Współczesna Onkologia (2008) vol. 12; 6 (255–260)

# Śródbłonkowe markery nowotworowe

*Tumour endothelial markers*

**Ewa Kopczyńska**

Katedra i Zakład Patobiochemii i Chemii Klinicznej, *Collegium Medicum* im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Rozwój choroby nowotworowej w dużym stopniu zależy od wytworzenia nowych naczyń krwionośnych w wyniku angiogenezy lub waskulogenezy postnatalnej. W obu tych procesach istotną rolę odgrywają komórki śródbłonka i ich prekursory. Identyfikacji tych komórek dokonuje się na podstawie swoistych markerów powierzchniowych. Dla komórek endotelialnych najbardziej charakterystyczny jest VEGFR-2.
Ostatnio zidentyfikowano nowe znaczniki – śródbłonkowe markery nowotworowe (ang. *tumour endothelial markers* – TEMs). Jest ich dziewięć (TEM 1–9), jednak tylko cztery z nich (TEM1, 5, 7, 8), związane z powierzchnią błony komórkowej, z biologicznego i klinicznego punktu widzenia budzą szczególne zainteresowanie. Te receptory przezbłonowe wykazują interakcje ze składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej. Zwiększoną ekspresję TEMs obserwuje się w śródbłonku różnych typów nowotworów, zwłaszcza w raku jelita grubego. Prawdopodobnie uczestniczą one w angiogenezie nowotworowej i mogą być celem terapii przeciwnowotworowej, zwłaszcza TEM8 – najbardziej swoisty dla neoangiogenezy.

**Słowa kluczowe:** markery nowotworowe, markery komórek śródbłonka.

## Wstęp

Wzrost guza nowotworowego i proces tworzenia przerzutów są zależne od rozwoju naczyń krwionośnych [1]. Guzy w fazie prewaskularnej mogą przetrwać *in situ* nawet wiele lat. Nabycie przez komórki nowotworowe fenotypu angiogennego, na skutek mutacji w protoonkogenach i genach supresorowych, prowadzi do wzrostu unaczynionego guza [2].

Tworzenie nowych naczyń krwionośnych odbywa się na drodze angiogenezy. Proces powstawania naczyń na bazie już istniejących dokonuje się w kilku etapach. Są to:

- aktywacja komórek śródbłonka (ang. *endothelial cells* – ECs) wewnątrz istniejących naczyń,
- degradacja błony podstawnej i macierzy zewnątrzkomórkowej,
- migracja i proliferacja komórek śródbłonka,
- wytworzenie rurkowatych struktur nowego naczynia,
- dojrzewanie i stabilizacja naczynia [3].

Okazuje się, że w tworzeniu nowych naczyń mogą uczestniczyć także endotelialne komórki progenitorowe (prekursorowe) (ang. *endothelial progenitor cells* – EPCs). Pod wpływem różnych czynników, m.in. czynnika pochodzenia stromalnego 1 (ang. *stromal cell derived factor 1* – SDF-1) uwalnianego przez komórki guza, dochodzi do mobilizacji i migracji komórek progenitorowych ze szpiku kostnego do miejsc tworzenia nowych naczyń (waskulogeneza postnatalna) [4].

Pulę wszystkich komórek śródbłonka stanowi kilka subpopulacji. Oprócz komórek EPCs są to krążące EPCs oraz dojrzałe ECs. Identyfikacji tych komórek dokonuje się na podstawie obecności lub braku swoistych markerów powierzchniowych. Głównymi markerami błonowymi komórek progenitorowych są antygeny CD133(AC133) i CD34 oraz receptor naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu 2, VEGFR-2 (ang. *vascular endothelial growth factor receptor 2*). Bardziej dojrzałe komórki występujące w krążeniu mają fenotyp CD133(–)/CD34(+)/VEGFR-2(+). Dojrzałe komórki śródbłonka wykazują wysoką ekspresję VEGFR-2, VE-kadheryny oraz czynnika von Willebranda (ang. *von Willebrand factor* – vWF). Innymi markerami komórek endotelialnych są CD31(PECAM) i P1H12. Z kolei vWF, CD31 i VE-kadheryna występują głównie w śródbłonku dużych naczyń, natomiast P1H12 – w śródbłonku mikronaczyń. Najlepszym markerem komórek śródbłonka jest VEGFR-2, ze względu na występowanie w naczyniach różnej wielkości [5, 6].

Kilka lat temu zidentyfikowano nowe markery komórek endotelialnych, tj. śródbłonkowe markery nowotworowe (ang. *tumour endothelial markers* – TEMs).

