

**DUMITRU MISCALENCU, FLORICA MAILAT,
CAMELIA IANCU, ILINCA NICOLAE**

**FACTORII NUCLEARI
DE TRANSCRIERE ÎN CANCER (ONCOPROTEINE)**

**EDITURA UNIVERSITATII DIN BUCURESTI
2001**

Referenti stiintifici: Prof. dr. Viorica Manolache
Prof. dr. Irina Teodorescu

© Editura Universitatii din Bucuresti
Sos. Panduri, 90–92, Bucuresti – 76235; Telefon/Fax: 410.23.84
E–mail: editura@unibuc.ro
Internet: www.editura.unibuc.ro

Tehnoredactare computerizata: Victoria Iacob

Descrierea CIP a Bibliotecii Nationale

Factorii nucleari de transcriere în cancer (oncoproteine) / D.

Miscalencu, Florica Mailat, Camelia Iancu, Ilinca Nicolae, Bucuresti:
Editura Universitatii din Bucuresti, 2001

96 p.

Bibliografie

ISBN 973-575-538-6

- I. Miscalencu, Dumitru
- II. Mailat, Florica
- III. Iancu, Camelia
- IV. Nicolae, Ilinca

616-006

CUPRINS

Introducere

Factori transcriptionali myc

Activarea genei c-myc

Activarea insertionala

Amplificarea genei myc

Translocatia genei myc

Funcțiile genei myc

N-myc

L-myc

C-myc, N-myc si L-myc

Expresia myc în cancer

Expresia myc în cancerul pulmonar

C-myc în cancerul gastric

Myc în cancerul colorectal

C-myc în cancerul de prostata

c-myc în cancerul mamar

Gena jun

Gena fos

Fos în AP-1

Gena fra-2

Genele familiei ETS

Gena ets-2

Factorii care influenteaza genele ets

Ets în cancer

Gena myb (myeloblastoma)

Rel/NF-kappaB

Gena EWS (sarcomul Ewing)

Protooncogena c-maf

Gena Pax

PU.1/Spi-1

Familia genelor Ski

INTRODUCERE

Oncoproteinele sunt molecule care actioneaza sustinut în perturbarea ciclului celular, conducând finalmente la transformarea canceroasa. Aparitia lor în celula se datoreaza modificarii genelor care codifica partenerii lor normali.

Studiul oncoproteinelor a capatat o amploare considerabila datorita interesului pe care îl prezinta în înțelegerea, pe de o parte, a modificarilor moleculare si a mecanismelor transformarii si, pe de alta parte, pentru terapia bolilor canceroase.

Pentru început, prezentam moleculele reunite dupa unii autori, în prima grupa de oncoproteine din cele patru grupe pe care le abordam. Dintre toate oncoproteinele cunoscute, cele de transcriere au o deosebita importanta prin faptul ca actioneaza direct asupra unor gene celulare ce intervin în sinteza materialelor necesare diviziunii celulare (diviziunea celulara repetata caracterizeaza celulele tumorale) si în blocarea genelor implicate în specializarea celulara.

În cazul fosfoproteinelor familiei myc, datele privind functiile acestora s-au îmbogătit prin stabilirea relatiilor lor cu alte proteine, care fie le stimuleaza, fie le blocheaza activitatea, asa cum se constata în cuplarea cu Max si Mad. Noile descoperiri sunt importante în ideea posibilitatii terapeutice de a anula functia carcinogenica a proteinelor acestei familii de oncogene.

Recent s-au stabilit caracterele diferite ale proteinei L-myc din cancerul pulmonar si ale proteinei N-myc din neuroblastom. Prezenta oncoproteinei myc în diferite tipuri de cancer (gastric, colorectal, de prostata, de vezica urinara, ovarian si mamar) argumenteaza rolul acesteia în initierea si mentinerea fenotipului de celula canceroasa.

Formarea complexului AP1 (proteina activatoare) din proteinele jun si fos este de o mare eficacitate în declansarea transcrierii unor gene cu rol în cresterea si diviziunea celulara, asa încât desfacerea complexului scade activitatea celor doua proteine atunci când actioneaza independent. Chiar si în aceasta postura, când sunt stimulate de anumiti factori, ele au o mare eficienta asupra genelor tinta.

Partenerii normali ai oncoproteinelor fos si îndeosebi ai oncoproteinelor descoperite ulterior, cum sunt proteinele codificate de genele Fra-1 si Fra-2, au roluri importante în dezvoltarea embrionara.

Virusul leucemiei acute aviene E26, prin oncogena sa ets determina la pui mielo- si eritroblastoza. La om gena ets-1 localizata în cromosomul 11q 23 a fost detectata ca oncogena în leucemiile acute limfoide si mieloide. Promotorul genei ets poate fi activat de AP1, AP2 si Sp1 care au efect reglator asupra acestei gene. Este un exemplu de interdependenta între proteinele nucleare de transcriere care au incitat numeroase cercetari moleculare.

Citochinele IL-1-alfa si TNF-alfa s-au dovedit cei mai puternici stimulatori ai genei ets, în timp ce bTGF, EGF si PDGF sunt stimulatori tardivi. Oncoproteina ets poate actiona în complex cu oncoproteina myb (myeloblastom) ca în cazul produsului oncoproteinic viral p135 gag-myb-ets

Oncogena rel (reticuloendotelioza) descoperita la curcani este aceeași cu gena NF-kB, gena de importanta majora în mecanismele de reglare a integritatii organismelor. Modificarea acestei gene conduce la un spectru larg de afectiuni printre care si neoplazia.

NF- κ B este un heterodimer constituit din proteinele RelA si RelB, molecula strict coordonata de inhibitorul sau specific IkappaB (I κ B). Multitudinea modalitatilor si a locurilor de actiune este apreciabila, deoarece NF- κ B este indus de peste 150 stimuli actionând ca factor de transcriere si controlând astfel transcrierea a peste 150 de gene. Perturbarile acestei gene au urmări dintre cele mai grave, finalizându-se cu transformarea maligna.

În ultimii ani s-au descoperit alte numeroase gene si proteine pe care le codifica si care au functii de factori de transcriere. Cel mai frecvent s-au detectat în tumori sau ca initiatori ai tumorilor. Pe de alta parte, partenerii lor normali sunt indispensabili în dezvoltarea si/sau diferentierea unor tipuri celulare.

Gena EWS (sarcomul Ewing) este caracteristica celulelor tumorale ale sarcomului Ewing. Tumorile induse de familia genelor Ewing prezinta translocatii recurente constând în fuziunea genei EWS din cromosomul 22q12 cu diferiti membrii ai factorilor de transcriere cum sunt FLI-1, ERG, ETV-1, FEV, din care unii sunt membrii ai familiei ets .

În celulele mieloide, proteina maf poate interactiona în transcriere cu myb pentru a actiona asupra genelor tinta ale proteinei myb. Cu factorii de transcriere Pax6 si Sox1, L-maf regleaza dezvoltarea cristalinului. Fiind descoperita si la metazoarele inferioare, gena Pax este considerata o gena ancestrala indispensabila dezvoltarii organismelor animale.

Familia genelor ski, sno si smad-3 codifica în numeroase tipuri celulare, proteine nucleare cu rol în transcriere intervenind remarcabil în proliferarea epitelilor.

PU.1/SPI-1, o alta gena din familia ETS este reclamata cu produsul ei, pentru dezvoltarea progenitorilor mieloizi si limfoizi si nu numai. Expresia necontrolata a acestei gene determina aparitia bolilor maligne fiind asa cum s-a mentionat, oncoproteina frecvent întâlnita în leucemia acuta mieloida.

Proteinele nucleare reprezinta ultima treapta în cascada de reactii implicate în transmiterea semnalelor, reactii care încep la nivelul membranei celulare si care reclama în vederea cuplării la DNA-ul unor gene, interventia unui factor extracelular. Ritmurile ciclului celular sunt însa controlate si de impulsuri pornite din interiorul celulei. Cercetarile moleculare releva ca uneori, unele gene își autoregleaza activitatea.

Intentia autorilor acestei lucrari vizeaza prezentarea datelor privind statutul actual al celorlalte trei grupe de oncoproteine (familiile ras, receptori celulari si factori de crestere).

FACTORII TRANSCRIPTIONALI MYC

Genele familiei MYC sunt: c-myc, L-myc si N-myc codifica proteine cu localizare nucleara si cu rol de reglatori ai transcripției (1). Alaturi de genele fos si jun (gene de raspuns timpuriu) a caror expresie este indusa foarte rapid ca urmare a cascadelor de fosforilare declansate prin activarea receptorilor factorilor de crestere induc transcrierea unor gene.

Toate genele familiei MYC codifica fosfoproteine de aproximativ 60 kD exprimate atât în celule normale cât si în celulele transformate malign în cazul în care expresia lor este dereglata. Capatul N-terminal al proteinelor Myc contine un domeniu de transactivare transcriptionala. Capatul C-terminal contine semnalul de localizare nucleara si urmatoarele situsuri: regiunea bazica, “helix-loop-helix” si “leucine zipper”, de unde si denumirea grupului, de factori transcriptionali ca proteine b HLH L Zip.

Regiunea bazica este implicata în legarea Myc la secvente specifice de DNA, în timp ce motivele HLH si Lzip sunt necesare pentru interactiunile proteina-proteina ale lui Myc, interactiuni fara de care aceasta nu poate forma homo- sau heterodimeri si în consecinta, nu-si poate exprima functia de transactivator transcriptional (2).

Reglarea nivelului expresiei Myc în celulele normale este asigurata prin diverse mecanisme. Nivelul bazal al Myc mRNA este semnificativ ca raspuns la stimuli externi cum sunt factori de crestere sau ca raspuns la activarea altor oncogene celulare. Se admite ca unul din aceste mecanisme, considerat si principal, consta în elongarea transcriptionala (3). Un alt mod de reglare deriva din turnoverul, foarte rapid în mod normal, al mRNA si proteinei Myc.

Proteinele Myc își autoregleaza productia, desi datele în acest sens sunt contradictorii. Toate mecanismele de control însa, au rolul de a mentine nivelul lui Myc între anumite limite si de a-i regla expresia înalta în timpul stimulării celulelor dorminde pentru a le determina intrarea în ciclul celular.

Protooncogenele myc si proteinele pe care le codifica implica o mare varietate de anomalii în expresia si functia lor în procesul transformării. Myc a fost descrisa initial ca oncogena virala, într-o serie de tulpini virale care afecteaza predominant celulele mieloides si macrofagele, inducând diverse tipuri de leucemii la pasari. Produsul genei v-myc din retrovirusul avian MC-29, a fost prima proteina descoperita, proteina codificata de oncogena virala localizata nuclear si cu capacitate de legare la DNA (4). Oncogena v-myc releva omologii cu protooncogena c-myc din genomul celulelor aviene si mamaliene. Astfel, v-myc MC-29 se omologheaza cu exonii 2 si 3 din gena c-myc (5).

Activarea genei c-myc Activarea insertionala.

Activarea insertionala este una din modalitatile de declansare a transcrierii genei c-myc, respectiv integrarea în genomul celular a unui genom retroviral integru sau partial. Retrovirusurile cu potential de replicare pot induce o varietate de tumori prin activarea insertionala a genelor celulare; aceasta presupune ca virusul nu detine o oncogena, ceea ce nu

este cazul retrovirusurilor care detin o oncogena si produc transformarea celulelor direct, "independent". Astfel, în cazul virusului ALV, DNA proviral se integreaza în DNA celular. Prin integrarea provirusului sau a fragmentelor lui, prin fragmente de jonctiune se realizeaza clonarea moleculara a DNA viral-DNA celei gazda. În celulele tumorale o asemenea recombinare determina activarea unei gene celulare care ofera un avantaj de crestere.

Mecanismul activarii genelor celulare de catre provirusul integrat este divers, dar întotdeauna legat de proprietatea retrovirusului de a poseda semnalele transcrierii. S-a propus ca LTR din dreapta al unui provirus integrat, sa serveasca direct ca promotor transcriptional al unei gene, promotor dependent de elementul proviral. Acest model de insertie a promotorului viral este valabil pentru multiple limfoame bursale induse de ALV, de unde sugestia ca multe, daca nu chiar toate provirusurile din vecinatatea lui c-myc ar detine deletii extinse ale genomului viral, asa încât, în unele cazuri nu ramâne decât un LTR solitar, intact. Alteori, în celulele tumorale, provirusul ALV ar putea apare independent de c-myc sau în orientare inversa. Aceasta forma indirecta a activarii transcriptionale a indicat cresterea enhancerilor transcriptionali ai LTR retroviral.

Activarea insertionala nu este unica pentru gena c-myc, deoarece asemenea integrari sunt cunoscute si pentru numeroase alte gene si retrovirusuri. Se subliniaza ca integrarea retrovirală are o anumita specificitate pentru secventele de DNA celular sau pentru structura cromatinei (6).

În numeroase lucrari experimentale sunt prezentate variante de integrare. Astfel, s-a stabilit ca numai genele myc cu promotor din LTR localizat între promotorul nativ (c-myc) si al doilea exon are functie transformanta în celulele embrionare de prepelita. LTR poate astfel transforma gena myc într-o gena transformanta pentru celulele embrionare, numai în conditiile în care se cupleaza într-o anumita pozitie determinata (7).

Analiza clonei moleculare care contine gena c-myc releva ca DNA-ALV se integreaza în "dreapta" fata de c-myc cu 575 perechi nucleotide ce reprezinta segmente din interiorul portiunii netranslatabile, împiedicând astfel folosirea semnalului normal al poliadenilarii (8). Concluzia este ca inducerea cu ALV a limfomului celulelor B este determinata de insertia provirusului în gena celulara c-myc. În 66 din 68 cazuri de limfoame induse de ALV, integrarea genomului viral se face în gena c-myc, iar 64 din ele au aceeași orientare transcriptionala. Toate provirusurile inserate s-au integrat fie în primul exon fie în primul intron al genei myc si, de asemenea, toate au avut deletii care au inclus segmente din vecinatatea lui 5'LTR. Majoritatea provirusurilor au pastrat ambele LTR (3' si 5') dar au pierdut segmente de lângă 5'LTR.

Analiza a 24 situri de insertie arata ca aceasta se face pe o distanta de 3000 kb, nemijlocit "stânga" fata de segmentul de codificare c-myc (9). MoMuLV (virusul leucemiei murine Moloney) care declanseaza aparitia timomului la sobolan se leaga partial la exonul 1 c-myc prin 5'LTR, orientarea acestuia fiind inversa transcrierii c-myc (10).

Amplificarea genei myc

Amplificarea specifica a genelor este implicata într-o varietate de raspunsuri adaptative ale celulelor, la stresurile mediului. În celulele tumorale si în cele selectate pentru rezistenta la droguri, s-au stabilit modalitati citogenetice de amplificare genica, printre care minicromosomii ce apar în metafaza si care sunt asemanatori perechilor de cromosomi, (dar

carora le lipseste un centromer) și regiunile cromosomale omogen colorate (HSR - Homogenous Staining Chromosomal Regions).

Aceste anomalii citogenetice sunt forme alternative ale amplificării genei, amplificare care poate merge de la câteva ori, la peste sute de ori. În celulele leucemice premielocitice HL-60 gena c-myc se amplifica de 8-32 ori situație care se regăsește și în celulele leucemice primare ale pacienților.

În carcinomul de colon de la om (COLO 320) c-myc prezintă până la 30 copii. Alterările structurale ale genelor preced amplificarea lor sau se obțin în timpul amplificării. În acest tip de carcinom sunt amplificate atât versiunile normale cât și cele alterate ale genei myc.

În unele celule tumorale, oncogenele amplificate pot complementa pe cele activate mutațional. Gena N-myc este consistent amplificată în majoritatea liniilor celulare de neuroblastom - tumora pediatrică fatală. Dimensiunea ampliconului în această tumora poate fi de ordinul a 200-2000 kb și conține secvențe distincte din bratul cromosomal 2q. Aproximativ 50% din neuroblastoamele aflate în stadiile avansate de evoluție (III,IV) contin oncogena N-myc amplificată.

Amplificarea genică nu este un proces inițiator al carcinogenezei. Amplificarea și creșterea expresiei c-myc și N-myc apar în timpul progresiei maligne a carcinomului pulmonar uman, ca și în celulele neuroblastomului. Probabil amplificarea unei gene afectează progresia malignă a celulelor deja inițiate. În unele cazuri, chiar oncogenele amplificate pot deveni transcripționale "linistite" după inducția diferențierii tumorale (11).

Amplificarea genelor celulare rămâne totuși, unul din mecanismele celulare adaptative genetice, mecanism necesar pentru capacitatea de sinteză a mari cantități de produse celulare specifice. Amplificarea neprogramată a genelor implicând domeniile DNA extensive este un proces frecvent prin care celulele capătă rezistență la drogurile selective, în timp ce amplificarea programată poate apărea în unele faze din timpul dezvoltării normale, așa cum este cazul celulelor foliculilor ovarieni ai mustei de fructe.

În neuroblastom, DNA amplificat este parte a genei c-myc, omologul celular al lui v-myc. Această nouă secvență de DNA a fost numită N-myc. Din 26 linii celulare de neuroblastom, 22 arată N-myc amplificat în proporție de 10-700 ori, iar celelalte 4 linii nu arată amplificare. În toate cazurile însă, amplificarea lui N-myc este detectată în minicromosomi și HSRs. Frecvent, amplificarea se detectează în stadiile III și IV, ceea ce presupune că aceasta reprezintă un fenomen târziu în evoluția neuroblastomului. În mod normal, N-myc este localizată pe bratul scurt al cromosomului 2 (2p23-24), în timp ce HSRs, s-au detectat pe numeroși diferiți cromosomi. Nu este clar dacă N-myc este translocată înainte de amplificarea sa, sau dacă apariția unor HSRs în diferite poziții cromosomiale reprezintă rezultatul amplificării prior.

Amplificarea genei N-myc apare atât în neuroblastom cât și în cancerul pulmonar cu celule mici. În acest ultim caz, amplificarea genei este asociată cu forme mult mai agresive ale tumorilor (12).

Amplificarea acestei gene de pe cromosomul 2 din celulele neuroblastomului uman stimulează creșterea, ceea ce oferă avantajul proliferării, fenomen de altfel comun multor tumori. În tumorile metastazice amplificarea locusului N-myc este un fenomen dominant (13).

Atât liniile celulare cât și tumorile de neuroblastom se disting prin exprimarea scăzută a HLA clasa I, majoritatea arătând oncogenă N-myc amplificată. Totuși, nu totdeauna rata scăzută de creștere a HLA clasa I în celulele tumorale, se corelează cu expresia c-myc. O corelație inversă între nivelele lui c-myc și HLA mRNA se observă numai după expunerea celulelor la rTNF- α (14).

Protooncogenă c-myc amplificată și hiperexprimată este observată și în cancerul cervical avansat, unde se asociază cu progresia tumorii. Hiperexpresia c-myc este corelată cu un risc de 6 ori mai mare sugerând că activitatea acesteia poate conferi celulelor tumorale, abilitate metastazică (15).

În 25% din histiocitoamele fibroase maligne se constată, de asemenea, 2-11 scurte amplificări ale genei c-myc, ca și creșterea activității ei transcripționale (16).

Amplificarea genelor familiei myc în celulele canceroase pulmonare mici are loc în diferiți cromosomi. În 7 din 9 linii celulare genele c-myc, N-myc și L-myc apar amplificate, proces evidențiat în 60% din liniile celulare ale acestui carcinom. Amplificarea, îndeosebi a genei c-myc se corelează cu cele mai agresive cancere, boala relevând cea mai dramatică evoluție (17).

Translocatia genei myc

Translocatiile cromosomiale presupun rearanjări specifice ale cromosomilor, care în cazul sistemului imunitar permit apariția unei multitudini de proteine (anticorpi), ca răspuns la invazia antigenilor. Rearanjările incorecte pot conduce la modificări moleculare cu tendința de transformare celulară. Gena c-myc se presupune că este implicată în transformare, în anumite translocatii care îi stimulează activitatea. Astfel sunt edificatoare translocatiile ei cu genele lanțurilor greu și ușor ale Ig în limfomul Burkitt și plasmocitomul murin. În celulele B maligne ale limfomului Burkitt, la 75% din pacienți s-a stabilit translocatia t (8;14), la aproximativ 16%, t (8;22), t (24;q11) și la 9%, t (2;8) (p11;q24).

În t (8;14), gena c-myc din cromosomul 8 (q8.4) este transferată în cromosomul 14, locusul CH (al lanțului greu VH Ig), iar gena IgCH trece în locul genei c-myc din cromosomul 8, mod în care apare t (8;14) (q24-q32). Gena c-myc astfel translocată este scoasă din circuitul reglator normal și intra sub influența constitutiv activă a unui locus Ig; de aici sugestia că ar juca un rol esențial în transformarea malignă. Break point (punctul de rupere) din cromosomul 8 al genei c-myc este însă foarte diferit. Când el are loc în exonul și intronul 1, gena este lipsită de elementele promotoriale proprii, considerându-se astfel că, transcrierea celor doi exoni rămași, care au abilitate de transcriere, sunt sub noua influență promotorială, probabil elemente Ig. În unele cazuri, punctul de rupere din cromosomul 8 are loc la distanță de exonul 1, gena translocându-se în întregime în cromosomul 14 laolaltă cu exonul 1 detinator al structurii promotoriale proprii, ceea ce presupune că cei doi exoni codificanți 2 și 3 sunt activați de propriile elemente activatoare. Cu toate acestea, gena c-myc juxtăpusă Ig are expresie înaltă datorată, probabil, plasării ei sub influența constitutiv activă a unui locus Ig, fapt ce implică un rol esențial în transformarea malignă. (18,19).

În majoritatea plasmocitoamelor murine, porțiunea distală a cromosomului 15 ce poartă gena c-myc, este translocată în cromosomul 12 care poartă locusul lanțului greu al unei Ig, sau în cromosomul 6 care poartă genele Ig kappa. În aceste condiții se pot produce mutații în elementele reglatoare promotoriale ale genei sau, locusul Ig poate juca un rol mai activ cu

elementele reglatoare ce acționează asupra genei (20).

Imunocitomu spontan la sobolan Louvain (Ric) determină juxtapozitia lui myc cu IgH, fiind de fapt, o translocatie reciproca t (6;7). Inițierea transcripțională a genei myc este schimbată la Ric. În linia stabilizată de fibroblaste Rat-2 de sobolan promotorul myc cel mai distal (P2) este locul preferat pentru inițiere. În Ric însă, numai 30% din transcrieri sunt inițiate în P2, 30% în P1 și 30% într-un nou promotor-P1a- localizat între P1 și P2 (21).

Abilitatea celulelor normale de a modula transcrierea lui c-myc inițiată în P2, oferă un fin mecanism de control al nivelelor RNA c-myc. În modelele aberante exprimate de gena translocată c-myc în celulele limfomului Burkitt se produc mutații în și lângă alelele translocate. Elongarea transcrierii inițiată în P2 poate fi blocată în condițiile în care se produc mutații (22).

Expresia protooncogenei umane c-myc este supusă la numeroase nivele și tipuri de control. Proteina MDBP omniprezentă la mamifere, cuplează specific într-un loc de la începutul primului intron al acestei gene. Proteina cuplează la un enhancer viral, astfel ca poate fi utilă pentru controlul expresiei genei c-myc.

În unele limfoame Burkitt, genele c-myc își pierd locul de cuplare la MDBP prin rearanjare cromosomală sau prin multiple mutații spontane, ceea ce ar putea contribui la activarea lor în procesul cancerizării (23).

Activarea constitutivă a lui myc este esențială pentru geneza cancerului și de aceea înțelegerea funcției sale depinde de identificarea și cunoașterea tintelor ei. Pentru determinarea mai specifică a rolului Myc în oncogeneza s-au făcut o serie de studii în ideea identificării genelor care sunt fie activate fie reprimite de către Myc. S-au identificat astfel gene ce codifică molecule de suprafață cum este LFA-1 în linii celulare limfoblastoide de tip B, și unele gene care codifică histone exprimate normal în timpul diferențierii eritroide. C-Myc reglează, de asemenea, gena pentru protimozina-alfa și gena ornitindecarboxilazei (ODC) prin intermediul elementului E-box din primul intron al acesteia tot prin interacțiunea cu acesteia element E-box (29, 30).

Myc interacționează și cu o serie de componente ale ciclului celular cum sunt diversele ciclone și kinazele asociate lor, precum și alți reglatori ai desfășurării normale a ciclului celular. Astfel, s-a arătat că proteinele myc acționează în amonte de o serie de kinaze dependente de ciclina, cum este cdc25, și antagonizează cu cel puțin un inhibitor al acestora, proteina p27 (31). S-a demonstrat indirect o interacțiune între Myc și produsul genei Rb retinoblastoma și o corelație între expresia sa și cea a genei p53 (28). O cooperare între Myc și Rb ar putea fi critică în timpul fazei G1 a ciclului celular dar și pentru reglarea intrării în faza S.

Se admite că oncogenele Myc stimulează celulele dorminde să sintetizeze DNA, demonstrându-se în acest sens că hiperexpresia lui Myc în celule blochează diferențierea acestora. Stimularea creșterii celulare de către c-myc poate fi responsabilă de abilitatea acesteia de a iniția și promova transformarea de tip malign (32).

Proteinele Myc sunt implicate nu numai în creșterea dar și în supraviețuirea celulară. Astfel, se susține că dereglarea expresiei myc sensibilizează celulele la moartea prin apoptoză și că proprietățile proapoptotice depind de capatul N-terminal și de domeniul bHL HL Zip al proteinei, dar și de interacțiunea cu proteinele partener. Unele gene 'tinta' ale proteinelor myc, cum sunt ODC și cdc25, se pare că intervin în apoptoză mediata de myc (33).

