

Glikoproteiny typu mucyn wytwarzane są głównie przez nabłonkowe komórki układu pokarmowego, oddechowego i moczopłciowego bądź to w formie wydzielniczej, bądź jako integralne białka błonowe. Cechami wyróżniającymi mucyny spośród innych glikoprotein są: (i) znaczna zawartość reszt seryny, treoniny i proliny, (ii) bardzo duża liczba przyłączonych łańcuchów O-glikozydowych, (iii) obecność w części białkowej powtarzających się odcinków o identycznym składzie aminokwasowym. Ze względu na sztywny, wydłużony kształt, ujemny ładunek, obecność specyficznych struktur cukrowych mucyny mają pełnić funkcje ochronne oraz brać udział w oddziaływaniach międzykomórkowych. Są one nośnikami antygenów towarzyszących nowotworom i jednym z czynników ułatwiających powstawanie przerzutów.

Słowa kluczowe: mucyny, struktura, funkcje, tumor/cancer

*Mucin-type glycoproteins are produced by epithelial cells of gastrointestinal, respiratory and urogenital tracts as secreted or membrane-bound molecules. Their protein backbone is characterized by the presence of repeating sequences rich in serine, threonine and proline residues. Mucins are highly glucosylated glycoproteins containing numerous O-linked oligosaccharides, often terminated in sialic acid. The increasing number of evidence suggest that because of their extended, filamentous structures, negative charge, presence of specific carbohydrate structures they play a role in mucosal defence, cellular signalling and cell-cell interactions. Mucins undergo characteristic changes in their expression associated with neoplastic transformation. They are the carriers of tumor-associated antigens, and probably one of the factors promoting metastasis.*

Key words: mucins, structure, function, tumor/cancer

# Mucyny – budowa, właściwości i rola w progresywnym wzroście nowotworowym

*Structure and function of mucins, their role in tumor progression*

Anna Laskowska, Maciej Ugorski

Laboratorium Glikobiologii, Zakład Immunochemii, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu

## WSTĘP

Spośród wielu typów komórek budujących organizmy wyższych kręgowców, tylko komórki naskórka i nabłonków wyściełających światła przewodu pokarmowego, oddechowego i moczopłciowego wchodzi w bezpośredni kontakt ze środowiskiem zewnętrznym. Tworzą one bariery zabezpieczające żywy organizm, między innymi przed utratą nadmiernych ilości wody, mechanicznymi i enzymatycznymi uszkodzeniami, czy inwazją ze strony różnych mikroorganizmów. Ze względu na szczególne zagrożenia, komórki naskórka i różnych nabłonków wymagają istnienia specjalnych mechanizmów ochronnych, co w przypadku tych ostatnich wyraża się produkcją wydzieliny, stanowiącej fizyczną barierę pomiędzy błoną komórkową a środowiskiem zewnętrznym. W skład tej wydzieliny, pokrywającej powierzchnie nabłonków i noszącej nazwę śluzu, wchodzi przede wszystkim glikoproteiny o wysokiej masie cząsteczkowej, które noszą nazwę mucyn. To właśnie one nadają śluzom ich lepką, żelowatą konsystencję i są odpowiedzialne za ich ochronne działanie [Strous i Dekker, 1992]. Śluz, wytwarzany przez specjalny rodzaj komórek nabłonkowych, zawiera około 90 proc. wody i 0,5-5 proc. glikoprotein typu mucyny. W jego skład wchodzi również sole mineralne, białka, lipidy i kwasy nukleinowe pochodzące z komórek i surowicy. Po raz pierwszy mucyny w stanie czystym wyizolowano ze śluzu pokrywającego powierzchnię nabłonka szyjki macicy [Carlstedt i wsp., 1983]. Później okazało się, że do grupy mucyn należą również niektóre integralne białka błonowe obecne na apikalnej powierzchni różnych komórek nabłonkowych, a także na leukocytach [Van Klinken i wsp., 1995]. Stąd też wziął się podział mucyn na dwie klasy: wydzielnicze (rozpuszczalne) i błonowe [Strous i Dekker, 1992]. Te ostatnie, jako nośniki różnych struktur cukrowych mogą pełnić funkcje ligandów dla cząsteczek adhezyjnych z rodziny selektyn, w związku z czym przypisuje im się ważną

rolę w oddziaływaniach międzykomórkowych – adhezji [Ugorski i Kłopotcki, 1996].

Cechami wyróżniającymi mucyny spośród innych glikoprotein są: (i) znaczna zawartość reszt seryny, treoniny i proliny oraz (ii) bardzo duża liczba przyłączonych łańcuchów O-glikozydowych. Mucyny wydzielnicze charakteryzują się bardzo wysoką masą cząsteczkową, która np. dla mucyn układu oddechowego może dochodzić do 10-30 000 kDa [Sheehan i wsp., 1991]. Zgodnie z przyjętą zasadą, do mucyn zalicza się glikoproteiny, w których O-glikany stanowią nie mniej niż 50 proc. całkowitej masy cząsteczki. Liczne łańcuchy O-glikozydowe przyłączone do reszt seryny i treoniny oraz duża liczba reszt proliny sprawiają, że cząsteczki mucyn reprezentują sztywne, wyciągnięte struktury.

Ze względu na wielkość cząsteczek, złożoność budowy, wysoką zawartość cukrów i heterogenność – badania nad strukturą i funkcjami mucyn napotykały na znaczne przeszkody metodyczne, czego przykładem były kłopoty z wyznaczeniem mas cząsteczkowych zarówno glikozylowanych mucyn, jak i ich części białkowej [Strous i Dekker, 1992]. Przełom w badaniach nad mucynami nastąpił wraz z postępem w dziedzinie klonowania genów. Izolacja i sekwencjonowanie komplementarnych DNA dla tych glikoprotein wykazały, że wytwarzane są one nie tylko przez komórki nabłonkowe, ale również przez śródbłonek naczyń i leukocyty. Stąd van Klinken i wsp. (1995) zaproponowali nowy podział mucyn na nabłonkowe i śródbłonkowe. Niniejsze opracowanie jest ograniczone wyłącznie do omówienia tych pierwszych.