Stosując technikę SAGE (ang. *serial analysis of gene expression*), St Croix i wsp. [7] zidentyfikowali geny kodujące dziewięć TEMs (TEM 1–9), których ekspresja w śródbłonku naczyń krwionośnych raka jelita grubego była znacząco większa niż w śródbłonku tkanki zdrowej. Ekspresja TEMs została potwierdzona metodą RT-PCR oraz metodą hybrydyzacji *in situ*.

Tumour growth in great measure depends on development of blood vessels during angiogenesis or postnatal vasculogenesis. Endothelial cells and their precursors play a significant role in both processes. These cells are identified based on specific cell surface markers. For endothelial cells VEGFR-2 is the most characteristic marker.
Recently, new markers were identified, i.e. tumour endothelial markers (TEMs). There are nine TEMs (TEM 1-9), but only four of them (TEM1, 5, 7, 8), associated with the cell surface, are of special interest from the biological and clinical point of view. These transmembrane receptors interact with extracellular matrix components. Increased expression of TEMs is observed in the endothelium of various tumour types, especially in colon cancer. Probably TEMs participate in tumour angiogenesis, and they can be an anti-cancer therapy target, particularly TEM8 – the most specific for neoangiogenesis.

**Key words:** tumour markers, endothelial cell markers.

Dalsze badania [8] wykazały, że cztery z nich – TEM1, 5, 7 i 8 – są białkami powierzchniowymi i głównie one stanowią obecnie przedmiot badań.

## Śródbłonkowy marker nowotworowy 8

Śródbłonkowy marker nowotworowy 8 (ang. *tumour endothelial marker 8* – TEM8, ang. *antrax toxin receptor* – ATR, ANTXR1) jest intensywnie badany i najlepiej poznany. Spośród wszystkich TEMs jest najbardziej swoisty dla śródbłonka nowotworowego i z tego względu najbardziej interesujący również dla onkologów.

### Budowa i funkcja receptora śródbłonkowego markera nowotworowego 8

Receptor TEM8/ATR jest białkiem błonowym typu I zbudowanym z 564 aminokwasów. Domena cytoplazmatyczna złożona z 220 aminokwasów jest dużo większa niż w innych TEMs powierzchniowych. Zawiera co najmniej 7 miejsc fosforylacji, dzięki czemu TEM8 jest zaangażowany w transmisję sygnału komórkowego [8, 9]. Z kolei część zewnątrzkomórkowa receptora zawiera domenę vWF A z motywem adhezyjnym zależnym od jonu metalu (ang. *metal ion dependent adhesion site* – MIDAS). Domena vWF A (domena I) obecna jest w części zewnątrzkomórkowej różnych białek powierzchniowych, włączając integryny. Domena ta jest ważna dla interakcji białko – białko i jest miejscem wiążącym integryny [8, 9]. Z nowszych badań wynika, że rozpuszczalna ektodomena receptora TEM8 jest cząsteczką adhezyjną wiążącą kolagen typu I, żelatynę, a także podjednostkę $\alpha$3 kolagenu typu VI [10]. To sugeruje interakcje tego receptora z cząsteczkami macierzy zewnątrzkomórkowej. Śródbłonkowy marker nowotworowy 8 zwiększa także aktywność chemotaktyczną komórek śródbłonka [10].

Znane są trzy izoformy tego receptora: długa, średnia i krótka. Tylko dwie pierwsze zawierają domenę vWF A [11].

Śródbłonkowy marker nowotworowy 8 wykazuje ekspresję w nabłonku tkanek dostępnych dla bakterii, tzn. w skórze, płucach i jelicie [12].

### Homolog śródbłonkowego markera nowotworowego 8 – CMG2

Receptorem bardzo podobnym do TEM8 jest CMG2 (ang. *capillary morphogenesis protein 2* – ANTXR2). Oba te białka wykazują 40-procentową homologię aminokwasową, mają domeny przezbłonową i vWF A. Białko CMG2 wiąże kolagen typu IV i lamininę. Wykazuje ekspresję w różnych typach tkanek, natomiast nadekspresja jest obserwowana w komórkach śródbłonka naczyń w trakcie ich tworzenia [11].

