44].

W kolejnych badaniach wykazano, że pembrolizumab ma większą skuteczność niż docetaxel u chorych z ekspresją PD-L1 na poziomie ok. 1%. Pacjentom podawano lek w dawkach odpowiednio 2 mg/kg oraz 10 mg/kg (w zależności od wskazań). Większa skuteczność wystąpiła u chorych z ekspresją PD-L1 na poziomie 50% lub wyższym [43, 44].

Ostatecznie, z większości doniesień wynika, że pembrolizumab wykazuje bezsprzecznie większą skuteczność u chorych z co najmniej 50% ekspresją PD-L1 na komórkach raka w porównaniu do innych chemioterapeutyków (pochodnych platyny), ale poprawa następuje także u tych z zaledwie 1% ekspresją PDL-1 [15, 43, 47].

Dodatkowo, godne uwagi jest, że pembrolizumab jest obecnie jedynym inhibitorem punktu kontrolnego, zatwierdzonym do leczenia pierwszorzutowego w zaawansowanym niedrobnokomórkowym raku płuca.

CTLA-4 jest to przezbłonowe białko, odpowiedzialne za hamowanie prawidłowego funkcjonowania limfocytów T. Jego aktywność opiera się na konstytutywnym kontrolowaniu CD28 i wiązaniu się do liganda CD80 (lub CD86) obecnego na komórkach dendrytycznych. Działanie to powoduje blokadę kostymulacji limfocytów i ich supresję. Dodatkowo, sparowanie CTLA-4 będącego na dziewiczym limfocycie T z cząsteczkami kostymulacyjnymi na komórkach prezentujących antygen, powoduje dojrzewanie limfocytów regulatorowych, odpowiedzialnych za stan immunotolerancji. Receptor CTLA-4 ma wyższe powinowactwo do CD80 lub CD86 od CD28, a jego ekspresja przebiega na limfocytach T CD8+ i CD4+ po stymulacji przez TCR [15, 43]. CTLA-4 należy do cząsteczek, które wykazują negatywny model regulacji komórki docelowej i odpowiada za hamowanie aktywności limfocytu T na samym początku jego różnicowania [43, 44, 48].

Początkowo, poszukując alternatywnych metod leczenia nowotworów nie brano pod uwagę receptora CTLA-4, gdyż nie znaleziono go na powierzchni komórek nowotworowych. Jednak po czasie zaobserwowano, że usuwanie sygnałów blokujących prowadzi do wzmocnienia odpowiedzi przeciwnowotworowej. Stwierdzono, że przeciwciała anti-CTLA-4 przyczyniają się do powstawania pamięci immunologicznej przeciwko komórkom nowotworowym [43, 48].

Jednym z preparatów blokujących CTLA-4 jest ipilimumab, który stymuluje aktywację i proliferację limfocytów T oraz poprawia umiejętność infiltrowania tkanki nowotworowej. Ipilimumab wpływa na zwiększenie odsetka aktywowanych

komórek T pomocniczych i cytotoksycznych we krwi obwodowej. Został on zatwierdzony przez FDA w leczeniu czerniaka, ale stosowany jest także w terapii raka płuca [43, 44, 48].

Charakterystyczne dla ipilimumabu jest działanie, zupełnie różne od standardowych cytostatyków. Jego działanie nie jest natychmiastowe lecz występuje po pewnym czasie od podania. Najczęściej ipilimumab stosuje się jako uzupełnienie standardowej chemioterapii w NDRP. Taka strategia jest podyktowana tym, że w wyniku chemioterapii następuje rozpad guza i antygeny nowotworu są uwalniane do środowiska. Zatem, za pomocą ipilimumabu blokuje się immunosupresję, a wzmacnia odpowiedź komórkową we wrażliwym okresie uczulania limfocytów T na antygeny raka płuca [43].

U chorych z zaawansowanym NDRP po ipilimumabie obserwowano poprawę kliniczną. Lek standardowo podawany jest w dawce 10mg/kg wraz z cyklami chemioterapii 3-6. W ogólnym znaczeniu ipilimumab był dobrze tolerowany przez pacjentów, lecz zdarzały się także skutki uboczne: biegunki, zmiany skórne, stany zapalne wątroby oraz jelit, w skrajnych przypadkach dochodziło do infekcji oportunistycznych, w tym zapalenia płuc. We krwi chorych poddanych terapii można było zaobserwować wzrost leukocytów oraz liczby limfocytów T CD4+ i CD8+ [43].

Poprawa kliniczna chorych z niedrobnokomórkowym rakiem płuca była istotna statystycznie i dotyczyła osób, u których wcześniej odstąpiono by od leczenia ze względu na stopień zaawansowania raka. W sumie ipilimumab wykazał duży potencjał terapeutyczny i nawet po zakończeniu podawania obserwowano dodatnie działanie leku i stabilną, prawidłową odpowiedź immunologiczną, a także relatywnie wysoki odsetek przeżywalności [43]. Ciągłe jednak trwają prace nad optymalizacją dawek, tak aby przy minimalnych działaniach niepożądanych uzyskać jak najlepsze działanie przeciwnowotworowe.

3. Podsumowanie

Leki immunosupresyjne znalazły zastosowanie w onkologii jako preparaty mające działanie przeciwnowotworowe. Nie są jednak pozbawione działań niepożądanych, dlatego coraz większy nacisk kładzie się na projektowanie leków działających docelowo tylko na komórki nowotworowe. Przykładem takiego podejścia są przeciwciała monoklonalne. Dzięki postępom czynionym w dziedzinie immunologii i onkologii opracowano innowacyjne metody leczenia z zakresu immunoterapii raka płuca, także z wykorzystaniem metod immunosupresji w mikrośrodowisku guza. Wspomniane w pracy techniki immunoterapii nowotworów są oparte na blokowaniu punktów kontrolnych układu immunologicznego. Terapie z blokowaniem receptorów PD-1 oraz CTLA-4 za pomocą swoistych przeciwciał monoklonalnych są obecnie wykorzystywane w leczeniu chorych z zaawansowanym rakiem płuca. Omawiane podejścia lecznicze wydają się mieć przewagę nad standardowymi metodami. Chemioterapia oraz radioterapia przynoszą w raku płuca ograniczony efekt, niosą też za sobą wiele skutków ubocznych. Ich zasadnicza wada polega uszkodzeniu i zabiciu licznych zdrowych komórek organizmu, obok wywołania śmierci komórek raka. Immunoterapia działa dużo precyzyjniej, dzięki nakierowaniu na swoiste receptory/ligandy, które znajdują się na komórkach nowotworowych lub na limfocytach T. Leczenie immunosupresantami

jest powszechnie dostępne i stosowane w onkologii. Konieczne są jednak dalsze badania, w celu optymalizacji ich działania, szczególnie w raku płuca, który wykazuje relatywnie niską immunogenność.

Z pewnością, w terapii raka płuca ogromny potencjał mają metody łączenia immunoterapii dla różnych punktów kontrolnych, a przede wszystkim wykorzystanie ich blokady. Oczywiście, terapie z wykorzystaniem punktów kontrolnych to nie jedyny obszar badań eksperymentalnych dotyczących raka płuca. Obiecujące próby prowadzone są także z wykorzystaniem wirusów onkolitycznych, jak Adenovirus, Coxsackievirus B3, wirus Seneca Valley, a także szczepionek DNA. Niektóre ze wspomnianych terapii są obecnie szeroko wykorzystywane w klinice onkologicznej, inne wymagają jeszcze przeprowadzenia rzetelnych dodatkowych badań. Na szczęście, nieustający rozwój nauk medycznych daje nadzieję na szybkie opracowanie skutecznych i bezpiecznych metod leczenia.

Literatura

1. Siegel RL., Miller KD., Jemal A., *Cancer statistics*, Cancer J Clin., 65, (2015), s. 5-29.
2. Devesa SS., Bray F., Vizcaino AP., Parkin DM., *International lung cancer trends by histologic type: male:female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising*, Int J Cancer. 117, (2005), s. 294-299.
3. Malhotra J., Jabbour S.K., Aisner J., *Current state of immunotherapy for non-small cell lung cancer*, Transl. Lung Cancer Research, 2, (2017), s. 196-208.
4. Siegel RL., Miller KD., Jemal A., *Cancer statistics, 2016*. CA Cancer J Clin., 66, (2016), s. 7-30.
5. Travis WD., Brambilla E., Noguchi M., *International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma*, Journal Thoracic Oncol., 6, (2011), s. 244-285.
6. Jemal A., Bray F., Center MM., Ferlay J., Ward E., Forman D., *Global cancer statistics*, CA Cancer J Clin., 61, (2011), s. 69-90.
7. Cancer facts and figures.
<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@editorial/documents/document/acspc-044552.pdf> (dostęp online 15.03.2018 r. godz. 18:00)
8. Guo L., Zhang H., Chen B. *Nivolumab as Programmed Death -1 (PD-1) Inhibitor for targeted immunotherapy in tumor*, Journal of Cancer, 8, (2017), s. 410-416.
9. Kordka R., Jassem J., Krzakowski M., *Onkologia – podręcznik dla studentów i lekarzy*. VIA Medica, Gdańska (2006), s. 87-96.
10. Meder J., Podstawy onkologii klinicznej. CMKP, Warszawa 2011, 5-16
11. Pikor LA., Ramnarine VR., Lam S., Lam WL., *Genetic alterations defining NSCLC subtypes and their therapeutic implications*. Lung Cancer, 82, (2013), s.179-189
12. Kim CF., Jackson EL., Woolfenden AE., Lawrence S., Babar I., Vogel S., Crowley D., Bronson RT., Jacks T., *Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer*, Cell, 121, (2005), s. 823-835.
13. Howlander N., Noone AM., Krapcho M., Garshell J., Miller D., Altekruse SF., Kosary CL., Yu M., Ruhl J., Tatalovich Z., Mariotto A., *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012*. Bethesda: National Cancer Institute, (2015).
14. Sun S., Schiller JH., Gazdar AF., *Lung cancer in never smokers--a different disease*, Nat Rev Cancer, 7, (2007), s. 778-790.
15. Domagala-Kulawik J., Osinska I., Hoser G., *Mechanisms of immune response regulation in lung cancer*, Translational Lung Cancer Research, 3, (2014), s. 15-22.