## BUDOWA MUCYN NABŁONKOWYCH

### Część białkowa (apomucyna)

Do tej pory u ludzi zidentyfikowano 9 genów dla mucyn nabłonkowych, które oznaczono jako *MUC1-MUC4*, *MUC5A/C*, *MUC5B* oraz *MUC6-MUC8*. Pełną sekwencję cDNA poznano dla *MUC1*, *MUC2*,

**Tab. 1. Typy regionu rdzeniowego łańcuchów O-glikozydowych mucyn**

REGION RDZENIOWY (INNER CORE)	
Typ 1	Gal $\beta$ 1-3GalNAc-R
Typ 2	GlcNAc $\beta$ 1-6[Gal $\beta$ 1-3]GalNAc-R
Typ 3	GlcNAc $\beta$ 1-3GalNAc-R
Typ 4	[GlcNAc $\beta$ 1-6]GlcNAc $\beta$ 1-3GalNAc-R
Typ 5	GalNAc $\alpha$ 1-3GalNAc-R
Typ 6	GlcNAc $\beta$ 1-6GalNAc-R
Typ 7	GalNAc $\alpha$ 1-6GalNAc-R
Typ 8	Gal $\alpha$ 1-3GalNAc-R

**Tab. 2. Typy regionu szkieletowego łańcuchów O-glikozydowych mucyn**

REGION SZKIELETOWY (CORE BACKBONE)	
Typ 1	Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ -R
Typ 2	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ -R
Typ 3	Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-R
Typ 4	Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-R

**Tab. 3. Cukrowe antygeny towarzyszące nowotworom, występujące na łańcuchach O-glikozydowych mucyn**

T	Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr
Tn	GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr
sjało-Tn	NeuAc $\alpha$ 2-6 GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr
sLe <sup>x</sup>	NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-3]GlcNAc $\beta$ -R
sLe <sup>a</sup>	NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3[Fuc $\alpha$ 1-4]GlcNAc $\beta$ -R

*MUC4* i *MUC7* [Bobek i wsp., 1993; Gendler i wsp., 1990; Gum i wsp., 1994; Moniaux i wsp., 1999], natomiast dla pozostałych jest ona poznana tylko częściowo. Analiza cDNA pozwoliła na potwierdzenie wcześniejszych danych dotyczących niezwykle wysokiej zawartości reszt pięciu aminokwasów: seryny, treoniny i proliny, jak również glicyny i alaniny, które razem stanowią aż 50 proc. wszystkich reszt aminokwasowych. Pierwszą pełną sekwencję cDNA podano dla ludzkiej mucyny o nazwie epizjalina (PEM – *polimorfic epithelial mucin*, PUM, MAM-6, DF-3), która występuje na powierzchni wielu różnych komórek i która obecnie nosi nazwę *MUC1* [Gendler i wsp., 1990]. Razem z *MUC4* [Moniaux i wsp., 1999], są to jedyne mucyny nabłonkowe reprezentujące integralne białka błonowe. Należy zaznaczyć, że w przypadku niektórych mucyn ekspresję ich genów stwierdza się w większości nabłonków, czego przykładem są *MUC1* i *MUC4* [Audie i wsp., 1993; Carrato i wsp., 1994; Ho i wsp., 1993], w przypadku innych ta ekspresja jest ograniczona tylko do niektórych narządów. I tak mRNA dla *MUC7* stwierdza się tylko w podżuchwowych gruczołach ślinowych i tchawicy [Biesbrock i wsp., 1997]. Stwierdzono również, że ta sama komórka zdolna jest do ekspresji kilku różnych mucyn, czego

przykładem są komórki kubkowe błony śluzowej jelit produkujące *MUC2* i *MUC3* [Chang i wsp., 1994].

Część białkowa mucyn zbudowana jest z kilku różnych domen. Największą z nich, tzw. domenę TRP (ang. *Tandem Repeat Peptide*), która jest obecna w każdej z poznanych mucyn, tworzą, występujące jeden za drugim, powtarzające się odcinki o identycznym składzie aminokwasowym. Wielkość tych fragmentów i ich sekwencja aminokwasowa są charakterystyczne dla danego typu apomucyny, natomiast liczba powtarzających się odcinków jest zmienna, stąd też ich angielska nazwa VNTR (*variable number of tandem repeats*). W przypadku *MUC1* waha się ona w granicach od 20 do 120 takich powtórzeń, z których każde utworzone jest z 20 aminokwasów [Gendler i wsp., 1990]. Centralnie położoną domenę TRP charakteryzuje bardzo wysoka zawartość reszt treoniny i seryny, z których wiele podstawionych jest łańcuchami O-glikozydowymi.

W cząsteczce błonowej mucyny *MUC1* (epizjalinie) po obu stronach domeny TRP występują sekwencje również bogate w reszty treoniny i seryny, które jednak nie są glikozylowane (ryc. 1A). Podobnie jak w przypadku innych integralnych białek błonowych, *MUC1* zawiera domenę śródbłonową, za pomocą której cząsteczki zakotwiczone są w błonie komórkowej, oraz domenę cytoplazmatyczną. Domena zewnętrzna komórki może być zbudowana z 1000 do 2200 aminokwasów, co związane jest ze zmienną liczbą podjednostek w domenie TRP [Gendler i wsp., 1990]. Ze względu na sztywny, wydłużony kształt domeny zewnętrznej komórki, może ona wystawać ponad powierzchnię błony komórkowej na odległość 200-500 nm [Wessling i wsp., 1995, 1996]. Taka cząsteczka *MUC1* utworzona jest z dwóch niekowalencyjnie związanych łańcuchów polipeptydowych, które powstają w wyniku proteolitycznego rozszczepienia pierwotnej cząsteczki [Ligtenberg i wsp., 1992]. W cząsteczce drugiej z mucyn błonowych – *MUC4* również wyróżnić można część zewnątrzkomórkową z domeną TRP oraz część śródbłonową i ogon cytoplazmatyczny [Moniaux i wsp., 1999]. Pomiedzy domeną TRP a powierzchnią błony komórkowej wyróżnić można dodatkowo: dwie domeny typu EGF, dwie domeny bogate w cysteinę oraz odcinek, w którym przyłączone są łańcuchy N-glikozydowe.