### Ligand receptorów śródbłonkowego markera nowotworowego 8 i CMG2

Śródbłonkowy marker nowotworowy 8 i CMG2 są receptorami dla toksyny produkowanej przez *Bacillus anthracis* (laseczkę wąglika). Toksyna wąglika (czynnik wirulencji) zbudowana jest z trzech peptydów: PA, LF i EF. Antygen ochronny (ang. *protective antygen* – PA), o masie cząsteczkowej 83 kDa, jest odpowiedzialny za wiązanie toksyny z receptorami komórkowymi, czynnik letalny (ang. *lethal factor* – LF), o masie cząsteczkowej 90 kDa, jest proteazą, natomiast czynnik obrzęku (ang. *edema factor* – EF), o masie cząsteczkowej 90 kDa wykazuje właściwości cyklazy adenylanowej. Indywidualnie LF i EF nie są toksyczne i wymagają połączenia z PA, żeby wejść do cytozolu. Połączenie PA z LF tworzy toksynę letalną, z kolei PA z EF – toksynę wywołującą obrzęk. Po związaniu z receptorem powierzchniowym PA jest rozszczepiany przez proteazę furynopodobną na dwa fragmenty. Fragment aminokońcowy $PA_{20}$ oddysocjowuje, natomiast karboksykońcowy $PA_{63}$ tworzy heptamer i wiąże LF i EF. Kompleksy $[PA_{63}]_7$–LF oraz $[PA_{63}]_7$–EF ulegają endocytozie. W kwaśnym środowisku endosomów zachodzą zmiany konformacyjne w $[PA_{63}]_7$, które pozwalają wejść w błonę

tych organelli i utworzyć pory. To z kolei umożliwia czynnikom LF i EF przemieszczenie się do cytozolu. Czynnik letalny jest proteazą cynkową, która inaktywuje kinazy kinaz MAP (ang. *mitogen-activated protein kinase kinases*), czyli MEK, które są jednym z ogniw szlaków przekazujących bodźce zewnętrzne do komórki. Z kolei EF jest cyklazą adenylanową, która katalizuje reakcję przejścia ATP w cAMP. Wewnątrzkomórkowe stężenie cAMP znacznie się zwiększa, a ponieważ jest to przekaźnik drugiego typu – dochodzi do rozregulowania wielu procesów zachodzących w komórkach [9, 13] (ryc. 1.).

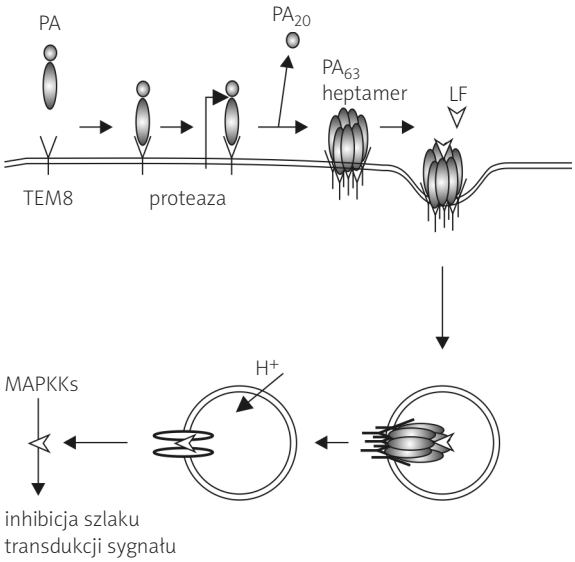
## Rola śródbłonkowego markera nowotworowego 8 w procesie angiogenezy

Funkcja i ekspresja receptora TEM8 ma związek z angiogenezą nowotworową. Śródbłonkowy marker nowotworowy 8 wykazuje nadekspresję w komórkach śródbłonka podczas tworzenia naczyń. Kilku niezależnych badaczy wykazało, że TEM8 wykazuje dużą ekspresję w komórkach śródbłonka raka jelita grubego. Śródbłonkowy marker nowotworowy 8 wydaje się być białkiem swoistym dla angiogenezy nowotworowej, ponieważ śródbłonek prawidłowych tkanek i proliferującego ciałka żółtego nie wykazuje jego ekspresji lub jest ona ledwie oznaczalna. Z tego powodu TEM8 wyróżnia się spośród wszystkich TEMs [14].

W angiogenezie nowotworowej rolę odgrywa prawdopodobnie interakcja TEM8 z C5. Nanda i wsp. [14] zidentyfikowali naturalny ligand TEM8. Okazała się nim podjednostka α3 kolagenu typu VI. Karboksyterminalna domena C5 tego kolagenu, podobnie jak TEM8, wykazuje nadekspresję w śródbłonku nowotworowym jelita grubego, natomiast jest nieoznaczalna w prawidłowej tkance jelita grubego. Powyższe fakty sugerują, że ekspresja TEM8 i kolagenu α3(VI) jest regulowana w sposób skoordynowany. Wiadomo, że cząsteczki macierzy zewnątrzkomórkowej lub ich fragmenty mają zdolność regulowania angiogenezy. Nie jest natomiast potwierdzone, czy taką właściwość ma też kolagen α3(VI). Kilka obserwacji sugeruje, że interakcja pomiędzy TEM8 i kolagenem α3(VI) jest istotna dla angiogenezy:

- TEM8 wykazuje interakcję z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej,
- kolagen α3(VI) wykazuje nadekspresję w gojących się ranach, zasobnych w nowo powstałe naczynia,
- kolagen α3(VI), jako jeden z nielicznych spośród 32 500 analizowanych transkryptów, wykazuje nadekspresję w śródbłonku nowotworowym [14].