16. Hanahan D., Weinberg RA., *Hallmarks of cancer: the next generation*, Cell, 144, (2011), s. 646-674.
17. Cui S., Dong L., Qian J., Ye L., Jiang L., *Classifying Non-Small Cell Lung Cancer by Status of Programmed Cell Death Ligand 1 and Tumor-Infiltrating Lymphocytes on Tumor Cells*, Journal of Cancer, 9, (2018), s. 129-134.
18. Gajewski TF., Schreiber H., Fu YX., *Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment*, Nat Immunol., 14, (2013), s. 1014-1022.
19. Pardoll DM., *The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy*, Nat Rev Cancer., 12, (2012), s. 252-264.
20. Conway EM., Pikor LA., Kung SH., Hamilton MJ., Lam S., Lam WL., Bennewith KL., *Macrophages, Inflammation, and Lung Cancer*, Am J Respir Crit Care Med., 193, (2016), s. 116-130.
21. Biragyn A., Lee-Chang C., *A new paradigm for an old story: the role of regulatory B cells in cancer*, Front Immunol., 3, (2012), s. 206.
22. Noy R., Pollard JW., *Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy*, Immunity, 41, (2014), s. 49-61.
23. Brandau S., Dumitru CA., Lang S., *Protumor and antitumor functions of neutrophil granulocytes*, Semin Immunopathol., 35, (2013), s. 163-176.
24. Bruno A., Ferlazzo G., Albin A., Noonan DM., *A think tank of TINK/TANKs: tumor-infiltrating/tumor-associated natural killer cells in tumor progression and angiogenesis*, J Natl Cancer Inst, 106, (2014), s. dju200.
25. Domagała-Kulawik J., *The nature of immunological reaction in the peripheral airways of cigarette smokers*, Curr. Respir. Med. Rev., 3, (2007), s. 117-127.
26. Aerts JG., Hegmans JP., *Tumor-specific cytotoxic T cells are crucial for efficacy of immunomodulatory antibodies in patients with lung cancer*, Cancer Res., 73, (2013), s. 2381-2388.
27. Jakóbsiak M. *Immunologia nowotworów*. Immunologia PWN. Warszawa 2007, s. 253-254.
28. Farion S., Carney D., Mulshine J. i wsp. *Heterogeneity of cell surface antigen expression of human small cell lung cancer detected by monoclonal antibodies*, Cancer Res., 46, (1986), s. 2633-2638.
29. Lasek W., Malejczyk J. *Mechanizmy cytotoxyczności limfocytów*. Immunologia PWN. Warszawa 2007, s. 241-249.
30. Bright RK., *Immunology of lung cancer*. Lung Cancer. W&W, (2000), s. 304-318.
31. Radzikowska E., *Zapalenie płuc w immunosupresji – ogólne problemy kliniczne*. Pneumonol. Alergol. Pol., 78, (2010), s. 236-243.
32. Rainiene T., *Immunosuppression in the past and today*. Acta Med Lituanica, 12, (2005), s. 10-17.
33. Ograczyk E., Kowalewicz-Kulbat M., Wawrocki S., Fol W., *Immunosupresja – wymagający sprzymierzeniec na trudne czasy. A review*. Postepy Hig Med. Dosw., 69, (2015), s. 1299-1312.
34. Chwieńko S., Kowal-Bielecka O., Sierakowski S., *Zastosowane cyklofosfamidu w leczeniu pacjentów z twardzią układową*. Postępy Hig. Med. Dośw., 60, (2006), s. 300-306.
35. Haubitz M., *Acute and long-term toxicity of cytophosphamide*, Trans. Med., 19, (2007), s. 26-31.
36. Huyan XH., Lin YP., Gao T., *Immunosuppressive effect cyclophosphamide on white blood cell and lymphocyte subpopulations from peripheral blood of Balb/c mice*. Int Immunol., 11, (2011), s. 1293-1297.
37. Trevillian P., *Immunosuppressants – clinical applications*, Aust. Prescr., 26, (2006), s. 102-108.

38. Rathee P., Chaudhary H., Rathee S., *Immunosuppressants. a Review*, Pharma Innovatio Journal, 1, (2012), s. 90-101.
39. Ciliao HL., Ribeiro DL., Camargo-Godoy RB., *Cytotoxic and genotoxic effects of high concentrations of the immunosuppressive drugs cyclosporine and tacrolimus in MRC-5 cells*, Exp Toxicol Pathol., 67, (2015), s. 179-187.
40. Misiura K., *Leki oksazafosforinawowe. Poszukiwanie nowych pochodnych, badania metabolizmu i stosowanie nowych strategii terapeutycznych*. Postępy Hig. Med. Doś., 58, (2014), s. 463-471.
41. Trefler J., Matyska-Piekarska E., Łącki JK., *Rola cyklofosfamidu w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów i jego powikłań*, Pol. Merkur. Lekarski., 132, (2007), s. 566-570.
42. Szuławska A., Czyż M., *Molekularne mechanizmy działania antracykliny*, Postępy Hig. Dośw., 60, (2006), s. 78-100.
43. Swatler J., Kozłowska E., *Immunoterapie nowotworów działające na punkty kontrolne układu odpornościowego*, Postępy Hig Med. Dośw., 70, (2016), s. 25-42.
44. Krawczyk P., Wojtas-Krawczyk K., *Przeciwciała monoklonalne przeciw immunologicznemu punktowi kontroli w leczeniu chorych na nowotwory*, Onkol Prak Klin., 11, (2015), s. 76-86.
45. Zhang F., Wei H., Wang X., *Structural basis of a novel PD-1 nanobody for immune checkpoint blockade*, Cell Discovery, 3, (2017), s. 1-12.
46. Taube JM., Anders RA., Young GD., *Colocalization of inflammatory response with B7+HL expression In human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape*, Sci. Transl. Med., 4, (2012), s. 127-137.
47. Pirker R., *Milestones in the systemic treatment of lung cancer*, Memo, 10, (2017), s. 22-26.
48. Buque A., Bloy N., Aranda F., *Trial watch: Immunomodulatory monoclonal antibodies for oncological indications*, OncoImmunology, 4, (2015), s. 1-16.

Immunosupresja a rak płuca

Streszczenie

Immunosupresja to wyjątkowy stan, w którym dochodzi do osłabienia lub zahamowania prawidłowej odpowiedzi immunologicznej. Stan ten dotyczy odpowiedzi zarówno humoralnej jak i komórkowej, może mieć charakter nabyty lub rzadziej wrodzony. Prowadzi między innymi do zmiennych niedoborów poszczególnych klas przeciwciał (IgA, IgG), a także spadku liczby oraz dysfunkcji komórek T. Leczenie immunosupresyjne znalazło zastosowanie w transplantologii, a także w onkologii. Wówczas wymierzone jest w komórki nowotworowe. W przypadku leczenia onkologicznego zastosowanie znalazło dzięki temu, że nowotwór, np. rak płuca, jest zdolny do wytworzenia w mikrośrodowiska immunosupresyjnego, które łączy różne elementy zapalenia, pobudzenia i hamowania układu immunologicznego. Terapie immunosupresyjne w raka płuca są szczególnie obiecujące, ze względu na częstotliwość występowania, wysoką śmiertelność i słabą immunogenność. Dostępne są techniki leczenia wykorzystujące blokadę tzw. punktów kontrolnych układu odpornościowego. I tak, PD-1 jest receptorem śmierci obecnym na limfocytach T, wykorzystywanym przez guza do indukcji apoptozy komórek układu immunologicznego. Komórki CD4+CTLA-4+ pełnią w mikrośrodowisku guza czynności regulatorowe i hamują odpowiedź układu odpornościowego. Potwierdzono jak dotąd skuteczność działających immunosupresyjnie przeciwciał monoklonalnych anty-CTLA-4 i anty-PD-1 w zaawansowanym niedrobnokomórkowym raku płuca. Są stosowane w monoterapii lub (zwłaszcza anty-CTLA-4) w połączeniu z cytostatykami.

Słowa kluczowe: rak płuca, immunosupresja, PD-1, CTLA-4.

Immunosuppression and lung cancer

Abstract

Immunosuppression is a unique state which leads to decreasing or inhibition of an immune response. This state concerns both humoral and cellular responses, it is usually acquired or infrequently congenital disorder. Disturbances in antibody production (different classes, e.g. IgA and IgG), either alterations in T cell number and/or function occur. Immunosuppressive treatment has been largely used in transplantology and oncology. In the later it is directed against tumor cells. Considering oncology treatment it has been applied due to the fact that tumor, for example lung cancer, is able to generate locally immunosuppressive microenvironment combining various elements of inflammation, immune activation and immune inhibition. Immunosuppressive therapies in lung cancer are especially promising, since the disease is frequent, with high mortality rate and low level of immunogenicity. Nevertheless, treatment therapies based on blockade of so-called immune check-points is currently available. Thus, PD-1 is a death receptor expressed on T lymphocytes, used by tumor to induce immune system cell apoptosis. CD4+CTLA-4+ cells are active in tumor microenvironment as regulatory cells and inhibit local immune response.

The efficacy of immunosuppressive monoclonal antibodies anti-CTLA-4 and anti-PD-1 has been already proven in advanced non-small cell lung cancer. The antibodies are used in monotherapy or combined with other anti-neoplastic therapy, for example with cytostatic drugs (especially anti-CTLA-4).

Keywords: lung cancer, immunosuppression, PD-1, CTLA-4.

Szczepionki nowej generacji

1. Wprowadzenie

Najstarsze doniesienia na temat stosowanych metod immunizacji sięgają X wieku naszej ery, kiedy to w Chinach zwalczano ospę poprzez wdychanie niskich dawek materiału biologicznego izolowanego z ran chorych na ospę pacjentów. Mimo to, pierwsza szczepionka przeciwko ospie prawdziwej została opracowana dopiero pod koniec XVIII wieku w wyniku badań przeprowadzonych przez Edwarda Jenner'a. Badacz ten zaobserwował, że osoby zaszczepione wirusem krowiej ospy są zabezpieczone przed zachorowaniem na ospę prawdziwą. Dalsze prace nad zastosowaniem szczepionek zaowocowały wprowadzeniem przez Richarda Dunninga do terminologii naukowej określenia „wakcynacja”, które pochodzi od łacińskiego słowa „vacca” czyli krowa i obecnie oznacza zabieg polegający na wprowadzeniu do organizmu żywego zabitych lub żywych patogenów o osłabionej zjadliwości w celu wytworzenia przeciwciał do likwidacji prezentowanych przez nie antygenów [1, 2]. W XIX wieku motorem napędowym rozwoju wakcynologii były odkrycia ojców mikrobiologii lekarskiej tj. Ludwika Pasteura – twórcy szczepionki przeciwko wścieklicznie oraz Roberta Kocha – odkrywcy prątków gruźlicy. Późniejszy rozwój badań i upowszechnienie szczepień spowodowało, że w latach siedemdziesiątych ubiegłego stulecia Światowa Organizacja Zdrowia wprowadziła rozszerzony program immunizacji o charakterze globalnym. Pomimo licznych sukcesów na polu wakcynologii w dalszym ciągu poszukiwane są nowe metody szczepień oraz nowe szczepionki. Obecnie wiele badań koncentruje się wokół szczepionek tzw. nowej generacji spośród których wyróżnia się: szczepionki oparte o rekombinowane antygeny, szczepionki DNA, szczepionki pochodzenia roślinnego oraz szczepionki wektorowe. W pracy tej przedstawiono charakterystykę, mechanizm działania wyżej wymienionych szczepionek nowej generacji oraz przykłady ich wykorzystania. Niniejsza praca oparta jest na analizie literatur.