Funcțiile genei myc

Productia genei c-myc induce activarea genelor care determina trecerea celulelor din faza Go în faza G1 a ciclului celular. Experimente care au folosit transfectanti cu gena c-myc demonstreaza ca proteina c-Myc umana este predominant localizata în fractia nucleara, ceea ce induce sinteza a 8 proteine si represia sintezei a altor 5 proteine. De aici, concluzia ca expresia c-myc induce gene implicate în raspunsul proliferativ al celulei (24).

În celulele eucariote exista un schimb continuu de macromolecule, între nucleoplasma si citoplasma, si de asemenea, o posibila cale de reglare a activitatii intracitoplasmice a proteinelor nucleare carora le controleaza accesul în nucleu.

Studiul proteinelor nucleare c-Myc, c-Fos, polimeraza alpha DNA si PCNA (Antigen Nuclear care Prolifereaza Celula) în diverse conditii fiziologice ale celulei în repaus sau catre o stare proliferativa, releva ca raspunsul acestora este diferit. Când fibroblastele sunt cultivate într-un ser saracit proteinele sunt detectate în citoplasma în timp ce stimularea cu ser determina acumularea proteinelor în nucleu. Delocalizarea si relocalizarea celor patru proteine nu urmeaza însa aceeasi cinetica.

Proteinele replicarii PCNA si polimeraza alfa DNA sunt primele care parasesc nucleul dupa care urmeaza p c-myc si p c-fos în conditiile saracirii serului. Dimpotriva, în conditiile stimulării serului proteinele c-myc si c-fos sunt localizate rapid în nucleu si ulterior intra PCNA si alfa polimeraza DNA.

Comunicarea dintre compartimentul nucleu si cel citoplasmatic este mediata de complexul porilor nucleari, structuri proteinice care perforeaza nucleolema. Schimbarile în compozitia porului si/sau structura membranei nucleare apar în diferite stadii ale cresterii. Se conclud ca proteinele c-Myc si c-Fos sunt implicate în evenimentele reglatoare pe când celelalte doua proteine, PCNA si alfa polimeraza DNA sunt implicate în mecanismul replicarii DNA.

Cultura de celule de *Xenopus* a aratat variatii semnificative în localizarea lui c-myc si PCNA în timpul dezvoltării. Astfel proteina c-Myc este pusa în rezerva în mari cantitati în citoplasma oocitului si translocata în nucleu dupa fertilizare, în timp ce localizarea nucleara a PCNA apare ciclic în etapele dezvoltării timpurii la *Xenopus*. Asa încât la începutul ciclului celular, în faza G1, se produce o acumulare intranucleara a proteinelor c-Myc si c-Fos, în timp ce PCNA si alfa DNA polimeraza se acumuleaza perinuclear. Totusi PCNA se detecteaza în nucleu numai în timpul fazei S si niciodata la periferia acestuia (25).

Protooncogena c-myc din oviductul avian poate fi influentata de actinea progesteronului. Cantitatea de mRNA specific c-myc a scazut dupa 10 minute de la injectarea hormonului. Dupa 30 de minute acest indicator a atins minimum (30% din valoarea primara), dupa care are loc oprirea treptata a sintezei mRNA c-myc. Efectul observat depinde de doza hormonului si este tesut-specifica. Se presupune ca gena de reglare timpurie, în particular c-myc, reprezinta punctul incipient al activitatii receptorilor hormonilor steroizi (26).

În absenta diviziunii celulare c-myc are rolul în controlul cresterii celulare. Reglarea proliferării implica coordonarea cresterii celulelor (acumulare de masa celulara) si a dezvoltării celulelor. Celulele P493-6 au aratat ca diviziunea lor este strict dependenta de prezenta serului fetal de vitel. Myc singura induce cresterea în dimensiuni a celulelor si regleza pozitiv sinteza proteinei. O crestere a sintezei proteinei ar putea fi o cauza a cresterii masei celulare. Myc stimuleaza activitatea metabolica, asa cum indica si acidifierea mediului de cultura. Se confirma modelul precum ca myc este implicat în reglarea cresterii celulei si confera pentru prima data evidenta indirecta ca induce cresterea celulei, o crestere în

dimensiune a celulei, necuplata la diviziunea celulara (27).

Protooncogena myc regleaza direct expresia altor gene prin cuplarea secventelor DNA specifice CACGTG. Printre genele tinta se citeaza ECA-39, p53, ODC (ornitin decarboxilaza), alfa-protimozin, cdc25A pentru reglarea lor de catre myc mai sunt necesari si alti factori celulari specifici (28).

N-myc

Gena N-myc si proteina N-myc prezinta numeroase similaritati cu gena c-myc si proteina c-myc. Pentru prima data, gena N-myc s-a descoperit în neuroblastoma de unde de altfel vine si initiala N. S-a demonstrat contributia ei la transformarea neoplazica a celulelor mamaliene în cultura. Gena N-myc atât din celulele normale cât si din celulele de neuroblastoma este de 16 kb iar mRNA de 4 kb.

Amplificarea genei, uneori de proportii, o incrimineaza în carcinogeneza (stadiile III si IV ale neuroblastomului) (34).

Asa cum s-a mentionat, gena N-myc este localizata pe bratul scurt al cromosomului 2 (2p23-24) iar secventele ei amplificate, pe alti cromosomi.

Inhibarea expresiei N-myc prin metoda antisens conduce la aparitia de fenotipuri diferite: intermediar, neuronal sau de tip Shwann, si induce fie supresia proliferarii celulare fie diferentierea si/sau apoptoza. Aceste constatari sugereaza ca N-myc poate actiona in procese celulare diferite (35).

Expresia N-myc este asociata in mod normal cu statutul nediferentiat al neuroblastelor care migreaza in timpul embriogenezei din creasta neurala (36) fiind implicata in reglarea directiei de dezvoltare si evolutiei celulelor acesteia, respectiv in migrarea ventrala si diferentierea neuronală (37). Astfel, N-myc este reglata negativ in urma inducerii diferentierii celulelor de neuroblastom de catre acidul retinoic (RA) sau IFN-gamma; acesta din urma scade transcriptia lui N-myc si reduce 'half-life' al mRNA (36).

În alte tipuri de celule decât cele de origine neurala, expresia N-myc este, de asemenea, importantă pentru dezvoltare. Soarecii mutanti pentru gena N-myc arată o dezvoltare anormala a ficatului, expresia acestei gene fiind limitata la nivelul structurilor periferice ale ficatului care vor genera capsula Glisson si este necesara pentru supravietuirea hepatocitelor (38).

Amplificarea genei N-myc este un fenomen frecvent într-o serie de celule tumorale în care ea se exprima, fiind asociata cu progresia rapida si prognosticul sumbru în neuroblastom (39) expresia sa core-lându-se cu aparitia si evolutia metastazelor (36). Nu numai N-myc, dar si celelalte doua gene myc pot dobândi un control transcriptional aberant în neuroblastom (

4 0) .
N-myc s-a gasit a fi amplificata în 30 de linii celulare de cancer pulmonar si doar într-o singura linie de adenocarcinom, situatie de altfel foarte rara (41). Detectarea prin FISH (Fluorescence In Situ Hybrdization) a amplificarii N-myc în celulele alveolare sau embrionare de rabdomiosarcom releva ca tumora apare doar în celulele alveolare nu si în cele embrionare, amplificarea genei putand constitui un factor de prognostic in cazul evolutiei nefavorabile a bolii (42). Tot ca factor de prognostic poate fi utilizata amplificarea lui N-myc în cazurile de gliom primar sau secundar (43).

Expresia si functia N-myc este, la rândul sau influentata de diversi factori, existând o corelatie între expresia sa si a altor tipuri de proteine implicate in proliferare, diferentiere sau

transformare și, de asemenea, influențată și de către factori extracelulari. În acest sens, s-a constatat o corelație între expresia genei N-myc și o genă supresoare tumorală Wt1 (identificată în tumora Wilms' a rinichiului la copii) în sensul că ele sunt coexprimate în mod normal în timpul dezvoltării rinichiului și sunt hiperexprimate în tumora Wilms. S-a arătat de asemenea că reprimarea promotorului genei N-myc este mediată de gena Wt1 (44).

Dintre factorii extracelulari, IGF-1 (Insuline-like Growth Factor - 1) stimulează creșterea nivelului mRNA al N-myc peste limitele bazale în linii celulare de neuroblastom, stimularea mediată de o cascada de semnalizare în care sunt implicate protein kinaze activate de mitogeni (45).

L-myc

Genă umană L-myc codifică multiple fosfoproteine nucleare ca urmare a procesării alternative a mRNA. În liniile celulare de carcinom pulmonar cu celule mici se formează câteva proteine de fosforilare de 66 kD și de 60 kD, care se constituie prin translocarea mRNA L-myc. Acestea se localizează în nucleu și au o viață foarte scurtă.

Asemenea genei c-myc, L-myc detine 3 exoni și 2 introni, un mRNA L-myc din care se scoate al doilea intron va fi de 3,9 mii nucleotide, iar dacă se elimină primul intron, mRNA devine de 3,6 mii nucleotide și va elabora proteina de 60 kD. În vivo, acest RNA sintetizează proteinele p32 și p37, care sunt prezente și în vitro procesarea diferită a transcriptului genei L-myc poate determina corelația p60, p66 (46, 47).

L-myc a fost inițial identificată în carcinomul pulmonar, fiind frecvent amplificată și hiperexprimată în cel cu celule mici și este slab exprimată în țesuturi umane adulte. În alte tipuri de carcinom pulmonar, altele decât cele cu celule mici, L-myc este hiperexprimată dar nu și amplificată (48). Prin inhibarea L-myc într-o linie celulară de carcinom pulmonar cu celule mici care hiperexprimă L-myc, s-a obținut inhibarea proliferării celulare (49).

În mod normal, L-myc, ca și ceilalți doi membri ai familiei Myc este implicată în procesele biologice de creștere și diferențiere. În dezvoltarea normală la soarece, gena L-myc este exprimată în rinichi, plămâni, tub neural și creier, în cel din urmă fiind prezentă atât în zonele proliferative cât și în cele diferențiate. Faptul că soarecii nuli pentru L-myc se dezvoltă normal și sunt viabili susține ideea conform căreia funcțiile sale ar putea fi preluate de către celelalte proteine Myc și că există mecanisme funcționale compensatorii în cadrul acestei familii de proteine (50).

Myc/Max/Mad

Un pas deosebit de important în înțelegerea funcției Myc a fost identificarea unei familii de proteine, de 21-22 kDa, și anume proteinele **Max**, care fac parte ca și Myc din grupul proteinelor ce conțin motivele bHLHZip (basic region Helix-Loop-Helix Leucine Zipper) (51). Funcția biologică a lui Myc nu poate fi exercitată decât în urma heterodimerizării cu proteinele Max. Interacțiunea Myc-Max se face prin intermediul motivelor "helix-loop-helix" și "leucine-zipper" din structura acestora. Heterodimerii Myc-Max leagă DNA cu afinitate ridicată și sunt foarte buni transactivatori transcriptionali. Homodimerii Myc-Myc au afinitate redusă de legare a DNA iar homodimerii Max-Max sunt inactivi deoarece nu conțin domeniul activator care se găsește la capatul N-terminal al lui Myc.

Complexul Myc-Max leaga DNA la nivelul secvenței 5'-CACGTG, cunoscută și ca miezul „Myc” din elementul E-box. Acest element conține secvențe repetitive purina/pirimidina care se pot modifica conformational de la structura B-DNA la structura Z-DNA. E-box este frecvent întâlnit în genomul uman și poate fi legat și de către alte proteine în aceeași manieră ca și complexe Myc/Max. De aceea, s-au derulat o serie de studii în celulele COS-7 (52) și în creier murin (53) menite să determine specificitatea cu care transcripția este mediata de acest element.

Max interacționează cu toate proteinele myc (c-Myc, N-Myc și L-myc) în reglarea transcripției dar poate funcționa ea însăși și ca represor transcripțional (54, 55).

Localizarea genei Max a fost cartată pe cromozomul 14; delețiile care implică acest cromosom în malignități mieloidă sau limfoide precum și translocările acestuia în leiomiomul uterin explică dereglarea funcției proteinei în aceste tipuri tumorale (56).

Proteinele Max există ca două izoforme care diferă prin inserția/deleția a 9 reziduuri de aminoacizi. Acestea sunt Max(L) sau forma lungă și Max(S) sau forma scurtă. Max(L) este mai eficientă în legarea DNA decât Max(S). S-a arătat în culturi de celule NIH3T3 că forma Max(L) reprezintă o gena reporter myc-responsivă în timp ce Max(S) fie stimulează fie nu are efect asupra acesteia. Comparativ cu celulele care hiperexprimă Max(S), cele care hiperexprimă Max(L) cresc mai lent, au necesități ridicate pentru factori de creștere și au o apoptoză mai accelerată în momentul deprivării de factori de creștere (57).

Expresia proteinelor Max în celulele epiteliale imortalizate sau transformate, precum și în fibroblaste este reglată în funcție de condițiile de creștere (58). În procesul diferențierii celulare, în celulele K562 expresia Max rămâne neschimbată în timpul diferențierii către linia mielomonocitară, pe când în cazul diferențierii eritroide expresia sa este reglată negativ (59).

Linia celulară tumorală de feocromocitom, PC12, nu exprimă o proteină Max funcțională deoarece în aceste celule se sintetizează un transcript mutant care codifică o proteină incapabilă să homo- sau heterodimerizeze (33).

Pierderea funcției proteinei Max la soareci rezultă în întârzieri în dezvoltare și chiar în blocarea creșterii embrionilor și țesuturilor extraembrionare, ceea ce coincide cu pierderea sau reducerea expresiei Max maternale în embrionul în creștere *in vivo*. Embrionii cu deficiența în expresia max sunt reduși ca dimensiune și prezintă degenerări citologice precum și capacitate redusă de incorporare a BrdU (60).

În ceea ce privește interacțiunile directe sau/si functionale între Myc și Max, există și evidente conform cărora ele pot acționa și independent în diverse tipuri celulare sau condiții experimentale. Astfel, în celulele K562, în timp ce mutații cu deleții ai proteinei Myc induc diferențierea către linia eritroidă, hiperexpresia lui Max stimulează același tip de diferențiere (61). În hepatocitele dorminde sau stimulate cu mitogen, Myc și Max pot acționa atât independent cât și în cadrul complexului Myc/Max (62). În celule mieloidă murine, linia 32D, Myc și Max intervin în cai apoptotice diferite (63). Interesant este faptul că în animale bitransgenice pentru Myc și Max direcționate de Emu (pentru lanțul greu de Ig), hiperexpresia lui Max atenuează statutul premalign de tip B-limfoproliferativ indus de Emu-Myc și reduce rata instalării bolii; aceasta sugerează că ridicarea nivelului expresiei proteinei Max *in vivo* poate inhiba funcția oncogenică a lui Myc (64).

-Nouă familie de proteine, recent descoperită, și anume familia **Mad** care cuprinde Mad1, Mxi-1, Mad3 și Mad4, antagonizează cu funcția Myc prin cuplarea Max și formarea de heterodimeri Max-Mad care blochează procesul transcripțional prin legarea la același situs pe DNA ca și heterodimerul Myc-Max (65). Max este considerat un partener central al lui Myc

cu capacitate alternativa de reglare, putand avea efecte opuse la legarea aceleiasi secvente de DNA. Heterodimerii Myc-Max functioneaza ca activatori transcriptionali în timp ce heterodimerii Max-Mad functioneaza ca supresori transcriptionali.

Foarte recent s-a identificat o noua proteina - Mmip-2- din familia "RING finger", care poate cupla proteinele Mad si astfel poate disrupe legarea la DNA a heterodimerului Max/Mad, putând astfel anula efectul supresiv al proteinelor Mad asupra proteinelor Myc. Mad si Mmip-2 se gasesc în diferite compartimente citoplasmatiche si nucleare, ceea ce s-a demonstrat prin trasarea lor cu GFP (Green Fluorescent Protein); ele interactioneaza si se transloca în compartimentul celular în care se afla mai abundenta (66).

-Alta proteina care interactioneaza cu proteinele familiei Mad este proteina bHLHZip Mlx (Max-like protein x) care structural si prin gradul extins de expresie în variate tipuri tisulare se aseamana cu proteina Max; are un timp de înjumatare prelungit si prin faptul ca formeaza heterodimeri cu proteinele Mad este capabila sa lege secventa CACGTG din structura DNA (67). Expresia lui Mad în tesuturi de soarece adult este limitata doar la acele tesuturi care contin populatii celulare al caror proces de diferentiere se reînnoeste în mod constant. În embrioni, transcriptele lui Mad sunt maxime în timpul organogenezei în momentul începerii diferentierii celulare. Transcriptele membrilor familiei Mad sunt exprimate diferit în timpul diferentierii celulelor în condrocite in vivo si în neuroni (celulele P19) in vitro. Astfel, transcriptul si proteina Mad3 au fost identificate în celulele proliferante, priori diferentierii. Mlx si Mad4 sunt mai abundente în celulele avansate în procesul diferentierii, iar Mad1 a fost identificata în celulele diferentiate terminal (68).

Alterarea functiei lui Mad inhiba iesirea granulocitelor din ciclul celular în timpul diferentierii acestora. La soareci, disruperea expresiei genei mad1 în urma recombinarii de tip omolog, releva ca precursori granulocitari sunt blocati în stadiul de "colony forming" (precursori formatori de colonii), în urma diferentierii hematopoietice în mutantii homozigoti. La soarecii nuli pentru Mad1 însa, numarul celulelor diferentiate din maduva osoasa si sângele periferic nu se schimba (69). Acelasi studiu arata ca reconstituirea seriei granulocitare dupa ablatia maduvei este crescuta la soarecii "knockout" pentru Mad1. În schimb, la aceste animale s-a constatat ca sunt exprimate ectopic în splina, alte doua gene ale familiei Mad, ceea ce sugereaza o redundanta functionala si o reglare care permit diferentierea aparent normala în absenta lui Mad 1 în cadrul acestei familii de gene.

Deletia la soareci a genelor Mad1 si Mxi-1 din familia Mad arata ca, desi ele induc aparitia unor diferite fenotipuri, ambele gene sunt esentiale în procesul de iesire din ciclul celular si al diferentierii celulare si, de asemenea ca, cel putin Mxi-1 poate actiona ca supresor tumoral (70).

Se admite existenta unei asa-numite "retele" Myc/Max/Mad, esentiala pentru reglarea expresiei genice. Masurarea afinitatilor la DNA a complexelor c-Myc/Max, Max/Max si Mad1/Max în celulele COS7 a demonstrat ca toate acestea leaga DNA cu afinitate comparabila la nivelul secventei E-Box specifica pentru c-myc. În celulele HL-60 nu s-a detectat complexul Mad1/Max desi s-a indus expresia Mad1 în timpul diferentierii lor. Complexul c-Myc/Max din aceste celule este reglat negativ, în timp ce reglarea complexului Max/Max a crescut (71). Aceste constatari au condus autorii la concluzia ca, în cadrul retelei Myc/Max/Mad are loc o reglare posttranscriptionala. Complexul Max/Mad nu are doar capacitatea de a inhiba transcriptia, dar s-a demonstrat si faptul ca poate bloca transformarea co-indusa de Myc-Ras (67).

Trecerea de la Myc-Max la Max-Max cupleaza arestul celulelor în ciclul celular, cu diferentierea celulara. Astfel, expresia ectopica a lui Mad1 la soareci transgenici, conduce pe

de o parte la letalitate postnatala si piticism, si pe de alta parte, are efect inhibitor asupra proliferarii celulelor hematopoietice si fibroblastelor embrionare provenite de la aceste animale. Fibroblastele care exprima Mad1 ectopic au morfologie alterata si comparativ cu cele de tip-salvatic sunt întârziate în progresia ciclului celular la trecerea din faza G1 în fazaS (65).

C-myc, N-myc si L-myc

Membrii familiei genelor myc, c-myc, L-myc si N-myc, desi codifica proteine cu structura si functii în general asemanatoare, acestea sunt exprimate diferential în diversele tipuri celulare, ceea ce sugereaza pe lânga functiile biologice comune ale acestor proteine si unele functii distincte. Reglarea acestor trei gene difera de la tesut la tesut, iar aceste diferente rezida în capacitatea fiecareia dintre ele de a se lega la DNA, un control suplimentar în acest sens fiind cuplarea proteinelor partenere Max (72).

Studiul creierului uman fetal în timpul dezvoltarii a relevat prezenta c-myc, N-myc si

L-myc în celule postmitotice din straturile corticale si intermediare dar si în straturile active mitotice care contin celule neuroepiteliale precursora (73).

În timpul dezvoltarii la soareci, desi L-myc se exprima în rinichi, plamân dar si în zonele proliferative si differentiate ale creierului si tubului neural, soarecii nuli pentru L-myc sunt viabili, competenti reproductibil si nu au anomalii congenitale (51).

În astrocitele de soarece stimulate *in vitro* cu INF-gamma expresia c-myc si L-myc creste mult peste nivelul bazal. În schimb, astrocitele differentiate terminal nu exprima deloc N-myc iar tratamentul cu INF-gamma nu induce expresia acestuia (74).

În cadrul aceluasi tip celular proteinele Myc actioneaza diferential fiind implicate în procese fiziologice diferite. De exemplu, în celulele cristalinelor de soarece, L-myc este implicata în procesul diferentierii celulelor epiteliale în celule fibroase, în timp ce c-myc nu afecteaza diferentierea si favorizeaza proliferarea (75).

N-myc si L-myc sunt exprimate cu deosebire în creier în timpul dezvoltarii. Precursorii neurali care s-au angajat catre o anumita directie de diferentiere exprima ambele proteine pe când celulele deja angajate exprima doar una dintre ele. Astfel, N-myc este hiperexpresata într-o linie celulara de precursori angajati catre diferentierea în neuroni iar L-myc în precursorii care se diferentiaza în celule gliale. Acesta sugereaza ca expresia diferentiala a proteinelor Myc ar putea avea rol în determinarea directiei de diferentiere (76).

Expresia uneia dintre proteinele Myc în detrimentul alteia în diverse procese biologice sugereaza o complementaritate în exercitarea functiei biologice de catre acestea. În celule leucemice de soarece (MEL), atât N-myc cât si L-myc pot substitui functia lui c-myc atunci când aceasta este nefunctionala ca urmare a unor deletii experimentale parțiale (42).

S-a demonstrat ca c-myc, N-myc si L-myc sunt coexpresate într-o serie de linii celulare de neuroblastom, carcinom de plamân si leucemie mieloida atât la nivelul mRNA cât si al proteinei (41).

În glioblastom sunt exprimate toate trei proteinele Myc desi gradul de expresie a fiecareia difera (77). Amplificarea N-myc se coreleaza cu prognostic prost în neuroblastomul uman, tumori în care nu s-a constatat o amplificare a lui c-myc sau L-myc dar, în schimb, s-a constatat o coexpresie a lui N-myc cu c-myc si, de asemenea, ca tumorile care nu exprimau

nici N-myc nici c-myc aveau aspect histologic de ganglioblastom (78).

Analiza celulelor de carcinom pulmonar uman arata amplificari ale genelor c-myc, N-myc si L-myc desi gradul de amplificare este heterogen atât în tumorile primare cât si în metastaze (79).

C-myc este frecvent dereglata în lecemii si limfoame. N-myc si L-myc pot substitui transformarea prin c-myc in vitro iar hiperexpresia lor, ca si a c-myc, poate bloca diferentierea liniilor celulare leucemice. Cu toate acestea, L-myc este exprimata cu preponderenta în leucemiile de tip mieloid, N-myc în cele de tip mieloid si limfoid, dar în toate tipurile de lecemii ele se coexprima cu c-myc (80). Este recunoscut rolul lui c-myc în patogenia tumorilor limfoide de tip B cum sunt limfomul Burkitt uman, plasmocitomul murin si imunocitomul de la sobolan. În acelasi timp însa, în urma investigatiilor asupra 9 linii celulare de mielom multiplu uman, s-a demonstrat ca c-myc este exprimat si chiar amplificat în toate aceste linii celulare, la acelasi nivel cu cel din celulele de carcinom de colon COLO 320 si cu cel din celulele leucemice umane HL60. În schimb, L-myc se exprima doar într-o singura linie care nu exprima c-myc, iar N-myc nu a fost detectata in nici una din liniile celulare examinate, cum de altfel nu s-au constatat nici rearanjari ale genelor myc detectate (81). In leucemiile acute si în alte linii celulare mieloid s-au detectat toate cele trei proteine myc cu urmatoarele diferentieri: c-myc este exprimat in toate, N-myc si L-myc doar într-o parte dintre acestea, L-myc prezentand unele deletii in exonul III si intronul I iar coexpresia tuturor s-a detectat doar în doua linii celulare si doar în doua cazuri de leucemie acuta, în majoritate, fie N-myc fie L-myc fiind coexprimat cu c-myc (82).

Este deja demonstrat faptul ca c-myc poate induce apoptoza în celulele deprivare de factori de crestere sau în cele tratate cu agenti citotoxici. Experimente efectuate în celule hematopoietice dependente de IL-3 pentru crestere, au aratat ca toate trei proteinele myc, si nu doar c-myc, sunt implicate în apoptoza mediata de absenta IL-3. În cazul expunerii la droguri citotoxice, în timp ce c-myc sensibilizeaza celulele la apoptoza, L-myc si N-myc confera rezistenta la aceste droguri. Aceasta a condus la afirmatia ca cele trei proteine myc sunt implicate în cai distincte si regleaza în mod diferential moartea celulara prin apoptoza (83).