Natomiast cząsteczki mucyn wydzielniczych zawierają, obok domeny TRP, jeszcze inne rodzaje domen. Mucyny *MUC2* (ryc. 1B), *MUC5AC*, *MUC5B* i *MUC6* wykazują pewne podobieństwa w budowie, czego wyrazem jest obecność w każdej z nich domen bogatych w cysteinę, analogicznych do domen D występujących w białku – czynniku von Willebranda. W przypadku *MUC2* domeny typu D stwierdza się na obu końcach cząsteczki [Gum i wsp., 1994], natomiast w genach mucyn

*MUC5AC*, *MUC5B* i *MUC6* podobne domeny wykryto w sekwencjach leżących, w stosunku do domeny TRP, od strony końca 3' tych genów [Meerzaman i wsp., 1994; Toribara i wsp., 1997].

Mucyny wydzielnicze występują głównie w formie oligomerów. Badania prowadzone przy użyciu mikroskopu elektronowego wykazały, że tworzą one liniowe struktury, jak to ma miejsce w przypadku mucyn pochodzących z ludzkich oskrzeli [Slayer i wsp., 1984]. Homooligomery powstające w wyniku tworzenia mostków dwusiarczkowych pomiędzy domenami bogatymi w cysteinę sąsiadujących monomerów wykazują znaczną heterogenność pod względem wielkości. To właśnie obecność oligomerów warunkuje żelowatą konsystencję śluzów wyścielających światło układu oddechowego, czy pokarmowego.

Mucyna *MUC7* różni się od pozostałych mucyn wydzielniczych wielkością (masa cząsteczkowa wynosi jedynie 125-250 kDa) i brakiem domen bogatych w cysteinę [Bobek i wsp., 1993]. Cząsteczki *MUC7* występują głównie w formie monomerów, obok których spotyka się połączone końcami dimery, oraz tworzące „gwiazdę” tetramery [Mehrotra i wsp., 1998]. Wreszcie, sklonowany ostatnio gen dla *MUC3* wykazuje obecność jednej domeny podobnej do EGF, której funkcja nie jest znana [Gum i wsp., 1997].

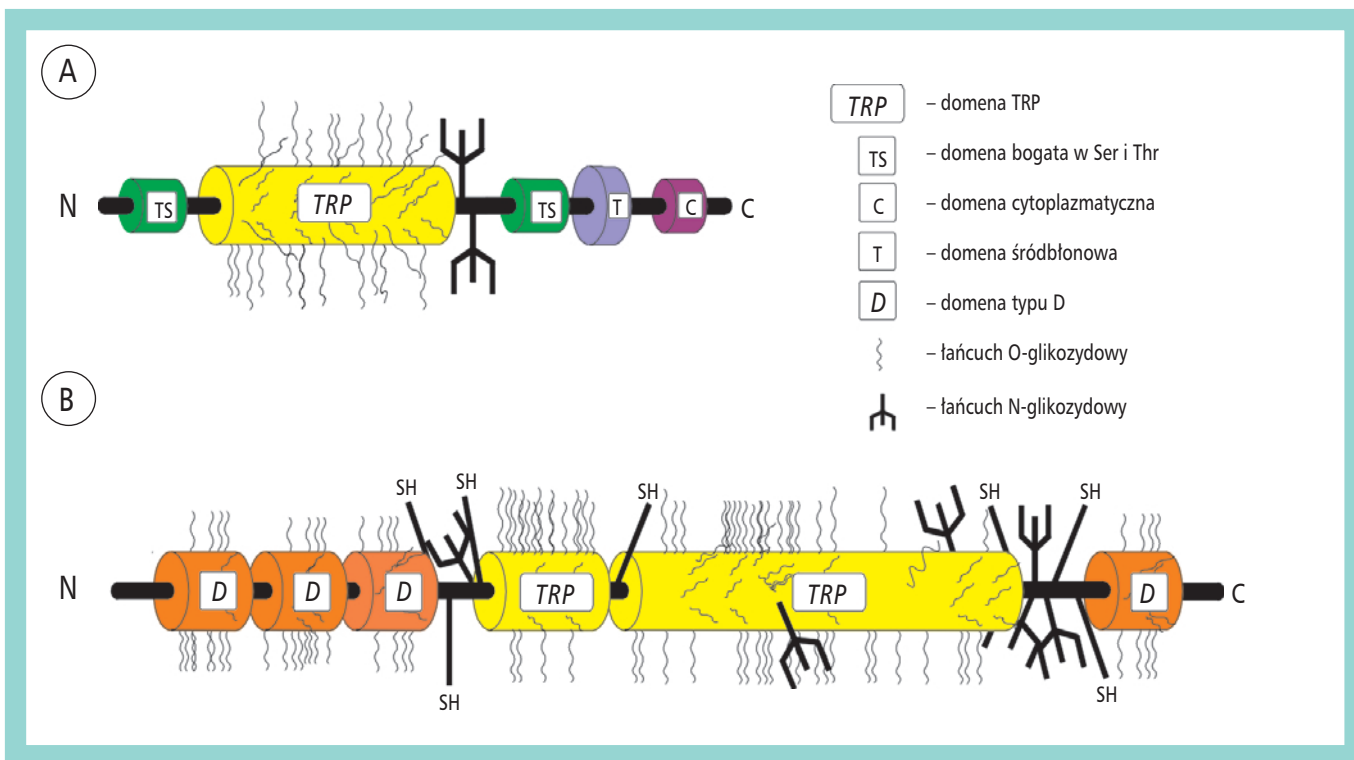
Mimo wielu podobieństw w budowie i składzie aminokwasowym mucyny wydają się reprezentować heterogenną grupę białek o wspólnych funkcjach, a nie jedną rodzinę białkową, na co wskazuje bardzo mały stopień homologii w ich sekwencjach aminokwasowych [von Klinken i wsp., 1995].