2. Szczepionki oparte o rekombinowane antygeny

Szczepionki oparte o rekombinowane antygeny, tzw. rekombinowane szczepionki podjednostkowe, wykorzystują zdolność jednego lub kilku określonych antygenów do wywołania odporności przeciwko patogenowi. Wprowadzane są one zazwyczaj w obecności substancji wspomagających, zwanych adiuwantami [3]. Rekombinowane formy białek drobnoustrojów, ważnych zarówno z punktu widzenia patogenezy wywoływanych przez nie chorób, jak i wzbudzanych swoistych mechanizmów odporności humoralnej i komórkowej, stanowią komponent antygenowy takich preparatów. Niewątpliwą zaletą stosowania rekombinowanych szczepionek podjed-

¹ olgakuzmycz@gmail.com, Uniwersytet Łódzki, Katedra Cytobiochemii, ul. Pomorska 141/143, bud. D, Łódź, 90-236

² paulina.machala.wp.pl@wp.pl, Uniwersytet Łódzki, Katedra Cytobiochemii, ul. Pomorska 141/143, bud. D, Łódź, 90-236

nostkowych jest możliwość czynnego indukowania odporności przy ograniczonych do minimum skutkach ubocznych [4].

Do produkcji białek rekombinowanych, które stanowią główny element składowy szczepionki, wykorzystywane są m.in. bakteryjne i drożdżowe systemy ekspresyjne. Od wyboru szczepu gospodarza, w komórkach którego zachodzi wytwarzanie antygeny szczepionkowego, zależy sukces całego procesu. Jest to ważne, ponieważ może to wpłynąć na translację transkrypty białka [5]. Po raz pierwszy rekombinowane ludzkie białko wyprodukowano w komórkach *Escherichia coli* i od tego czasu wiele leków (hormony, czynniki wzrostu, interferony), które zostały otrzymane właśnie tą drogą, zostało zastosowanych w leczeniu ludzi. Przygotowanie antygeny rekombinowanego rozpoczyna się od wklonowania genu kodującego porządane białko do wektora ekspresyjnego, pod kontrolą promotora regulującego jego ekspresję. Plazmid taki jest następnie transformowany do komórek *E. coli*, gdzie ulega ekspresji. Aktywność promotora jest regulowana poprzez zastosowanie chemicznego induktora, który stymuluje ekspresję wprowadzonego genu i tym samym syntezę rekombinowanego antygeny [6]. Często do produkcji białek rekombinowanych są wykorzystywane także drożdże, ponieważ taki system ekspresyjny jest ekonomicznie opłacalny. W systemie tym komórki gospodarza szybko się namnażają, a białko wytwarzane jest z wysoką wydajnością. *Saccharomyces cerevisiae* to pierwszy i najlepiej poznany system drożdży wykorzystywanych w celu otrzymywania rekombinowanych antygenów. Z zastosowaniem *S. cerevisiae* jako gospodarza, wyprodukowana została m.in. szczepionka przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B [5]. Szczepionki podjednostkowe są najczęściej oparte na białkach, peptydach lub polisacharydach, które zawierają immunogenne epitopy, wzbudzające odpowiedź układu immunologicznego. Jednym z największych problemów podczas produkcji tego typu szczepionek jest identyfikacja właściwego antygeny, który będzie rozpoznawany zarówno przez przeciwciała neutralizujące i receptory obecne na powierzchni limfocytów B, a także, w kompleksie z cząsteczkami MHC (*Major Histocompatibility Complex*), będzie prezentowany limfocytom T. Duże znaczenie w tego typu szczepionkach ma także dobranie odpowiedniego nośnika, który nie tylko umożliwi optymalną prezentację antygeny, ale także wydłuży czas jego ekspozycji. Niektóre antygeny wprowadzane wraz z białkiem nośnikowym indukują odpowiedź immunologiczną charakteryzującą się znacznie wyższym mianem przeciwciał oraz gwarantują lepszą pamięć immunologiczną [7].

2.1.1. Adiuwanty stosowane w szczepionkach rekombinowanych

Biorąc pod uwagę właściwości adiuwantów, ich zastosowanie w przypadku szczepionek podjednostkowych pozwala na zmniejszenie dawki wprowadzonego antygeny. Jest to istotna część składowa rekombinowanych szczepionek podjednostkowych, a ich główną funkcją jest nasilenie i ukierunkowanie swoistej odpowiedzi immunologicznej na antygeny szczepionkowe [7]. Jednym z najpowszechniej stosowanych adiuwantów jest wodorotlenek glinu, silnie aktywujący mechanizmy odpornościowe typu Th2 (ang. *T helper cells*). Został on zastosowany m.in. w szczepionce przeciwko błonnicy, tężcowi i krztuściowi, a także w szczepionkach przeciwko wirusowi brodawczaka ludzkiego i wirusowemu zapaleniu wątroby [7, 8]. Obecnie dużym zainteresowaniem cieszą się zaliczane do klasycznych adiuwantów

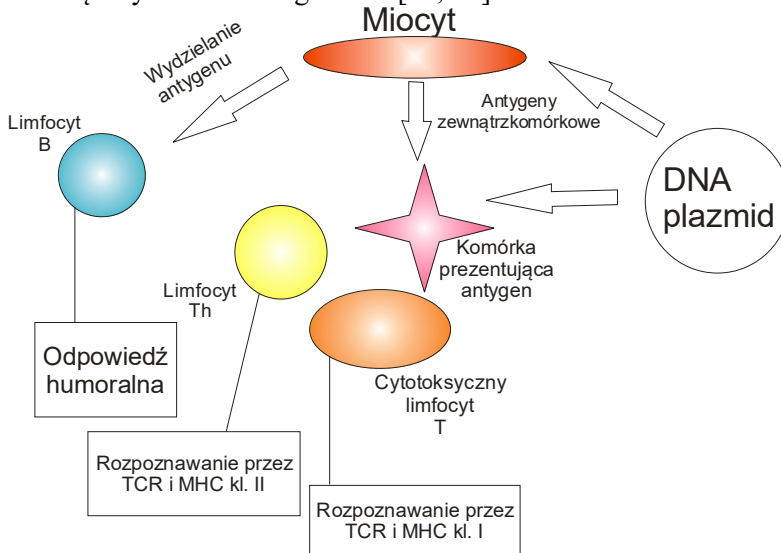
ligandy receptorów rozpoznających wzorce, tzw. receptorów PRR (*Pattern Recognition Receptors*). Ligandy te wspomagają przede wszystkim odpowiedź immunologiczną typu Th2, ale prowadzone są intensywne badania zmierzające do opracowania ligandów, które głównie aktywowałyby mechanizmy typu Th1. Takie adiuwanty mogłyby znaleźć zastosowanie w szczepionkach przeciwko AIDS, malarii, wirusowemu zapaleniu wątroby czy grypie. Na przykład, jako ligand dla receptora TLR3 (*Toll-like Receptor*) stosowany jest syntetyczny analog dwuniciowego (ds) RNA, tzw. poli (I:C), czyli kwas poliinozynowo-policytydylowy, który indukuje wytwarzanie interleukiny 12 (IL-12) i interferonów typu I. Ułatwia on w ten sposób prezentację antygenów w kontekście cząsteczek MHC klasy II, a także wspomaga powstawanie cytotoksycznych limfocytów T. Z kolei bakteryjne liposacharydy wykorzystywane są jako ligandy dla receptora TLR4. Mając jednakże na uwadze właściwości pirogenne LPS, nie wiąże się nadziei z ich zastosowaniem klinicznym. Poszukiwanie mniej toksycznej pochodnej LPS doprowadziło do opracowania MPLA (monofosforylowy lipid A), który w połączeniu z wodorotlenkiem glinu, aktywuje odpowiedź immunologiczną typu Th1. Właściwości adiuwantowe wykazuje także ligand dla receptora TLR5, którym jest bakteryjna flagelina. Posiada ona zdolność do indukowania mieszanej odpowiedzi immunologicznej typu Th1/Th2. Bardzo obiecujące wyniki w badaniach przedklinicznych otrzymano dla imidazochinolonów będących ligandami dla receptorów TLR7 i TLR8. Związki te charakteryzują się potencjalnymi właściwościami adiuwantowymi, które prowadzą do aktywacji komórek dendrycznych i wytwarzania cytokin prozapalnych typu Th1, IFN- γ i IL-12. Oligonukleotydy, zawierające motywy CpG, są rozpoznawane przez receptory TLR9 i przyczyniają się one do nasilenia produkcji przeciwciał i silnej indukcji odpowiedzi typu Th1 [8].

3. Szczepionki DNA

Szczepionki DNA zawierają plazmidy z wklonowanymi genami kodującymi immunologicznie istotne antygeny wirusów, bakterii lub pasożytów, w przypadku chorób infekcyjnych, lub też białka ssaków, w przypadku chorób nieinfekcyjnych takich jak nowotwór, choroby autoimmunologiczne czy alergie [9]. Plazmidy ekspresyjne wykorzystywane do konstruowania szczepionek DNA posiadają promotory wirusowe, np. cytomegalowirusa czy wirusa SV40 [10]. Charakteryzują się wieloma zaletami w porównaniu z innymi technikami szczepienia zarówno z punktu widzenia bezpieczeństwa, jak i stabilności i immunogenności. Szczepionki DNA wprowadzane są zazwyczaj domięśniowo, a ich mechanizm działania polega na penetracji plazmidowego DNA wraz z wprowadzonym genem do jądra komórkowego miocytu, co warunkuje procesy transkrypcji i translacji transgenów przez komórki docelowe. Następstwem tego jest ekspresja białka, które po wydzieleniu z miocytu inicjuje odpowiedź układu odpornościowego [11].