Expresia myc în cancer

Expresia c-myc în cancerul pulmonar

Amplificarea si hiperexpresia oncogenelor familiei Myc sunt legate si de prognoza unor tumori solide pulmonare precum cancerul celulelor mici pulmonare (SCLC - small cell lung carcinoma). Gena c-myc este mai oncogena în stadiul final al bolii, în particular cu o supraactivare dupa chemoterapie având efecte în proliferare, diferentiere si apoptoza celulara.

Analiza proteinei endogene c/Myc în relatia ei cu diferentierea prin cocultivare cu oligodeoxinucleotide (ODN) antisens în linia SCLC-GLC4, nu arata diferente semnificative în expresia moleculelor de adeziune. ODN antisens c-myc induce inhibitia sporirii proteinei c-Myc, fara a afecta expresia CD15 (antigen mieloid) a vimentinei si VLA-alpha4 (molecula

de adeziune) (84).

La om s-au identificat genele cdc25A, B si C, dintre care primele doua au proprietati oncogene, hiperexprimându-se în cancerule de sân, cap si gât. La 40 pacienti cu NSCLC (Non-Small Cell Lung Cancer) analiza potentialului cdc25A în tumorile primare arata ca acesta se hiperexprima în 60% (24 din 40) tumori, cdcB în 45% (18 din 40), iar cdcC nu se exprima în nici una din tumori. C-myc ar putea creste expresia cdc25 A si B, dar analizele arata ca c-myc nu se asociaza cu acestea. Gena cdc25B se amplifica în 40% (8 din 20) tumori, proces care însa, nu se coreleaza cu statutul expresiei genei c-myc. Toate tumorile în care se hiperexprima cdc25 A si B, din punct de vedere histologic sunt slab diferite. Cele moderat diferite sau diferite exprima un nivel scazut de cdc25A, iar cdc25B se hiperexprima în 19% (3 din 16) tumori (85).

În terapia cancerului SCLC si non-SCLC, inclusiv în tumorile în care sunt exprimate protooncogenele c-myc si c-ras, se recomanda terapia cu compusi N1,N-12-bis(ethyl/spermine) care este un citostatic pentru tumorile pulmonare (86). În linia celulara SCLC-R1, o noua linie de cancer uman cu celule pulmonare mici metastazice, genele c-myc, L-myc, N-myc, int-2, c-erbB-2, H-ras, K-ras, c-mos si hst-1 nu arata amplificari sau rearanjari (87).

În 128 cazuri de carcinom pulmonar cu celule mari s-au constatat corelatii între expresia lui c-myc si a caspasei-3. Astfel, timpul mediu de supravietuire al celor cu c-myc negativa era de 89 saptamâni, pentru cei cu caspasa-3 negativa era de 41 saptamâni, iar pentru cei cu caspasa-3 pozitiva era de 79 saptamâni. Exista o semnificativa relatie inversa între expresia c-myc si caspasei-3. Pacientii cu tumori c-myc negative si caspasa-3 pozitiva au cea mai favorabila prognoza (102 saptamâni), în timp ce cei cu c-myc pozitiva si caspasa-3 negativa au cea mai sumbra prognoza (22 saptamâni) (88).

C-myc în cancerul gastric

În liniile AKG si GK2 de carcinom gastric obtinute din efuzii pleurale si ascitice sunt amplificate oncogenele c-myc si K-ras. Organizarea si numarul copiilor c-myc amplificate sunt diferite de cele K-ras, ceea ce sugereaza ca ele sunt amplificate independent una de cealalta (89).

În adenocarcinomul gastric FISH s-au analizat câteva gene, printre care si c-myc. Probele cromosomiale specifice au detectat amplificarea acesteia în regiunile colorate omogen (HSR) si în minicromosomi (DM) din 24 tumori (15,5%), dar amplificarea înalta apare major în minicromosomi (90).

TNF-alpha este o citokina multifunctionala elaborata de macrofage, cu proprietatea de citostatic sau citotoxic pentru numeroase celule tumorale. Citokina arata o marcata citotoxicitate asupra celulelor tumorale care hiperexprima c-myc asa cum sunt celulele SNU-16 de carcinom gastric; amplificarea c-myc ducând astfel la apoptoza. În celulele acestei linii, TNF-alpha creste, în functie de timp, nivelul p53 si Bax efect care persista 12 ore. Deci, dereglarea lui c-myc joaca un rol important în sensibilizarea celulelor tumorale la TNF-alpha. Se sugereaza ca apoptoza indusa de acesta citokina citostatica se face via p53 si Bax (91).

S-au analizat imunohistochimic 76 cancerule gastrice primare umane în scopul stabilirii expresiei proteinei c-myc urmarita dupa indicii proliferativi. Nivelul expresiei s-a corelat atât cu parametri biologici cât si cu cei clinici. În 36 din cele 76 cazuri (47,4%) de

cancer gastric primar, s-a constatat hiperexpresia Myc ca si în cele timpurii (42,9%). Expresia proteinei Myc este mai radical exprimata în celulele canceroase slab diferentiate ceea ce se coreleaza semnificativ cu activitatea crescuta a proliferarii. Subiectii care au nivele înalte ale Myc supravietuiesc mai putin. Într-un procent de cancer gastric uman proteina Myc poate functiona ca regulator al cresterii celulelor canceroase si expresia ei poate reprezenta un fenotip agresiv al acestui tip de cancer (92).

Myc în cancerul colorectal

În 70 de cazuri de cancer colorectal amplificarea genei myc este de 26%, numarul de copii fiind de 2-5 ori. Acest proces apare în stadii mai avansate ale invaziei tumorale si se asociaza cu mutatii în p53. Prezenta amplificarii c-myc este un indicativ al perioadei mai scurte de supravietuire, valoarea de prognostic însa, fiind discutabila (93).

Din 35 probe tumorale s-a detectat hiperexpresia mRNA c-myc în 22 cazuri (63%), fara însa sa existe o corelatie între hiperexpresia genei si profunzimea invaziei si a metastazarii ganglionilor limfatici. Rata supravietuirii este semnificativ mai scazuta la pacientii la care gena se hiperexprima, decât la cei la care nu se hiperexprima. Deci, mRNA c-myc hiperexprimat este un indicator de prognostic sumbru la subiectii cu cancer colorectal (94).

Structurile acentrice extracromosomiale autonome replicate numite “double-minute chromosome” (DM) sau minicromosomi mediaza, de asemenea, amplificarea oncogenelor în tumorile umane. Minicromosomii din celulele liniei de cancer de colon contin oncogena myc care se localizeaza si se replica la periferia nucleului (95).

C-myc în cancerul de prostata

Este cunoscut faptul ca în acest tip de cancer, raspunsul privind proliferarea celulelor este corelat cu continutul acestora în mRNA c-myc. De altfel, în mai multe tipuri de malignitati umane, aceasta protooncogena se amplifica în timpul transformarii celulare, în mitogeneza si în proliferare. În cancerul de prostata s-au detectat deletii alelice ale bratului lung al cromosomului 10 (10q 23-25) care este locusul genei MX11, care apartine familiei genelor helix-loop-helix (bHLH) cu functii în supresia tumorală prin antagonizarea transcrierilor induse de c-myc. Datorita mutatiilor punct din alelele obtinute din 4 adenocarcinoame de prostata, alterarile genei MX11 apar implicate în aparitia si/sau progresia acestor tumori. Gena supresoare de tumori - MX11 - localizata la 10q23 ar putea fi responsabila de deletiile alelice radicale observate în acest tip de cancer (96).

Cancerul de prostata poate, eventual, deveni rezistent la androgeni, tumora crescând si ucigând pacientul. Caracterizarea evenimentelor genetice care duc la neoplazia prostatei refractara la androgeni, releva radical hiperexpresia genei c-myc si proliferarea necontrolata a celulelor canceroase (97,98).

C-myc în cancerul mamar

Amplificarea și/sau hiperexpresia c-myc și c-erbB2, ca și concentrația totală a catepsinei-D (CD) sunt asociate cu prognoza sumbră de cancer mamar (99). La 35 femei cu acest tip de cancer, s-a examinat expresia mRNA a ornitin-decarboxilazei și semnificația ei clinico-patologică. Expresie semnificativ mai înaltă se constată la femeile mai tinere, iar la cele cu tumori voluminoase expresia este și mai pronunțată.

În carcinoamele mamare inclusiv în cele primare s-a constatat, atât *in vitro* cât și *in vivo*, o corelație între expresia ornitin-decarboxilazei și genele c-myc; de aici sugestia că expresia enzimei poate reprezenta un nou potențial marker pentru carcinomul mamar (100).

Tratarea liniilor celulare de carcinom mamar cu Oncostatin M (OSM) induce scăderea de 2-5 ori a numărului celulelor și aceasta independent de statutul receptorului estrogen. Tratamentul a redus în 12 ore în proporție de 40%, celulele aflate în faza S, iar după 6 zile, de 10 ori mai mult, aparând însă schimbări morfologice ale acestora și creșterea de 5 ori în 30 minute de la începutul tratamentului a mRNA c-fos. În schimb, se constată o creștere în fazele G₀/G₁. Deci, schimbările celulelor tumorilor mamare induse de OSM sunt asociate cu scăderea clonogenității, a celulelor aflate în faza S și de asemenea, cu o varietate de schimbări fenotipice, toate marcate de inducerea diferențierii (101).

Linia celulară de cancer mamar IIB-BR-G detine *in vitro* protooncogenele c-myc și c-fos, iar *in vivo* devine spontan metastazică. După aproape 40 de pasaje subcutane secvențiale de xenogrefe originare la soareci nuzi, 80% din aceștia fac metastaze primare spontane la nivel pulmonar și în ganglionii limfatici (102).

Expresia c-myc în alte tipuri de cancer

Statutul aberant al genei c-myc se constată și în cancerul de vezică urinară, unde gena este alterată la diferite nivele în timpul genezei și progresiei tumorilor. În 31 probe prelevate de la subiecți cu acest tip de cancer, s-au detectat statutul metilării, amplificarea genică și hiperexpresia mRNA c-myc. Prezența amplificării genei c-myc la 5 din 15 carcinoame se corelează statistic semnificativ cu metilarea, cu expresia genei și cu parametri clinico-histopatologici (103).

În 90 cazuri de carcinoame epiteliale ovariene s-a studiat expresia mRNA c-myc, folosindu-se metoda nucleazei S1; s-a constatat prezența mRNA c-myc în 27 din cele 90 tumori, dar nu s-a constatat o asocieră semnificativă între această expresie și diseminarea metastazică. Totuși, s-a sugerat că expresia mRNA c-myc s-ar putea corela cu receptorul estrogen și cu diseminarea metastazică. mRNA c-myc s-a exprimat în 45% din tumorile pozitive la acest receptor și în 24% în cele negative. De aici, concluzia că în cazul cancerului ovarian c-myc nu este semnificativ asociat cu parametri clinici (104).

TRANSCRIPTIONAL FACTORS – MYC

c-myc, L-myc and N-myc genes are members of Myc family of protooncogenes that encode nuclear proteins which are regulators of transcription. These genes are early response genes, expressed in normal cells, whose expression is rapidly induced after growth factors stimulation. The myc oncogenes are abnormally expressed in transformant cells as it has been

shown in a wide variety of malignant tumors.

All myc genes encode similar phosphoproteins of approximately 60 kDa. The N-terminal region of Myc contains a transcriptional transactivation domain. The C-terminal region of the proteins contains a nuclear localization domain followed by basic region, helix-loop-helix domain (HLH) and a leucine zipper motif. The basic region is involved in Myc binding to specific DNA sequences and the HLH and leucine zipper domains are required for direct protein-protein interactions that ensure Myc dimerization and function as transcriptional regulators.

A second family of proteins, named Max, can interact with Myc to form heterodimers via HLH and leucine zipper domains. This interaction is essential for the Myc ability to bind specific DNA sequences and to regulate transcription. Myc-Max heterodimers bind with a high affinity to 5'-CACGTG sequence of DNA known as "Myc-core" within the E-box element. It has been recently identified a new family of proteins, named mad, that antagonize with Myc function by binding Max, therefore Mad-Max heterodimers block the transcriptional function of Myc.

Normal myc expression induces the activation of proliferation – related genes involved in G0-G1 transition during cell cycle. It has been shown that the level of expression of Myc is associated with proliferation and differentiation processes. Myc directly regulates the expression of several genes, i.e. ODC (ornithine decarboxylase), p53 and cdc25.

Although Myc family members encode similar proteins, they are differentially expressed in various cellular types. That suggest that besides their common biological activities they may have some distinct functions.

N-myc has been first time described in neuroblastoma cells, its expression being normally associated with undifferentiated state of neuroblasts during embryogenesis. L-myc was identified in lung carcinoma cells and encodes multiple phosphoproteins as a result of alternative splicing of L-myc mRNA.

All three myc genes (c-myc, N-myc and L-myc) are aberrantly expressed malignant cells derived from various tissues. Dysregulated myc expression in cancer cells may result from gene amplification, chromosomal translocations or constitutive activation of myc expression.

Amplification of c-myc has been reported especially in leukemic cells, colon carcinoma and some lung carcinoma cells. N-myc alone, or associated with the amplification of c-myc and L-myc, is highly amplified in neuroblastoma cells and lung cancer. Several chromosomal translocation associated with malignant transformation involve c-myc protooncogene. Thus, in chromosomal translocation in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma, c-myc is translocated on locuses under the control of promoter or enhancer elements of genes that encode different immunoglobulin chains. Constitutive activation of myc is also known to contribute to cancerogenesis, cellular growth induced by an aberrant myc expression may be responsible for its ability to promote malignant transformation. Myc oncogenes hyperexpression correlates with a block in differentiation process in leukemia and lymphoma cells. On the other hand, as shown by several studies, c-myc, N-myc and L-myc might be involved, although on different pathways, in regulating apoptotic cell death.

Numerous studies on various types of cancer reveal different patterns in the expression of myc protooncogenes. Thus, c-myc has been shown to be amplified and hyperexpressed in lung cancer, gastric and colorectal adenocarcinoma, prostate and breast cancer. In neuroblastoma cells, lung carcinoma and some myeloid leukemia cells, c-myc is coexpressed with the other two members of myc family, N-myc and L-myc. They are all amplified heterogeneously in primary lung carcinoma as well as in metastases.

1. DePinho RA. Schreiber-Agus N. Alt FW. Myc family oncogenes in the development of normal and neoplastic cells. *Adv. Cancer Res.*, 57, 1, 1991.
2. Blackood EM. Kretzer L. Eisenman RN. Myc and max function 1. DePinho RA. Schreiber-Agus N. Alt FW. Myc family oncogenes in the development of normal and neoplastic cells. *Adv. Cancer Res.*, 57, 1, 1991; as a nucleoprotein complex. *Curr. Opin. Gen. Dev.*, 2, 227, 1992.
3. Bentley DL. Groudine M. A block to elongation is largely responsible for decreased transcription of c-myc in differentiated HL60 cells. *Nature*, 321, 702, 1986.
4. Donner P. Greisser-Wilke I. Moelling K. Nuclear localization and DNA-binding of the transforming gene product of avian myelocytomatous virus. *Nature*, 296, 262, 1982.
5. Rabbits TH. The c-myc proto-oncogene involvement in chromosomal abnormalities. In "Oncogenes and Growth Factors", Ed. by Bradshaw RA and Prentis S., 24-33, 1987.
6. Nusse R. The activation of cellular oncogenes by retroviral insertion. In "Oncogenes and Growth Factors", Ed. by Bradshaw RA. and Prentis S., 59-67, 1987.
7. Zhou RP. Duesberg PH. Myc protooncogene linked to retroviral promotor, but not to enhancer, transforms embryo cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 9, 2924-2928, 1988.
8. Nottenburg C. Stubblefield E. Varmus HE. An aberrant avian leukosis virus provirus inserted downstream from the chicken c-myc coding sequence in a bursal lymphoma results from intrachromosomal recombination between two proviruses and deletion of cellular DNA. *Gen. Virol.*, 61, 6, 1828-1833, 1987.
9. Robinson HC. Gagnon GC. Patterns proviral insertion and deletion in avian leukosis virus-induced lymphomas. *J. Virol.*, 57, 1, 28-36, 1986.
10. Lazo PA. Tschlis PN. Recombination between two integrated proviruses, one of which was inserted near c-myc in a retrovirus-induced rat thymoma: implications for tumor progression. *J. Virol.*, 62, 3, 788-794, 1988.
11. Alitalo K. Amplification of cellular oncogenes in cancer cells. In "Oncogenes and Growth Factors", Ed. by Bradshaw RA. And Prentis S., 17-22, 1987.
12. Schwab M. Amplification of N-myc in human neuroblastomas. In "Oncogenes and Growth Factors", Ed. by Bradshaw RA and Prentis S., 50-59, 1987.
13. Hunt JD. Valentine M. Tereba A. Excision of N-myc from chromosome 2 in human neuroblastoma cells containing amplified N-myc sequences. *J. Cell Biol.*, 10 (2), 823-829, 1990.
14. Gross N. Beck D. Favre S. In vitro modulation and relationship between N-myc and HLA class I RNA steady-state levels in human neuroblastoma cells. *Cancer Res.*, 50 (23), 7532-7536, 1990.
15. Riou GF. Bourhis J. Le MG. The c-myc proto-oncogene in invasive carcinomas of the uterine cervix: clinical relevance of over-expression in early stages of the cancer. *Cancer Res.*, 10 (5A), 1225-1231, 1990.
16. Strandberg-Gibson C. Croker BB. Chromatin structure of amplified and single copy c-myc in malignant fibrous histiocytoma cell lines. *Cell Biochem., suppl.* 13B, 41, 1989.
17. Brooks BJ. Battey J. Nau MM. Gazelar AF. Minna J. Amplification and expression of the myc gene in small-cell lung cancer. In "Adv. in Viral Oncology", Ed. by Klein G., Raven Press, NY, 7, 155-172, 1987.
18. Klein G. Klein Eva. Myc/Ig juxtaposition by chromosomal translocations: some new insights, puzzles and paradoxes. In "Adv. in Viral Oncology", Ed. by Klein G., Raven Press, NY., 7, 33-47, 1987.
19. Croce C. Erikson J. Tsujimoto Y. Nowell P. Molecular basis of human B- and T cell neoplasia. In "Adv. in Viral Oncology", Ed. by Klein G., Raven Press, NY, 35-53, 1987.
20. Gough N. Chromosomal translocation and the c-myc gene paradigm lost. In "Oncogenes and Growth Factors" Ed. by Bradshaw RA. and Prentis S., 7, 47-49, 1987.
21. Axelson H. Pear WS. Panda CK. Bazin H. Klein G. Sumegi J. Transcriptional deregulation of myc in IgH/myc 6;7 translocation carrying rat immunocytomas. *Res. Chromosom. Cancer*, 3 (2), 142-148, 1991.
22. Spencer CA. LeStrange RC. Novak U. Hayward WS. Groudine M. The block to transcription elongation is promoter dependent in normal and Burkitt's lymphoma c-myc alleles. *Genes Dev.*, 4 (1), 75-88, 1990.
23. Zhang XY. Supakar PC. Wu KZ. Ehrlich KC. Ehrlich M. An MDBP site in the first intron of the human c-myc gene. *Cancer Res.*, 50 (21), 6865-6869, 1990.
24. Schweinfest CW. Fujiwara S. Lau LF. Papas TS. C-myc can induce expression of G₀/G₁ transition

- genes. *Mol. and Cell Biol.*, 8, 8, 3080-3087, 1988.
25. Vriza S. Lemaître JM. Leibovici M. Thierry N. Mechali M. Comparative Analysis of the Intracellular Localization of c-Myc, c-Fos and Replicative Proteins during Cell Cycle Progression. *Molecular and Cellular Biology*, 12, 8, 3543-3555, 1992.
 26. Fink KL. Wieben ED. Woloschak GE. Gayle E. Spelsberg TC. Rapid regulation of c-myc protooncogene expression by progesterone in the avian oviduct. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 6, 1796-1800, 1988.
 27. Schumacher M. Staeger MS. Pajic A. Polack A. Weidle UH. Bornkamm GW. Eick D. Kohlhuber F. Control of cell growth by c-Myc in the absence of cell division. *Curr. Biol.*, 9 (21), 1255-8, 1999.
 28. Ben-Yosef T. Yanuka O. Halle D. Benvenisty N. Involvement of Myc targets in c-myc and N-myc induced human tumors. *Oncogene*, 17 (2), 165-71, 1998.
 29. Gaubatz S. Meichle A. Eilers M. An E-box element localized in the first intron mediates regulation of the prothymosin alpha gene by c-myc. *Mol. Cell Biol.*, 14 (6), 3853-62, 1994.
 30. Bello-Fernandez C. Packham G. Cleveland JL. The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 (16), 7804-8, 1993.
 31. Steiner P. Rudolph B. Muller D. Eilers M. The functions of Myc in cell cycle progression and apoptosis. *Prog. Cell Cycle Res.*, 2, 73-82, 1996.
 32. Luscher B. Larsson LG. The basic region/helix-loop-helix/leucine zipper domain of Myc proto-oncoproteins; function and regulation. *Oncogene*, 18 (19), 2955-6, 1999.
 33. Hopewell R. Ziff EB. The nerve growth factor-responsive PC12 cell line does not express the myc dimerization partner max. *Mol. Cell Biol.*, 15 (7), 347-8, 1995.
 34. Schwab M. Verma HE. Bishop JM. Human N-myc gene contributes to neoplastic transformation of mammalian cells in culture. *Nature*, 316, 6024, 160-162, 1985.
 35. Galderesi U. Di Bernardo G. Cipollaro M. Peluso GC. Cascino A. Cotrufo R. Melone M. Differentiation and apoptosis of neuroblastoma cells; role of N-myc gene product. *J. Cell Biochem.* 73 (1), 97-105, 1999.
 36. Wada RK. Pai DS. Huang J. Yamashiro JM. Sidell N. Interferon-gamma and retinoic acid down-regulate N-myc in neuroblastoma through complementary mechanism of action. *Cancer Lett.*, 121 (2), 181-8, 1997.
 37. Wakamatsu Y. Watanabe Y. Nakamura H. Kondoh H. Regulation of the neural crest cell fate by N-myc; promotion of ventral migration and neuronal differentiation. *Development*, 124 (10), 1953-62, 1997.
 38. Giroux S. Charron J. Defective development of the embryonic liver in N-myc -deficient mice. *Dev. Biol.*, 195 (1), 16-28, 1998.
 39. Pession A. Trere D. Perri P. Rondelli R. Montanaro L. Mantovani W. Derenzini M. Paolucci G. N-myc amplification and cell proliferation rate in human neuroblastoma. *J. Pathol.*, 183 (3), 339-44, 1997.
 40. Hemmi H. Yamada K. Yoon UH. Kato M. Taniguchi F. Tsuchida Y. Shimatake H. Coexpression of the myc gene family members in human neuroblastoma cell lines. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 36 (6), 1135-47, 1995.
 41. Bar-Ner M. Messing LT. Segal S. Inhibition of murine erythroleukemia cell differentiation by normal and partially deleted c-myc genes. *Immunobiology*, 185, 150, 1992.
 42. Hachitanda Y. Toyoshima S. Akazawa K. Tsuneyoshi M. N-myc gene amplification in rhabdomyosarcoma detected by fluorescence in situ hybridization; its correlation with histologic features. *Mol. Pathol.*, 11, 1222-7, 1998.
 43. Galanis E. Buckner J. Kimmel D. Jenkins R. Alderete B. O'Fallon J. Wang CH. Scheithauer BW. James CD. Gene amplification as a prognostic factor in primary and secondary high-grade malignant gliomas. *Int. J. Oncol.*, 13 (4), 717-24, 1998.
 44. Zhang X. Xing G. Saunders GF. Proto-oncogene N-myc promoter is down-regulated by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. *Anticancer Res.*, 19 (3A), 1641-8, 1999.
 45. Misawa A. Hosoi H. Arimoto A. Shikata S. Akiota S. Matsumura T. Houghton PJ. Sawada T. N-myc induction stimulated by insulin-like growth factor I through mitogen activated protein kinase signaling pathway in human neuroblastoma cells. *Cancer Res.*, 60 (1), 64-9, 2000.
 46. Brooks B. Battey J. Nau M. Gazdar A. Minna J. Amplification and expression of the myc gene in small-cell lung cancer. In "Adv. in Viral Oncology" Ed. Klein G., Raven Press NY., 7, 155-172, 1987.
 47. De Greve J. Battey J. Fedorko J. Binner M. Evan G. Kaye F. Sanseville E. Minna J. The human L-myc gene encodes multiple nuclear phosphoproteins from alternatively processed mRNA. *Mol. and Cell Biol.*, 8, 10, 4381-4388, 1988.
 48. Yamamoto A. Shimizu E. Sumimoto K. Shinohara A. Namikawa O. Uehara H. Sone S. L-myc