### Część cukrowa (O-glikany)

W glikoproteinach typu mucyn licznie występujące łańcuchy cukrowe połączone są z rdzeniem białkowym przede wszystkim wiązaniami O-glikozydowymi, utworzonymi pomiędzy resztami treoniny i seryny łańcucha polipeptydowego a resztami N-acetylogalaktozoaminy łańcucha cukrowego.

Łańcuchy O-glikozydowe mucyn dzielimy umownie na trzy części: (i) odcinek rdzeniowy (ang. *inner core*), „szkieletowy” (*backbone*) i obwodowy (*periphery*) [Hanski i wsp., 1992]. O-glikany mucyn, zbudowane zwykle z 1-20 reszt cukrowych, mogą tworzyć struktury liniowe, bądź występować jako struktury rozgałęzione. Są one zwykle naładowane ujemnie ze względu na obecność licznych reszt kwasu sjałowego lub grup siarczanowych, przyłączonych do galaktozy lub N-acetyloglukozoaminy łańcucha cukrowego.

Odcinek rdzeniowy, stanowiący najbardziej wewnętrzny fragment łańcucha cukrowego, połączony jest bezpośrednio z resztą seryny/treoniny łańcucha polipeptydowego poprzez redukcyjną resztę N-acetylogalaktozoaminy. W znanych dotychczas mucynach stwierdzono obecność 8 typów rdzeni (tab. 1.) [Kim i wsp., 1996]. Nie wykazano, przynajmniej na razie, żadnych ogólnych reguł



Ryc. 1. Schemat budowy mucyn: (A) mucyna błonowa *MUC1*, (B) mucyna wydzielnicza *MUC2*, opis w tekście

dotyczących występowania mucyn o określonym typie rdzenia w danym typie tkanki. Najczęściej spotykane w prawidłowych tkankach są struktury rdzeniowe typu 1, 2, 3 i 4. Na przykład w komórkach nabłonka okrężnicy występują mucyny z łańcuchami O-glikozydowymi o rdzeniu cukrowym typu 3 [Podolsky, 1985], natomiast w komórkach pochodzących z żołądka – typu 1 i 2 [Sloimiany i wsp., 1984]. Należy zaznaczyć, że typ rdzenia syntetyzowany przez komórkę może ulec zmianie w wyniku transformacji nowotworowej [Kim i wsp., 1996; Hanski i wsp., 1992]. I tak w przypadku raka okrężnicy obok rdzenia typu 3, pojawiają się O-glikany z rdzeniami typu 1 i 5.

Prawidłowe komórki nabłonkowe błon śluzowych człowieka wytwarzają mucyny z łańcuchami cukrowymi o czterech typach odcinka „szkieletowego” (tab. 2.). Typ 2 odcinka „szkieletowego” może wydłużać się, tworząc tzw. łańcuchy polilaktozaminowe zbudowane z powtarzających podjednostek N-acetylolaktozamin.

W części obwodowej łańcuchów O-glikozydowych mucyn do łańcucha głównego najczęściej przyłączane są reszty kwasu sjałowego i/lub fukozy, co prowadzi do powstania antygenów z grupy Lewis (tab. 3.) [Feizi i Childs, 1987]. Stosunkowo często przyłączane są również grupy siarczanowe [Van Beurden-Lamers i wsp., 1989]. Znacznie rzadziej natomiast terminalną resztą cukrową jest N-acetylogalaktozamina lub galaktoza, co z kolei prowadzi do powstania antygenów grupowych ABO (tab. 3.) [Feizi i Childs, 1985]. Obecność licznych reszt kwasu sjałowego i grup siarczanowych nadaje mucynom wydzielni-

czym ładunek ujemny, którego obecność w dużej mierze determinuje właściwości fizykochemiczne tej grupy glikoprotein. W komórkach prawidłowych mucyny błonowe, nie będące składnikiem śluzu, zawierają stosunkowo niedużo reszt kwasu sjałowego i grup siarczanowych na korzyść galaktozy, fukozy i N-acetylolaktozamin [Corfield i Warren, 1996].

Obok łańcuchów O-glikozydowych, cząsteczki mucyn mogą również zawierać niewielką liczbę łańcuchów N-glikozydowych [Hilken i Buijs, 1988]. W przypadku mucyny *MUC1*, będącej integralnym białkiem błonowym, są to łańcuchy cukrowe typu złożonego [Hilken i Buijs, 1988]. Natomiast na mucynach typu wydzielniczego wydają się dominować łańcuchy N-glikozydowe typu „bogatego w mannozę” [Van Nieuw Amerongen i wsp., 1987].

### ZMIANY W EKSPRESJI I GLIKOZYLACJI MUCYN POWSTAŁE W WYNIKU TRANSFORMACJI NOWOTWOROWEJ

Liczne badania porównawcze tkanek nowotworowych i odpowiadających im tkanek prawidłowych, jak również rosnących *in vitro* linii komórkowych transformowanych i nietransformowanych wykazały, że zmiany w części białkowej i cukrowej mucyn nieodłącznie towarzyszą komórkom nowotworowym. Zmiany w części białkowej mogą obejmować zarówno zmniejszenie lub zwiększenie ekspresji danej apomucyny, jak i zmiany w rodzaju produkowanych mucyn.