W odróżnieniu od szczepionek, które zawierają w sobie zabite albo atenuowane patogeny, szczepionki DNA, podobnie jak rekombinowane szczepionki podjednostkowe, pozbawione są patogenności, co pozwala na ich bezpieczne stosowanie. Oprócz tego, jak wykazały liczne badania doświadczalne, efektywnie aktywują one wrodzone i swoiste mechanizmy odpornościowe warunkowane wytworzeniem antygenowo-swoistych przeciwciał, a także powstawaniem pomocniczych i cytotok-

sycznych limfocytów T (Rys.1) [11]. Ponadto, szczepionki DNA wyróżniają się dużą „elastycznością”, związaną z możliwością wprowadzenia do jednego plazmidu ekspresyjnego kilku różnych genów kodujących, np. antygeny wirusowe i bakteryjne oraz immunologicznie i biologicznie aktywne białka. Są to tzw. wielogenowe lub poliwalentne szczepionki DNA. Obecnie są prowadzone badania nad szczepionkami DNA drugiej generacji, które wykazują większy procent odpowiedzi komórkowej i humoralnej zarówno w małym, jak i w dużym modelu zwieręcym. Co ciekawe, badania sugerują o możliwości wykorzystania tego typu szczepionek do aktywacji CTL (CD81 cytotoksyczne komórki T) oraz zwiększenie wydajności pobierania plazmidu, co zwiększy ich immunogenność [11, 12].



Rys. 1. Schemat mechanizmu działania szczepionek DNA

4. 4. Szczepionki pochodzenia roślinnego

Pierwsze propozycje wykorzystania roślin transgeniczných jako alternatywnego systemu do produkcji białek terapeutycznych powstały ponad dwadzieścia lat temu. We wczesnych latach 90-ch ubiegłego wieku trzy grupy badawcze, kierowane przez Charles'a Arntzena, Hilary Koprowski i Roy'a Curtiss'a, rozpoczęły pracę nad konstrukcją szczepionek pochodzenia roślinnego. Pierwsza na świecie licencjonowana szczepionka, wykorzystująca system roślin transgeniczných, pojawiła się w roku 2006, w USA. Szczepionka ta została opracowana w Dow Agrosiences LLC i był to preparat przeciwko wirusowi rzekomego pomoru drobiu (NDV – *Newcastle Disease Virus*). Do przygotowania tej szczepionki zastosowano komórki transgenicznego tytoniu, które hodowano *in vitro* w przystosowanym bioreaktorze. Taki model hodowli umożliwił otrzymanie dużych ilości antygeny szczepionkowego, który podawano podskórnie ptactwu. Na przestrzeni wielu lat dzięki zastosowaniu roślin transgeniczných, otrzymano wiele preparatów terapeutycznych i diagnostycznych, takich jak interferon alfa (IFN- α) (leczenie przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C), glukocerebrozydaza (leczenie choroby Gauchera) czy

przeciwciała, wykorzystywane zarówno diagnostycznie, jak i w leczeniu chorób nowotworowych, chorób przenoszonych drogą płciową czy próchnicy zębów [13].

Wyjściową ideą konstruowania roślin transgenicznych było dążenie do opracowania tzw. szczepionek jadalnych, których droga podawania polegałaby na zjedzeniu warzywa czy owocu. Obecnie białka szczepionkowe wykorzystywane są dopiero po ich dokładnym oczyszczeniu, a tzw. surowe szczepionki jadalne są nieosiągalną technologią. Dużym utrudnieniem do stosowania nie tylko jadalnych szczepionek, ale i jadalnych farmaceutyków proteinowych ogólnie, jest przedwczesne trawienie białka w układzie pokarmowym, zwykle przed jego działaniem. Dlatego też dostarczenie antygeny w ilości niezbędnej do aktywacji układu immunologicznego może wymagać podania dużej ilości materiału szczepionkowego w celu zrekompensowania strat. Mimo wszystko roślinne komórki są najkorzystniejsze do sporządzenia szczepionek doustnych, ponieważ ich sztywna ściana komórkowa zapewnia należną ochronę antygeny przed trawieniem w żołądku i jelicie. Ponadto, szczepionki jadalne roślinne są wysoce stabilne, nie zawierają patogenów i mogą być zaprojektowane tak, aby zawierały wiele antygenów. Uważa się, że doustny typ szczepienia może skutecznie indukować humoralną i komórkową odporność ogólnoustrojową, a oprócz tego eliminuje dyskomfort i ból związany z iniekcją [13, 14]. Błony śluzowe przewodu pokarmowego stanowią jedną z głównych dróg penetracji czynników potencjalnie patogennych. W obrębie błon śluzowych dominującą rolę pełni związany z nimi układ odpornościowy, którego morfologiczną składową stanowią skupiska grudek limfatycznych i grudki limfatyczne samotne, określane wspólną nazwą MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue*) czyli tkanki limfatycznej związanej z błonami śluzowymi. Tkanka ta jest szczególnie dobrze rozwinięta w jelitach i nosi nazwę GALT (*gut-associated lymphoid tissue*), czyli tkanki limfatycznej w obrębie przewodu pokarmowego. Najważniejszą funkcją tkanki limfatycznej błon śluzowych jest wytwarzanie wydzielniczych przeciwciał IgA, które działają bakteriostatycznie, neutralizują toksyny bakteryjne, opłaszczają i aglutynują mikroorganizmy oraz zapobiegają wniknięciu drobnoustrojów patogennych wgłąb tkanek. Miejscem indukcji odpowiedzi immunologicznej w obrębie przewodu pokarmowego są głównie kępkę Peyera, które są miejscem występowania komórek M. Podstawową funkcją komórek M jest wychwytywanie makrocząsteczek i mikroorganizmów ze światła jelita i przenoszenie ich do regionu podnabłonkowego. Dzięki obecności na powierzchni komórek M glikokaliksu, który zawiera reszty cukrowe reagujące specyficznie ze składnikami ścian niektórych bakterii, proces ten jest ułatwiony. Po przetransportowaniu antygeny, za pośrednictwem komórek M, zachodzi prezentowanie makrocząsteczek limfocytom, które poprzedzone jest dodatkową „obróbką” antygeny w makrofagach błony śluzowej. W indukcji odpowiedzi immunologicznej mogą uczestniczyć również komórki dendrytyczne, wypuszczające wypustki do światła jelita [15].

5. Szczepionki wektorowe

Wirusy lub bakterie mogą być wykorzystywane jako wektory, czyli nośniki antygenów szczepionkowych. Szczepionkę wektorową sporządza się przez wbudowanie do genomu nośnika genów kodujących antygeny innego patogenu, np. bakterii lub wirusa. Główna idea polega na wstawieniu genów do wektorów nie chorobotwórczych lub atenuowanych i produkcji szczepionkowych białek antygenowych przez komórki wektora, co inicjuje szybką odpowiedź immunologiczną immunizowanego gospodarza. Główną wadą szczepionek wektorowych jest to, że sam nośnik genów może indukować mechanizmy odpornościowe u szczepionego osobnika, a powstałe swoiste przeciwciała mogą neutralizować sam wektor i tym samym ograniczać jego efektywność do ekspresji wprowadzanych genów [16].

Większość wektorów wirusowych, które mogą być wykorzystane do stworzenia szczepionki wektorowej opiera się na atenuowanych adenowirusach lub zmodyfikowanym wirusie Ankara (MVA). Przykładami takich szczepionek mogą być preparaty zawierające adenowirus 35 i 5, które przeznaczone są do indukowania odporności przeciwko gruźlicy i znajdują się obecnie w trakcie badań klinicznych [17]. Poszukiwane są także metody, które umożliwią wykorzystanie Pokswirusów (np. wirus ospy prawdziwej), jako wektorów szczepionki przeciwko wirusowi HIV [18]. Szczepionki wektorowe dostarczają antygen do komórek prezentujących antygen (APC) z wykorzystaniem organizmów naturalnie zdolnych wnikać w komórkę eukariotyczną i najsukuteczniej indukują one komórkowe mechanizmy odporności, a co najważniejsze, odpowiedź cytotoksycznych limfocytów T. Dodatkowo komórki APC promują fagocytozę zainfekowanych komórek, co nasila prezentację antygeny. Większość wektorów wirusowych to atenuowane adenowirusy, które dzięki swojej zdolności do replikacji w komórkach ludzkich warunkują wydłużenie ekspresji antygeny szczepionkowego i jego prezentację przez komórki APC. Przyczynia się to do powstawania silnej swoistej odpowiedzi humoralnej i komórkowej. Z kolei wektory wirusowe, które oparte są na zmodyfikowanym niereplikującym wirusie Ankara, wykazują duży potencjał do indukcji limfocytów T CD4⁺. Wektory bakteryjne natomiast, są zdolne do naśladowania naturalnej infekcji, prowadzącej do stymulacji niespecyficznego odpowiedzi prozapalnej i antygenowo swoistej odpowiedzi komórkowej. Zaletą wektorowych nośników antygenowych jest to, że mogą one być zaprojektowane w sposób wywołujący odporność przeciw własnym lub eksprymowanym heterologicznie antygenom [17].

6. Aktualne badania oraz nowe metody szczepień

W XXI wieku głównym punktem zainteresowania immunoprofilaktyki jest zapobieganie takim chorobom zakaźnym jak AIDS, gruźlica czy malaria. Przewiduje się, iż tradycyjne szczepionki nie będą raczej skuteczne w eliminacji infekcji powodowanych przez te patogeny [3]. Dlatego też cały czas są opracowywane nowe strategie immunizacji, a naukowcy próbują jak najlepiej poznać wzajemne interakcje pomiędzy patogenem a układem immunologicznym gospodarza. W nowoczesnych szczepionkach wykorzystuje się m.in. rekombinowane białka i nanocząsteczki (SARS-CoV, MERS-CoV), syntetyczne peptydy (szczepionka przeciwko wirusa grypy), wirusopodobne cząstki zaopatrzone w antygeny (szczepionka przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby), wektory wirusowe (szczepionka przeciwko gorączce doliny Rift), rekombinowane bakterie z rodzaju *Salmonella* i *Listeria*,

a także szczepionki DNA (szczepionka przeciwko wirusowi Ebola, denga, gorączce doliny Rift) [2].