- overexpression and detection of auto-antibodies against L-myc in both the serum and pleural effusion from a patient with non-small cell lung cancer. *Intern. Med.*, 36 (10), 724-7, 1997.
49. Dosaka-Akita H. Akie KH. Hiruomi H. Kinoshita I. Kawakami Y. Murakami A. Inhibition of proliferation by L-myc antisense DNA for the translational initiation site in human small-cell lung cancer. *Cancer Res.*, 55 (7), 1559-64, 1995.
 50. Hatton KS. Mahon KC. Chin L. Chiu FC. Lee HW. Peng D. Morgenbesser SD. Horner J. De Pinho RA. Expression and activity of L-myc in normal mouse development. *Mol. Cell Biol.*, 16 (4), 1794-804, 1996.
 51. Cole MD. Myc meets its Max. *Cell*, 65 (5), 715-6, 1991.
 52. Vervoorts J. Luscher B.. DNA binding of Myc/Max/Mad complexes to oligonucleotides containing two E-box elements; c-Myc/Max heterodimers do not bind DNA cooperatively. *Biol. Chem.*, 380 (9), 1121-6, 1999.
 53. Kuramoto N. Ogita K. Yoneda Y. Gene transcription through Myc family members in eucaryotic cells. *Jpn. J. Pharmacol.*, 80 (2), 103-9, 1999.
 54. Blackwood EM. Eisenman RN. Max; A helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence specific DNA-binding complex with myc. *Science*, 251 (4998), 1211-7, 1991.
 55. Kato GJ. Lee WM. Chen LL. Dang CV. Max; functional domains and interaction with c-c-myc. *Genes Dev.*, 6 (1), 81-92, 1992.
 56. Wagner AJ. Le Beau MM. Diaz MO. Hay N. Expression, regulation and chromosomal regulation of the Max gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 (7), 3111-5, 1992.
 57. Zhang H. Fan S. Prochownik EV. Distinct roles for Max protein isoforms in proliferation and apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 272 (28), 17416-24, 1997.
 58. Martel C. Lallemand D. Cremisi C. Specific c-myc and Max regulation in epithelial cells. *Oncogene*, 10 (11), 2195-205, 1995.
 59. Delgado MD. Lerga A. Canelles M. Gomez-Casares MT. Differential regulation of Max and role of c-myc during erythroid and myelomonocytic differentiation of K562 cells. *Oncogene*, 10 (8), 1659-65, 1995.
 60. Shen-Li H. O'Hagan RC. Hou H Jr. Horner JW. Lee HW. DePinho RA. Essential role for max early embryonic growth and development. *Genes Dev.*, 14 (1), 17-22, 2000.
 61. Canelles M. Delgado MD. Hyland KM. Lerga A. Richard C. Dang CV. Leon J. Max and inhibitory c-Myc mutants induce erythroid differentiation and resistance to apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Oncogene*, 14 (11), 1315-27, 1997.
 62. Skouteris GG. Schroder CH. c-Myc and Max interactions in quiescent and mitogen-stimulated primary hepatocytes. *Exp. Cell Res.*, 225 (2), 237-44, 1996.
 63. Nesbit CE. Grove L. Yin X. Prochownik EV. Differential apoptotic behaviors of c-myc, N-myc, and L-myc oncoproteins. *Cell Growth Differ.*, 9 (9), 731-41, 1998.
 64. Lindeman GJ. Harris AW. Bath ML. Eisenman RN. Adams JM. Overexpressed max is not oncogenic and attenuates myc-induced lymphoproliferation and lymphomagenesis in transgenic mice. *Oncogene*, 10 (5), 1013-7, 1995.
 65. Ayer DE. Eisenman RN. Mad; A heterodimeric partner for max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell*, 72, 211, 1993.
 66. Yin XY. Gupta K. Han WP. Levitan ES. Prochownik EV. Mmip-2, a novel RING finger protein that interacts with mad members of the Myc oncoprotein network. *Oncogene*, 18 (48), 6621-34, 1999.
 67. Billin AN. Eilers AL. Queva C. Ayer DE. Mlx, A novel Max-like BHLHzip protein that interacts with the Max network of transcription factors. *J. Biol. Chem.*, 274 (51), 36344-50, 1999.
 68. Queva C. Hurlin PJ. Foley KP. Eisenman RN. Sequential expression of the MAD family of transcriptional repressors during differentiation and development. *Oncogene*, 16 (18), 967-77, 1998.
 69. Foley KP. McArthur GA. Queva C. Hurlin PJ. Soriano P. Eisenman RN. Targeted disruption of the MYC antagonist MAD1 inhibits cell cycle exit during granulocyte differentiation. *EMBO J.*, 17 (3), 774-85, 1998.
 70. Foley KP. Eisenman RN. Two MAD tails; what the recent knockouts of Mad1 and Mx1 tell us about the MYC/MAX/MAD network. *Biochim. Biophys. Acta*, 1423 (3), 37-47, 1999.
 71. Sommer A. Bousset K. Kremmer E. Austen M. Luscher B. Identification and characterization of specific DNA-binding complexes containing members of the Myc/Max/Mad network of transcriptional regulators. *J. Biol. Chem.*, 273 (12), 6632-42, 1998.
 72. Prochownik EV. Van Antwerp ME. Differential patterns of DNA-binding by myc and max proteins. *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. USA, 90 (3), 960-4, 1993.
73. Hirvonen H. Makela TP. Sandberg M. Kalimo H. Vuorio E. Alitalo K. Expression of the myc proto-oncogenes in developing human fetal brain. *Oncogene*, 5 (12), 1787-97, 1990.
 74. Rubio N. Torres C. Interferon- gamma induces proliferation but not apoptosis in murine astrocytes through the differential expression of the myc proto-oncogene family. *Brain Res. Mol*, 71 (1), 104-10, 1999.
 75. Morgenbesser SD. Schreiber-Agus N. Bidder M. Mahon KA. Overbeek PA. Horner J. DePinho RA. Contrasting roles for c-myc and L-myc in the regulation of cellular growth and differentiation in vivo. *EMBO J.*, 14 (4), 743-56, 1995.
 76. Bernard O. Drago J. Sheng H. L-myc and N-myc influence lineage determination in the central nervous system. *Neuron*, 9 (6), 1217-24, 1992.
 77. Herms JW. von Loewenich FD. Behnke J. Markakis E. Kretzschmar HA. c-myc oncogene family expression in glioblastoma and survival. *Surg. Neurol.*, 51 (5), 536-42, 1999.
 78. Svlac I. Ellenbogen R. Jung WH. Vawter GF. Kretzschmar C. Grier H. Korf BR. myc gene amplification and expression in primary human neuroblastoma. *Cancer Res.*, 50(5), 1459-63, 1990.
 79. Noguchi M. Hirohashi S. Hara F. Kojima A. Shimasato Y. Shinkai T. Tsuchiya R. Heterogenous amplification of myc family oncogenes in small-cell lung carcinoma. *Cancer*, 66 (10), 2053-8, 1990.
 80. Hirvonen H. Hukkanen V. Salmi TT. Pelliniemi TT. Alitalo R. L-myc and N-myc in hepatopoietic malignancies. *Leuk. Lymphoma*, 11 (3-4), 197-205, 1993.
 81. Jenberg-Wiklund H. Petterson M. Larsson LG. Anton R. Nilsson K. Expression of myc family genes in established human multiple myeloma cell lines; L-myc but not c-myc gene expression in the U-226 myeloma cell line. *Int. J. Cancer*, 51, 116-23, 1992.
 82. Hirvonen H. Hukkanen V. Salmi TT. Pelliniemi TT. Knuutila S. Alitalo R. Expression of L-myc and N-myc proto-oncogenes in human leukemia cell lines. *Blood*, 78, 3012, 1991.
 83. Nesbit CE. Fan S. Zhang H. Prochownik EV. Distinct apoptotic responses imparted by c-myc and max. *Blood*, 92, 1003, 1998.
 84. van Vaardenburg RC. Meijer C. Pinto-Sietsma SJ. De Vries EG. Timens W. Mulder NM. Effects of c-myc oncogene modulation on differentiation of human small-cell lung carcinoma cell lines. *Anticancer Research*, 18 (1A), 91-5, 1998.
 85. Wu W. Fan YH. Kemp BL. Walsh G. Mao L. Overexpression of cdc25A and cdc25B is frequent in primary non-small cell lung cancer but is not associated with overexpression of c-myc. *Cancer Research*, 58 (18), 4082-5, 1998.
 86. Barr LF. Campbell SE. Tamez P. Casero RA Jr. The growth inhibitory effect of N1, N12-bis (ethyl) spermine in small-cell lung cancer cells is maintained in cells expressing the c-myc and Ha-ras oncogenes. *Clinical Cancer Research*, 4 (6), 1557-61, 1998.
 87. Gasperi-Campani A. Roncuzzi L. Zoli W. Lenzi L. Gruppioni R. Sensi A. Zini N. Farabegoli F. Amadori D. Chromosomal alterations, biological features and in vitro chemosensitivity of SCLC-R1, a new line from human metastatic small-cell lung. *European Journal of Cancer*, 34 (5), 724-30, 1998.
 88. Volm M. Koomagi R. Prognostic relevance of c-Myc and caspase-3 for patients with non-small cell lung cancer. *Oncol. Rep.*, 7 (1), 95-8, 2000.
 89. Bertoni L. Zoli W. Mucciolo E. Ricotti L. Nergadze S. Amadori D. Giulotto E. Different genome organization in two new cell lines established from human gastric carcinoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 105 (2), 152-9, 1998.
 90. Hara T. Ooi A. Kobayashi M. Mai M. Yanagihara K. Nakanishi I. Amplification of c-myc, K-sam, and c-met in gastric cancers; detection by fluorescence in situ hybridization. *Laboratory Investigation*, 78 (9), 1143-53, 1998.
 91. Park IC. Park MJ. Lee SH. Choe TB. Jang JJ. Hong SI. Increased susceptibility of the c-Myc overexpression cell line, SNU-16, to TNF-alpha. *Cancer Letters*, 125 (1-2), 17-23, 1998.
 92. Han S. Kim HY. Park K. Cho HJ. Lee MS. Kim HJ. Kim YD. c-myc expression is related with cell proliferation and associated with poor clinical outcome in human gastric cancer. *J. Korean Sci.*, 14 (15), 526-30, 1999.
 93. Masramon L. Arribas R. Tortola S. Perucho M. Reinado MA. Moderate amplification of the c-myc gene correlates with molecular and clinico-pathological parameters in colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 77 (12), 2349-56, 1998.
 94. Kakisako K. Miyahara M. Uchino S. Adachi Y. Kitano S. Prognostic significance of c-myc mRNA expression assessed by semi-quantitative RT-PCR in patients with colorectal cancer. *Oncology Reports*, 5 (2), 441-5, 1998.

95. Shimizu N. Hoh N. Utiyama H. Wahl GM. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *Journal of Cell Biology*, 140 (6), 1998.
96. Kuczyk MA. Serth J. Bokemeyer C. Schwede J. Herrmann R. Machtens S. Grunewald V. Hofner K. Jones U. The MX11 tumor suppressor gene is not mutated in primary prostate cancer. *Oncology Research*, 5 (11), 213-6, 1998.
97. Steiner MS. Anthony CT. Lu Y. Holt JT. Antisense c-myc retroviral vector suppresses established human prostate cancer. *Human Gene Therapy*, 9 (5), 747-55, 1998.
98. Foury O. Nicolas B. Joly-Pharaboz MO. Andre J. Control of the proliferation of prostate cancer cells by an androgen and two antiandrogens. Cell specific sets of responses. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 66 (4), 235-40, 1998.
99. Scorilas A. Trangas T. Yotis J. Pateras C. Talieri M. Determination of c-myc amplification and overexpression in breast cancer patients; evaluation of its prognostic value against c-erbB-2, cathepsin-D and clinico-pathological characteristics using univariate and multivariate analysis. *Br. J. Cancer*, 81 (8), 1385-91, 1999.
100. Mimori K. Mori M. Shiraishi CT. Haraguchi M. Ueo H. Shirasaka C. Akiyoshi T. Expression of ornithine decarboxylase mRNA and c-myc mRNA in breast tumors. *International Journal of Oncology*, 12 (3), 597-601, 1998.
101. Douglas AM: Grant SL. Goss GA. Clouston DR. Sutherland RL. Begley CG. Oncostatin M induces differentiation of breast cancer cells. *International Journal of Cancer*, 75 (1), 64-73, 1998.
102. Bover L. Barrio M. Bravo AL: Slavutsky I. Larippa I. Bolondi A. Ayala M. Mordoh J. The human breast cancer cell line IIB-BR-G has amplified c-myc and c-fos oncogenes in vitro and is spontaneously metastatic in vivo. *Cellular and Molecular Biology*, 44 (3), 493-504, 1998.
103. Sardi I. Dal Canto M. Bartoletti R. Guazzelli R. Travaglini F. Montali E. Molecular genetic alterations of c-myc oncogene in superficial and locally advanced bladder cancer. *European Urology*, 33 (4), 424-30, 1998.
104. Tanner B. Hengstler JG. Luch A. Meinert R. Kreutz E. Arand M. Wilkens C. Hofmann M. Oesch F. Knapstein PG. Becker R. c-myc mRNA expression in epithelial ovarian carcinomas in relation to estrogen receptor status, metastatic spread, survival time, FIGO stage and histologic grade and type. *International Journal of Gynecological Pathology*, 17 (1), 66-74, 1998.

Gena jun

Gena c-jun este transcrisa imediat dupa stimularea celulelor cu mitogeni. Ea codifica o fosfoproteina de 39 kD reprezentând componenta majora AP-1 (proteina activatoare-1) a complexului de reglare transcriptionala

Din familia genei jun, pe lânga c-jun, mai fac parte si genele jun-B si jun-D, ambele fiind factori de transcriere cu un domeniu de transactivare N-terminal si unul de cuplare la DNA compus dintr-o regiune bazica si un motiv "zipper" leucina în capetele sale C-terminale.

Prin intermediul motivului "zipper" (leucinei), proteina Jun poate forma homo- sau heterodimeri ce vor cupla la DNA, exprimându-si astfel functia de reglator transcriptional. Proteinele Jun pot forma heterodimeri si cu proteinele reglatoare ale transcrierii elaborate de alte gene cum sunt genele familiei fos, conditie în care raspunsurile transcriptionale vor diferi în timpul dezvoltarii si diferentierii celulare.

Rolul esential al genei c-jun ar fi în tranzitia din faza G0 în faza G1 a ciclului celular pe care-l controleaza. Actioneaza asupra altor gene prin siturile AP-1 ale acestora, situri pe care le detine ea însasi în promotorul sau asupra caruia se poate actiona cu forbol ester (1).

AP-1 a fost prima proteina identificata ca factor transcriptional care recunoaste în promotorul genelor, situsul TRE (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetat response element). Desi c-jun si c-fos codifica componente ale factorului de transcriere ce stimuleaza expresia variatelor gene tinta în raspunsul la TPA (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetat), propria lor transcriere este indusa, de asemenea, dupa activarea PKC. În celulele umane, inductia mRNA c-jun de catre TPA, desi tranzitorie, dureaza mai mult decât inductia c-fos, transcriptul c-jun având o stabilitate crescuta.

Când complexul AP-1 controleaza expresia genelor implicate în proliferarea celulelor, expresia c-jun si c-fos creste rapid în numeroase tipuri celulare, ca raspuns la actiunea mitogenilor EGF, TGF-alpha, PDGF etc. Nivelele mRNA c-jun au o crestere logaritmica. Fiind un activator nuclear AP-1 cu componentele ei actioneaza direct pe genele implicate în crestere si diviziune necesitând semnale care vin în cascada din momentul cuplarii unui factor de crestere la un receptor de pe plasmalema celulei (2).

Factorii care influenteaza activitatea genelor jun

Factorii care influenteaza activitatea genei c-jun pot fi atât pozitivi cât si negativi. Astfel, silymarin, un flavonid polifenolic derivat din *Silybum marimum*, cunoscut ca un antiinflamator, citoprotector si anticancerigen, implica supresia NF-kB (factor de transcriere

nucleara) și reglează diferite gene care intervin în inflamație.

Silymarin nu afectează activitatea AP-1, dar inhibă activitatea PK indusă de TNF și N-terminal c-jun kinaza, abrogând astfel citotoxicitatea TNF ca și activitatea caspazei (3).

Se sugerează ideea că adenilat ciclaza pare a fi implicată în hiporeglarea expresiei mRNA c-jun pe calea PKA. În plus, canalele de Ca^{2+} tip L, calmodulin și PKII-dependența de Ca^{2+} /calmodulin, pot fi parțial implicate în hiporeglarea mRNA c-jun indusă de forskalin (4).

Fibroblastele de soareci 3T3 derivate din fetoși lipsiți de c-jun, (principalul component al factorului de transcriere AP-1), în răspunsul celular la agentul alkilant metansulfonat (MMS), este cel mai potent și selectiv activator al JNK/SAPK (kinaze induse de stres) și al p38, rezultând o foarte eficientă inducție a hiperfosforilării și transcrierii genei.

Agentul alkilant induce apoptoza cu înaltă eficiență în celulele tip-salbatic, dar nu în cele c-jun^{-/-}. Rezistența la apoptoza este însoțită și de expresia alterată a ligandului CD95 (CD95L), un cunoscut inductor al apoptozei. Adăugul de rCD95L restaurează sensibilitatea la apoptoza în fibroblastele c-jun^{-/-}. Apoptoza indusă de MMS în fibroblastele de tip-salbatic sau în leucocite umane este, puternic redusă prin neutralizarea ligandului cu anticorpi anti-CD95L. c-jun poate acționa ca un reglator pro-apoptotic în celulele expuse lezării DNA via inducției CD95L. Odată semnalizată moartea celulei indusă de CD95, aceasta nu este afectată de absența c-jun, subliniindu-se faptul că numai inițierea și nu procesul apoptotic indus de stres depinde de c-jun (5).

Calpoinele (cistein-proteaze citoplasmice activate de Ca^{2+}) acționează asupra factorilor de transcriere c-fos și c-jun care răspund cu înaltă sensibilitate. Integritatea structurală a monomerilor c-fos și c-jun nu este crucială pentru a fi recunoscută de calpoine (6).

JNK (c-jun-N-terminal kinaza) are diferite funcții. Recent s-a arătat că în plachetele ERK2 această kinaza este activată de trombina și hiporeglată de angajarea integrinei beta(3)alpha (IIb). JNK-1 este prezentă în plachetele umane fiind activată de trombina, și fosforilată la concentrații scăzute de trombina. În condițiile inhibării cuplării fibrinogenului la integrina alpha(IIb)beta(3) s-a demonstrat că activitatea JNK-1 este reglată negativ. În premieră, s-a relevat că MAP-kinazele și JNK-1 sunt reglate negativ de disponibilitatea integrinei (7).

N-4 hydroxy phenil retinamida (4-HPR), un analog al acidului retinoic induce apoptoza prin activarea susținută a JNK (c-jun-N-terminal kinaza) în linia celulară de carcinom de prostată -LNCaP p53^{+/+} care este sensibilă la androgeni, dar nu în linia celulară PC-3 p53^{-/-} care este insensibilă la androgeni. Activarea JNK de către 4-HPR este dependentă de caspaza, deoarece un inhibitor al acesteia oprește activarea kinazei.

Iradieră cu UV-C și UV-gamma induce activarea JNK în ambele linii celulare, sugerând că imposibilitatea celulelor PC-3 de a răspunde la 4-HPR se datorează defectelor amonte de calea JNK. Curcuminul inhibă, de asemenea, activitatea JNK, concluzia fiind că pe calea JNK se produce semnalizarea apoptotică declansată de 4-HPR (8).

Recent s-a identificat o nouă PK activată de mitogeni (MAP-kinaza) care reglează semnalul apoptotic (ASK-1) ce activează caile JNK (c-jun N-terminal kinase) și p38 MAP kinaza cu roluri pivotale în apoptoza indusă de TNF și Fas. Hiperexpresia ASK-1-DeltaN, o nouă proteină MAP, activează JNK și induce apoptoza în celulele PC-12 diferențiate și în neuronii simpatici SCG (9).

c-jun contribuie la moartea neuronilor indusă de A beta (amiloidul beta). Totuși,

neuronii deficienți în c-jun sunt relativ rezistenți la toxicitatea cu acest amiloid. În neuronii tratați cu A beta, în paralel cu schimbările în expresia genei, se constată și o aparentă activare a promotorului c-jun, atât în cei deficienți în c-jun cât și în cei de tip salbatic. De asemenea, alte câteva gene cum sunt c-fos, fos-B, ngfi-B și I-kappaB au fost induse de A beta în neuronii de tip-salbatic (10).

jun-B. Expresia amplificată a acestei gene este mediată de alterările factorilor cuplați la elementul TATAA. Transcrierea ei amplificată se asociază specific cu expresia v-src și nu poate fi reprodusă prin expresia unui vector c-src, v-Ha-ras sau v-raf. Mutatia punctiformă a elementului TATAA din gena jun B abolește complet mutantele v-src sugerând că proteinele cuplate la gena sunt modificate. Inducția ei este însă dependentă de activitatea crescută a TK și de cuplarea ATP de către proteina V-src. Se sugerează că proteinele src pot modula unii efectori nucleari pe care implică produsele genelor celulare ras și raf. jun B, jun D și c-jun pot forma heterodimeri ce cuplează la siturile specifice AP-1, dar diferă în afinitățile de cuplare, relevând diferite activități biologice și transcripționale (11).

jun D. Sectionarea axonilor induce în pericarioul neuronilor, reacții morfologice, biochimice și funcționale. Printre genele induse în acești neuroni sunt și cele care codifică proteinele factorilor de transcriere; sunt așa numitele gene “de răspuns timpuriu” ce aparțin familiilor jun, fos și krox ce sunt asociate cu creșterea și dezvoltarea sistemului nervos. Genele jun, fos și krox sunt prezente în sistemul nervos adult, chiar în absența oricărui stimul intențional. În hipocamp și izocortex, proteinele “de răspuns timpuriu” aparute în urma unei epilepsii induse, expresia jun-D și fos-B se pastrează 24 ore (12).

c-jun și v-jun în transformare

Oncogena v-jun a fost descoperită ca parte a genomului ASV 17, un retrovirus cu replicare defectivă, izolat din fibrosarcomul spontan de pui; în acest caz produsul oncogenei este cuplat cu produsul genei gag în proteina Gag-Jun de 65 kD. În intenția de a se elucidă de ce la pui structura v-jun este neoplazică, aceasta s-a comparat cu c-jun, demonstrându-se astfel că, în jumătatea COOH-terminală a proteinei v-jun are loc substituția a 2 aminoacizi, iar în jumătatea NH₂-terminală are loc deleția a 27 aminoacizi. Pe lângă această deleție, secvențele c-jun de la soarece și om au o substituție adițională de aminoacizi, față de c-jun de la pui (2).

v-jun induce alterări marcate în fibroblastele transformate în ce privește reglarea ciclului celular în prezența sau absența contribuției factorilor de creștere. În timpul creșterii asincrone, fibroblastele transformate de v-jun se divid mai repede decât cele normale, timpul fazei G₁ a ciclului fiind substanțial redus. Fibroblastele normale dependente de mitogeni serici ies din ciclu și intra într-o sensibilă stare de “liniste” (Go). Din contra, fibroblastele transformate de v-jun își continuă ciclul și mențin un nivel ridicat al blastomului, ca și creșterea expresiei markerilor dependenți de ciclul celular, respectiv ciclina A, CDK2 (PK dependentă de ciclina).

Fibroblastele transformate sunt total dependente de factorii de creștere necesari multiplicării celulelor. În condițiile saracirii serului, progresia ciclului celular este însoțită de rate înalte ale apoptozei. În condițiile depleției mitogenului, v-jun manifestă capacitatea de a promova progresia ciclului celular și apoptoza, capacitate proprie oncoproteinelor myc, E1A și E2F (13).

Prin nivelele mRNA, expresia c-jun este masiv redusa în celulele transformate de v-jun, datorita scaderii ratei transcrierii. Scaderea reglarii transcriptionale este evidenta, deoarece promotorul c-jun este de 10 ori mai putin activ în celulele transformate decât în cele normale. Reducerea este atribuita unui motif TRE-like conservat în pozitia -72 (TRE jun proximal), motif esential pentru expresia de baza, eficienta în celulele normale, dar care confera activitate transcriptionala redusa sau chiar absenta în celulele transformate .

Elementul TRE jun proximal este recunoscut de mixtura c-jun/Fra si de complexul cAMP-responsiv element-binding protein/activating transcription factor-like din celula normala. Expresia ectopica a v-jun represeaza activitatea promotorului c-jun în celulele normale, prin TRE jun proximal, astfel ca, deficitul de transcriere mediat de TRE jun in vivo se coreleaza cu cuplarea v-jun la acest element.

Promotorul c-jun este refractar inducerii pe calea activarii prin stres a PK/c-jun NH2-terminal kinaza în celulele transformate de v-jun, sugerând ca aceasta din urma interfera cu expresia genei care regleaza semnalul. c-jun reprezinta astfel, un exemplu de gena celulara a carei transcriere in vivo este reglata negativ de v-jun (14).

Stimularea activitatii transcriptionale a genei c-jun via fosforilarii mediata de MAP-kinazele activate de mitogeni, stres sau de c-jun NH2-terminal (SAPK/JNK) depinde de un situs -regiune delta- din kinaza scurtata a domeniului activarii NH2-terminal, deletata în derivatul oncogenic v-jun. Aceasta mutatie amplifica marcat oncogenitatea v-jun, desi consecintele ei transcriptionale nu sunt rezolvate; aceasta reflecta incertitudinea faptului ca SAPK/JNK ar inhiba direct functia c-jun sau ar facilita si mentine specificitatea fosforilarii reglatoare pozitiva.

c-jun devine activa când se cupleaza la DNA via SAPK/JNK demonstrând ca acest proces nu exclude transactivarea. Se sugereaza ca SAPK/JNK activeaza primer ca un reglator pozitiv al transactivarii c-jun in situ si ca pierderea sitului scurtat fizic diminueaza activitatea c-jun (15).

v-jun ca si c-jun codifica o proteina ce cupleaza la DNA functionând ca factor de transcriere si este în acelasi timp componenta a complexului AP-1. Transformarea oncogenica prin v-jun este mediata de expresia aberanta a genelor tinta specifice. v-jun de lungime deplina a fost fuzionata cu forma sa NH2-terminal trunchiata la bindingul hormonal al receptorului estrogen uman. Cele doua proteine functioneaza ca transactivator ligand-inducibil. Expresia proteinei de fuziune în fibroblastele de pui determina transformarea dependenta de estrogen (16).