Szczególnie dużo uwagi poświęcono zmianom w ekspresji mucyny *MUC1*. Z ba-

dań tych wynika, że procesowi nowotworowemu na ogół towarzyszy znaczące podwyższenie poziomu ekspresji, związanej z powierzchnią komórki mucyny [Zotter i wsp., 1988]. W przypadku złośliwych form raka piersi może on być do 10 razy większy w porównaniu z prawidłową tkanką [Zotter i wsp., 1988]. Sugeruje się, że ekspresja *de novo* lub nadekspresja mucyny *MUC1* jest cechą komórek nowotworowych związaną z ich inwazyjnością. Korelację między obecnością *MUC1* a inwazyjnością komórek nowotworowych pokazano między innymi na przykładzie inwazyjnego raka przewodów żółciowych, brodawczaka trzustki śluzotwórczego wewnątrzprzewodowego i gruczolakoraka przewodów żółciowych [Yonezawa i Sato, 1997; Yonezawa i wsp., 1998]. Równocześnie obecność mucyny *MUC2* w tych samych typach nowotworów wskazuje na ich nieinwazyjny charakter i jest dobrym wskaźnikiem prognostycznym [Yonezawa i Sato, 1997]. Innym przykładem zmian ilościowych i jakościowych w ekspresji mucyn są komórki raka piersi, w których, obok znacznie podwyższonej ekspresji *MUC1*, stwierdza się obecność mucyny *MUC6*, nie wytwarzanej przez prawidłowe komórki [de Bolos i wsp., 1998].

Zmiany, którym podlegają łańcuchy cukrowe mucyn, a które związane są z procesem nowotworowym, można podzielić na trzy kategorie: (i) obniżenie liczby łańcuchów O-glikozydowych przyłączonych do apomucyny, (ii) niekompletną syntezę O-glikanów, której towarzyszy nagromadza-

nie struktur prekursorowych, (iii) zmiany w strukturach łańcuchów O-glikozydowych.

Obniżenie liczby łańcuchów O-glikanów prowadzi do odsłonięcia pewnych fragmentów łańcucha polipeptydowego mucyn, które stają się dostępne, np. dla komórek układu odpornościowego [Finn i wsp., 1995]. Zjawisko to, obserwowane w przypadku *MUC1* obecnej na komórkach raka piersi, jajnika i trzustki próbuje się obecnie wykorzystywać w immunoterapii tych nowotworów (patrz rozdział: *MUC1 jako antygen*).

W wyniku niekompletnej syntezy łańcuchów O-glikozydowych mucyn, na powierzchni komórek nowotworowych gromadzą się antygeny T, Tn i sjalo-Tn (tab. 4.) [Lisowska, 1995]. W tkankach prawidłowych antygen T występuje głównie w formie kryptycznej, maskowany przez dołączenie innych reszt cukrowych, najczęściej kwasu sjałowego lub przez bardziej ekspozowane na zewnątrz błony komórkowej inne łańcuchy cukrowe. Można go wykryć, na przykład na powierzchni prawidłowego nabłonka przelyku czy żołądka, ale tylko w ilościach śladowych. Zwiększona ekspresja antygeny T i Tn koreluje z nabyciem przez komórki fenotypu inwazyjnego w rakach pęcherza moczowego, okrężnicy, trzustki i sutka [Dall'Olio, 1995]. Antygen sjalo-Tn pojawia się na powierzchni komórki gruczolakoraka okrężnicy (94 proc.), piersi (84 proc.), płuc (96 proc.) i jajników (100 proc.) [Thor i wsp., 1986].

Przykładem typowych modyfikacji struktur cukrowych związanych z transformacją nowotworową są zmiany w ekspresji układów grupowych ABH i Lewis [Feizi i Childs, 1985]. W przypadku tych ostatnich prowadzi to do pojawiania się (neosyntezy) na powierzchni komórek nowotworowych antygenów sjalo-Lewis<sup>a</sup>, sjalo-Lewis<sup>x</sup>, czy polimerycznych form antygenów sjalo-Lewis<sup>x</sup> i Lewis<sup>y</sup>, których nie stwierdza się na odpowiadających im prawidłowych komórkach.

Generalnie, w porównaniu z prawidłowymi komórkami, mucyny wytwarzane przez komórki nowotworowe charakteryzują się mniejszą liczbą krótszych O-glikanów.

## ROLA W PROGRESYWNYM WZROŚCIE NOWOTWOROWYM

Mucyny wydzielnicze, wchodzące w skład śluzu wysięlającego światła przewodu pokarmowego, oddechowego, moczopłciowego, pełnią funkcje przede wszystkim **ochronne** [Van Klinken i wsp., 1995]. Lepkość śluzu, jego właściwości mechaniczne, są w głównej mierze uzależnione od części cukrowej mucyn, tzn. obecności rozlicznych łańcuchów O-glikozydowych oraz od ich występowania w formie oligomerów.

Obok tej, tradycyjnie przypisywanej im funkcji, mucyny, zwłaszcza błonowe, ze względu na duże rozmiary, ogromną ilość łańcuchów cukrowych, konformację cząsteczki oraz ujemny ładunek, mogą być, z jednej strony, istotną przeszkodą sterycz-