Synteza peptydów na drodze chemicznej otworzyła nowe możliwości dla opracowania szczepionek, w których antygenem są peptydy zbudowane od 2 do 100 aminokwasów. Takie szczepionki mogą zawierać antygeny samodzielne lub w połączeniu z epitopami limfocytów T i B. Postęp dotyczący zrozumienia struktury peptydów i możliwości ich zastosowania w szczepionkach, związany jest z pojawieniem się nowych technik badawczych, np. magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), modelowania molekularnego i krystalografii X-ray. Liczne szczepionki na bazie peptydów wykazały swoją skuteczność w badaniach preklinicznych na ludziach, ale niestety nadal istnieje wiele przeszkód do ich pełnego klinicznego wykorzystania. Opracowano także eksperymentalne preparaty zawierające antygeny połączone z cząsteczkami stałymi, tzw. system ISCOM, czyli system kompleksów immunostymulujących. Obejmuje on adiuwant Quil w niskim stężeniu oraz peptydy i charakteryzuje się podwyższoną immunogennością antygeny. Za szczególnie obiecujące uważa się szczepionki wykorzystujące nanocząsteczki, cząstki wirusopodobne, wyhodowane *ex vivo* komórki dendryczne wywodzące się z monocytów, a także ukierunkowane „dostarczanie” antygenów do receptorów komórek dendrycznych, takich jak receptory dla lektyn typu C, receptor mannozowy, receptory zmiatacze (*scavenger receptors*) czy receptory dla fragmentu Fc przeciwciał.

W ostatnich latach zwiększyło się również zainteresowanie receptorami Toll-like (TRL) jako cząsteczkami docelowymi i stymulacją komórek dendrycznych (DCs) poprzez aktywację tych receptorów. Z zastosowaniem mysiego modelu doświadczalnego zaobserwowano m.in., iż ligandy receptorów TLR aktywują komórki dendryczne i indukują odpowiedź immunologiczną. Nadal jednak niewiadomo czy taka szczepionka będzie wywierała równie korzystny efekt na ludzi. Silną odpowiedź układu odpornościowego zaobserwowano także z wykorzystaniem antygenów dla receptorów chemokinowych na komórkach dendrycznych. Ponadto, badano toksyny bakteryjne i peptydy komórek dendrycznych wiążące docelowe antygeny bez angażowania receptorów komórek dendrycznych. Obecnie poszukuje się nowych metod dostarczania szczepionek opartych o atenuowane wektory bakteryjne, nanocząstki, nośniki syntetyczne czy podjednostkę B toksyny produkowanej przez *Vibrio cholerae* [19].

7. Podsumowanie

Najwcześniejsze metody immunizacji sięgają X wieku naszej ery. Dotyczyły one zwalczania ospy w Chinach i polegały na wdychaniu niskiej dawki materiału izolowanego z rany chorego. W dziewiętnastym wieku pędem dla rozwoju wakcynologii stały się odkrycia ojców mikrobiologii lekarskiej – Ludwika Pasteura, twórcy szczepionki przeciwko wścieklicznie, i Roberta Kocho, który był odkrywcą prątków gruźlicy. W latach siedemdziesiątych ubiegłego stulecia wprowadzony został przez Światową Organizację Zdrowia rozszerzony program immunizacji o charakterze globalnym. Obecnie są poszukiwane nowe metody szczepień i nowe szczepionki. Największe zainteresowania naukowców wzbudziły szczepionki nowej generacji, m. in. szczepionki oparte o rekombinowane antygeny, szczepionki DNA, szczepionki pochodzenia roślinnego oraz szczepionki wektorowe. Niniejsza praca jest oparta na analizie literatury.

Literatura

1. Sánchez-Sampedro L., Perdiguero B., Mejías-Pérez E., García-Arriaza J., Di Pilato M., Esteban M., *The Evolution of Poxvirus Vaccines*. *Viruses*, 7: 1726-1803, 2015.
2. Hussein I. H., Raad M., Chams N., Gerges-Geagea A., Chams S., Leone A., Sayegh S., Jurjus A., Badran R., *Vaccines Through Centuries: Major Cornerstones of Global Health*. *Frontiers Public Health*, 3:269, 2015.
3. Nascimento I.P., Leite L.C.C., *Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45:1102-1111, 2012.
4. Hansson M., Nygren P.A., Ståhl S., *Design and production of recombinant subunit vaccines*, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 32: 95-107, 2000.
5. Çelik E., Çalik P., *Production of recombinant proteins by yeast cells*. *Biotechnology Advances*, 30:1108-1118, 2012.
6. Overton T. W., *Recombinant protein production in bacterial hosts*. *Drug Discovery Today*, 19: 5, 2014.
7. Jarzab A., Skowicki M., Witkowska D., *Szczepionki podjednostkowe –antygeny, nośniki, metody koniugacji i rola adiuwantów*. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 67: 1128-1143, 2013.
8. Chodaczek G., *Adiuwanty jako czynniki podnoszące skuteczność szczepionek*. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 58: 47-59, 2004.
9. Arce-Fonseca M., Rios-Castro M., Carrillo-Sánchez S. D., Martínez-Cruz M., Rodríguez-Morales O., *Prophylactic and therapeutic DNA vaccines against Chagas disease*. *Parasites & Vectors*, 8:121, 2015.
10. Jedlina-Panasiuk L., *Próby wykorzystania szczepionek genetycznych przeciwko helmintom* *Kosmos problemy nauk biologicznych*, 54: 123-130, 2005.
11. Bastos P. V., Zurita-Turk M., Luerce Saraiva T. D., Prósperi De Castro C., Mendes Souza B., Mancha Agresti P., Alvarenga L. F., Pfeiffer V. N., Santiago Pacheco Azevedo M., Santos Rocha C., Santos Pontes D., Azevedo V., Miyoshi A., *DNA Vaccines Approach: From Concepts to Applications*, *World Journal of Vaccines* 4:50-71, 2014.
12. Kutzler M.A., Weiner D.B., *DNA vaccines: ready for prime time?* *Nature Reviews Genetics*, 9:776-788, 2008.
13. Thomas D. R., Penney C. A., Majumder A., Walmsley A. M., *Evolution of Plant-Made Pharmaceuticals*, *International Journal of Molecular Sciences*, 12:3220-3236, 2011.
14. Kwon K., Verma D., Singh D. N., Herzog R., Daniell H., *Oral delivery of human biopharmaceuticals, autoantigens and vaccine antigens bioencapsulated in plant cells*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65:782–799; 2013.
15. Gołąb J., Jakóbiśiak M., Lasek W., Grzesiowski P., Hryniewicz W., *Immunologia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, ss 359, 287-292, 2006.
16. Tomczyk T., Orzechowska B., *Zastosowanie wirusa pęcherzykowatego zapalenia jamy ustnej (VSV) jako wektora szczepionek przeciwvirusowych*. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 67: 1345-1358, 2013.
17. Roeske K., Stachowiak R., Bielecki J., *Założenia i perspektywy wykorzystania żywych wektorów bakteryjnych we współczesnej wakcynologii*. *Postępy Mikrobiologii*, 55:27-44, 2016.
18. Choi Y., Chang J., *Viral vectors for vaccine applications*. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 2:97-105, 2013.
19. Apostolopoulos V., *Vaccine Delivery Methods into the Future*. *Vaccines* 4:9, 2016.

Szczepionki nowej generacji

Streszczenie

W latach siedemdziesiątych ubiegłego stulecia wprowadzony został przez Światową Organizację Zdrowia rozszerzony program immunizacji o charakterze globalnym. Obecnie są poszukiwane nowe metody szczepień i nowe szczepionki. Nawiększe zainteresowania naukowców wzbudziły szczepionki nowej generacji, m. in. Szczepionki oparte o rekombinowane antygeny, szczepionki DNA, szczepionki pochodzenia roślinnego oraz szczepionki wektorowe. W prezentowanej pracy przedstawiono charakterystykę i mechanizm działania szczepionek nowej generacji wyżej wymienionych oraz przykłady ich wykorzystania. Nieniejsza praca jest oparta na analizie literatur.

Słowa kluczowe: szczepionki, adiuwanty, szczepionki DNA, szczepionki wektorowe, szczepionki jadalne.

Vaccines of new generation

Abstract

In the seventies of the last century the World Health Organization was started the expanded global program of immunization. Nowadays new methods and new vaccines are searching. The highest interest arouses the vaccines of new generation, including vaccines based on recombinant antigens, DNA vaccines, plant-derived vaccines and vector vaccines. In the paper there are presented the characteristics and mechanism of action of vaccines of new generation, which are mentioned, and the examples of their use. This paper is based on the analysis of literature.

Keywords: vaccines, adjuvants, DNA vaccines, virus – vectored vaccines, edible vaccines.

Zaburzenia metabolizmu tryptofanu w patogenezie chorób sercowo-naczyniowych

1. Wstęp

Zarówno w Polsce jak i na świecie choroby układu sercowo-naczyniowego stanowią, od wielu lat, najczęstszą przyczynę zgonów, co może być związane ze zwiększającą się częstością występowania m.in. nadciśnienia, otyłości, dyslipidemii i cukrzycy. Zaburzenia te są najczęściej spowodowane miażdżycą będącą wynikiem występowania długotrwałego, przewlekłego zapalenia w ścianie naczyń krwionośnych. W ostatnich latach zwrócono uwagę, że zarówno katabolity tryptofanu jak i enzymy, a zwłaszcza 2,3-dioksygenaza indolaminy (IDO), katalizujący kluczowy etap degradacji tryptofanu na drodze szlaku kinureninowego, mogą być aktywowane przez stan zapalny w wielu tkankach, w tym w ścianie tętnicy. U osób cierpiących na niektóre choroby sercowo-naczyniowe zauważono zmiany stężeń poszczególnych kinurenin w osoczu w porównaniu z osobami zdrowymi. Może to stanowić dodatkowy potencjalny czynnik ryzyka występowania chorób sercowo-naczyniowych.

2. Tryptofan

Tryptofan (TRP) jest jednym z aminokwasów egzogennych niezbędnych do syntezy białek. Organizm ludzki nie jest w stanie go sam zsyntetyzować, stąd musi być dostarczany wraz z pożywieniem. Do jednych z najbogatszych źródeł pokarmowych tego aminokwasu należą m.in: ryby, nabiał, drób, pestki dyni, słonecznika, nasiona sezamu, siemię lniane, orzechy, płatki owsiane, kakao i brokuły [1]. W normalnych warunkach tryptofan ulega przemianie m.in. do 5-hydroksytyraminy, melatoniny i serotoniny (5-HT). W stresie i nadmiernej obecności cytokin prozapalnych oraz glikokortykosteroidów, szlak metabolizmu tryptofanu ulega zmianie na szlak kinureninowy (KP). W tych warunkach blisko 94% całkowitej puli tryptofanu jest metabolizowane na jego drodze [2]. Również niedobór witaminy B₆ może prowadzić do zaburzeń przemiany tryptofanu, zwiększając stężenie jego metabolitów w ustroju [3].