Genele tinta pentru proteinele Jun

Proteinele nucleare de transcriere actioneaza asupra promotorilor si enhancerilor diverselor gene carora le stimuleaza expresia. Proteina Jun actioneaza în complexul AP-1 dar si independent, fapt demonstrat recent. Astfel, JTAP-1 (o gena cathepsin-like) este înalt reglata ca raspuns la actiunea v-jun inducând transformarea celulara. Ea se hiperexpresia de 7-10 ori în celulele CEF (Chicken Embryo Fibroblasts) transformate de v-jun, comparativ cu hiperexpresia din celulele normale,

Omologia DNA si a aminoacizilor releva ca JTAP-1 este înalt similara cu peste 100 cistein-proteaze dintr-o varietate de specii si este asemanatoare cu omologul de la pui-cathepsina O-. Analiza expresiei în CEF a genelor v-Ha-ras, v-src, c-fos si myc în acelasi timp cu JTAP-1 releva ca hiperexpresia acesteia este unica în toate celulele transformate de

v-jun. Astfel ca, JTAP-1 este o tinta specifica a v-jun hiperexprimata si nu o simpla consecinta a transformarii celulare (17).

Studiindu-se rolul semnalizarii PK indusa de EGF si factorul de transcriere c-jun în celulele carcinomului epidermal uman A413, s-a constatat expresia genei 12-lipoxigenazei. EGF creste activitatea ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase) si JNK (NH₂-terminal Kinaza c-jun).

Hiperexpresia c-jun amplifica expresia mRNA 12-lipoxigenazei si activitatea enzimei. Siturile Sp1-binding din regiunea promotor a genei 12-lipoxigenazei sunt necesare pentru activarea prin (legare) c-jun. Inductia ultima a c-jun prin activarea ERK si JNK este esentiala pentru acest raspuns (18).

Apolipoproteina A-1 este tinta negativa a hipoexpresiei v-jun. Hiporeglarea expresiei genei apolipoproteinei A-1 se face prin efectul asupra promotorului activ. O diminuare similara a reglarii acestei gene o poate determina myc si v-src, dar nu c-fos, v-Ha-ras, c-src sau c-ski. V-jun poate avea un efect potential reglator metabolic si asupra colesterolului (19).

Gena fos

Proteinele Fos declanseaza transcrierea unor gene, motiv pentru care sunt considerate proteine nucleare ce ocupa ultima treapta în cascada transmiterii semnalelor de la membrana celulei la DNA. Asociata cu proteina Jun, proteina Fos formeaza complexul AP-1 descoperit initial ca proteina care initiaza si declanseaza transcrierea unor gene.

Gena fos se exprima în timpul cresterii si diferentierii celulare. Proteinele familiei Fos sunt: c-Fos, Fos-B, Fra-1 si Fra-2. Dupa dimerizarea cu proteinele Jun, le creste atât afinitatea de cuplare cât si activitatea de transcriere. Proprietatile diferite ale heterodimerilor, ca si diversele interactiuni combinate ale proteinei Fos extind considerabil spectrul potential si specificitatea functiilor reglatoare ale acesteia.

Soarecii lipsiti de gena c-jun functionala mor, în parte, la mijlocul gestatiei, ceea ce demonstreaza ca c-jun este esentiala pentru dezvoltarea normala. Cei care supravietuiesc au însa, defectiuni în osteogeneza, gametogeneza, neurogeneza si hematopoieza.

Protooncogena c-fos detine componente omoloage cu oncogena v-fos componente întrerupte de 4 regiuni introni, absente în genomul virusurilor purtatoare ale oncogenei. Atât la soareci cât si la om exista o regiune de 104 nucleotide care reprezinta secventele deletate în timpul biogenezei v-fos.

Proteina c-Fos este formata din 380 resturi de aminoacizi, remarcabil de similari cu ai proteinei v-Fos care este formata din 381 resturi de aminoacizi. Gena c-fos detine înca 104 nucleotide aditionale, care însa nu cresc dimensiunea transcriptelor. Primii 332 de aminoacizi ai proteinelor c-Fos si v-Fos de la soareci, difera numai în 5 reziduuri, în timp ce în ceilalti 48 aminoacizi, diferentele sunt mai mari si în consecinta, COOH-terminali ai celor doua proteine difera.

Genele de la soarece si om au peste 90% secvente omoloage, diferind numai în 24 reziduuri din totalul de 380. Virusul FBR (Finkel-Biskis-Reilly) MSV (Murine Sarcoma Virus) are genomul format din 3791 nucleotide care codifica un singur produs de fuziune gag-fos de 546 aminoacizi. Oncogena v-fos a osteosarcomului FBR induce tumori mezenchimale (osteosarcom, rabdomiosarcom, condrosarcom, liposarcom) si inhiba adipogeneza.

Virusul FBJ (Finkel-Biskis-Jenkins) (MSV-Murine Sarcoma Virus), care poarta

v-fos induce, de asemenea, osteosarcom. DNA proviral FBJ contine 4026 nucleotide ce includ 2 LTR de 617 nucleotide fiecare, 1639 nucleotide din secventele celulare c-fos si un segment din anvelopa virionului-gena env. Codoanele initial si terminal ale genei v-Fos detin secvente dobândite care codifica o proteina de 381 aminoacizi, cu greutatea moleculara de 49.601.

În celulele transformate de FBJ-MSV s-a identificat pe electroforeza în gel poli-acrilamida de SDS, o fosfoproteina transformanta de 55.000

Inductibilitatea genei fos

Ca raspuns la mitogeni sau agenti specifici, gena fos este indusa rapid, la câteva minute de la adausul inductorului aparând transcripte specifice c- fos. Frecvent, inductia este tranzitorie si precede în general, inductia altor proteine nucleare cum este si proteina genei myc. Dupa inductia cu TPA sau cu vitamina D3, gena c-fos se exprima în celulele U937 (linie promielocitica) sau în celulele HL-60 (linie monomielocitica), în 1-3 minute cu maximum la 30 minute. Nivelele transcriptiei genei declina în proportie de 20-25%, dar ramân neschimbate 10 zile. Proteina c-Fos necesara diferentierii mieloide se exprima numai 2 ore, nivelul maxim fiind atins la o ora.

Când fibroblastele "linistite" sunt tratate cu ser sau cu factorii de crestere PDGF, EGF, TPA (ester forbol), c-fos este indusa în 2-3 minute, cu nivele maxime (de peste 20 ori) la 20 minute si cu declin la o ora (20).

Prelucrarea celulelor NIH3T3 cu acesti factori de crestere, initiaza expresia genelor timpurii, printre care si c-fos, care la rândul ei activeaza expresia altor gene, cum este si gena transin. Stimularea cu TPA a acestei gene reduce expresia ei cu 50% si aceasta prin micșorarea selectiva a proteinei Fos.

Prin receptorii lor, PDGF si EGF interactioneaza cu segmentul reglator TGAGTCA localizat în regiunea promotoriala a genei transin. Acest segment este de fapt, un situs de legare a factorului de transcriere AP-1, în care componenta de baza este proteina Fos. Stimularea expresiei genei transin cu PDGF este blocata prin reducerea selectiva a proteinei Fos (21).

EGF determina cresterea marcata a mRNA c-fos si c-myc în cultura primara de celulele tiroidiene. Nivelul maxim este atins dupa 30 minute de la adausul de EGF, în timp ce nivelul mRNA c-myc creste dupa 30-60 minute cu un maxim atins la 90 minute (22),

Gena c-raf codifica o serin/treonin kinaza numita Raf-1 care raspunde de semnalele transmembranare si care în forma mutanta capata proprietati transformante. Proteina v-Raf, partenerul oncogenic al c-raf-1 poate transactiva transcrierea a doi promotori inductibili timpurii si anume: proteina c-Fos din celulele umane si murine si promotorul genei umane beta-actina (23).

Substantele care maresc concentratia intracelulara de cAMP conduc rapid si tranzitoriu expresia c-fos în celulele soarecilor. În promotorul acestei gene sunt elemente care participa la raspunsul cAMP în testul tranzitor. Situsul de legare, de baza al promotorului este localizat în 65pb din segmentul de initiere a transcrierii si corespunde cu situsul CRE la care se cupleaza diferiti factori celulari. cAMP induce astfel expresia c-fos în melanocite, gena stimulata la rândul ei de toxina holerica si de NGF (24,25).

Spre deosebire de IFN-gamma, IL-1 si TNF induc nivele marcate ale expresiei genei fos în celulele endoteliale umane în cultura. Nivelul maxim de mRNA apare la o ora dupa

stimularea cu IL-1 si la 4-7 ore efectul dispare (26).

În urma incubării cu angiotensina II-poli-peptid care declanșează constricția vaselor, în celulele musculare netede ale aortei de sobolan se produce o creștere rapidă a nivelului mRNA c-fos, care atinge maximum după 30 minute, ulterior scăzând. Un efect similar asupra nivelului mRNA c-fos are și serul fetal de vitel. Angiotensina II stimulează expresia genei c-fos prin intermediul unor mediatori intracelulari cum sunt PKC și Ca^{2+} (27).

Inducerea protooncogenelor fos și sis, ca și a genelor proteinelor matricei extracelulare de către butirat în procesul diferențierii gliomului F-98 la sobolan, nu influențează mRNA Ki-ras. Butiratul induce astfel reversibil mRNA fibronectinei și colagenului (28).

În linia celulară PC12 de feocromocitom s-a studiat biochimia mecanismului de inducție a expresiei genei c-fos, constatându-se că acesta depinde de stadiul activității de diferențiere și proliferare celulară. Agenții care depolarizează neuronii induc c-fos pe calea deschiderii canalelor de Ca^{2+} . Se concluează că, inducerea c-fos se realizează nu numai pe calea interacțiunii "receptor-ligand" ci și cu agenți depolarizatori sau prin interacțiuni care influențează canalele pentru Ca^{2+} (29).

Virusurile sau unele proteine ale acestora, au capacitatea de a transactiva expresia genelor celulare endogene legate de procesul de proliferare celulară. Proteina p40^{tax} a virusului HTLV-I determină expresia protooncogenei c-fos care codifică sinteza proteinei c-Fos, în contrast cu nivelul neschimbat al mRNA altor gene cum sunt c-myc, c-myb și c-jun. P40^{tax} joacă un rol important în transformarea limfocitelor T.

Produsul genei BZLF-1 din EBV numit ZEBRA este o proteină ce cupleştează la DNA și este parțial omoloagă cu c-fos, la rândul ei cuplând specific la siturile AP-1; această proteină poate induce ciclul litic al limfocitelor B infectate latent. ZEBRA poate induce astfel, c-fos prin siturile AP-1-like prezente în promotorul genei c-fos.

Inducerea transcrierii c-fos începe după o oră de la infectarea cu VSH-2 și atinge maximum după 3 ore, iar după 24 ore se oprește complet. Inducerea c-fos în celulele L929 determină apariția a două transcripte nucleotidice, iar în celulele W138 (celule umane diploide), numai un transcript. Pentru inducerea c-fos este obligatorie sinteza proteinelor virale (30, 31, 32).

Expresia protooncogenei c-fos apare și în procesul creșterii după 30-40 minute, și după 4 ore posthepatectomie. Gena c-myc se exprimă timp de o oră și apoi după 6-8 ore. Se subliniază expresia diferențiată a genelor studiate în fazele prereplicative ale hepatocitelor (33). Astfel, gena c-fos este indusă tranzitoriu în diferite linii celulare în cultură, de către numeroși stimuli celulari, totuși, unii autori susțin că gena c-fos este constitutiv transcrisă în diverse celule printre care și cele limfoide (34).

În procesul formării encefalului la sobolan, s-a demonstrat că în perioada de dezvoltare rapidă a embrionului și până la a 16-a zi postnatal mRNA c-fos are un nivel foarte scăzut. Se apreciază că gena c-fos nu participă la reglarea mitozei în perioada postnatală timpurie, pentru că ulterior să joace un rol important în dezvoltarea funcțională a țesutului nervos cerebral (35).

În ultimul timp s-a acordat o mare atenție genei c-fos și expresiei ei în celula nervoasă. Expunerea la un mediu condiționat anterior cu amfetamina (1mg/Kg i.p.) induce expresia c-fos în cortexul frontal, expresie considerată un marker pentru activitatea neuronilor.

Administrarea acuta si repetata a amfetaminei induce expresia aditionala a c-fos si în nucleul accumbens (36).

Injectarea subcutana a formalinei (50 micromoli, 10%) la sobolani masculi creste activitatea c-fos în gyrus dentatus (DG1 si câmpurile CA3), iar la femele, nivelele c-fos sunt mai scazute în câmpurile hipocamapale (37).

Injectarea formalinei diluate în peretele colonului reduce expresia fos în neuronii mienterici si în glia enterica, în neuronii maduvei spinarii si în cei din trunchiul cerebral, ceea ce s-ar datora stimulării chimice directe a colonului si/sau colitelor acute ulceroase (38).

Proteina c-Fos se modifica în maduva spinarii de la sobolanii carora li s-a grefat adenocarcinomul de prostata- MAT-Ly Lu- în membrele posterioare. Marcajul cel mai dens al fos apare în segmentul L3-L5, pe aceeasi parte a membrului grefat. Marcajul detectat la 5 zile creste pâna la 10 zile si apoi scade. Coarnele ventrale ale maduvei sunt cel mai dens marcate. Se demonstreaza ca semnalele sunt transmise de tumora spre sistemul nervos central inclusiv maduva spinarii care reflecta o stare de durere (39).

Fos în AP-1

Genele fos si jun codifica proteine nucleare care participa la reglarea transcrierii altor gene. c-Fos si c-Jun formeaza complexe proteinice care interactioneaza specific cu elementul reglator de legare via cunoscutului complex AP-1. Desi jun se poate cupla la DNA în absenta lui fos, prezenta acesteia mareste viteza de cuplare pe baza stabilizarii complexului DNA-proteina. Pentru formarea complexului fos-jun raspund 7 resturi de leucina. Cele doua proteine Fos si Jun formeaza heterodimeri care se leaga cu mai înalta eficienta la promotorul genelor ce detin situsul AP-1. Proteina Fos actioneaza în sensul reglării transcriptionale, prin domeniile de la capatul C-terminal (40, 41).

AP-1, complex constituit din p-c-Jun si p-c-Fos regleaza transcrierea promotorilor ce contin elemente de cuplare activatoare de tip AP-1-like. C-Jun are activitate de legare a DNA, iar c-Fos este omoloaga în domeniul de legare a DNA cu c-Jun. In vitro, c-Jun se leaga la DNA ca homodimer la situl AP-1, pe când c-fos nu poate dimeriza si nu detine afinitate pentru elementul AP-1. Proteinele translatate c-Jun si c-Fos se leaga la DNA AP-1, de 250 ori mai eficient ca heterodimeri, decât o fac cu homodimerii c-Jun. Astfel, c-jun cupleaza la DNA ca dimer, iar la c-fos, în calitate de partener natural. În hiperexpresia proteinei c-Jun în absenta c-Fos, se pot produce homodimeri aberanti ai complexelor transcriptoare, care pot altera mecanismele normale de control ale expresiei genelor (42).

Transformarea prin proteinele Fos

Transformarea prin proteina c-Fos poate fi realizata daca este alterat domeniul codificat pentru cuplare COOH-terminal. Când transcrierea genei c-fos este indusa cu diversi agenti într-o varietate de tipuri celulare, proteina c-Fos este sintetizata tranzitoriu. Pentru transformarea celulara este obligatorie o sustinuta sinteza a proteinei c-Fos.

Datorita deletiei a 104 pb în timpul biogenezei v-fos, proteina v-Fos are un COOH-terminal alterat, asa încât ea se va sintetiza constitutiv, inducând transformarea. Astfel, p55^{fos} elaborata de FBJ-MSV cât si p75^{gag-fos} elaborata de FBR-MSV induc transformarea

morfologica mai pronunțată în ultimul caz. Deși p75^{gag-fos} este o proteină de fuziune, componenta gag nu pare să influențeze abilitatea transformantă a proteinei (20). Virusul himeric FBR care și-a deletat gena gag păstrează un înalt potențial transformant caracteristic, astfel ca gena gag nu participă la elaborarea proteinei transformante (43).

Proteinele c-Fos sunt de 4-5 ori mai fosforilate decât proteinele v-Fos. Ambele conțin câteva fosfopeptide generale, dar proteina c-Fos conține și unele importante fosfopeptide unice, care însă lipsesc din proteina v-Fos. Aceste situri unice ale fosforilării c-Fos sunt localizate la capetele COOH (ultimii 20 aminoacizi). Fosforilarea proteinei c-Fos și nu a proteinei v-Fos este stimulată de 5 ori *in vivo* când celulele sunt tratate cu ester forbol. Nivelul fosforilării c-Fos este independent de PKC (20).

Lezarea DNA este o manifestare centrală a carcinogenezei. Agentul care lezează DNA activează un număr de căi de transducție a semnalelor ce duc la repararea DNA, apoptoză sau la amplificarea ciclului celular. O celulă cu DNA deficient reparat este mai expusă la mutații care promovează cancerul. FBR-v-fos, omologul retroviral al protooncogenei c-fos inhibă răspunsul celulei la radiații. Celulele care exprimă acest omolog retroviral au abilitate redusă în ce privește repararea DNA lezată de radiații, astfel încât ele supraviețuiesc puțin postiradiere. În plus, FBR-v-fos inhibă PK dependentă de DNA, o kinază specifică activată după expunerea celulelor la radiații. Aceste efecte sunt specifice pentru radiațiile ionizante, dar nu și pentru cele ultraviolete; efectele sunt dependente de modificarea unui lipid reclamat pentru tumorigeneza indusă de FBR-v-fos miristilată. O mutantă nemiristilată nu are efect. Oncogena retrovirală poate conduce la instabilitate genetică crescută, ceea ce amplifică potențialul oncogenic al celulei.

FBR-v-fos inhibă multiple diferite căi de diferențiere; *in vitro* inhibă creșterea și diferențierea terminală a adipocitelor și activitatea proteinei c/EBP alpha, un regulator cheie al acestei diferențieri, regulator care se poate implica în generarea liposarcomelor (44, 45).

FBJ-virusul sarcomului murin poartă v-fos și induce osteosarcomul. Expunerea soarecilor transgenici la nivele înalte de c-fos conduce la apariția postnatală a tumorilor osoase, respectiv cartilajinoase.

În primordiile prezumtive ale picioarelor embrionului de pui aflat în stadiul 10 și-a indus ectopic oncogena fos, prin microinjectarea retrovirusului competent de replicare. Consecința a fost trunchierea cartilajelor tuturor oaselor lungi, cu condrodisplazie datorată retardării severe a diferențierii condrocitelor proliferative în condrocite mature sau hipertrofiate, ca și o ușoară întârziere a condensării precartilajinoase.

Expresia genelor tuturor membrilor cunoscuți ai AP-1 de la pui ce includ și genele transformante c-jun și fra-2 nu induce totuși anomalii macroscopice în formarea membrilor sugerând că o fracție specifică a proteinei Fos intervine în diferențierea osului embrionar endocondral. Extinderea trunchierii este mai marcată în cazul v-fos decât al c-fos. Se relevă că activitatea transformantă a proteinei Fos este necesară pentru inducerea displaziei, sugerându-se faptul că mecanismele moleculare comune sunt implicate atât în condrodisplazia embrionară cât și în formarea tumorilor osoase (46).

Celulele osoase sunt o primă țintă pentru funcția biologică a complexului factorilor de transcripție fos/jun (AP-1). Expresia dereglată a c-fos sau v-fos în celulele osoase induce tumorigenitate și deci apariția osteosarcomului non-metastazic. Din contra, oncogena v-fos transformă fibroblastele într-un fenotip invaziv însoțit de expresia diverselor gene asociate invaziei și metastazării. Activitatea susținută a AP-1 se pare că nu este suficientă pentru

inductia în celulele osoase transformate a genelor asociate invaziei și metastazării dependente de complexul AP-1. S-au identificat promotorii genei colagenazei I și a stromelizin-1, ca mijloace utile pentru analiza altor factori care reglează progresia metastazării osteomului (47).

Fibroblastele transformate de oncogenele v-fos arată expresia crescută a unui număr de gene implicate în invazia celulelor tumorale și în metastază. În contrast cu fibroblastele normale de sobolan-208F-, celulele transformate de fos sunt independente de factorul de creștere pentru invazie. Invazia celulelor transformate de v-fos sau EGF reclamă activitatea AP-1 și este inhibată de oligonucleotide antisens c-Jun și de expresia unei mutații negative dominante c-jun -TAM-67-. Invazia indusă de EGF este inhibată de oligonucleotidele antisens c-Fos și c-Jun. Se avansează ipoteza că rolul AP-1 în transformare este de a activa programul invaziei multigenice (48).

Gena fra-2

Gena fra-2 este înrudită cu protooncogenele c-fos codificând un membru al familiei fos, element component al factorului de transcriere AP-1. Fra-2 este o genă distinctă de alte gene fos deoarece are un rol unic în diferențierea celulară din perioada fetală. Ea este activă în organogeneza târzie, fapt demonstrat imunohistochimic. Transcriptele fra-2 sunt prezente în câteva epitelii diferențiate, în cartilaje și în sistemul nervos în dezvoltare.

În a 16-a zi de dezvoltare embrionară, fra-2 este detectată în straturile bazale și granuloase ale epidermei, dar nu în cele cornificate. În a 17-a zi este detectată, de asemenea, în cartilaje dar și în oasele în dezvoltare. Nivele înalte se exprimă și în țesutul cromafin din medulosuprarenala, în cortexul embrionar dar și în creierul matur la nivelul putamenului, hipotalamusului și hipocampusului (49).

c-jun and c-fos protooncogenes

Ap-1 was originally identified as a TPA-inducible DNA-binding factor that stimulated transcription of the simian virus 40 (SV40) enhancer. Purification of the two major proteins present in AP-1 revealed to be encoded by two different proto-oncogenes: c-jun, the cellular homologue of v-jun oncogene of ASV 17 (avian sarcoma virus 17), and c-fos, the homologue of v-fos oncogene of FBJ (Finkel-Biskis-Jinkis) murine osteosarcoma virus. Both c-jun and c-fos can be activated as transforming genes by overexpression of normal genes. They can be rapidly induced in a large number of different cell types by a variety of factors, including growth factors and are immediate early response genes.

Like other nuclear oncogenes, there are multiple jun and fos-related genes, jun-B and jun-D from the jun family and the fra-2 gene related to c-fos, the latter being involved in cell differentiation during development. All these genes encode proteins that are capable of dimerization and have a specific sequence for DNA binding.

Structural analysis of c-jun encoded protein, which is 340 amino acids, revealed that
i s
C-terminal end contains a leucine zipper motif (for dimerization), a basic region (for DNA binding) and transactivation domain. The N-terminal end of the protein contains a regulatory domain which is absent in v-jun encoded protein. Phosphorylation of N-terminal region is associated with increased DNA binding and transcriptional activity. The jun proteins can form homodimers which are transcriptional activators or can associate with c-fos proteins to

form heterodimers which are less efficient as transcriptional activators. The c-jun proteins can act within the AP-1 complex and as well as independently in influencing the expression of other genes.

C-fos protein, which is 381 amino acids, is similar but not identical, to that of c-jun protein in that it contains the basic region and zipper motif that is differently located in the protein structure. Unlike c-jun proteins, c-fos encoded proteins are unable to form stable homodimers.

The Jun and Fos proteins form heterodimers with other transcription factors related proteins of CREB family (c-AMP responsive element binding factors). C-jun and c-fos expression is differently influenced by other protooncogenes encoded proteins such as Ras, Raf and Src.

Transformant activity of v-jun and c-jun has been demonstrated in a variety of cell types. Fibroblasts transformed by v-jun are able to divide more rapidly than their normal partners and are dependent on growth factors. C-jun mRNA expression is negatively regulated in cells transformed by v-jun.

Transformation by c-fos depends on a sustained synthesis of the protein and on the presence of an altered binding domain. C-fos proteins are 4-5 fold more phosphorylated than v-fos proteins. V-fos proteins are able to inhibit diverse differentiation pathways, are involved in carcinogenesis of liposarcoma and osteosarcoma. Fibroblasts transformed by v-fos show an increased expression of genes involved in invasion and metastasis of tumoral cells.

GENELE FAMILIEI ETS

(Eritroblastoza)

Genele ets codifica factori de transcriere care recunosc secventele GGAA prezente în variate elemente promotor/enhancer celulare si virale, activând transcrierea pe calea cuplării la aceste secvente. Genele ets sunt implicate în reglarea dezvoltării si se exprima într-o varietate de celule inclusiv hematopoietice.

La pui, gena ets-1 se exprima prin proteina p54^{c-ets-1} si prin proteina p68^{c-ets-1}, proteine care diferă în capatul N-terminal datorita procesării alternative. P-68^{c-ets-1} se exprima în celulele endoteliale ale vaselor de sânge în formare, iar p54^{c-ets-1} se exprima în celulele hematopoietice. Prin proteinele sale, gena ets-1 acționează asupra altor numeroase gene care contin situsul de cuplare ets (EBS-Ets-Binding Site).