ną w oddziaływaniach między komórkami; z drugiej mogą pełnić rolę ligandów dla cząsteczek adhezyjnych, ułatwiając w ten sposób te kontakty. Dlatego nadekspresja mucyn ma znaczący wpływ na **właściwości adhezyjne** komórek [Hilkens i wsp., 1992; Van Klinken i wsp., 1995]. Przykładem hamującego wpływu na adhezję jest episialina (*MUC1*), która w prawidłowych komórkach nabłonka jest obecna wyłącznie na powierzchni apikalnej, natomiast w wyniku transformacji nowotworowej pojawia się w dużej ilości na całej powierzchni błony komórkowej [Zotter i wsp., 1988]. W konsekwencji prowadzi to do rozluźnienia oddziaływań komórki nowotworowej z komórkami sąsiednimi oraz z macierzą zewnątrzkomórkową, co może, np. ułatwiać uwalnianie się komórek nowotworowych z guza pierwotnego [Hilkens i wsp., 1992; Wesseling i wsp., 1995, 1996]. Zdaniem Wessling i wsp. (1996) anty-adhezyjne właściwości episialiny wynikają najprawdopodobniej z jej struktury. Osiągająca znaczną długość (200-500 nm), sztywna cząsteczka przesłania inne, leżące w obrębie glikokaliksu glikoproteiny o średniej długości cząsteczki około 35 nm. Natomiast ujemny ładunek, który cząsteczkom *MUC1* nadają reszty kwasu sjałowego, zdaniem tych autorów, wydaje się odgrywać znacznie mniejszą rolę w jej antyadhezyjnych właściwościach. Przeciwnie wyniki uzyskali natomiast Sawada i wsp. (1993), którzy w przypadku komórek SW1990 ludzkiego raka trzustki wykazali, że kwas sjałowy, związany właśnie z łańcuchami O-glikozydowymi mucyn, obniża adhezję homo- i heterotypową komórek nowotworowych.

W procesie wiązania komórek nowotworowych do śródbłonka naczyńniowego, który w konsekwencji prowadzi do migracji tych pierwszych z układu naczyniowego, daje się wyróżnić dwa podstawowe etapy. Zgodnie z hipotezą zaproponowaną przez Honna i Tanga (1992) etap pierwszy obejmuje wstępne rozpoznanie i słabe oddziaływanie między komórkami śródbłonka, a toczącymi się na nich komórkami nowotworowymi, w czym udział biorą cząsteczki adhezyjne – selektyny E i P i odpowiednie ligandy cukrowe, głównie antygeny sjalo-Lewis<sup>a</sup> i sjalo-Lewis<sup>x</sup>. Etap drugi obejmuje silne oddziaływanie międzykomórkowe, za które są odpowiedzialne przede wszystkim cząsteczki adhezyjne z rodziny integryn. Rezultaty ostatnich badań wskazują na mucyny jako główne nośniki antygenów sjalo-Lewis<sup>a</sup> i sjalo-Lewis<sup>x</sup> na komórkach nowotworowych [Ugorski i Kłopotki, 1996]. Usunięcie tych glikoprotein z powierzchni błony komórkowej za pomocą O-sjałoglikoproteazy, enzymu trawiącego wyłącznie białka z rodziny mucyn, powoduje w przypadku niektórych linii komórkowych raka okrężnicy znaczne obniżenie ich adhezji do selektyny E i P [Mannori i wsp., 1995]. Podobne wyniki uzyskano stosując inhibitor syntezy łańcuchów O-glikozydowych – benzylo- $\alpha$ -N-acetylogalaktozoaminę [Izumi i wsp., 1995; Kojima i wsp., 1992]. Wskutek działania tego inhibitora na powierzchni komórek

pojawiają się mucyny pozbawione antygenów Lewis. Obniżenie zdolności wiązania komórek raka trzustki do selektyny E uzyskiwano również poprzez zablokowanie tych oddziaływań za pomocą mucyn, zawierających antygeny sjalo-Lewis<sup>a</sup> i sjalo-Lewis<sup>x</sup>, pochodzących z surowicy pacjentów z chorobą nowotworową [Sawada i wsp., 1994].

Wydaje się, że im więcej jest mucyn na powierzchni komórki nowotworowej, im mniej zatem prezentowane są ligandy dla selektyny – antygeny sjalo-Lewis<sup>a</sup> i sjalo-Lewis<sup>x</sup>, tym większa jest zdolność komórek do tworzenia przerzutów [Huand i wsp., 1992]. Na przykładzie komórek ludzkiego raka okrężnicy pokazano, że zahamowanie glikozylacji mucyn obniża właściwości inwazyjne takich komórek w warunkach *in vitro* [Yoon i wsp., 1996].

Biorąc powyższe informacje pod uwagę wydaje się, że mucyny, zwłaszcza te związane z powierzchnią komórki, jak *MUC1*, odgrywają ważną rolę we właściwościach adhezyjnych komórek nowotworowych. Mucyny spełniają bowiem wszystkie podstawowe kryteria „dobrych” ligandów dla selektyny: (i) dzięki wydłużonej i sztywnej budowie oraz wielkości są dobrze wyeksponowane na powierzchni komórek, (ii) posiadają dużą liczbę łańcuchów O-glikozydowych, które skupione w „pęki”, występują głównie w obrębie jednej domeny TRP i jak to już wspomniano (iii) są głównymi nośnikami antygenów cukrowych sjalo Lewis<sup>a</sup> i sjalo Lewis<sup>x</sup> na powierzchni komórek nowotworowych.

## MUC1 JAKO ANTYGEN

Mucyna *MUC1* ze względu na powierzchnię lokalizację, budowę cząsteczki, której charakterystyczną cechą jest obecność powtarzających się sekwencji aminokwasowych tworzących powtarzające się epitopy antygenowe oraz ze względu na fakt, że w komórkach nowotworowych wykazuje niższy stopień glikozylacji, może być rozpoznawana przez komórki układu immunologicznego [Barratt-Boyes, 1996].

Rozpoznanie *MUC1* zarówno przez limfocyty T (CD8<sup>+</sup>) cytotoksyczne, jak i pomocnicze nie wymaga jej prezentacji, odpowiednio przez cząsteczki MHC klasy I i II [Finn i wsp., 1995]. Jest ona bezpośrednio wiązana przez cząsteczki TCR. Zdolność do wywołania odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego przez *MUC1* wykazano początkowo u pacjentów z rakiem trzustki i piersi, u których stwierdzono obecność cytotoksycznych limfocytów T w drenujących węzłach chłonnych. Komórki te, po stymulacji *in vitro* reagowały z i niszczyły komórki różnych linii komórkowych raka trzustki i piersi pod warunkiem, że na ich powierzchni występowały cząsteczki *MUC1* [Barnd i wsp., 1989].