3. Szlak kinureninowy (*kinurenine pathway*, KP)

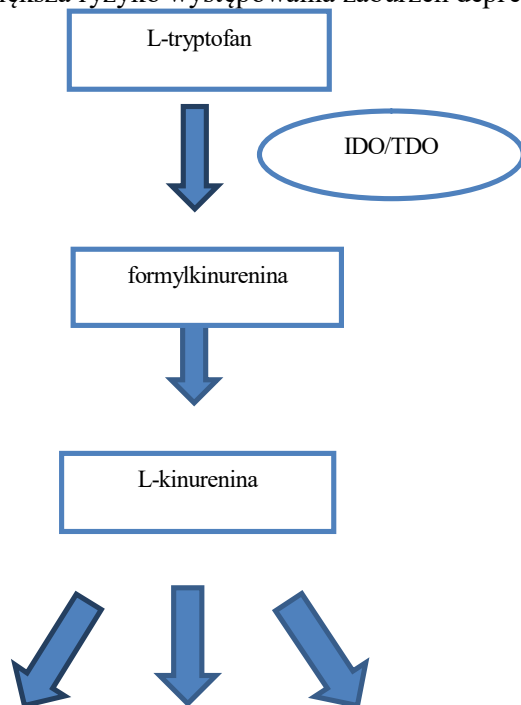
Najważniejszą podstawową funkcją szlaku kinureninowego zachodzącego w wątrobie jest wytwarzanie NAD⁺ (najważniejszego kofaktora redoks). Metabolizm tryptofanu szlakiem kinureninowym prowadzi do powstania wielu pośrednich i aktywnych metabolitów, które mogą wykazywać względem siebie działanie

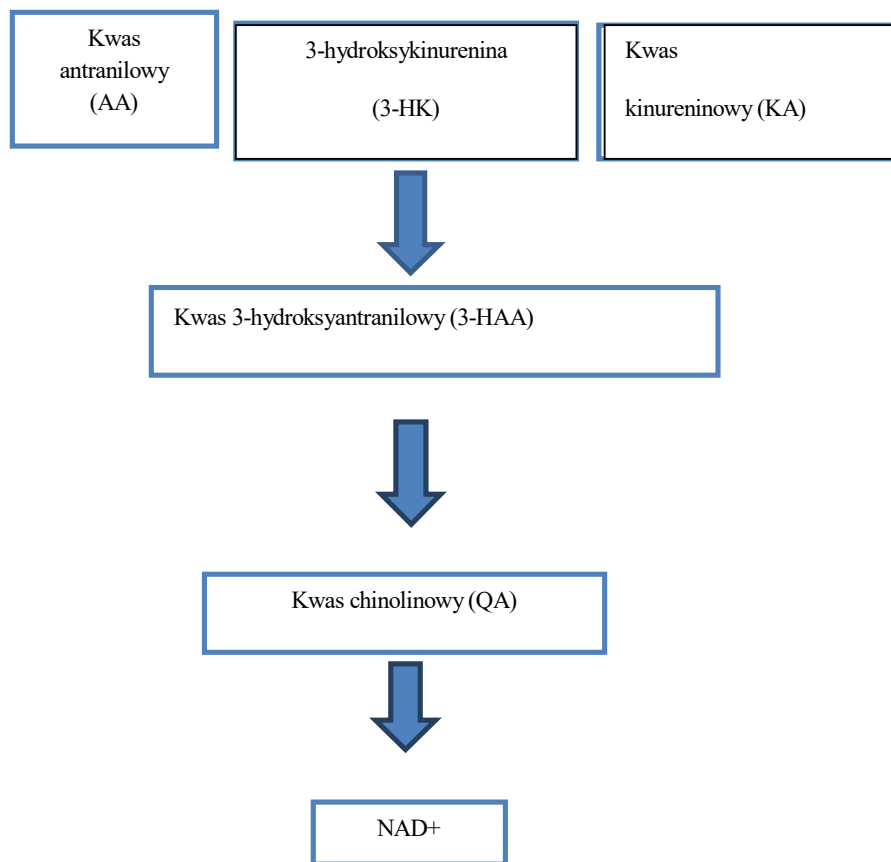
¹ justyna.kubacka@twojpsychodietetyk.pl, Katedra i Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum UMK w Bydgoszczy, www. cm.umk.pl.

² paulina.cembrowska@wp.pl, Katedra i Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum UMK w Bydgoszczy, www. cm.umk.pl.

³ diag.ka@wp.pl, Katedra i Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum UMK w Bydgoszczy, www. cm.umk.pl.

antagonistyczne. W początkowym etapie aminokwas metabolizowany jest do formylkinureniny, która to natychmiastowo przekształcana jest do kinureniny (rys. 1). W reakcji tej kluczową rolę odgrywają dwa enzymy (oksygenazy): 2,3 dioksygenaza tryptofanowa (TDO) i 2,3 dioksygenaza indolaminy (IDO). Są to najlepiej poznane i opisane dotąd enzymy szlaku kinureninowego. Metabolizm kinureniny (KYN) może się odbywać trzema drogami i prowadzić do powstania jej pochodnych: kwasu kinureninowego (KA), 3-hydroksykinureniny (3-HK), kwasu ksanturyнового (XA) oraz kwasu 3-hydroksyantranilowy (3-HAA), określanych wspólnie mianem kinurenin. Szlak kinureninowy jest dobrze kontrolowany w warunkach fizjologicznych, natomiast w sytuacji pobudzenia układu immunologicznego metabolizm tryptofanu przez TDO i IDO na drodze szlaku kinureninowego gwałtownie wzrasta stanowiąc nawet do 94% całkowitej degradacji tryptofanu [4]. Początkowo szlak kinureninowy był postrzegany przede wszystkim jako źródło substancji wysokoenergetycznych. W momencie kiedy odkryto, że podanie niektórych kinurenin do mózgu szczurów powodowało drgawki i zmiany w ich zachowaniu – diametralnie wzrosło zainteresowanie ich znaczeniem w wielu procesach chorobowych. Dysregulacja metabolizmu tryptofanu drogą szlaku kinureninowego została powiązana z wieloma różnymi chorobami, w tym z zaburzeniami neurodegeneracyjnymi (m.in. chorobą Huntingtona, Alzheimera i chorobą Parkinsona) [5], stwardnieniem rozsianym [6], depresją [7], schizofrenią [8], cukrzycą [9], nowotworami [10] i chorobą zapalną jelit [11]. Zwiększona degradacja tryptofanu drogą szlaku kinureninowego przyczynia się jednocześnie do zmniejszenia syntezy serotoniny w mózgu, co zwiększa ryzyko występowania zaburzeń depresyjnych [12].





Rysunek 1. Metabolizm tryptofanu na drodze szlaku kinureninowego
Źródło: opracowanie własne na podstawie [2]

3.1. Szlak kinureninowy w chorobach sercowo-naczyniowych

Pojawiające się dowody wskazują, że katabolity tryptofanu poza rozregulowaniem funkcji układu odpornościowego, przyczyniają się także do inicjowania ogólnoustrojowego procesu zapalnego. Przewlekły stan zapalny prowadząc m.in. do dysfunkcji śródbłonna naczyniowego i rozwoju zmian miażdżycowych może przyczyniać się w konsekwencji do rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego [13]. W czasie trwania stanu zapalnego oraz przy zatrzymaniu akcji serca, dochodzi do nasilenia katabolizmu tryptofanu przezIDO. Proces ten wpływa na zmniejszenie stężenia aminokwasu z jednoczesną kumulacją jego toksycznych metabolitów w obrębie naczyń krwionośnych. To z kolei przyczynia się do silnego rozkurczu naczyń i spadku ciśnienia krwi [30, 31]. Ponadto niektóre katabolity szlaku kinureninowego spełniać mogą funkcje potencjalnych biomarkerów chorób sercowo-naczyniowych [4]. Sugeruje się, że wzrost stężenia w osoczu katabolitów tryptofanu, takich jak m.in. : KYN, 3-HK, XA może być związany ze zwiększoną śmiertelnością z powodu chorób układu krążenia [32].

4. Właściwości kluczowych enzymów szlaku kinureninowego

4.1. 2,3 dioksygenaza tryptofanowa (TDO)

Pierwszy etap przemian tryptofanu zachodzi w wątrobie przy udziale TDO. Enzym ten w normalnych warunkach odpowiada za większość konwersji tego aminokwasu, kontrolując jego stężenie w osoczu. W centrum katalitycznym enzymu, znajduje się jon żelazowy, który po połączeniu z tlenem molekularnym ulega utlenianiu powodując aktywację enzymu. W związku z tym do przeprowadzenia reakcji konieczna jest obecność kwasu askorbinowego jako reduktora oraz methemoglobiny. W odróżnieniu od pozostałych enzymów KP znany jest czas półtrwania TDO, który wynosi 2h (dla apoenzymu) [14]. TDO stanowi kluczową rolę w dostępności tryptofanu dla tkanek poza wątrobowych i jest indukowany zarówno przez sam tryptofan jak i przez glukokortykoidy oraz estrogeny. [15]. Zarówno TDO, jak i IDO katalizują pierwszy etap w rozkładzie TRP, prowadząc do utworzenia N-formylkynureniny, która jest następnie deformylowana do kynureniny (KYN) [13].

4.2. 2,3-dioksygenaza indolaminy (IDO)

Wyróżnia się dwie izoformy IDO: IDO1 i ostatnio opisaną IDO2, która to bierze udział w przemianach tryptofanu drogą KP. W odróżnieniu od TDO, IDO występuje nie tylko w wątrobie i ośrodkowym układzie nerwowym, ale także w płucach, łożysku i jelitach [16]. Wzmoczone wytwarzanie cytokin prozapalnych, przede wszystkim interferonu gamma (INF- γ), prowadzi do aktywacji IDO. Następnie wzrost aktywności IDO implikuje nasilenie katabolizmu tryptofanu na drodze szlaku kinureninowego z jednoczesnym ograniczeniem wytwarzania serotoniny. Proces ten powoduje zwiększenie syntezy kinurenin wpływając na zaburzenie pracy mitochondriów i aktywację szlaków stresu oksydacyjnego, a tym samym do nadmiernego wytwarzania wolnych rodników w ustroju [17]. Także w czasie indukcji ogólnoustrojowego stanu zapalnego aktywność IDO w komórkach śródbłonna naczyniowego wzrasta, co skutkuje silnym rozkurczem naczyń krwionośnych i spadkiem ciśnienia krwi [29].