Śródbłonkowy marker nowotworowy 8 może mieć w przyszłości znaczenie diagnostyczne w chorobie nowotworowej. W badaniach Rmali [15, 16] ekspresja TEM8 była większa w raku jelita grubego niż w zdrowej tkance i zwiększała się wraz z progresją choroby nowotworowej. Właściwość ta sugeruje, że TEM8 może mieć wartość prognostyczną i predykcyjną w raku jelita grubego. Może być także markerem użytecznym do identyfikacji mikronaczyń nowotworowych w raku piersi, a jego zwiększona ekspresja ma związek z progresją choroby [17].




*PA – peptyd wiążący toksynę wąglika z receptorem TEM8*
*PA20 – fragment PA o masie cząsteczkowej 20 kDa*
*PA63 – fragment PA o masie cząsteczkowej 63 kDa*
*LF – czynnik letalny*
*MAPKKs – kinazy kinaz MAP*

**Ryc. 1.** Mechanizm działania letalnej toksyny wąglika
***Fig. 1.*** *Action of anthrax lethal toxin*

## Śródbłonkowy marker nowotworowy 8 jako cel terapii antyangiogennej i przeciwnowotworowej

Ekspresja TEM8 wydaje się szczególnie intrygująca ze względu na jego dużą specyficzność dla angiogenezy nowotworowej. Z klinicznego punktu widzenia może być ważnym celem strategicznym w leczeniu nowotworów.

Ważność TEM8 jako celu dla terapii znajduje poparcie w badaniach z użyciem toksyny wąglika jako związku przeciwnowotworowego. Wzorzec ekspresji TEM8 może pomóc w wyjaśnieniu regresji choroby nowotworowej obserwowanej po iniekcji myszom toksyny wąglika w dawce nietoksycznej [18–20].

W badaniach Koo i wsp. [18] np. wykazano, że inhibicja sygnalizacji szlakiem kinaz MAPK przez letalną toksynę wąglika (ang. *anthrax lethal toxin* – LeTx) lub drobnocząsteczkowe inhibitory (PD98059) uruchamia apoptozę w komórkach nowotworowych i powoduje regresję czerniaka ludzkiego wszczepionego myszom. Sugeruje to, że zahamowanie kinaz MAPK może być użyteczną strategią w leczeniu czerniaka. Letalna toksyna wąglika wykazuje aktywność inhibicyjną nie tylko w stosunku do komórek czerniaka, ale także innych, jak chociażby nerwiaka zarodkowego współczulnego [19]. Okazała się również skuteczna w hamowaniu szlaku MEK w komórkach NIH 3T3 transformowanych H-ras. Efektem takiego działania była inhibicja, a w niektórych przypadkach nawet regresja wzrostu guza oraz osłabienie procesu angiogenezy [20].

Ciągle poszukuje się nowych inhibitorów TEM8. W kilku niezależnych badaniach testowano zmutowane lub zmodyfikowane formy domeny PA toksyny wąglika. Zmutowany czynnik PA z substytucją R659S i M662R wykazywał specyficzność w stosunku do komórek raka jajnika z nadekspresją TEM8 [21]. Z kolei Rogers i wsp. [22] jako inhibitor angiogenezy i wzrostu nowotworu zaproponowali zmutowaną

formę czynnika PA – $PA^{SSSR}$. Innym inhibitorem TEM8 o właściwościach przeciwnowotworowych jest cząsteczka podobna do przeciwciała – TEM8-Fc. Składa się ona z domeny PA toksyny wąglika oraz fragmentu Fc ludzkiej immunoglobuliny G1. Białko to hamuje wzrost i przerzutowanie nowotworów ludzkich zaszczepionych myszom [23].

Bardzo interesujące wydają się badania przeprowadzone pod kierownictwem Leppla (2008 r.) [24]. Okazało się, że toksyna wąglika jest selektywnie toksyczna dla ludzkiego czerniaka z aktywującą mutacją genu *BRAF* (V600E; aktywacja MEKs). Założeniem badaczy z Bethesdy było otrzymanie wariantów tej toksyny o niskim stopniu toksyczności, dużej swoistości nowotworowej i potencjalnej użyteczności klinicznej. Otrzymano zmutowaną toksynę, która jest selektywnie aktywowana przez metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs) w komórkach nowotworowych wykazujących nadekspresję MMPs. Toksyna ta była dla myszy mniej toksyczna niż typ dziki ze względu na ograniczoną ekspresję MMPs w komórkach prawidłowych. Systematyczne jej podawanie dawało lepszy efekt przeciwnowotworowy niż podawanie typu dzikiego, a jego biodostępność była większa. Okazuje się, że toksyna aktywowana przez MMPs ma potencjalną aktywność przeciwnowotworową nie tylko w stosunku do czerniaków z mutacją *BRAF*, ale także w stosunku do innych typów nowotworów, w tym do raka jelita grubego i raka płuca, niezależnie od stanu genu *BRAF*. Powyższe wyniki badań na myszach sugerują, że toksyna aktywowana przez MMPs może mieć w przyszłości zastosowanie w terapii nowotworów.