Cytotoksyczne limfocyty T rozpoznają jako swoisty epitop część apomucyny. Epitop ten jest zlokalizowany w bezpośrednim sąsiedztwie epitopu związanego przez przeciwciała i obejmuje peptyd Ala-Pro-Asp-Thr-Arg stanowiący część powtarzających się od-

ciników aminokwasowych, wchodzących w skład domeny TRP [Burchell i wsp., 1989]. Stąd w jednej cząsteczce *MUC1* taki epitop może być powtórzony od 20 do 120 razy. Jego pojawienie związane jest ze zmniejszoną glikozylacją mucyn w komórkach nowotworowych.

Ostatnio, u pacjentek z rakiem piersi, opisano również odpowiedź typu komórkowego, której wytworzenie wymaga prezentacji specyficznych peptydów pochodzących z *MUC1* przez cząsteczki MHC klasy I [Domenech i wsp., 1995]. Obok odpowiedzi typu komórkowego, u pacjentów z rakiem jajnika, piersi i trzustki stwierdza się również obecność swoistych przeciwciał skierowanych przeciwko *MUC1* [Gourevitch i wsp., 1995; Kotera i wsp., 1994; Mensdorff-Pouilly i wsp., 1996].

Mucyna *MUC1* posiada właściwości immunomodulacyjne. Lityczne działanie limfocytów T może być, np. hamowane przez cząsteczki *MUC1* obecne w krążeniu, jak to wykazano u pacjentek z rakiem piersi [Barnard i wsp., 1989; Hilken i wsp., 1992]. Podobny efekt można obserwować w przypadku komórek nowotworowych z wysoką ekspresją *MUC1* na ich powierzchni [Gimmi i wsp., 1996].

Cząsteczki mucyn stają się również immunogenne ze względu na obecność specyficznych struktur cukrowych, takich na przykład jak antygeny Tn czy sjalo-Tn [Apostolopoulos i McKenzie, 1994].

## PODSUMOWANIE

Ostatnia dekada przyniła ogromny postęp wiedzy na temat budowy i właściwości mucyn, co zawdzięczamy w bardzo dużej mierze rozwojowi biologii molekularnej. Sklonowanie genów kodujących cząsteczki mucyn pozwoliło na opracowanie odpowiednich ich modeli na poziomie produktu białkowego, co z kolei znacznie ułatwiło badania nad funkcjami biologicznymi tych glikoprotein. Jak to już zostało powiedziane, tradycyjna rola mucyn sprowadzająca się wyłącznie do funkcji ochronnych, to tylko jedna z proponowanych aktywności biologicznych. Jak się wydaje, mucyny odgrywają bardzo ważną rolę we właściwościach adhezyjnych komórek i co jest bardzo prawdopodobne w przypadku mucyn błonowych – mają one brać udział w przekazie sygnału do wnętrza komórki.

Mucyna *MUC1*, jeden z najlepiej poznanych antygenów towarzyszących nowotworom, ze względu na swoje biochemiczne i immunologiczne właściwości, wydaje się być bardzo interesującym celem w immunoterapii nowotworów. Do otrzymania skutecznej szczepionki przeciwnowotworowej, próbuje się wykorzystywać syntetyczne peptydy, o sekwencjach odpowiadających fragmentom apomucyny, w połączeniu z adjuwantami, czy syntetyczne antygeny cukrowe typu Tn i sjalo-Tn [Apostolopoulos i McKenzie, 1994; Barratt-Boyes, 1996; Finn i wsp., 1995].