5. Właściwości metabolitów szlaku kinureninowego

5.1. Kinurenina (KYN)

Kinurenina wykazuje właściwości rozszerzające naczynia krwionośne [18]. Podwyższony poziom kinureniny obserwowany jest w osoczu pacjentów z retinopatią cukrzycową [19]. Ważne znaczenie kliniczne ma współczynnik KYN/TRP, który stanowi wskaźnik aktywności IDO. Podwyższone stężenia KYN/TRP obserwowano u osób z nadwagą oraz otyłością typu brzusznej (trzewną, androidalną) [13]. Otyłości towarzyszy przewlekły stan zapalny, który jest ważnym czynnikiem etiologicznym i rokowniczym chorób układu sercowo-naczyniowego [20]. Z kolei przewlekły stan zapalny zwiększa degradację tryptofanu drogą szlaku kinureninowego, o czym świadczy podwyższony stosunek KYN do TRP w osoczu [21]. Liczne badania wykazały, że otyłość, zwłaszcza trzewna, jest istotnym, niezależnym czynnikiem ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego, takich jak

m.in. nadciśnienie tętnicze, choroba wieńcowa, niewydolność serca, nadkomorowe i komorowe zaburzenia rytmu serca [20]. Kynurenina łatwo przenika barierę krew-mózg [22]. Zwiększony wskaźnik KYN/ TRP wiąże się również z większym prawdopodobieństwem wystąpienia śmiertelnych zdarzeń sercowo-naczyniowych [4] także u osób nie chorujących wcześniej na chorobę wieńcową [23].

5.2. Kwas kinureninowy (KA)

W organizmie człowieka kwas kinureninowy powstaje z kinureniny na drodze reakcji enzymatycznej z udziałem aminotransferazy kinureninowej. Po wprowadzeniu go do przewodu pokarmowego jest łatwo absorbowany z jelit do krwi i z prądem krwi transportowany jest głównie do wątroby i nerek. Kwas kinureninowy stanowi neuroaktywny metabolit tryptofanu. Wykazano, że KA wywiera działanie przeciwdrgawkowe i neuroprotektcyjne. Przydatność kliniczną KA ogranicza słabe przenikanie przez barierę krew-mózg i trudności w rzetelnym oznaczeniu jego poziomu we krwi. Stąd przedmiotem badań naukowych stają się również inne metabolity szlaku kynureninowego. Powstający kwas kinureninowy nie jest gromadzony, lecz uwalniany z komórek na drodze dyfuzji. Z mózgu przechodzi szybko do krwi, a następnie do moczu i tą drogą jest wydalany [22]. Poziomy KA we krwi można wykorzystać do przewidywania nawracającego zawału mięśnia sercowego u pacjentów z chorobą wieńcową [4].

5.3. 3-hydroksykinurenina (3-HK)

3-hydroksykinurenina jest prekursorem kwasu ksanturyнового (XA), ale na drodze alternatywnej może także ulec konwersji do kwasu 3-hydroksyantranilowego (3-HAA). Stężenie tego metabolitu wzrasta w czasie trwania stanu zapalnego, dlatego może sugerować współistniejącą dysfunkcję śródbłonna naczyniowego [24].

5.4. kwas ksanturyновый (XA)

Kwas ksanturyновый, powstaje w wyniku transaminacji 3-hydroksykinureniny. Niedobór witaminy B₆ skutkuje zwiększeniem syntezy XA. Przy tym warto zauważyć, że przewlekłe stany zapalne mogą być związane z niedoborem tej witaminy w osoczu, co może prowadzić do zwiększenia syntezy diabetogennego metabolitu, XA. Kwas ksanturyновый w moczu pojawia się przed kliniczną manifestacją niedoboru witaminy B₆ [14]. XA wykazuje działanie diabetogenne poprzez wiązanie, a następnie inaktywację insuliny. Wysokie stężenie XA w osoczu wiąże się również z insulinoopornością i wyższym ryzykiem zachorowania na cukrzycę typu 2 [25]. U pacjentów z cukrzycą stwierdza się podwyższone stężenie XA zarówno w osoczu jak i w moczu, w postaci kompleksów w połączeniu z cynkiem (XA-Zn) [9].

5.5. Kwas 3-hydroksyantranilowy (3-HAA)

Zauważono, że u pacjentów po przebytych udarze, poziom 3-HAA w osoczu w pierwszych dwóch tygodniach po tym incydencie był znacznie zmniejszony w porównaniu z osobami zdrowymi. Konieczne są dalsze badania pozwalające stwierdzić, czy ten metabolit degradacji tryptofanu może być stosowany jako użyteczny biomarker stopnia nasilenia udaru [24].

6. Choroby układu sercowo-naczyniowego (*cardiovascular disease, CVD*)

Dane GUS pokazują, że choroby układu krążenia są najczęstszą przyczyną zgonów w Polsce. W 2013 r. z przyczyn kardiologicznych zmarło w Polsce ponad 177 tys. osób, co stanowiło 45,8% wszystkich zgonów. Spośród chorób układu krążenia przyczyną największej liczby zgonów – podobnie jak w całej Europie – jest choroba niedokrwienna serca (I20-I25), która w 2013 r. odpowiadała za 23% zgonów kardiologicznych (41 tys. zmarłych), w tym zawał serca stanowił blisko 9% zgonów z powodu chorób układu krążenia (15 tys. zgonów) [28]. Szacuje się, że pomimo znacznych postępów w diagnostyce i leczeniu, choroby sercowo-naczyniowe pozostaną w większości krajów świata główną przyczyną zgonów do co najmniej 2020 r. [31].

Miażdżycza tętnic jest głównym czynnikiem etiologicznym chorób sercowo-naczyniowych, które stanowią jedną z najczęstszych przyczyn zgonów na świecie. Również nadciśnienie, a także otyłość i zespół metaboliczny (*Metabolic Syndrome, MetS*) związane są ze zwiększonym ryzykiem sercowo-naczyniowym. W badaniach na szczurach Wistar z współistniejącym nadciśnieniem tętniczym stwierdzono wyższe poziomy KYN, KA i 3-HK w osoczu i wyższą aktywność TDO w wątrobie, niż u szczurów bez nadciśnienia. Stąd sugestia, że nadciśnienie tętnicze jest związane z aktywacją szlaku kinureninowego [26]. U pacjentów z CVD obserwuje się nasiloną aktywację IDO prowadzącą do zwiększonego rozkładu TRP oraz wzrost wartości wskaźnika KYN/TRP. Epidemiologicznie dane wskazują także, że katabolity tryptofanowe, takie jak: KYN, 3-HK i XA wiążą się ze śmiertelnością z powodu CVD [27]. Ponadto zaobserwowano wyższe poziomy KYN, XA i KA w osoczu pacjentów z zaawansowaną cukrzycą typu 2, niż w próbkach osób bez cukrzycy [9].

7. Znaczenie kliniczne

Udowodniono, że przewlekły stan zapalny w połączeniu z klasycznymi czynnikami ryzyka występowania chorób sercowo-naczyniowych, zwiększa degradację tryptofanu drogą szlaku kinureninowego [21]. Osiągnięcie normalizacji metabolizmu TRP może stanowić ważny element leczenia objawów u pacjentów cierpiących na CVD, a wskaźnik KYN/ TRP – cenny marker chorób sercowo-naczyniowych, zwłaszcza miażdżycy [23].

8. Wnioski

Przewlekły stan zapalny organizmu oraz stany zapalne wewnątrz śródbłonna naczyniowego skutkujące jego dysfunkcją, są główną przyczyną rozwoju powikłań sercowo-naczyniowych oraz chorób metabolicznych, takich jak cukrzyca typu 2 i otyłość. Przewlekłe stany zapalne i wynikający z nich niedobór witaminy B₆ wpływają na zwiększone wytwarzanie immunomodulujących metabolitów tryptofanu, które predysponują do występowania insulinooporności, a następnie cukrzycy. Zwiększone stężenie wybranych kinurenin może stanowić jeden z elementów przewidywania ryzyka wystąpienia chorób kardiometabolicznych w przyszłości. Pomiar stężenia TRP, poszczególnych kinurenin oraz znajomość stosunku KYN/ TRYP stanowią obiecujące czynniki prognostyczne niekorzystnego rokowania, zwłaszcza u pacjentów z już istniejącymi chorobami układu sercowo-naczyniowego.

Konieczne są dalsze badania pozwalające określić, czy parametry te mogą stanowić w przyszłości podstawę wprowadzenia do praktyki klinicznej bardziej skutecznych i precyzyjnych protokołów terapeutycznych, celem zmniejszenia zachorowalności i umieralności z przyczyn sercowo-naczyniowych.