Virusul leucemiei acute aviene- E26- determina la pui, mielo- si eritroblastoza . Genomul lui contine gena de fuziune tripartita -gag-myb-ets-, care codifica o fosfoproteina nucleara - p135^{gag-myb-ets}. S-a stabilit ca leucemogenicitatea mieloida se datoreaza prezentei genei myb, iar cea eritroida, prezentei genei v-ets.. De aici sugestia ca, proteinele ets sunt importante în hematopoieza, îndeosebi în eritropoieza, dar si în procesul metastazării (50).

Gena ets-1 umana este localizata lângă o regiune break-point pe cromosomul 11q23 si a fost detectata în unele leucemii acute limfoide si mieloida. Promotorul ei nu contine secventa TATA, dar contine, în schimb, în intima asociere, multiple situri de initiere a transcrierii. Promotorul genei detine câte un loc de cuplare pentru AP-1 si AP-2 si în plus 5 locuri prezumtive de cuplare pentru Sp1. De asemenea, promotorul ei contine si un loc de

cuplare pentru proteina Ets-1, ceea ce indica existenta unui mecanism autoreglator pentru expresia genei. Proteinele AP-1, AP-2 si c-Jun au astfel efect reglator asupra activitatii genei ets-1 (51).

În timpul morfogenezei penelor de pui, s-a demonstrat ca c-ets-1 este un factor transcriptional nuclear care se exprima în derm. Sunt elaborate cele doua proteine p54 si p68, iar dupa tratamentul cu hidrocortizon expresia p68 creste, iar a p54 scade. În timpul morfogenezei penelor, celulele dermale migreaza de-a lungul pachetelor de fibre de colagen, pentru a coloniza ariile unde se formeaza primordiul penei. Embrionii de pui tratati cu hidrocortizon în timpul fazei critice a rearanjarilor dermale, expun arii tegumentare aproape lipsite de penaj, arii în care dermul prezinta cantitati crescute de colagen interstitial.

Deoarece ets-1 regleaza gena metaloproteinazei matriciale, s-a analizat expresia colagenazei tip IV (de 72kD) în embrionii tratati cu hidrocortizon si în embrionii martori. Astfel, s-a demonstrat ca expresia mRNA al colagenazei, scade în dermul puilor tratati, dar se coreleaza cu expresia p54^{c-ets-1}. În acest mod, hidrocortizonul moduleaza expresia c-ets-1 care astfel poate fi implicat într-un model alterat al dezvoltarii penei, dezvoltare mediata de acumularea colagenului prin scaderea activitatii colagenazei (52).

Asa cum s-a mentionat, membrii familiei genei ets se exprima în tesutul hematopoietic, implicându-se astfel în evolutia normala a acestui tesut. In vitro, s-a demonstrat ca ets-1 contribuie la dezvoltarea fenotipului eritroid. Ca raspuns la tratamentul cu hemin si/sau cytosin arabinofuranosid (Ara-c), liniile pluripotente eritroleucemice HEL si K562 exprima mesaje pentru un numar de gene ets, dar numai nivelele de ets-1 sunt crescute. Astfel tratamentul mentionat induce diferentierea eritroida. Pe de alta parte, oligonucleotidele antisens Ets-1 inhiba hemoglobinizarea celulelor tratate. În contrast, infectia cu virusul care contine ets-2 nu determina modificari detectabile în procesul proliferarii sau în caracterul eritroid al celor doua linii celulare. Deci, ets-1 intervine important în diferentierea eritroida (53).

Familia factorilor de transcriere ETS controleaza un mare numar de gene din celulele hematopoietice. Astfel, s-a urmarit la soareci evolutia unor linii de limfocite aflate în stadiile timpurii ale specificitatii lor. Paralel, s-a urmarit populatia de celule distinct primare, reprezentând stadii de dezvoltare a limfocitelor T si B, a precursorilor limfoizi pluripotenti, a celulelor NK mature si a celor mieloide. Celulele au fost monitorizate pentru expresia mRNA a genelor erg, ets-1, ets-2, fli-1, elf, gabp.alpha, pu.1 si spi-B. Stadiile cele mai timpurii ale diferentierii limfocitelor arata o particularitate dinamica a reglarii genelor acestei familii, cu tranzitii acute în exprimarea corelata cu evenimentele stoparii în unele faze ale dezvoltarii. ets-1, spi-B si pu.1 sunt exprimate în aceste stadii, dar nu în limfocitele T târzii. Gena erg este indusa în timpul specificitatii liniei T si ulterior este silentioasa permanent. Gena spi-B este hiperreglata tranzitoriu, dupa care devine silentioasa în acelasi stadiu ca al genei erg. Gena pu.1 represeaza marcat linia limfocitelor T ajunsa la un anumit grad de dezvoltare, dar este factor de reglare pentru genele celulelor B si mieloide. Astfel, setul factorilor ETS mobilizat în timpul specificitatii liniei T este diferit de cel care mentine expresia genelor în timpul selectiei timocitelor, ca si în toate clasele de limfocite T mature (54).

Pentru elucidarea reglarii transcriptionale si a remodelarii endometrului uman în timpul diferitelor stadii ale ciclului menstrual, s-au analizat 3 membri ai familiei ETS: astfel elf-1 predomina în epiteliul glandular, în timp ce ets-1 si ets-2 au activitate redusa atât în acesta cât si în celulele stromale. În timpul fazei menstruale a ciclului, expresia este scazuta, dar în celulele deciduale ale fazei secretorii târzii sunt comune activarile ets-1, ets-2 si elf-1;

aceste aspecte se confirmă și în celulele în cultură ale stromei endometriale. Celulele endoteliale diferențiază și diverse izoforme și produse de fosforilare ale genelor *ets-1* și *ets-2* din cele două tipuri celulare. Deoarece *elf-1* predomină în celulele glandulare, se presupune că gena are un rol unic în reglarea specifică a epitelului endometrului (55).

La pacienții infectați cu HIV-1, s-a descoperit faptul că situsul 5'LTR HIV-1 se cuplează la NF-kappaB, ceea ce presupune că acest situs detine potențial de legare cu mai mulți factori de transcriere, printre care, posibil, și GABP-alpha și GABP-beta ambii fiind membri ai familiei factorilor de transcriere Ets (56).

Gena *ets-2*

Gena *ets-2* este membru al familiei *ets* având aminoacizii proteinei pe care o codifică, similari cu v-*ets* a virusului E26. Gena detine 10 exoni din care 9 participă la codificarea celor 49 aminoacizi ai proteinei Ets-2. Ea direcționează sinteza a 3 transcripte RNA care diferă prin lungimea capetelor 3'. Heterogenitatea dimensiunilor transcriptelor se datorează, probabil, utilizării a 3 diferite locuri de semnale de poliadenilare (57).

Gena umană *ets-2* este deci un omolog al genei v-*ets* care codifică o proteină nucleară de 56kD (p56). Promotorul genei *ets-2* detine un loc de cuplare Sp1 și unul GC-elementul proximal al sitului de inițiere. În plus, detine și un situs deosebit de lung (de 250 p.b) necesar transcrierii *ets-2*, care poate servi ca activator al transcrierii (58).

P56 kD umană este o fosfoproteină cu perioada de înjumătățire de 20 minute. Tetradecanoil forbol acetat (TFA) declanșează creșterea de 5-20 ori a nivelului proteinei Ets-2 în liniile celulare umane, nivel probabil reglat de PKC, direct sau indirect via mecanismelor de post-translație (59).

Anticorpii monoclonali specifici pentru *ets-2* uman, preparați din soareci imunizați recunosc două proteine umane modificate de *ets*: p56 și p54, dar nu reacționează cu proteinele de pui, sobolan, soareci, bovine sau maimuță. În schimb, recunosc numai epitopi specifici ai proteinei umane Ets 2, 3, epitopi distincti din cei 8 ai pEts-2 (60).

S-a detectat și caracterizat un nou element reglator cu activitate de promotor în intronul 1 c-*ets-2*, care induce expresia acestui transcript divergent în 5', prin multiple situri start dispersate în interiorul a 300 p.b. Printre acestea, 3 reprezintă puncte de inițiere transcripțională majoră. În diverse linii celulare, precum COLO 320, NBE sau HepG2 s-au detectat transcripte inițiate de acest nou promotor, care releva situri putative de legare pentru factorii Ets, Myb, GATA și Oct. La pui, acest promotor este conservat funcțional (61).

Gena *ets-2* poate fi o tinta nucleară a genei ras în liniile celulare tumorale ovariene și pe calea de semnalizare ras, se poate activa în cancerul ovarian, printr-un mecanism independent de alterarea genetică a ras (62).

Alte gene ale familiei *ets*

Din familia genelor *ets*, gene nucleare cu capacitate de inițiere a transcrierii, se cunosc următoarele: *erg*, *elk-1*, *elk-2*, *fli-1*, *etv*, *pu.1* și *spi-B*. Gena *erg* este înrudită cu proteina Ets și expresia ei poate fi urmărită în timpul dezvoltării embrionare timpurii. *Erg XI* codifică cel puțin două proteine rezultate în urma splicingului alternativ. Când este exprimată

ectopic prin microinjectii de mRNA sintetic, în procesul dezvoltării lui *Xenopus* apar multiple defectiuni. Se admite ca gena *erg* s-ar implica și în motilitatea celulelor, ca și în dezvoltarea sistemului circulator (63).

GATA-1 este un factor de transcriere specific liniei eritroide.; promotorul acestei gene, care poate fi activat de virusul E26 de la pui contine multiple situri de cuplare ets (EBS-Ets-Binding Site). Analiza EBS demonstreaza ca acest promotor este o tinta pentru cuplarea și activarea de către membrii familiei genelor ets. Gena *gata-1* își poate autoregla expresia, dar regleaza, în timpul eritropoiezei normale și leucemice, transcrierea unui număr de gene înrudite. În sistemul murin ea este reglata de expresia proteinei p135gag-myb-ets. EBS de la pui s-a detectat în promotorul genei stromelizin cu care are identitate în secvențele miez ets (50).

Gena *pu.1* codifica un factor de transcriere din familia ets, care controleaza expresia multor gene specifice celulelor B, macrofagelor și expresiei critice pentru dezvoltarea liniilor limfocitare și mielocitare. Ca așa stau lucrurile o dovedeste faptul ca, soareci deficienți în gena *pu.1* au defecte în evoluția acestor linii celulare.

Gena *pu.1* este identica cu gena *spi-1* izolată din siturile de integrare provirală (virus Friend) comune în eritroleucemia murina MEL (MurinEritroLeucemia) indusă de acest virus; se apreciază ca expresia dereglată a genei este o treaptă esențială a bolii. Pe de altă parte, se susține ca hiperexpresia genei *pu.1* + DMSO induce oprirea marcată a creșterii și apoptozei celulelor MEL, de unde ideea ca unele oncogene, în condiții specifice, induc inhibarea acestor procese, mai curând decât proliferarea și transformarea celulelor. S-a descris rolul PU.1 în diferențierea, proliferarea și apoptoza celulelor hematopoietice, ca și un probabil mecanism molecular al efectelor induse de aceasta în celulele MEL (64).

Sarcomul Ewing este cel mai diferențiat membru al familiei tumorilor primitive neuroectodermale periferice. Translocatia cromosomială care implică gena *ews* și alte 5 gene ale factorilor de transcriere ai familiei ets, creiază gene de fuziune ce codifică factori de transcriere aberanți, implicați într-o vastă majoritate de sarcoame Ewing. Astfel, factorii de transcriere himerici rezulta din fuziunea NH₂-terminal a genei *ews* cu COOH-terminal al uneia din cele 5 gene ets. Majoritatea tumorilor exprimă fuziunea *ews/fli-1*, dar unele exprimă variate himere precum *ews/etv-1*.

Injectarea în soareci SCID a celulelor NIH3T3 care exprimă fuziunile de gene menționate, conduce la apariția mai rapidă a tumorilor care, în plus sunt și mai voluminoase decât celulele de control. Potențialul tumorigenic al fiecărei fuziuni *ews/ets* este legat de structura C-terminal. C-terminal FLI-1 conferă un potențial tumorigenic mai înalt decât o face domeniul ETV-1 corespunzător. Tumorile rezultate în urma fuziunilor *ews/fli-1* și *ews-etv-1* releva aspecte macro- și microscopice asemănătoare, însă diferă de cele provenite din celulele NIH3T3 activate de gena *ras*. Astfel, în ciuda diferențelor structurale, respectivele fuziuni promovează oncogeneza via căilor biologice similare (65, 66).

La soareci, s-a caracterizat o nouă gena ets divergentă- gena *ehf*- (Ets Homologous Factor) care cartează la 11p12 și are deleții în numeroase carcinoame de prostată, mamară și pulmonare, dar și o “pata fierbinte” cu amplificare sau deleție ereditară. Proteina Ehf reprezintă activitatea indusă de ets-2 a promotorilor stromelisinei-1 și colagenazei-1. Se sugerează ca aceasta ar contribui la dezvoltarea organismului uman și carcinogenezei acestuia, candidând la statutul de gena supresoare de tumori (67).

Proteina E1af aparține familiei factorilor de transcriere ETS și este implicată în reglarea expresiei genei metastazării. Într-un sarcom nediferențiat de la un copil, s-a stabilit ca o parte din gena ar putea fuziona prin translocatie cu gena *ews*. Gena umană *e1af* este localizată în regiunea q21 a cromosomului 17, fiind organizată în 13 exoni distribuiți de-a

lungul a 19kb din DNA genomic. Regiunile netranslate 3' si 5' ale genei sunt de 0,7 si respectiv 0,3kb (68).

În evolutia limfocitelor, expresia genelor Ig este strict reglata în functie de timp si în maniera tesut-specifica. În controlul legarii V (kappa)-J (kappa) poate fi implicata o noua familie de proteine, alta decât PU-1. Astfel, s-a identificat factorul PRF, înrudit cu PU-1. Aceasta noua proteina interactioneaza cu secvente care cupleaza PU.1 si în variati promotori si enhanceri, inclusiv kappa E3.

Expresia genei prf predomina în precursorii liniei B, dar nu în limfocitele mature. Neavând functie de activare transcriptionala, proteina Prf poate actiona ca un antagonist al celorlalte proteine ale familiei ETS cum sunt Pu.1 si Spi-B (69).

Gena tie-2 codifica un receptor TK specific celulelor endoteliale, receptor reclamat pentru dezvoltarea normala si hiperreglat în timpul angiogenezei. Promotorul genei detine locuri de cuplare înalt conservate pentru factori de transcriere ETS. Astfel un nou asemenea factor

Ets- Nerf-2 se exprima în celulele endoteliale si poate transactiva puternic regiunea reglatoare a genei tie-2, comparativ cu ceilalti factori ETS care au efect stimulator redus sau chiar absent. În concluzie, factorul Ets-Nerf-2 poate regla expresia genei vascular-specifice tie-2, ca factor de transcriere critic (70).

Factorii care influenteaza genele ets.

Citokinele si factorii de crestere s-au dovedit a fi cei mai puternici stimulatori ai expresiei genelor familiei ETS. Astfel sunt considerati TNF-alpha si IL-1-alpha pentru gena c-ets-1 pe care o induce într-o ora sustinându-I timp de 19 ore productia de mRNA si de proteina c-Ets-1. Din contra, bTGF, EGF si PDGF sunt stimulatori tardivi initiind activitatea genei dupa 19 ore. Acesti factori de crestere, potenteaza însa inductia c-Ets-1 prin TNF-alpha, în timp ce TNF-beta este inefectiv.

Folosind inhibitori ai transcrierii si translatiei s-a demonstrat cresterea mRNA c-Ets-1 via TNF-alpha, rezultata din noua transcriere mai curând decât din stabilizarea produselor sintetizate. Deci, c-ets-1 este o tinta nucleara pentru numerosi factori de crestere, functionând ca o gena de raspuns timpuriu pentru TNF-alpha (71).

Tetradecanoil forbol acetat (TFA) declanseaza cresterea de 5-20 ori a nivelului proteinei Ets-2 în linii celulare umane. Un efect similar are si oleil acetil glicerina, care este un activator al PKC. Ciclohexamida amplifica efectul TFA (59).

Activarea mitogenica a genei ras induce pe calea PK, fosforilarea lui Ets-2 la pozitia treoninei 72. Astfel, în liniile de celule tumorale ovariene, gena ets-2 este o tinta nucleara a actiunii ras (62).

Tintele genei ets.

Proteinele Ets cu functia principala de transactivare, actioneaza asupra unor gene carora le declanseaza activitatea. Deoarece activeaza si gene cu rol în diviziunea celulara sunt considerate, în primul rând, ca proteine cu functii mitogenice.

Se sugereaza ca gena ets ar avea un rol esential în activarea genei TNF. Cotransfectia plasmidei c-ets sau expresia jun cu constructele reporter promotor TNF-CAT, releva

participarea ambilor factori în reglarea transcrierii genei TNF. Mutatiile specifice în siturile ets sau jun conduc la pierderea completa a responsabilitatii factorilor de transcriere asupra genei TNF (72).

Factorul de transcriere Ets regleaza o activitate enhanceriala în al 3-lea intron al genei TNF-alpha. În acest intron s-a stabilit prezenta unui construct reporter ce contine regiunea flancata 5' din gena TNF-alpha de la soareci, si care se manifesta slab când este transfectat în celulele macrofage-like RAW-2647. Adausul la acest construct a intronului 3 al TNF-alpha duce la amplificarea proteinei CAT, proces anulat însa, prin îndepartarea unei secvente conservate de 20 p.b. din intron, sau daca este cotransfectat cu gena reporter un factor de cuplare Ets dominant negativ. Mutatiile în acest situs distrug locurile potentiale ale factorului de transcriere Ets, reducând astfel activitatea transcriptionala. În celulele RAW-2647, Ets ar avea rol de factor de transcriere pentru productia de TNF-alpha (73).

IL-5 exprimat primar în limfocitele Th2 joaca un rol important în aparitia bolilor alergice cum este si astmul alergic. Reglarea expresiei genei IL-5 de catre factorii de transcriere Ets-1 si Ets-2, dar nu de Ecf-1 se produce prin activarea promotorului IL-5 uman în celulele T Jurkat, reclamând fie PMA (Phorbol 12 Miristat Acetat) plus ionomicina, fie PMA plus proteina virala Tax-1. Proteinele Ets-1 si Ets-2 își exercita efectele pe promotorul IL-5 via motifului GGAA din elementul cle 0. Se demonstreaza în premiera ca Ets-1 si Ets-2 pot coopera cu GATA-3, ionomicina si Tax-1 pentru cresterea efectului si în prezenta PMA. Sinergismul GATA-3, fie cu Ets-1 fie cu Ets-2 poate juca un rol important în reglarea expresiei IL-5 în celulele Th2 dependente de calciu sau de Tax-1, sau în limfocitele T leucemice (74).

În timpul repararii tesutului hepatic, celulele stromale stelate (HSC), pericite-like, trec din starea inactiva, în celule asemanatoare miofibroblastelor sintetizatoare ale matricei extracelulare. În izolatele de HSC proaspete sau activate, s-a detectat factorul de transcriere Ets-1, ca si mari cantitati de mRNA ale acestuia. Transcriptele specifice Ets-1 sunt prezente si în celulele parenchimale, dar si în cele stelate demonstrând faptul ca expresia hepatica a Ets-1 nu este specifica sau stricta pentru HSC. Implicatiile factorului Ets-1 în modelarea diferitelor celule ale tesutului hepatic sugereaza ca acesta ar putea fi de importanta cruciala pentru activarea celulelor stelate în procesul repararii tesutului hepatic (75).

Gena ets-1 regleaza transcrierea multor altor gene care codifica proteinele matricei extracelulare, respectiv osteopontin si tenascin, precum si enzimele implicate în degradarea si remodelarea acesteia, cum sunt stromelisin si UPA (Urokinase plasminogen Activator) (76).

Tenasacin-c (Tn-c) este o glicoproteina a matricei extracelulare care se exprima pregnant în timpul dezvoltarii, dar la nivele scazute în tesuturile adulte normale. Nu se exprima însa, în timpul vindecarii ranilor, bolilor fibrotice sau cancerului. S-a experimentat reglarea promotorului uman Tn-c, în fibroblaste pentru stabilirea mecanismelor ce controleaza expresia genei Tn-c, constatându-se prezenta unui scurt segment în promotorul sau, cuprins între perechile de baze -133 si -27, care detin 3 locuri de cuplaere EBS conservate în evolutie, locuri la care, in vitro, cupleaza proteina Fli-1 ce mediaza transcrierea genei Tn-c. De asemenea, doua EBS proximale contribuie semnificativ la activitatea bazala a promotorului acestei gene. GABP prezent în extractele nucleare de fibroblaste, interactioneaza cu cele doua EBS proximale. Câteva locuri de cuplare Sp1 si Sp3 din regiunea promotoriala sunt în intima proximitate cu EBS. Studiile pe Drosophila demonstreaza ca fie Fli-1 fie GABP-alpha+beta, interactioneaza functional cu Sp1 rezultând stimularea sinergica a activitatii promotorului tenasacin-c, glicoproteina matricei extracelulare. Deci, pentru prima data se afirma ca gena tn-c este reglata de proteine Ets, care cu concursul sitului Sp1 activeaza expresia Tn-c (77).

În timpul morfogenezei glandei mamare s-a observat expresia factorului transcriptional c-Ets, ca și una din tinte ale acestuia - gena upa- în celulele mezenchimale aflate în stadiul timpuriu al invaziei epiteliale, iar mai târziu, în însăși celulele epiteliale. Studiile in vitro au arătat că mRNA ambelor gene (c-ets și upa) poate fi indusă în culturi de celule epiteliale mamare normale, ca răspuns la condițiile de mediu pentru fibroblaste.

Liniile celulare tumorogene invazive din epiteliul glandular mamar exprimă constitutiv c-Ets-1 și Upa, în timp ce liniile neinvazive, nu. În coculturile tridimensionale în gel de colagen, expresia preferențială a genei c-ets este detectată în celulele epiteliale migrate prin gel, dar și în celulele canceroase diseminate. Expresia celor două gene se corelează cu invazivitatea celulelor (78).

Factorul de transcriere c-Ets-1 este implicat și în transactivarea genelor proteazelor de degradare a matricei extracelulare, de unde s-a sugerat că ar interveni important în invazia tumorală. Analiza expresiei genelor ets-1, collagenazei-1 și upa în numeroase tipuri de carcinoame relevă că în celulele canceroase (mai frecvent în cele neuroendocrine) sunt prezente transcriptele c-ets-1, comparativ cu alte carcinoame. Iar în stadiile III și IV și în metastaze mai frecvent decât în stadiile I și II.

Gena collagenazei-1 se exprimă în 16/34 tumori neneuroendocrine și în 1/20 tumori neuroendocrine, fie în celulele stromale (12/17) fie în cele canceroase (6/17). mRNA Upa s-a exprimat în celulele canceroase și/sau stromale în 45/54 carcinoame pulmonare. Astfel, cei 3 factori de transcriere sunt implicați în invazia cancerului pulmonar sugerându-se că proteina c-Ets-1 poate transactiva gena collagenazei-1 în timpul invaziei tumorale (79).

Inhibitorul tisular al metaloproteinazei-1 (TIMP-1) degradează matricea extracelulară, elementul responsabil de controlul expresiei genei timp-1 fiind un situs selectiv de legare pentru proteinele c-Fos și c-Jun. Adiacent acestuia este și un loc de cuplare pentru proteinele Ets. Deși c-Ets-1 singur nu activează transcrierea de la TIMP-1, ea crește totuși sinergic transcrierea cu AP-1. Se sugerează că AP-1 leagă c-Ets-1 la promotorul TIMP-1, prin interacțiunea prolină-proteina în vederea exercitării reglării transcriptionale dependente de Ets. În concluzie, expresia TIMP-1 este controlată de mai multe elemente transcriptionale Ets-1 și AP-1 (80).

Reglarea genei leucocitelor -integrin CD11c- care codifică o proteină de 150,95 kD, este mediată de AP-1 și Ets-1 fiind predominantă în monocite, dar detectată și în unele neoplasme ale celulelor T și B, ca și în unele limfoame de origine incertă, cu celule mari. În promotorul său, această genă are 5 situri ce pot interacționa cu proteinele nucleare, prezentând secvențe pentru AP-1, AP-2 și pentru proteina Jun. Prezintă, de asemenea, secvențe pentru factorii Ets-C și Ets-A. Deletia lui Ets are drept consecință, reducerea marcată a expresiei genei CD11c indusă de ester forboli, în timp ce deletia lui Ets-A conduce la o modestă scădere a expresiei acestei gene. S-a demonstrat că Ets cooperează cu siturile AP-1 în procesul reglării expresiei lui CD11c (81).

Ets în cancer

Proteina c-Ets-1 este asociată cu invazivitatea unor linii celulare de carcinom, unele proteinaze stromale (MMP-2, MT-1, MMP) fiind activate în aceste linii celulare.

S-a comparat contribuția potențialului c-Ets-1 cu fenotipul EMT, derivat dintr-un carcinom mamar, în scopul stabilirii expresiei vimentinei, constatându-se că în două linii neinvazive vimentina este absentă, iar în alte 4, proteina c-Ets-1 s-a exprimat din abundență.

Nu s-a stabilit cert o relatie cantitativa sau calitativa între expresia c-Ets-1 și cele 3 proteaze care sunt reglate de aceasta. În schimb, proteina se exprimă în liniile invazive c-Ets-1 pozitive. De aici sugestia ca, c-Ets-1 poate contribui la formarea fenotipului invaziv EMT al carcinomului mamar (82).