Swoistość nadekspresji TEM8 podczas angiogenezy nowotworowej czyni z tego receptora szczególny cel terapii ze względu na brak reakcji krzyżowych z tkankami zdrowymi [25].

## Śródbłonkowy marker nowotworowy 1

### Budowa śródbłonkowego markera nowotworowego 1

Śródbłonkowy marker nowotworowy 1 (TEM1, endosialina, antygen CD248) jest to glikoproteina o masie cząsteczkowej 165 kDa. To przezbłonowe białko zbudowane jest z 757 aminokwasów. Większą jego część (685 aminokwasów) stanowi N-końcowa domena zewnątrzkomórkowa, natomiast krótka domena C-końcowa występuje w cytoplazmie. Część zewnątrzkomórkowa TEM1 składa się z domeny lektynopodobnej, wykazującej cechy wspólne z trombomoduliną, domeny Sushi/scr/ccp oraz z trzech domen EGF-podobnych [8, 26–28]. Śródbłonkowy marker nowotworowy 1 jest receptorem orfanowym, może oddziaływać z cząsteczkami węglowodanowymi za pośrednictwem domeny lektynowej [29]. Prawdopodobnymi ligandami receptora TEM1 są kolagen typu I i typu IV oraz fibronektyna [30]. Endosialina jest rozpoznawana przez monoklonalne przeciwciało FB5 [26]. Immunoreakcja z FB5 była specyficzna dla mikronaczyń nowotworowych, natomiast tkanki prawidłowe wykazywały reakcję ujemną [8].

### Śródbłonkowy marker nowotworowy 1 w nowotworach

Chociaż mRNA TEM1 jest wykrywane w niektórych tkankach prawidłowych, to zarówno ekspresja mRNA, jak i białka jest znacznie zwiększona w różnych typach nowotworów. Zwiększoną ekspresję TEM1 obserwowano m.in. w raku jelita grubego, raku piersi, płuca, trzustki, pęcherza moczowego, w glejaku i czerniaku [26, 30, 31].

Badania doświadczalne wykazały, że brak ekspresji receptora TEM1 redukuje wzrost guza, inwazję i przerzutowanie. Poza tym brak TEM1 powoduje zwiększenie liczby małych niedojrzałych naczyń oraz zmniejszenie liczby średnich i dużych naczyń. Ta nienormalna odpowiedź angiogenna sugeruje rolę TEM1 w kontroli interakcji pomiędzy komórkami nowotworowymi, komórkami śródbłonka i macierzy [30].

W najnowszych badaniach (2008 r.) stwierdzono, że endosialina nie wykazywała ekspresji na powierzchni komórek śródbłonka glejaka, lecz na perycytach [32] i w innym badaniu nie wykazywała ekspresji na komórkach śródbłonka, lecz na nowotworowych miofibroblastach [33]. Zatem TEM1 wykazuje ekspresję nie tylko na komórkach śródbłonka, ale także na perycytach związanych z naczyniami guza oraz na fibroblastach zrębu w ludzkich nowotworach.

W celu zrozumienia molekularnego mechanizmu działania endosialiny Becker i wsp. [34] w 2008 r. podjęli próbę identyfikacji zewnątrzkomórkowych ligandów TEM1. Dowiedli, że specyficznym ligandem jest białko związane z przerzutowaniem Mac-2 BP/90K, w którym fragment C-końcowy zawiera miejsca wiązania dla galektyny 3 i kolagenów jako struktur odpowiedzialnych za wiązanie endosialiny. Zatem zidentyfikowano nową interakcję pomiędzy endosialiną na fibroblastach zrębu i Mac-2 BP/90K obecną na komórkach nowotworowych. Analiza ekspresji Mac-2 BP/90K *in vivo* wykazała słabą ekspresję lub jej brak w większości normalnych tkanek i bardzo silną ekspresję w ludzkich tkankach nowotworowych.