Literatura

1. Jarosz M. (red.), *Normy żywienia dla populacji Polski*, Instytut Żywności i Żywienia, Warszawa, 2017.
2. Turzyńska D., Szyndler J., Maciejak P., Sobolewska A., Płaźnik A., *Kwas kynureninowy – neuroprotektynowa substancja w chorobach ośrodkowego układu nerwowego*, *Postępy Psychiatrii i Neurologii* 19 (2010), s. 61-72.
3. Dakshinamurti K., Paulose C.S., Viswanathan M. i wsp., *Neurobiology of pyridoxine*, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 585 (1990), s. 128-144.
4. Badawy A., *Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism: Regulatory and Functional Aspects*, *International Journal of Tryptophan Research*, 10 (2017), s. 1-20.
5. Breda C., Sathyaikumar K.V., Sograte Idrissi S., Notarangelo F.M., Estranero J.G., Moore G.G., Green E.W., Kyriacou C.P., Schwarcz R., Giorgini F., *Tryptophan-2,3-dioxygenase (TDO) inhibition ameliorates neurodegeneration by modulation of kynurenine pathway metabolites*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4868470/>, data dostępu: 28.03.2018.
6. Lovelace M.D., Varney B., Sundaram G., Franco N.F., Ng M.L., Pai S., Lim C.K., Guillemain G.J., Brew B.J., *Current evidence for a role of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism in multiple sclerosis*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4972824/>, data dostępu: 28.03.2018.
7. Agudelo L.Z., Femenia T., Orhan F., Porsmyr-Palmertz M., Goigny M., Martinez-Redondo V., Correia J.C., Izadi M., Bhat M., Schuppe-Koistinen I., Pettersson A.T., Ferreira D.M., Krook A., Barres R., Zierath J.R., Erhardt S., Lindskog M., Ruas J.L., *Skeletal Muscle PGC-1 α 1 Modulates Kynurenine Metabolism and Mediates Resilience to Stress-Induced Depression*, [http://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(14\)01049-6](http://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(14)01049-6), data dostępu: 28.03.2018.
8. Wonodi I., Schwarcz R., *Cortical kynurenine pathway metabolism: a novel target for cognitive enhancement in Schizophrenia*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2833131/>, data dostępu: 27.03.2018.
9. Oxenkrug G.F., *Increased plasma levels of xanthurenic and kynurenic acids in type 2 diabetes*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4558247/>, data dostępu: 27.03.2018.
10. Munn D.H., Mellor A.L., *IDO in the Tumor Microenvironment: Inflammation, Counter-Regulation, and Tolerance*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26839260>, data dostępu: 28.03.2018.
11. Wolf A.M., Wolf D., Rumpold H., Moschen A.R., Kaser A., Obrist P., Fuchs D., Brandacher G., Winkler C., Geboes K., Rutgeerts P., Tilg H., *Overexpression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human inflammatory bowel disease*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15380529>, data dostępu: 28.03.2018.
12. Muller N., Schwarz M.J., *The immune-mediated alteration of serotonin and glutamate: towards an integrated view of depression*, *Molecular Psychiatry*, 12, (2007), s.988-1000.
13. Mangge H., Stelzer I., Reininghaus E.Z., Weghuber D., Postolache T.T., Fuchs D., *Disturbed tryptophan metabolism in cardiovascular disease*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4922792/>, data dostępu: 28.03.2018.
14. Rajtar-Leontiew Z., *Znaczenie kliniczne witaminy B6 (pirydoksyny)*, *Nowa Pediatria*, 2 (2001), s. 20-21.

15. Cervenka I., Agudelo L.Z., Ruas J.L., *Kynurenines: Tryptophan's metabolites in exercise, inflammation, and mental health*, Science 357, 369 (2017), s. 1-8.
16. Chaves A.J., Carvalho C.N., Mendes Vasconcelos S.M., Freitas de Lucena D., Maes M., Macedo D., *IDO chronic immune activation and tryptophan metabolic pathway: A potential pathophysiological link between depression and obesity*, Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 80 (2018), s. 234-249.
17. Grant R.S., *Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity Increases NAD⁺ Production in IFN- γ -Stimulated Human Primary Mononuclear Cells*, International Journal of Tryptophan Research, 11 (2018), s.1-8.
18. Badawy A., *Tryptophan availability for kynurenine pathway metabolism across the life span: Control mechanisms and Focus on aging, exercise, diet and nutritional supplements*, Neuropharmacology 112 (2017), s. 248-263.
19. Song P., Ramprasath T., Wang H., Ming-Hui Z., *Abnormal kynurenine pathway of tryptophan catabolism in cardiovascular diseases*, Cellular and Molecular Life Sciences 74 (2017), s. 2899-2916.
20. Bogołowska-Stiebllich A., Tałałaj M., *Otyłość a choroby układu sercowo-naczyniowego*, Borgis, Postępy Nauk Medycznych 5b (2013), s. 19-25.
21. Mangge H., Summers K.L., Meinitzer A., Zelzer S., Almer G., Prassl R., *Obesity-related dysregulation of the Tryptophan – Kynurenine metabolism: Role of age and parameters of the metabolic syndrome*, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/oby.2049>, dostęp: 30.03.2018.
22. Karakuła-Juchnowicz H., Flis M., Szymona K., Kuczyńska M., Stelmach E., Kowal-Popczak A., *Nowe perspektywy w leczeniu przeciwpsychotycznym – znaczenie szlaku kynureninowego*, Psychiatria Polska 48/6, (2014), s.1167-1177.
23. Sulo G., Vollset S.E., *Nygaard Neopterin and kynurenine-tryptophan ratio as predictors of coronary events in older adults, the Hordaland Health Study*, International Journal of Cardiology 168 (2013), s. 1435-1440.
24. Darlington L.G., Mackay G.M., Forrest C.M., *Altered kynurenine metabolism correlates with infarct volume in stroke*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1789248>, data dostępu: 30.03.2018.
25. Reginaldo C., Jacques P., Scott T., Oxenkrug G., Selhub J., Paul L., *Xanthurenic acid is associated with higher insulin resistance and higher odds of diabetes*, FASEB Journal, 29 (2015), s. 1-20.
26. Bartosiewicz J., Kaminski T., Pawlak K., Karbowska M., Tankiewicz-Kwedlo A., Pawlak D., *The activation of the kynurenine pathway in a rat model with renovascular hypertension*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28165296>, data dostępu: 30.03.2018.
27. Zuo H., Ueland P.M., Ulvik A., Eussen S.J., Vollset S.E., Nygård O., Midttun Ø., Theofylaktopoulou D., Meyer K, Tell G.S., *Plasma Biomarkers of Inflammation, the Kynurenine Pathway, and Risks of All-Cause, Cancer, and Cardiovascular Disease Mortality: The Hordaland Health Study*, American Journal of Epidemiology, 183 (2016), s. 249-258.
28. Główny Urząd Statystyczny; *Statystyka zgonów i umieralności z powodu chorób układu krążenia*, <https://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/ludnosc/statystyka-przyczyn-zgonow/>, 07.01.2016, data dostępu: 10.05.2018.
29. Wang Y., Liu H., McKenzie G. i wsp.: *Kynurenine is a novel endothelium-derived relaxing factor produced during inflammation*. Nat Med.2010; 16:279-285.
30. Zeden J.P., Fusch G., Holtfreter B. i wsp.: *Excessive tryptophan catabolism along the kynurenine pathway precedes ongoing sepsis in critically ill patients*. Anaesth Intensive Care. 2010; 38, s. 307-316.

31. Rywik S., Kupść W., Piotrowski W., Broda B., Piwoński J., Kurjata P., Waśkiewicz A., Gaździk D.: *Wieloośrodkowe ogólnopolskie badanie stanu zdrowia ludności – projekt WOBASZ. Zdefiniowanie problemu oraz cele badania*, <https://ojs.kardiologiapolska.pl/kp/article/viewFile/2737/5911>, data dostępu: 10.05.2018.
32. Zuo H., Ueland PM., Ulvik A., Eussen SJ., Vollset SE., Nygård O., Midttun Ø., Theofylaktopoulou D., Meyer K., Tell GS.: *Plasma Biomarkers of Inflammation, the Kynurenine Pathway, and Risks of All-Cause, Cancer, and Cardiovascular Disease Mortality: The Hordaland Health Study*, *Am J Epidemiol.* 2016 Feb 15;183(4):249-58, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26823439>, data dostępu: 10.05.2018r.,

Zaburzenia metabolizmu tryptofanu w patogenezie chorób sercowo-naczyniowych

Streszczenie

Tryptofan (TRP) jest egzogennym aminokwasem niezbędnym do syntezy białek. W normalnych warunkach tryptofan ulega przemianie do 5-hydroksytyraminy i serotoniny. W stresie i nadmiernej obecności cytokin oraz glikokortykosteroidów szlak metabolizmu tryptofanu ulega zmianie na szlak kinureninowy (KP). Pierwszy etap kataboliczny w szlaku kinureninowym kontrolowany jest głównie przez dwa enzymy: 2,3-dioksygenazę indolaminy (IDO) i 2,3-dioksygenazę tryptofanu (TDO), co prowadzi do powstania kilku bioaktywnych katabolitów, takich jak: kinurenina (KYN), kwas kinureninowy (KA), 3-hydroksykinurenina (3-HK), kwas ksanturynowy (XA) i kwas 3-hydroksyantranilowy (3-HAA). Zwiększone stężenie tych katabolitów, jak i wzrost aktywności IDO i TDO w surowicy wiąże się z powstaniem i rozwojem chorób sercowo-naczyniowych (CVD) takich jak: choroby serca, miażdżycza tętnic i dysfunkcja śródbłonna. Niniejsza praca stanowi przegląd badań dotyczących związku wybranych metabolitów szlaku kinureninowego ze zwiększeniem ryzyka chorób sercowo-naczyniowych.

Słowa kluczowe: tryptofan, szlak kinureninowy, choroby sercowo-naczyniowe.

Disorders of tryptophan metabolism in the pathogenesis of cardiovascular diseases

Abstract

Tryptophan (TRP) is an essential amino acid necessary for the synthesis of proteins. In normal conditions, tryptophan is converted to 5-hydroxytryptamine and serotonin. Under the stress and excessive presence of cytokines and glucocorticoids, the tryptophan path of metabolism changes to the kynurenine pathway (KP). The first catabolic stage in the kynurenine pathway is mainly controlled by two enzymes: indolamine 2,3-dioxygenase (IDO) and tryptophan-2,3-dioxygenase (TDO), which leads to the formation of several bioactive catabolites, such as: kynurenine (KYN), kynurenic acid (KA), 3-hydroxykynurenine (3-HK), xanthurenic acid (XA) and 3-hydroxyanthranilic acid (3-HAA). Increased concentration of these catabolites as well as an increase in IDO and TDO activity in the serum is associated with the formation and development of cardiovascular diseases (CVD) such as: heart disease, atherosclerosis and endothelial dysfunction. This paper reviews the studies on the association of selected metabolites of the kynurenine pathway with an increased risk of cardiovascular.

Keywords: tryptophan, kynurenine pathway, cardiovascular disease.

Indeks Autorów

Adamczuk G.....	38, 125, 136	Michalik M.....	68
Bałabuszek K.....	86	Miszczyk J.....	49
Berlińska E.	96	Mroczek A.....	86
Cembrowska P.....	182	Ostrowska M.	125, 136
Chmielarski M.....	58, 111, 159	Pawlicka M.....	86
Czekaj P.....	68	Piecowicz-Szczęsna H.....	86
Dugiełło B.	68	Pluskota R.....	152
Goede A.....	58, 111, 159	Rychtyk K.....	49
Golińska J.	58, 111, 159	Sikora A.....	86
Hajduga D.....	96	Stefańska A.....	182
Humeniuk E.....	38, 125, 136	Szmytkowska P.	68
Korga A.	125, 136	Szymańska K.....	38, 125, 136
Kubacka J.	182	Tadeja A.	152
Kuradczyk M.....	23	Welz A.....	152
Kuźmycz O.....	173	Wędrowska E.	58, 111, 159
Machała P.	173	Wróblewska P.....	7
Majewska K.....	7		