În evoluția leziunilor precanceroase bronșice se constată schimbări ale proteazelor matricei, corelat cu factorul de transcriere c-Ets-1. S-a analizat imunohistochimic, colagenaza-1, stromelisin 1 și 3, matrilisin, uPA-1 și expresia genei c-ets-1. Proteazele matricei și c-Ets-1 care le reglează sunt frecvent exprimate în carcinoamele invazive. Colagenaza-1 și matrilisina se exprimă în leziunile bronhiolare intraepiteliale și frecvent în carcinoamele bronșice. Stromelisin-1 se exprimă inconsistent în 31% din aceste leziuni și în 50% din carcinoame. Stromelisin-3 și uPA-1 sunt, de asemenea, slab exprimate, dar mai mult în leziunile preinvazive și în carcinoame. (83).

Expresia c-Ets-1 în astrocitele umane se asociază cu sinteza fms-like tirozin-kinaza-1 (FLI-1)/vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-1 și, implicit cu neoangiogeneza. Gliomalele maligne se caracterizează prin neovascularizare marcată și prin proliferarea endoteliului vascular. Factorul de creștere a endoteliului vascular (VEGF) este o proteină angiogenică secretată de celulele gliale, având un rol crucial în inducția neoangiogenezei. Protooncogenul c-ets-1 codifică un factor de transcriere care, in vivo se asociază cu formarea vaselor de sânge atât în condiții fiziologice cât și patologice, inclusiv în neovascularizarea tumorilor. Ets-1 este un activator transcriptional al FLT-1, ceea ce a incitat investigarea expresiei Ets-1 în 32 tumori astrogliale umane aparținând grupului WHO I-IV în scopul corelării cu expresia modelului VEGF-FLT-1. Prin hibridare in situ, în microvasele gliomului s-au detectat nivele înalte de mRNA Ets-1, cu semnale particulare marcate pentru proliferarea endoteliului vascular glomeruloid al glioblastomului (WHO I-IV).

S-au identificat transcripte Ets-1 de lungimi depline, dar nu s-a identificat nici una din cele 3 variante splice cunoscute, care codifică izoforme cu domenii functionale diferite. Proteina Ets-1 este preferențial prezentă în nucleul celulelor endoteliale cu morfologie de stare activă, în timp ce în celulele inactive, proteina este citosolică, ceea ce presupune translocarea ei în timpul neoangiogenezei. Sinteza VEGF din celulele gliomului este însoțită de expresia Ets-1 în celulele endoteliale adiacente microvaselor. De asemenea, în celulele endoteliale ale microvasculaturii gliomului, se observă o semnificativă corelație între expresia Ets-1 și Flt-1. Se sugerează ca, VEGF secretat de celulele gliomului induce Ets-1 în aceste celule, care ulterior transactivează VEGF receptor Flt-1. Această cascada poate promova crucial neoangiogeneza în gliomalele umane (84).

Proliferarea și diferențierea epitelului normal al prostatei, ca și creșterea inițială a celulelor canceroase, sunt dependente de androgeni, în ultima instanță, cancerul de prostată devenind independent de acești hormoni și refractar la terapia cu ei. Gena antigen-specifică prostatei (PSA) este un indice de antigenicitate atât pentru cancerul dependent cât și pentru cel independent de androgeni. PDEF (Prostate-Derived Ets Factor), aparține familiei ETS și acționează asupra genei psa, ca activator transcriptional independent de androgeni via promotorul său. PDEF se cuplează preferențial la GGAT mai curând decât la GGAA și interacționează direct cu un domeniu de cuplare a receptorului androgenilor, amplificând activarea promotorului PSA mediata de acestia. Se sugerează ca, asemenea funcțiilor critice ale altor factori ETS în diferențierea celulară și în tumorigeneza, și PDEF este un important reglator al dezvoltării prostatei și/sau cancerului acesteia (85).

MYB-ETS

Virusul leucemiei aviene acute- E26- codifica o oncoproteina de fuziune constituita din versiunile trunchiate ale factorilor de transcriere cMyb si c-Ets-1. Proteina Myb-Ets codificata de acest virus este o paradigma pentru functia oncoproteinelor fuzionate care sunt activatori transcriptionali. Aceasta proteina de fuziune MEP (Myb-Ets-Protein) transforma progenitorii hematopoietici. Secvena Ets a MEP se dovedeste necesara pentru mentinerea multipotentei MEP. Transformata cu o mutanta E26 sensibila la temperatura, MEP (cu o leziune Ets-ts1.1) modifica forma celulelor eritroide, eozinofile si mieloide la temperatura nepermisiva. MEP transformat-ts1.1 difera de MEP transformat de E26 tip-salbatic (86,87).

Retrovirusul E26ABC care detine v-myb si v-ets induce proliferarea celulelor neuroretinei de pui (CNR) în mediu minim, puternic stimulate de factorul de crestere fibroblastic bazal (bFGF) care confera abilitatea de a forma colonii în agar moale. v-ets difera de partenerul sau celular -c-ets-1- prin doua mutatii punct si prin replasarea ultimilor 13 aminoacizi C-terminal. Aceasta diferita secventa C-terminal influenteaza activitatea de legare la DNA. Replasarea în virusul E26ABC a secventei care codifica ultimii 16 aminoacizi C-terminal a v-ets via secventei care codifica 13 c-ets-1 derivat din C-terminal (virus E26ABC) induce productia proteinei p135^{gag-myb-ets} ce modifica proprietatile biologice ale celulelor CNR. Celulele CNR infectate cu E26ABC proliferaza în mediul minim mai eficient decât E26ABC si raspund la bFGF putând creste în mediul moale (88).

Reglarea expresiei c-myb în celulele leucemice mieloblastice umane ML-1 de catre proteina c-Ets-1 conduce la proliferarea sustinuta caracteristica celulelor transformate. În absenta serului, celulele ML-1 li s-a administrat IGF-1 si transferina (TF) în scopul stimulării cresteri, iar în scopul stimulării diferentierii lor li s-a administrat TGF-beta sau TNF-alpha+TF. Dupa administrarea factorilor de crestere, expresia c-Myb creste timp de o ora, în timp ce ulterior adausului factorilor de diferentiere expresia acesteia înceteaza complet în 3 ore. S-a stabilit o corelatie între nivelul acestei proteine din celulele în care ea s-a legat la intronul 1 al genei c-myb si expresia mRNA c-Myb. S-a observat o crestere intracelulara, îndeosebi intranucleara, a nivelului proteinei c-Ets, în timp ce dupa expunerea la factori de diferentiere se constata o scadere pronuntata a nivelului ei. De aici concluzia ca, nivelul la care se exprima factorul de transcriere, poate afecta expresia altor oncogene, tinte implicate în reglarea proliferării celulare. Expresia stimulata a unui factor de transcriere poate conduce ulterior la proliferarea ciclica caracteristica celulei cancerose (89).

Gena myb (myeloblastom).

Familia genei myb are 3 membri: c-myb, A-myb si B-myb, care codifica proteine nucleare ce se cupleaza la DNA, în maniera secventa-specifica si functioneaza ca reglatori ai transcrierii. Protooncogenă c-myb codifica un factor de transcriere care joaca un rol important în seria celulara hematopoietica, dar si într-o serie de alte tipuri celulare. Astfel, proteina Myb este reclamata în hematopoieza fetala murina, dar si în reglarea cresterii si diferentierii celulelor hematopoietice de la mai multe specii de animale. c-myb este critica pentru organogeneza colonului murin. Colonul mamalian însa, se dezvolta dintr-un tub de celule nediferentiate, care ulterior se constituie într-un organ complex înalt organizat, cu o continua

reînnoire a epiteliului sau. Este cunoscută expresia c-myb în epiteliul colonului murin și în criptele colonului uman, dar și expresia crescută în celulele adenocarcinomului colorectal.

Gene c-myb fragmentate s-au utilizat în timpul dezvoltării epiteliului colonic la embrionii de soareci, constatându-se că animalele mor intrauterin. Probe de colon prelevate de la acești embrioni înainte de a muri, aflați în stadiul E15, s-au transplantat sub capsulele renale la soareci recipienți, în ideea observării citodiferențierii. Comparativ cu colonul parental de la mame heterozigote, colonul de la femelele homozigote cu c-myb are epiteliul discontinuu și cripte anormale. În plus, expresia Bcl-2 care este o țintă a proteinei c-Myb este redusă și astfel apoptoza este crescută indicând reclamarea critică a c-myb în dezvoltarea normală a colonului (90).

O formă a c-myb procesată alternativ codifică la pui o secvență adițională de 120 resturi de aminoacizi, iar la soareci, de 121, aminoacizi codificați de exonul adițional 9A absent din oncogenă v-myb, proteinele ce conțin acești aminoacizi nefiind oncogenice.

Cu construcții myb cu sau fără exonul 9A, s-a apreciat importanța aminoacizilor constatându-se că aminoacizii codificați de acest exon induc proteina c-Myb la o puternică transactivare, deși nu s-a stabilit o corelație directă între nivelele activării transcripționale și capacitatea leucemogenă (91).

Majoritatea promotorilor care conțin elementul E2F sunt activați tranzitoriu în timpul trecerii din fază G1 în fază S a ciclului celular. În promotorul său, protooncogenă c-myb deține elementul E2F care este indus în fază G1 după intrarea în ciclul celular și care rămâne activ și în următoarele secvențe ale ciclului. Elementul E2F din c-myb poate fi identificat prin cuplarea Sp1. E2F myb și/sau Sp1 sunt reclamate pentru activarea deplină a promotorului c-myb în diferite tipuri celulare, dar și pentru menținerea crescută a expresiei în celulele NIH 3T3 a promotorului c-myb în fază G1. Deci, elementul E2F poate fi identificat diferit prin cuplarea unor seturi mici de proteine (92).

A-myb

Factorul de transcriere A-myb este un marker *in vivo*, al centroblastelor. Structural este înrudit cu c-myb și-i implicat în controlul proliferării și/sau diferențierii limfocitelor B mature, exprimându-se preferențial în cele CD38⁺, CD39⁻ sIgM.

Expresia A-myb este reglată în celulele B normale și în cele din limfomul Burkitt fiind detectabilă numai în fazele S și G2/M ale ciclului celular și nu în fazele G0, G1. Proliferarea susținută a limfocitelor B umane este indusă de o serie de liganzi cum sunt: IL-6, IL-13, IFN-gamma, TNF-gamma. Diferențierea celulelor B din centrul germinal evoluează fie către celule cu memorie, fie către plasmocite, fiind însoțită de reglarea redusă a expresiei A-myb; de aici considerăm că A-myb este un marker al centroblastelor generate *in vivo* (93).

B-myb

Factorul de transcriere B-myb este o fosfoproteina care reglează ciclul celular fiind un potent reglator al progresiei acestuia. Se apreciază că B-myb murin are potențial de transactivator al c-myb. Astfel, mutante prin deleții ale B-myb și c-myb arată că domeniul C-terminal al c-myb acționează ca reglator negativ al transactivării transcripționale, iar același domeniu al B-myb, acționează ca un amplificator pozitiv al transactivării. Hiperexpresia celor

doua gene în celulele 32Dc13, în prezenta G-CSF, induce diferentierea terminala în granulocite, ceea ce demonstreaza ca c-myb blocheaza constant acest proces ducând la o continua proliferare a celulelor. Hiperepresia ectopica a B-myb blocheaza însa abilitatea proliferativa a celulelor 32Dc13, în prezenta G-CSF si accelereaza diferentierea lor în granulocite indusa de acesta. Concluzia este ca, c-myb si B-myb nu au activitate biologica identica, iar domeniul reglator terminal al c-myb joaca un rol critic în functia sa biologica (94).

S-a sugerat ca fosforilarea B-myb în faza S a ciclului celular, s-ar datora kinazei dependente de ciclina; astfel, s-au identificat 10 locuri de fosforilare a peptidului B-myb, fiecare din acestea continând o fosfoserina sau fosfotreonina urmata de prolina, de unde concluzia ca fosforilarea se datoreaza unei kinaze directionata de prolina.

Abilitatea lui B-myb de a activa o plasmida reporter, a fost amplificata prin cotransfectia ciclinei A, în timp ce mutageneza celor 10 locuri de fosforilare, blocheaza efectul coexpresiei ciclinei A. Efectul fosforilarii exprimat prin potentialul de transactivator al B-myb este amplificat de locurile de fosforilare în jumatarea terminala a capatului COOH. Locul de fosforilare (ser-581) apare ca reglator negativ pentru cuplarea la DNA, iar mutatia lui amplifica abilitatea B-myb de a cupla la DNA. Se sugereaza ca B-myb este o tinta pentru fosforilarea prin ciclin-cdk-2, proces care regleaza activitatea sa transcriptionala (95).

Embrionii soarecilor deficienti în B-myb, aflatii în stadiile E4 si E5 mor de timpuriu. Blastocistul în cultura arata ca B-myb este reclamat pentru formarea masei celulare interne. B-myb este singurul membru al familiei myb, care se exprima în celulele stem embrionare (96).

Genele tinta pentru myb

Genele tinta asupra carora actioneaza myb nu s-au cunoscut multa vreme dupa descoperirea proteinelor Myb, dar în ultimii ani s-au identificat câteva. Astfel, recent s-a identificat la pui gena tom-1 ca tinta directa pentru v-myb. Aceasta gena are 2 promotori din care numai tom-1A este activat de v-myb în cooperare însa cu ets-2, unul din membrii familiei factorilor de transcriere ETS. Abilitatea lui v-myb de a coopera cu proteina Ets difera de cea a partenerului sau celular neoncogen c-myb, care însa coopereaza cu ets-1 si cu ets-2, în timp ce

v-myb coopereaza, asa cum s-a mentionat, numai cu ets-2. Trunchierea N-terminal a c-myb prin care se activeaza potentialul sau oncogenic abroga specific abilitatea proteinei de a coopera cu ets-1. Aceasta releva faptul ca N-terminus c-myb este oncogenic si nu mai coopereaza cu ets-1. Deci, myb este factor transcriptional cu capacitatea de a induce promotorul genei tom-1 (97).

Proteinele Myb si Ets sunt candidate ca reglatori ai expresiei genei c-kit în celulele hematopietice umane. Kit este o TK receptor cu rol important în cresterea celulelor hematopietice. Analiza unui fragment de 1kb care flancheaza 5'uman din promotorul genei, c-kit releva ca o regiune de 139 nucleotide amonte de locul de initiere a transcrierii este critica pentru activarea promotorului. Exista câteva potentiale locuri de cuplare pentru myb si ets de tip-salbatic, dar nu exista proteine mutante myb-deficiente. Cuplarea la acest fragment se face cu myb combinat cu ets-2. Regiunea care flancheaza 5'a c-kit are activitate promotoriala în celulele nehematopietice numai în conditiile în care acestea sunt transfectate cu vectori ce exprima c-myb si ets-2. Coexpresia acestora în asemenea celule

amplifica transactivarea promotorului c-kit, în comparație cu ceea ce se observă în celulele transfectate cu fiecare proteină în parte. Se admite că proteinele Myb și Ets joacă un rol important în funcționalitatea promotorului c-kit, gena ce codifică un receptor care intervine critic în celulele hematopoietice (98).

Clonarea genei C/EBP de la pui arată că promotorul acesteia conține un număr de situri de cuplare C/EBP fiind activată de C/EBP beta, de unde sugestia că această genă se autoreglează prin însăși produsul ei proteic. Promotorul C/EBP nu este activat de C/EBP alpha, un alt membru al familiei C/EBP, înalt exprimat în celulele mielomonocitice; de aici concluzia că autoreglarea este specifică exclusiv pentru C/EBP beta. Promotorul C/EBP beta conține, de asemenea, câteva motive de cuplare a proteinei Myb sugerând că gena c/ebp beta este și myb-inducibilă. S-a demonstrat că promotorul C/EBP beta este activat sinergic de v-myb și c/ebp beta și, de asemenea, că transcrierea acestei gene endogene este amplificată de v-myb.; aceasta este deci o nouă genă țintă v-myb. Reglarea expresiei ei de către v-myb stimulează sinteza C/EBP beta prin activarea promotorului (99).

CD34 este o glicoproteină de suprafață exprimată specific în stadiile de stem și progenitori ale celulelor maduvei osoase. Se explorează un posibil rol al c-myb în reglarea expresiei CD34 în procesul hematopoiezei, ca și ideea că această protooncogenă poate induce expresia CD34 prin activarea promotorului murin al acesteia. Experimentele au demonstrat însă, că c-myb nu este reclamată pentru expresia CD34 în celulele endoteliale sau hematopoietice primitive din sacul vitelin, dar, în schimb, este necesară pentru hematopoieza definitivă (100).

Ciclina A1 diferă de celelalte ciclone prin faptul că se exprimă în progenitorii hematopoietici și în leucemia mieloidă acută. Compararea ciclonei A1 cu ciclina A privind activitatea promotorilor în liniile celulelor aderente și din leucemia mieloidă, relevă că promotorul ciclonei A1 este preferențial activat în liniile mioide, într-un mic fragment (de 335 p.b) care conține locuri potențiale de cuplare a proteinei c-Myb.

Coexpresia unui vector care exprimă c-myb cu un promotor ciclina A1 crește semnificativ activitatea reporter în CV-1 aderent, ca și în celulele mioide U937. C-myb s-ar putea cupla la promotorul ciclonei A1, la locul de lângă cel al startului transcrierii. Mutageneza direcționată pe acest loc scade cu 50% transactivarea promotorului în celulele KCL22 care exprimă nivele înalte de c-myb și în celulele CV-1 transfectate cu c-myb. De asemenea, fibroblastele primare embrionare umane transfectate cu un vector care exprimă c-myb induc gena endogenă a ciclonei A1. În concluzie, c-myb induce mecanisme specifice hematopoiezei în reglarea ciclului celular (101).

Factorul de transcriere nuclear c-myb deși înalt exprimat în celulele hematopoietice este funcțional și în celulele NIH3T3 în ciuda faptului că nivelele sale nu sunt detectabile. Transfectarea în fibroblaste a unor construcții c-myb sau dominant negative (GRE myb și respectiv GRE MEn) de lungimi deplinate, a condus la identificarea trombospodinei-2 (TSP-2) ca produs genic represat în celulele GRE Myb și indus în celulele GRE MEn. Acest studiu stabilește că mRNA are un half-life (timp de înjumătățire) TSP-2 mult mai scurt în celulele GRE myb comparativ cu celulele NIH3T de tip-salvatic, sugerându-se faptul că c-myb afectează expresia TSP-2 via unui mecanism post-transcripțional (102).

v-myb

Factorii de transcriere sunt oncogenici, fie în condițiile în care sunt alterați funcțional prin fuziunea cu alte proteine fie prin expresia lor dereglată.

Factorul de transcriere myb este emblematic sub aspectul faptului că poate transforma celulele de origini diferite. Astfel, câteva forme de Myb pot transforma diferite linii hematopoietice de pui. De asemenea, este reclamată pentru hematopoieza fetală murină și pentru reglarea creșterii și diferențierii liniilor hematopoietice la diferite alte specii animale (103, 104).

Efectele biologice ale proteinei c-myb și ale corespondentului său viral-v-Myb sunt strict diferite, deoarece c-myb este indispensabil hematopoiezei normale în timp ce v-myb induce leucemia acută. Domeniul v-myb DNA-binding (DBD) diferă de cel al proteinei c-myb prin deleția primelor 3 "repeats" (secvențe de DNA repetitive) ceea ce se corelează cu transformarea oncogenică eficientă. V-myb DBD (R2R3) arată o specificitate DNA-binding intrinsecă pentru o secvență bogată în AT (105).

Expresia aberantă a protooncogenei c-myb reprezintă un factor cheie în dezvoltarea fenotipului neoplazic într-o varietate de contexte. Pe baza aceasta se admite că ablația funcției sale ar putea fi eficientă terapeutic folosind anticorpi anti-c-myb. Deci, protooncogenei c-myb codifică un factor de transcriere care joacă un rol important în hematopoieză; modificarea activității ei conduce însă, la transformare. În linia celulară TK-6 obținută de la un pacient cu leucemie mieloidă cronică mieloidă în criza blastică, s-a detectat mRNA c-myb trunchiat de 2 kb, ca și proteina sa c-Myb de 55 kD. Clona c-DNA c-myb mutantă (WTK-1) din c-DNA TK-6 comparată cu tipul salvatic uman, relevă că secvențele WTK-1 diverg la capetele 3' ale exonului 9. Proteina codificată de WTK-1 (myb-TK-6) are 402 aminoacizi și este lisată de down-reglatorul negativ al proteinei c-myb normale.

În celulele NIH3T3, metoda cu luciferază relevă că expresia vectorului care codifică myb (TK-6) stimulează promotorul mim-1 reglat de myb mai eficient decât o face proteina c-Myb umană tip-salvatic, sugerând că myb (TK-6) este un factor de transcriere funcțional, proteina având astfel potențial transformant. Același aranjament al genei c-myb în TK-6 se constată și târziu în probele pacientului sugerând faptul că această mutație este obținută în timpul evoluției bolii (106).

Tax, proteina transformantă HTLV-I este reclamată pentru puternica activare a transcrierii virusului, activare mediată prin interacțiunea cu domeniul Kix al proteinei de cuplare CREB care este un coactivator celular (CBP). S-a testat abilitatea lui Tax de a dereglă activitatea factorului de transcriere celulară c-myb, deoarece ambele elemente interacționează *in vitro* cu domeniul Kix al CBP și deci cuplează la acesta. Mecanismul interferenței lor transcripționale poate promova în celulele infectate cu HTLV-I, expresia genei celulare dereglată, ceea ce duce la apariția leucemiei (107).

Ciclinele de tip D, D1 și D2 inhibă specific transcrierea când sunt activate prin domeniul v-myb DNA-binding, dar nu prin domeniul c-myb DNA-binding. Nivelele crescute ale acestor două cicline duc la stabilizarea proteinei Myb, dar nu la alterarea cuplării lor la DNA. Efectul diferit al ciclinelor D asupra v-myb și c-myb ar explica mecanismul activării oncogenice a proteinei v-Myb, care apare ca un activator transcripțional mai puternic, urmând diferențierea monoblastelor transformate indusă de TPA când cele două cicline sunt down-reglate (108).

Proteina c-Myb este controlată de interacțiuni moleculare și de mutații punct, care îi amplifică activitatea oncogenică, astfel că, schimbările ei conformationale îi reglează

activitatea.

Ciclofilina cyp-40 si peptidilprolil izomeraza ar putea inhiba activitatea de cuplare c-Myb DNA, ceea ce reclama domeniul C-terminal al proteinei, în timp ce domeniul sau N-terminal catalitic este blocat de ciclosporina A, inhibitorul sau competitiv. Cyp-40 nu cupleaza si deci nu inhiba derivatul oncogenic v-myb care are domeniul de cuplare mutat. Se sugereaza ca mutatiile în proteina v-Myb îi permit evitarea mecanismului reglator negativ mediat de enzime precum Cyp-40 si izoenzimele peptidilprolil, implicate în reglarea transcrierii, transformarii si diferentierii celulare (109).

Anii '80 au adus primele informatii privind oncogena v-myb, numai ulterior fiind descoperita protooncogena c-myb. Mieloblastomul la pui este declansata de oncogena v-myb din virusul AMV al leucemiei aviene E26. Pe lângă oncogena v-myb acesta detine si oncogena v-ets ce induce eritroblastoza. Oncogena v-myb din virusul AMV codifica o proteina de 45kD, iar virusul E26 codifica proteina p135gag-myb-ets. Protooncogena c-myb codifica o proteina de 75kD -p75-. Toate aceste proteine sunt proteine nucleare; astfel, p45 s-a detectat în nucleii celulelor infectate, dar nu este obligatoriu legata de procesul transformarii. Ea este totusi prezenta si în citoplasma, conditie în care se poate corela cu reversia fenotipului transformat (110).

Produsul oncogenei v-myb din AMV codifica proteina p48^{v-myb} care este, de fapt, forma redusa a p75^{c-myb} din celulele normale. Deci, aceste doua proteine pot functiona ca transactivatori ai expresiei genelor (111, 112).

Ets gene

Ets genes are transcription factors that binds GGAA sequences in the promotor/enhancer regions of the target genes. They are expressed preferentially in the hematopoietic tissue and involved in normal development of these cells. Human ets-1 gene is localized on 11q23 chromosom and it has been demonstrated that regulates erythroid differentiation in vitro after hemin and AraC stimulation of HEL and K562 erythroleukemic cells lines. Human ets-2 gene is a homologue of the viral gene v-ets. The chicken ets-1 gene encodes two proteins, p54 and p68 that differ at their N-terminal end because of the alternative splicing of ets mRNA.

Other members of ets family of genes, related to ets-1 and ets-2, are erg, elk-1, fli-1, etv, pu.1 and spi-B. Ets genes have been implicated in some human chromosomal translocations as well as other retrovirus-induced tumors. Ets genes expression is induced by various citokines and growth factors, among these, TNF-alpha, IL-1-alpha, EGF, TGF-beta, PDGF. Genes that encode citokines and growth factors such as TNF and IL-5, are also targets for the translational transactivating activity of ets.

Several studies shown that ets gene expression, especially ets-1, is associated with the invasion of numerous tumoral cell lines of epithelial and glandular origins and corellates with neoangiogenesis and with expression, regulation and synthesis of VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Ets factors functions, namely PDEF (Prostate-Derived Ets Factor) in cell differentiation and tumorogenesis is also sustained by its implication in normal prostate development and in prostate adenocarcinoma.