## Śródbłonkowy marker nowotworowy 7

### Budowa śródbłonkowego markera nowotworowego 7

Śródbłonkowy marker nowotworowy 7 (TEM7, TEM3, PLXDC1 – ang. *plexin domain containg 1*) występuje w błonie komórkowej i wykazuje aktywność receptorową. Podobnie jak TEM1, TEM7 jest białkiem przezbłonowym z dużą domeną zewnątrzkomórkową, hydrofobową przezbłonową i krótką cytoplazmatyczną. Region zewnątrzkomórkowy zawiera domeny: podobną do pleksyny i podobną do nidogenu. Chociaż funkcja tych domen nie jest dokładnie poznana, to wiadomo, że najprawdopodobniej uczestniczą one w interakcjach białko – białko [8]. Powszechnie wiadomo, że główną funkcją nidogenu (entaktyny) jest wiązanie niekolagenowych składników błony podstawnej z siecią włókien kolagenu IV. Prawdopodobnie uczestniczy też w adhezji komórek.

### Homolog śródbłonkowego markera nowotworowego 7 – TEM7R

Białko pokrewne śródbłonkowego markera nowotworowego 7 (TEM7R, PLXDC2 – ang. *plexin domain containing 2*) wykazuje 57-procentową homologię aminokwasową z TEM7 [8].

### Śródbłonkowy marker nowotworowy 7 a neoangiogeneza

Nanda i wsp. [35] zidentyfikowali w śródbłonku nowotworowym kilka nowych wariantów TEM7: wewnątrzkomórkowy (TEM7-I), wydzielniczy (TEM7-S) oraz obecny

na powierzchni błony komórkowej (TEM7-M). Stwierdzono ponadto, że zarówno białko, jak i mRNA TEM7 wykazują nadekspresję w śródbłonku różnych guzów litych, m.in. w raku piersi, płuca, mózgu, jelita grubego [35] oraz w mięsaku kościopochodnym [36]. Wyniki tych badań stwarzają nowe możliwości dla terapii antyangiogennej, której celem byłby błonowy TEM7, tym bardziej że zidentyfikowano fizjologiczny ligand receptorów TEM7 i TEM7R – kortaktynę. Domeną wiążącą te receptory jest 9-aminokwasowa sekwencja, zlokalizowana tuż za domeną SH3. Kortaktyna jest białkiem występującym w cytoplazmie różnych typów komórek i odgrywającym rolę m.in. w migracji komórek i endocytozie. Odkrycie tego ligandu stwarza szanse na to, by zsyntetyzowane zostały związki o małej masie cząsteczkowej (peptydy lub ich analogi), dla których celem terapeutycznym będzie śródbłonek naczyń krwionośnych guzów [35].

Wyjaśnienia roli TEM7 w procesie neoangiogenezy podjęli się Fuchs i wsp. [36]. Zaobserwowali oni dodatnią korelację pomiędzy ekspresją TEM7 i nasileniem tworzenia naczyń *in vitro*, a także inhibicyjny wpływ siRNA TEM7 na proliferację i migrację komórek śródbłonka. Wynika z tego, że TEM7 odgrywa rolę w procesie angiogenezy, ponieważ proliferacja i migracja komórek śródbłonka to kluczowe etapy w tym procesie.

Małe interferujące RNA (ang. *small interfering RNA* – siRNA) to dwuniciowe cząsteczki RNA, które powodują wyciszanie ekspresji genów o homologicznej sekwencji. Kompleks siRNA-rybonukleza wiąże się z komplementarną do siRNA cząsteczką mRNA i tnie ją na kawałki, uniemożliwiając w ten sposób powstanie kodowanego przez nią białka.

## Śródbłonkowy marker nowotworowy 5

### Śródbłonkowy marker nowotworowy 5 – receptor GPCR-podobny

Śródbłonkowy marker nowotworowy 5 (TEM5), choć podobnie jak wcześniej omówione TEMs występuje w błonie komórkowej, jest nieco innym białkiem. Aktywność receptorową wykazuje wraz z białkiem G, uczestniczy w komunikacji komórkowej i transdukcji sygnału. To białko przezbłonowe zbudowane jest z 1331 aminokwasów. Długa część N-końcowa zawiera kilka funkcjonalnych domen: cztery domeny LRR (ang. *leucine – rich repeats*), domenę typu immunoglobuliny oraz domenę wiążącą hormon. Domeną przezbłonową TEM5 przypomina białka CELsr1 związane z kadheryną i rodziną receptorów $\alpha$-latrotoksynowych niezależnych od wapnia [8].