## PIŚMIENNICTWO

- Apostolopoulos V, McKenzie FC. *Crc Rev Immunol* 1994; 14:293-309.
- Audie JP, Janin A, Porchet N, Copin C, Gosselin B, Aubert JP. *J Histochem Cytochem* 1993; 41:1479-1485.
- Barnard DL, Lan MS, Metzgar RS, Finn OJ. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:7159-7163.
- Barratt-Boyes SM. *Cancer Immunol Immunother* 1996; 43:142-151.
- Becker JW, Ericson HP, Hoffman S, Cunningham BA, Edelman GM. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:1088-1092.
- Biesbrock AR, Bobek LA, Levine MJ. *Glycoconjugate J* 1997; 14:415-422.
- Bobek LA, Tsai H, Biesbrock AR, Levine MJ. *J Biol Chem* 1993; 268:20563-20569.
- Burchell J, Taylor-Papadimitriou J, Boshell M, Gendler S, Duhig T. *Int J Cancer* 1989; 44:691-696.
- Carlstedt I, Lindgren H, Sheehan JK, Ulmsten U, Wingerup L. *Biochem J* 1983; 211:13-22.
- Carrato C, Balague C, De Bolos C, Gonzales E, Gamba J, Planas J, Perini JM, Andreu D, Real FX. *Gastroenterology* 1994; 107:160-172.
- Chang SK, Dohrman AF, Basbaum CB, Ho SB, Tsuda T, Toribara NW, Gum JR, Kim YS. *Gastroenterology* 1994; 107:28-36.
- Corfield AP, Warren BF. *J Pathol* 1996; 180:8-17.
- Dall'Olio F. *Clin Mol Pathol* 1995; 49:126-135.
- de Bolos C, Guma M, Barranco C, Garrido M, Kim SY, Real FX. *Int J Cancer* 1998; 77:193-199.
- Domenech N, Henderson RA, Finn OJ. *J Immunol* 1995; 155:4766-4774.
- Feizi T, Childs RA. *Trends Biochem Sci* 1985; 1:24-29.
- Finn OJ, Jerome KR, Henderson RA, Pecher G, Domenech N, Magarian-Blander J, Barratt-Boyes SM. *Immunol Rev* 1995; 145:61-89.
- Gendler SJ, Lancaster CA, Taylor-Papadimitriou J, Duhig T, Peat N, Burchell J, Pemberton L, Lalani EN, Wilson D. *J Biol Chem* 1990; 265:15286-15293.
- Gimmi CD, Morrison BW, Mainprice BA, Gribben JG, Boussiotis VA, Freeman GJ, Park SYL, Watanabe M, Gong J, Hayes DF, Kufe DW, Nadler LM. *Nat Med* 1997; 2:1367-1370.
- Gourevitch MM, Mensdorff-Pouilly S von, Litvinov SV, Kenemans P, van Kamp GJ, Verstraete AA, Hilgers J. *Br J Cancer* 1995; 72:934.
- Gum JR, Hicks JW, Toribara NW, Siddiki B, Kim YS. *J Biol Chem* 1994; 269:2440-2446.
- Gum JR, Ho JLL, Pratt WS, Hicks JW, Hill AS, Vinall LE, Robertson AM, Swallow PM, Kim YS. *J Biol Chem* 1997; 272:26678-26686.
- Hanski C, Hanisch FG, Riecken EO. *Cancer J* 1992; 5:332-342.
- Hilkens J, Buijs F. *J Biol Chem* 1988; 263:4215-4222.
- Hilkens J, Ligtenberg MJL, Vos H, Litvinov SV. *Trends Biochem Sci* 1992; 17:359-363.
- Ho SB, Niehans GA, Lyftogt C, Yan PS, Chervitz DL, Gum ET, Dahiya R, Kim YS. *Cancer Res* 1993; 53:641-651.
- Honn KV, Tang DG. *Cancer Metastasis Rev* 1992; 11:353-375.
- Izumi Y, Taniuchi Y, Tsuji T, Smith CW, Nakomori S, Fidler IJ, Irimura T. *Exp Cell Res* 1995; 216:215-221.
- Kim YS, Gum J, Brockhausen I. *Glycoconjugate J* 1996; 13:693-707.
- Kojima N, Handa K, Newman W, Hakomori S. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 182:1288-1295.
- Kotera Y, Fontenot JD, Pecher G, Metzgar RS, Finn OJ. *Cancer Res* 1994; 54:2856-2860.
- Ligtenberg MJL, Kruijshaar L, Buijs F, van Meijer M, Litvinov SV, Hilkens J. *J Biol Chem* 1992; 267:6171-6177.
- Lisowska E. *Acta Biochem Pol* 1995; 42:11-18.
- Mannori G, Crottet P, Ceccconi O, Hanasaki K, Aruffo A, Nelson RM, Varki A, Bevilacqua MP. *Cancer Res* 1995; 55:4425-4431.
- Meerzaman D, Charles P, Daskal E, Polymeropoulos MH, Martin BM, Rose MC. *J Biol Chem* 1994; 269:12932-12939.
- Mehrotra R, Thornton DJ, Sheehan JK. *Biochem J* 1998; 334:415-433.
- Mensdorff-Pouilly S von, Gourevitch MM, Kenemans P, Verstraeten AA, Litvinov SV, van Kamp GJ, Meijer S, Vermorken J, Hilgers J. *H Eur J Cancer* 1996; 32A:1325.
- Moniaux N, Nollet S, Porchet N, Degand P, Laine A, Aubert J-P. *Biochem J* 1999; 338:325-333.
- Podolsky DK. *J Biol Chem* 1985; 260:15510-15515.
- Sawada T, Ho JLL, Chung Y-S, Sowa M, Kim YS. *Int J Cancer* 1994; 57:901-907.
- Sawada T, Ho JLL, Sagabe T, Yoon W-H, Chung Y-S, Sowa M, Kim YS. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 195:1096-1103.
- Sheehan JK, Thornton DJ, Somerville M, Carlstadt I. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144:S4-S9.
- Slyter HS, Lamblin G, Le Treut A, Galabert C, Houdret N, Degand P, Roussel P. *Eur J Biochem* 1984; 142:209-218.
- Slomiany A, Zdebska E, Slomiany BL. *J Biol Chem* 1984; 259:14743-14749.
- Strous GJ, Dekker J. *Crc Rev Biochem Molec Biol* 1992; 27:57-92.
- Thor A, Ohuchi N, Szpak C, Johnston W, Schlom J. *Cancer Res* 1986; 46:3118-3124.
- Toribara NW, Ho SB, Gum E, Gum JR, Lau P, Kim YS. *J Biol Chem* 1997; 272:16398-16403.
- Ugorski M, Kłopocki AG. *Post Hig Med Dośw* 1996; 50:209-231.
- Nieuw Amerongen AV, Oderkerk C, Roukema P. *Carbohydr Res* 1987; 164:43-48.
- Van Beurden-Lamers WMO, Spee-Brand R, Dekker J, Strous GJ. *Biochim Biophys Acta* 1989; 990:232-239.
- Van Klinken B-W, Dekker J, Buller HS, Eberhard AC. *Am J Physiol* 1995; 269:G613-G627.
- Wessling J, van der Valk SW, Vos HL, Sonnenberg A, Hilkens J. *J Cell Biol* 1995; 129:255-265.
- Wessling J, van der Valk S, Hilkens J. *Mol Biol Cell* 1996; 7:565-577.
- Yonezawa S, Sato E. *Pathol Int* 1997; 47:813-830.
- Yonezawa S, Taira M, Osako M, Kubo M, Tanaka S, Sakoda K, Takao S, Aiko T, Yamamoto M, Irimura T, Kim YS, Sato E. *Pathol Int* 1998; 48:319-322.
- Yoon WH, Park HD, Lim K, Hwang B-D. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 222:694-699.
- Zotter S, Hageman PC, Lossnitzer A, Mooi WJ, Hilgers J. *Cancer Res* 1988; 48:55-101.

## ADRES DO KORESPONDENCJI

mgr Anna Laskowska

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej  
im. Ludwika Hirszfelda PAN  
ul. Rudolfa Weigla 12  
53-114 Wrocław