Budowa tego receptora sugeruje jego przynależność do rodziny receptorów GPCR klasy II (ang. *G protein-coupled receptors*). Receptory te odpowiadają za przewodzenie sygnału komórkowego. Ich ligandami są peptydy, takie jak sekretyna, kalcytonina, wazoaktywny peptyd jelitowy. Aktywują one kaskady sygnałowe cyklazy adenylanowej i fosforanu inozytolu. W związku z powyższym istnieje sugestia, że TEM5 również może transmitować sygnały do komórki [8]. Wykazuje także podobieństwo do dwóch genów *GPR 123* i *GPR 125*. Innym homologiem TEM5 jest inhibitor angiogenezy specyficzny dla mózgu – BAI 1, regulator angiogenezy indukowany przez p53 [25].

### Rola śródbłonkowego markera nowotworowego 5 w procesie angiogenezy

W czasie angiogenezy, podczas tworzenia struktur kapilarnych lub stymulacji przez czynniki wzrostowe, komórki śródbłonka uwalniają rozpuszczalny fragment TEM5 (sTEM5, *soluble* TEM5), który wiąże glikozaminoglikany. W wyniku proteolitycznego przekształcenia przez MMP-9 na powierzchni sTEM5 jest eksponowane miejsce wiązania integryny $\alpha_v\beta_3$. Adhezja komórek endotelialnych do sTEM5 promuje ich przeżycie [37].

Omówione śródbłonkowe markery nowotworowe, mając zdolność wiązania białek macierzy zewnątrzkomórkowej (kolageny, laminina, fibronektyna, żelatyna), prawdopodobnie uczestniczą w angiogenezie nowotworowej. Ich lokalizacja w błonie komórkowej czyni je dogodnym celem terapii przeciwnowotworowej.

**Piśmiennictwo**


1. Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. N Engl J Med 1995; 333: 1757-62.
2. Rak J, Yu JL, Kerbel RS, Coomber BL. What do oncogenic mutations have to do with angiogenesis/vascular dependence of tumors? Cancer Res 2002; 62: 1931-4.
3. Folkman J. Angiogenesis and angiogenesis inhibition. EXS 1997; 79: 1-8.
4. Ribatti D. The involvement of endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis. J Cell Mol Med 2004; 8: 294-300.
5. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells. Mobilization, differentiation, and homing. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003; 23: 1185-9.
6. Rafii S. Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. J Clin Invest 2000; 105: 17-9.
7. St Croix B, Rago C, Velculescu V, et al. Genes expressed in human tumor endothelium. Science 2000; 289: 1197-201.
8. Carson-Walter EB, Watkins DN, Nanda A, Vogelstein B, Kinzler KW, St Croix B. Cell surface tumor endothelial markers are conserved in mice and humans. Cancer Res 2001; 61: 6649-55.
9. Bradley KA, Mogridge J, Mourez M, Collier RJ, Young JAT. Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. Nature 2001; 414: 225-9.
10. Werner E, Kowalczyk AP, Faundez V. Anthrax toxin receptor 1/tumor endothelium marker 8 mediates cell spreading by coupling extracellular ligands to the actin cytoskeleton. J Biol Chem 2006; 281: 23227-36.
11. Scobie HM, Rainey JA, Bradley KA, Young JA. Human capillary morphogenesis protein 2 functions as an anthrax toxin receptor. PNAS 2003; 100: 5170-4.
12. Bonuccelli G, Sotgia F, Frank PG, et al. ATR/TEM8 is highly expressed in epithelial cells lining Bacillus anthracis` three sites of entry: implications for the pathogenesis of anthrax infection. Am J Physiol Cell Physiol 2005; 288: 1402-10.
13. Rainey GJ, Wigelsworth DJ, Ryan PL, Scobie HM, Collier RJ, Young JAT. Receptor-specific requirements for anthrax toxin delivery into cells. PNAS 2005; 102: 13278-83.
14. Nanda A, Carson-Walter EB, Seaman S, et al. TEM8 interacts with the cleaved C5 domain of collagen alpha 3(VI). Cancer Res 2004; 64: 817-20.
15. Rmali KA, Puntis MCA, Jiang WG. Prognostic values of tumor endothelial markers in patients with colorectal cancer. J Gastroenterol 2005; 11: 1283-6.
16. Rmali KA, Watkins G, Harrison G, Parr C, Punits MC, Jiang WG. Tumour endothelial marker 8 (TEM-8) in human colon cancer and its association with tumour progression. Eur J Surg Oncol 2004; 30: 948-53.
17. Davies G, Rmali KA, Watkins G, Mansel RE, Mason MD, Jiang WG. Elevated levels of tumour endothelial marker-8 in human breast cancer and its clinical significance. Int J Oncol 2006; 29: 1311-7.

18. Koo HM, VanBrocklin M, McWilliams MJ, Leppla SH, Duesbery NS, Woude GF. Apoptosis and melanogenesis in human melanoma cells induced by anthrax lethal factor inactivation of mitogen-activated protein kinase kinase. PNAS 2002; 99: 3052-7.
19. Rouleau C, Menon K, Boutin P, et al. The systemic administration of lethal toxin achieves a growth delay of human melanoma and neuroblastoma xenografts: assessment of receptor contribution. Int J Oncol 2008; 32: 739-48.
20. Duesbery NS, Resau J, Webb CP, Koochekpour S, Koo HM, Leppla SH, Woude GF. Suppression of ras-mediated transformation and inhibition of tumor growth and angiogenesis by anthrax lethal factor, a proteolytic inhibitor of multiple MEK pathways. PNAS 2001; 98: 4089-94.
21. Chen KH, Liu S, Bankston LA, Liddington RC, Leppla SH. Selection of anthrax toxin protective antigen variants that discriminate between the cellular receptors TEM8 and CMG2 and achieve targeting of tumor cells. J Biol Chem 2007; 282: 9834-45.
22. Rogers MS, Christensen KA, Birsner AE, et al. Mutant anthrax toxin B moiety (protective antigen) inhibits angiogenesis and tumor growth. Cancer Res 2007; 67: 9980-5.
23. Duan HF, Hu XW, Chen JL, et al. Antitumor activities of TEM8-Fc: an engineered antibody-like molecule targeting tumor endothelial marker 8. J Natl Cancer Inst 2007; 99: 1551-5.
24. Liu S, Wang H, Currie BM, et al. Matrix metalloproteinases anthrax lethal toxin demonstrates high potency in targeting tumor vasculature. J Biol Chem 2008; 283: 529-40.
25. Nanda A, St Croix B. Tumor endothelial markers: new targets for cancer therapy. Curr Opin Oncol 2004; 16: 44-9.
26. Rettig WJ, Garin-Chesa P, Healey JH, Su SL, Jaffe EA, Old LJ. Identification of endosialin, a cell surface glycoprotein of vascular endothelial cells in human cancer. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 10832-6.
27. Christian S, Ahorn H, Koehler A, et al. Molecular cloning and characterization of endosialin, a C-type lectin-like cell surface receptor of tumor endothelium. J Biol Chem 2001; 276: 7408-14.
28. Opavsky R, Haviernik P, Jurkovicova D, et al. Molecular characterization of the mouse TEM1/endosialin gene regulated by cell density in vitro and expressed in normal tissues in vivo. J Biol Chem 2001; 276: 38795-807.
29. Im DS. Orphan G protein-coupled receptors and beyond. Jpn J Pharmacol 2002; 90: 101-6.
30. Tomkowicz B, Rybinski K, Foley B, et al. Interaction of endosialin/TEM1 with extracellular matrix proteins mediates cell adhesion and migration. PNAS 2007; 104: 17965-70.
31. Nanda A, Karim B, Peng Z., et al. Tumor endothelial marker 1 (TEM1) functions in the growth and progression of abdominal tumors. PNAS 2006; 103: 3351-6.
32. Simonavicius N, Robertson D, Bax DA, Jones C, Huijbers IJ, Isacke CM. Endosialin (CD248) is a marker of tumor-associated pericytes in high-grade glioma. Mod Pathol 2008; 21: 308-15.
33. Christian S, Winkler R, Helfrich I, Boos AM, Besemfelder E, Schadendorf D, Augustin HG. Endosialin (Tem1) is a marker of tumor-associated myofibroblasts and tumor vessel-associated mural cells. Am J Pathol 2008; 172: 486-94.
34. Becker R, Lenter MC, Vollkommer T, Boos AM, Pfaff D, Augustin HG, Christian S. Tumor stroma marker endosialin (Tem1) is a binding partner of metastasis – related protein Mac-2 BP/90K. FASEB J 2008; 22: 3059-67.
35. Nanda A, Buckhaults P, Seaman S, et al. Identification of a binding partner for the endothelial cell surface proteins TEM7 and TEM7R. Cancer Res 2004; 64: 8507-11.
36. Fuchs B, Mahlum E, Halder C, et al. High expression of tumor endothelial marker 7 is associated with metastasis and poor survival of patients with osteogenic sarcoma. Gene 2007; 399: 137-43.
37. Vallon M, Essler M. Proteolytically processed soluble tumor endothelial marker (TEM) 5 mediates endothelial cell survival during angiogenesis by linking integrin alpha(v)beta3 to glycosaminoglycans. J Biol Chem 2006; 281: 34179-88.

**Adres do korespondencji**

dr med. Ewa Kopczyńska
Katedra i Zakład Patobiochemii i Chemii Klinicznej
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
*Collegium Medicum* w Bydgoszczy
ul. M. Skłodowskiej-Curie 9
85-094 Bydgoszcz
tel. +48 52 585 36 00
e-mail: kopczynska@cm.umk.pl