Myb gene

C-myb is a member of a multigene family encoding nuclear phosphoproteins with sequence-specific DNA-binding activity. There are described three members of this gene family: c-myb, A-myb and B-myb.

The expression of c-myb appears to be restricted to hematopoietic cells, especially cells of myeloid-macrophage lineage, and to brain. C-myb expression has been shown to be involved in myeloid leukemogenesis, in the murine colon organogenesis, c-myb expression being highly elevated in colorectal adenocarcinoma. A-myb is an *in vivo* marker for the centroblasts, with possible implication in proliferation and/or differentiation of B lymphocytes. B-myb has been demonstrated to be a potent regulator of the cell cycle progression. The members of myb genes, c-myb, A-myb and B-myb, are differently expressed in various cell types and they do not have the same biological activity. Cellular myb is essential for myeloid development and, when transduced into certain retroviral forms, can be a potent leukemogenic agent by itself.

The c-myb encoded a protein of 636 aminoacids in length, is highly conserved, with a structural homologue being present in yeast. The N-terminal region of the c-myb product contains a site that is phosphorylated by casein kinase II (CK II), followed the DNA-binding domain. The CK II site is deleted in v-myb protein and it becomes activated in the c-myb products following insertional mutagenesis, suggesting that phosphorylation of this site may regulate the DNA-binding activity of the normal protein. The C-terminal end contains two transactivation domains, a transactivation domain and a negative regulatory region. These regions are possible responsible for the c-myb involvement in both cell proliferation and preventing differentiation of hematopoietic cells.

The myb gene was first characterized as the transforming gene of avian myeloblastosis virus (AVL) and encodes a v-myb p48 kDa protein. The c-myb gene has also been activated by ALV and MLV proviral-mediated insertional mutagenesis. In contrast to many oncogenes, v-myb is not transforming for fibroblasts but is a potent inducer of myeloid transformation.

MYB-ETS

The AVL virus E26 contains an oncogene that resulted from the fusion of truncated viral genes v-myb and v-ets joined the the viral gag sequence. The viral oncoprotein, a transcription factor-type oncogene of E26 avian leukemia virus, is a chimeric product of 135 kDa that contains a portion of the viral gag gene, a myb DNA-binding domain, a myb transactivation domain and an ets DNA-binding domain. The oncogenic function of such chimeras might result either from the additive function of two components or from a unique codependency on the molecular structure of the two joined domains.

Mutants of the Myb-Ets- protein (MEP=Myb-Ets-Protein) have different transformant activity on erythrocytes and myeloid cells from the wild-type E26 MEP and it has been shown that ets sequence is required for the potency of MEP. An E26ABC strain of the ALV virus induces cell proliferation of the chicken neuroretina in a minimal medium.

It has been demonstrated that in human myeloblastic cell lines there is a relationship between c-myb and c-ets-1 regulation of expression that leads to sustained cell proliferation during malignant transformation.

Gena jun

1. Hilberg F. Wagner EF. Embryonic stem (E5) cells lacking functional c-jun :consequences for growth and differentiation, AP-1 activity and tumorigenicity. *Oncogene* 1992, 7, 2371-2380.
2. Angel P. Karin M. The role of Jun, Fos and AP-1 complex in cell proliferation and transformation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1972, 129-157.
3. Manna SK. Mukhopadhyay A. Van NT, Aggarwal BB. Silymarin suppresses TNF-induced activation of NK-kappaB, c-jun N-terminal kinase, and apoptosis. *J.Immunol.* 1999,163(12), 6800-9.
4. Lee JK. Choi MR .Song DK .Huh SO. Kim YH. .Suh HW. Activation of adenylate cyclase results in down-regulation of c-jun mRNA expression in rat C6 glioma cells. *Neurosci. .Lett.*, 1999, 276 (1), 53-6.
5. Kolbus A. Herrl.Schreiber M. Debatin KM. Wagner EF. Angel P. c-Jun-Dependent CD95-L.Expression Is a Rate-Limiting Step in the Induction of Apoptosis by Alkylating Agents. *Mol. Cell Biol.* 2000, 20 (2), 575-582.
6. Pariat M. Salvat C. Bebien M. Brockly F. Altieri E. Carillo S. Jariel-Encontre I. Piechaczyk M. The sensitivity of c-Jun and c-Fos proteins to calpains depends on conformational determinants of the monomers and not on formation of dimers. *Biochem. J.* 2000, 345(Pt.1), 129-138.
7. Bugaud F. Nadal-Wollbold F. Levy-Toledano S. Rosa JP. Bryckaert M. Regulation of c-Jun-NH2 Terminal Kinase and Extracellular-Signal Regulated Kinase in Human Plateles. *Blood* 1999, 94 (1), 3800-3805.
8. Chen YR. Zhou G. Tan TH. C-Jun N-terminal mediates apoptotic signaling induced by N-(4-hydroxyphenyl) retinamide. *Mol. Pharmacol.* 1999, 56(6), 1271-9.
9. Kanamoto T. Mota M. Takeda K. Rubin LL. Miyazono K. Ichijo H. Bazenet C. Role of apoptosis signal-regulating kinase in regulation of the c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptosis in symphythetic neurons. *Mol .Cell Biol.* 2000, 20(1), 196-204.
10. Kihiko ME. Tucker HM. Rydel RE. EstusS. c-Jun contributes to amyloid beta-induced neuronal apoptosis but is not necessary for amyloid beta-induced c-jun induction. *J.Neurochem.* 1999, 73(6), 2609-12.
11. Apel J. Jun-B regulation by v-src. *Mol. and Cell Biol.* 1992, 12, 8, 3356-3364.
12. Herdegen T. Zimmermann M. Expression of c-jun and jun-B transcription factors represent specific changes in neuronal gene expression following axotomy. *Progress in Brain Research* 1994, 103, 153-171.
13. Clark W. Gillespie DA. Transformation by v-Jun prevents cell cycle exit and promotes apoptosis in the absence of serum growth factors. *Growth and Differentiation* 1997, 8(4), 371-380
14. Hussain S. Kilbey A. Gillespie DA. V-Jun represses c-jun proto-oncogene expression in vivo through a 12-O-tetradecanoylphorbol-13 acetate-responsive element in the proximal gene promotor. *Growth and Differentiation* 1998, 9(8), 677-86.
15. May GH. Funk M. Black EJ. Clark W. Hussain S. Woodgett JR. Gillespie DA. An oncogenic mutation uncouples the v-Jun oncoprotein from positive regulation by the SAPK/JNK pathway in vitro. *Current Biology* 1998, 8(2), 117-20.
16. Kruse U. Iacovoni JS. Goller ME. VogtPK. Hormone-regulatable neoplastic transformation induced by a Jun-estrogen receptor chimera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 1997, 94(23), 12396-400.
17. Hadman M. Gabos L. Loo M. Sehgal A. Bos TJ. Isolation and cloning of JTAP-1: a cathepsin-like gene upregulated in response to V-Jun induced cell transformation. *Oncogene* 1996, 12(1), 135-42.
18. Chen BK. Kung HC. Tsai TY. Chang WC. Essential role of mitogen-activated protein kinase pathway and c-Jun induction in epidermal growth factor-induced expression of human 12-lipoxygenase. *Mol. Pharmacol.* 2000, 57(1), 153-61.
19. Hadman M. Lin W. Bush L. Bos TJ. Apolipoprotein A-1 is a negative target of v-jun overexpression. *Oncogene* 1998, 16(5), 655-60.

Gena fos

20. Barber JR. Verma IM. Modification of Fos proteins, phosphorylation of c-fos but not v-fos is stimulated by 12-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate and serum. *Mol. and Cell Biol.* 1987, 7, 6, 2201-2211.
21. Kerr L.D. Holt J.T. Matisian L.M. Growth factors regulate transin gene expression by c-fos-dependent and c-fos-independent pathway. *Science* 1998, 242, Nr.4884, 1424-1427.
22. Heldin N.E. Westermark B. Epidermal growth factor, but not thyrotropin, stimulates the expansion of c-fos and c-myc messenger ribonucleic acid in porcine thyroid follicle cells in primary culture. *Endocrinology* 1988, 122, 3, 1042-1046.
23. Jamal S. Ziff E. Transactivation of c-fos and beta-actin genes as a step in early response to transmembrane signals. *Nature* 1990, 29, 344 (6265), 463-466.
24. Berkowitz Laura A. Riobowol K. T. Gilman M. Z. Multiple sequence elements of a single functional class are required for cyclic AMP responsiveness of the mouse c-fos promoter. *Mol. and Cell Biol.* 1989, 9, 10, 4272-4281.
25. Hart I.R. Rao J. Wilson Rosemary E. cAMP-induced c-fos expression in cells of melanocyte origin. *Biochem. And Biophys. Res. Commun.* 1989, 159, 2, 408-413.
26. Colotta F. Lampugnani MG. Polentarutti N. Degana E. Mantovani A. Interleukin-1 induces c-fos protooncogene expression in cultured human endothelial cells. *Biochem and Biophys. Res. Commun.* 1998, 152, 3, 1104-1114.
27. Kawahara Y. Sumako M Tsuda T. Fukizari H Fukumato Y. Takai Y. Angiotensin II induces expression of the c-fos gene through protein kinase C activation and calcium ion mobilization in cultured vascular smooth muscle. *Biochem and Biophys. Res. Commun.* 1988, 150, 1, 52-59.
28. Tang SJ. Ko LW. Wu LY. Wang FF. Induction of fos and sis proto-oncogenes and genes of the extracellular matrix proteins during butyrate-induced glioma differentiation. *Biochem. and Biophys. Acta Gene Struct. and Express.* 1990, 1048, 1, 59-65.
29. Morgan J.I. Curran T. Role of ion flux in the control of c-fos expression. *Nature* 1986, 322, 6079, 552-555.
30. Nagata K. Ohtani K. Nakamura M. Sugamura K. Activation of endogenous c-fos proto-oncogene expression by human T-cell leukemia virus type 1-encoded p40^{tax} protein in the human T-cell line, Jurkat. *J. Virol.* 1989, 63, 3, 3220-3226.
31. Flemington E. Speck SH. EBV BZLF1 transactivator induces the promoter of a cellular cognate gene, c-fos. *J. Virol.* 1990, 64 (9), 4549-4552.
32. Goswami BB. Transcriptional induction of c-fos proto-oncogene by HSV-2. *Biochem and Biophys. Res. Commun.* 1987, 143, 3, 1055-1062.
33. Biesiada E. Wisniewski J. Krawczyk Z. Khorazy M. Expression of c-fos, c-myc and hsp70 genes at early stages of the regenerating of rat liver. *Bull. Pol Acad. Sci. Biol. Sci.* 1987 35, nr.7-9, 165-171.
34. Kikuchi K. Makishima F. Tissue-specific expression of mRNA in mouse lymphocytes detected by v-fos not by human c-fos DNA probes. *Cell Struct. Funct.* 1990, 15 (6), 323-328.
35. Gubits Ruth M. Hazelton Jeanette L. Simantov R. Variations in c-fos gene expression during rat brain development. *Mol. Brain Res.* 1988, 3, 3, 2, 197-201.
36. Mead AN. Vasilaki A. Spyeaki C. Duka T. Stephens DN. AMPA-receptor involvement in c-fos expression in the medial prefrontal cortex and amygdala dissociates neural substrates of conditioned activity and conditioned reward. *Eur. J. Neurosci.* 1999, 11 (11), 4089-98.
37. Ceccarelli I. Scaramuzzino A. Aloisi AM. Effects of formalin pain on hippocampal c-Fos expression in male and female rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1999, 64 (4), 797-802.
38. Miampamba M. Sharkey KA. c-Fos expression in the myenteric plexus, spinal cord and brainstem following injection of formalin in the rat colonic wall. *J. Auton. Nerv. Syst.* 1999, 77 (2-3), 140-151.
39. Kergozien S. Delcros JG. Jouan H. Moulinoux JP. Induction of Fos protein expression in spinal cord neurons of tumour-bearing rats. *Br. J. Cancer* 1999, 80 (10), 1512-7.
40. Abate C. Gentz R. Curran T. Characterization of DNA and protein-binding domains of the products of the fos and jun proto-oncogenes. *J. Cell Biochem.* 1989, 97.
41. Sassone CP. Ronsane LJ. Visvader J. Fratner I. Dwarki VJ. Cooperativity of Fos and Jun oncoproteins in transcriptional regulation. *J. Cell Biol.* 1989, 260.
42. Halazonetis TD. Georgopoulos K. Greenberg ME. Leder Ph. C-jun dimerizes with itself and with c-Fos

- forming complexes of different DNA- binding affinities. *Cell* 1988, 55, 5, 917-924.
43. Miller A. D. Veruca I. A. Curran T. Deletion of the gag region from FBR murine osteosarcoma virus does not affect its enhanced transforming activity. *J.Virol.* 1985, 55, 3, 523-526.
 44. Abbott DW. Holt JT. Finkel-Biskis-Reilly mouse osteosarcoma virus v-fos inhibits the cellular response to ionizing radiation in a myristilation-dependent manner. *J. of Biological Chemistry* 1997, 272 (22), 14005-8.
 45. Abbott DW. Holt JT. Finkel-Biskis-Reilly osteosarcoma virus v-Fos inhibits adipogenesis and both the activity and expression of CCAAT enhancer binding protein alpha, a key regulator of adipocyte differentiation. *J.of Biological Chemistry* 1997, 272 (51), 32454-62.
 46. Watanabe H. Saitoh K. Kameda T. Murakami M. Niikapaura Y. Okazaki S. Morishita Y. Moris S. Yokouchi Y. Kuroiwa A. Iba H. Chondrocytes as a specific target of ectopic Fos expression in early development. *Proceeding of the National Academy of Sciences of The United States of America* 1997, 94(8), 3994-9.
 47. Rupp B. Lorenz U. Schmidt J. Veren Skiold AR. Discordant effects of activator protein-transcription factor on gene refutation, invasion and metastasis in spontaneous radiation-induced and fos-induces osteosarcomas. *Molecular carcinogenesis* 1998, 23(2), 67-75.
 48. Lamb RF. Hennigan RF. Turnbull K. Katsanakis KD. MacKenzie ED. Birnie GD. Ozanne BW. AP-1-mediated invasion requires increased expression of the hyaluronan receptor CD44. *Molecular and Cellular Biology* 1997, 17(2), 963-76.
 49. Carrasco D. Bravo R. Tissue expression of the fos-related transcription factor fra-2 during mouse development. *Oncogene* 1995, 10, 1069-1079.b

Gena ets

50. Seth A. Robinson L. Thompson DM. Watson DK. Papas TS. Transactivation of GATA-1 promoter with ETS-1, ETS-2 and ERGB/Hu-FLI-1 proteins; stabilization of the ETS-1 protein binding on GATA-1 promoter sequences by monoclonal antibody. *Oncogene* 1993, 8, 1783-1790.
51. Oka T. Rairkar A. Chen JH. Structural and functional analysis of the regulatory sequences of the ets-1 gene. *Oncogene* 1991, 6, 2077-2083.
52. Turque N. Buttice G. Benscart A. Stehelin D. Crepieux P. Desbiens X. Hydrocortisone modulates the expression of c-ets-1 and 72kDa type IV collagenase in chicken dermis during early feather morphogenesis. *International Journal of Developmental Biology* 1997, 41 (1), 103-9.
53. Clausen PA. Athanasian M. Chen Z. Dunn KJ. Zhang Q. Lautenberger JA. Mavrothalassitis G. Blair DG. ETS-1 induces increased expression of erythroid markers in the pluripotent erythroleukemic cell lines K562 and HEL. *Leukemia* 1997, 11 (8), 1224-33.
54. Anderson MK. Hernandez-Hoyos G. Diamond RA. Rothenberg EV. Precise developmental regulation of Ets family transcription factors during specification and commitment to the T cell lineage. *Development* 1999, 126 (14), 3131-48.
55. Kilpatrick LM. Kola I. Salamonsen LA. Transcription factors Ets1, Ets2, and Elf1 exhibit differential localization in human endometrium across the menstrual cycle and alternate isoforms in cultured endometrial cells. *Biol. Reprod.* 1999, 61 (1), 120-6.
56. Estable MK. Bell B. Hirst M. Sadowski I. Naturally occurring human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeats have a frequently observed duplication that binds RBF-2 and depresses transcription. *Journal of Virology* 1998, 72 (8), 6465-74.
57. Watson DK. Mavrothalassitis GJ. Jorcyk CL. Smyth FE. Papas TS. Molecular organization and differential polyadenylation sites of the human ETS2 gene. *Oncogene* 1990, 15 (10), 1521-1527.
58. Mavrothalassitis GJ. Watson DK. Papas TS. The human ETS2 gene promoter; molecular dissection and nuclear hypersensitivity. *Oncogene* 1990, 5 (9), 1337-1342.
59. Fujiwara S. Fischer RJ. Bhat NK. Diaz de la Espina SM. Papas T S. A short lived nuclear phosphoprotein encoded by the human ets-2 protooncogene is stabilized by activation on protein kinase C. *Mol. and Cell Biol.*, 1988, 8, 11, 4700-4706.
60. Fujiwara S. Koizumi S. Fischer RJ. Papas TS. Monoclonal antibodies specific to human Ets-2 oncoprotein: recognition of epitopes clustered on the B domain. *Hybridoma* 1990, 9 (6), 559-571.
61. Begue A. Cresieux P. Vu Dac N. Hautefenille A. Spuyt N. Landet V. Stehelin D. Identification of a second promoter in human c-ets-2 proto-oncogene. *Gene Expression* 1997, 6 (6), 333-47.
62. Patton SE. Martin ML. Welson LL. Fang X. Mills GB. Bast RC.Jr. Ostrowski MC. Activation of the ras-mitogen activated protein kinase pathway and phosphorylation of ets-2 at position threonine 72 in

- human ovarian cancer cell lines. *Cancer Research* 1998, 58 (10), 2253-9.
63. Baltzinger M. Mager-Heckel AM. Remy P. XI erg: expression pattern and overexpression during development plead for a role in endothelial cell differentiation. *Dev. Dyn* 1990, 216 (4-5), 420-33.
 64. Oikawa T. Yamada T. Kihara-Negishi F. Yamamoto H. Kondoh N. Hitomi Y. Hashimoto Y.. The role of Ets family transcription factor PU.1 in hematopoietic cell differentiation, proliferation and apoptosis. *Cell Death. Differ.* 1999, 6 (7), 599-608.
 65. Teitell MA. Thompson AD. Sorensen PH. Shimada H. Triche TJ. Denny CT. EWS/ETS fusion genes induce epithelial and neuroectodermal differentiation in NIH 3T3 fibroblasts. *Lab. Invest.* 1999, 79 (12), 1535-43.
 66. Thompson AD. Teitell MA. Arvand A. Denny CT. Divergent Ewing's sarcoma EWS/ETS fusions confer a common tumorigenic phenotype on NIH 3T3 cells. *Oncogene* 1999, 18 (40), 5506-13.
 67. Kleinbaum LA. Duggan C. Ferreira E. Coffey GP. Buttice G. Burton FH. Human chromosomal localization tissue tumor expression and regulatory function of the ets family gene EHF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999, 264 (1), 119-26.
 68. Coutte L. Monte D. Baert J. de Launoit Y. Genomic organization of the human elaf gene, a member of Ets transcription factors. *Gene* 1999, 240 (1), 201-7.
 69. Hashimoto S. Nishizumi H. Hayashi R. Tsuboi A. Nagawa F. Takemori T. Sakano H. Prf, a novel Ets family protein that binds to the PU.1 binding motif, is specifically expressed in restricted stages of B cell development. *Int. Immunol.* 1999, 11 (9), 1423-9.
 70. Dube A. Akbarali Y. Sato TN. Libermann TA. Oettgen P. Role of the ets transcription factors in the regulation of the vascular-specific Tie2 gene. *Circ. Res.* 1999, 84 (10), 1177-5.
 71. Gilles F. Raes MB. Stehelin D. Vandebunder B. Fafeur V. The c-ets-1 proto-oncogene is a new early-response gene differentially regulated by cytokines and growth factors in human fibroblasts. *Experimental Cell Research* 1996, 222 (2), 370-8.
 72. Kramer B. Wiegmann K. Kronke M. Regulation of the human TNF promoter by the transcription factor Ets. *J. of Biological Chemistry* 1995, 270 (12), 6577-83.
 73. Tomaras GD. Foster DA. Burrell CM. Taffet SM. ETS transcription factors regulate an enhancer activity in the third intron of TNF-alpha. *J. Leukoc. Biol.* 1999, 66 (1), 183-93.
 74. Blumenthal SG. Aichele G. Wirth T. Czernilofsky AP. Nordheim A. Dittmer J. Regulation of the human interleukin-5 promoter by Ets transcription factors. Ets1 and Ets2, but not Elf-1 cooperate with GATA3 and HTLV-1 Tax1. *J. Biol. Chem.* 1999, 274 (18), 12910-1
 75. Knittel T. Kobold D. Dudas J. Saile B. Ramadori G. Role of the Ets-1 transcription factor during activation of rat hepatic stellate cells in culture. *Am. J. Pathol.* 1999, 155 (6), 1841-8.
 76. Hultgarth-Nilsson A. Cercek B. Wang JW. Naito S. Lowdahl C. Sharifi B. Forrester JS. Fagin JA. Regulated expression of the ets-1 transcription factor in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. *Circulation Research* 1996, 78 (4), 589-95.
 77. Shirasaki F. Makhluf HA. LeRoy C. Watson DK. Trojanowska M. Ets transcription factors cooperate with Sp1 to activate the human tenascin-C promoter. *Oncogene* 1999, 18 (54), 7755-64.
 78. Delannoy-Courdent A. Fauquette W. Dong-Le. Bourhis XF. Boilly B. Vandebunder B. Desbiens X. Expression of c-ets-1 and uPA genes is associated with mammary epithelial cell tubulogenesis or neoplastic scattering. *Internat. J. of Development Biol.* 1996, 40 (6), 1097-208.
 79. Bolon I. Gough V. Devonassoux M. Vandebunder B. Wernert W. Moro D. Brambilla C. Brambilla E. Expression of c-ets-1, collagenase 1, and urokinase-type plasminogen activation genes in lung carcinomas. *American Journal of Pathology* 1995, 147 (5), 1298-310.
 80. Logan SK. Garabedian MJ. Campbell CE. Werb Z. Synergistic transcriptional activation of the tissue inhibition of metalloproteinases-1 promoter via functional interaction of AP-1 and Ets-1 transcription factors. *J. of Biological Chemistry* 1996, 271 (2), 774-82.
 81. Noti JD. Reinemann C. Petrus MN. Regulation of the leukocyte integrin gene CD11c is mediated by AP-1 and Ets transcription factors. *Molecular Immunology* 1996, 33 (2), 115-27.
 82. Gilles C. Polette M. Birembaut P. Brunner N. Thompson EW. Expression of c-ets-1 mRNA is associated with an invasive, EMT-derived phenotype in breast carcinoma. *Clinical and Experimental Metastasis* 1997, 15 (5), 519-26.
 83. Bolon I. Brambilla E. Vandebunder B. Robert C. Lantuejoul S. Brambilla C. Changes in the expression of matrix proteases and of the transcription factor c-Ets-1 during progression of precancerous bronchial

- lesions. *Laboratory Investigation* 1996, 75 (1), 1-13.
84. Valter MM. Hugel A. Huang HJ. Cavenee WK. Wiestler OD. Pietsch T. Wernert N. Expression of the Ets-1 transcription factor in human astrocytomas is associated with Fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1) vascular endothelial growth factor receptor-1 synthesis and neoangiogenesis. *Cancer Res.* 1999, 59 (21), 5608-14.
 85. Oettgen P. Finger E. Sun Z. Akbarali Y. Thamrongsak U. Boltax J. Grall F. Dube A. Weiss A. Brown L. Quinn G. Kas K. Endress G. Kunsch C. Libermann TA. PDEF, a Novel Prostate Epithelium-specific Ets Transcription Factor, Interacts with the Androgen Receptor and Activates Prostate-specific Antigen Gene Expression. *J. Biol. Chem.* 2000, 275 (2), 1216-1225.
 86. Frampton J. McNagny K. Sieweke M. Philip A. Smth G. Grof T. v-Myb DNA binding is required to block thrombocytic differentiation of Myb-Ets-transformed multipotent haematopoietic progenitors. *WMBO Journal* 1995, 14 (12), 2866-75.
 87. Rossi F. McNagny KM. Logie C. Stewart AF. Graft T. Excision of Ets by an inducible site-specific recombinase causes differentiation of Myb-Ets-transformed hematopoietic progenitors. *Current Biology* 1996, 6 (7), 866-72.
 88. Garrido C. Leprince D. Plaza S. Aumercier M. Stehelin D. Saule S. Back-mutation of the v-Ets to the c-Ets carboxy-terminal amino acids in the P135 gag-myb-ets results in chicken neuroretina cells transformation and loss of basic fibroblasts growth factor responsiveness. *Oncogene* 1996, 12 (7), 1449-56.
 89. Bloch A. Liu XM. Wang LG. Regulation of c-myb expression in ML-1 human myeloblastic leukemia cells by c-Ets-1 protein. *Advances in Enzyme Regulation* 1995, 35, 35-41.

Gena myb

90. Zorbas M. Sicurella C. Bertoncetto I. Venter D. Ellis S. Mucenski ML. Ramsay RG. C-Myb is critical for murine colon development. *Oncogene* 1999, 18 (42), 5821-30.
91. Woo CH. Sopchak L. Lipsick JS. Overexpression of an alternatively spliced form of c-Myb results in increases in transactivation and transforms avian myelomonoblasts. *Journal of Virology* 1998, 72 (8), 6813-21.
92. Campanero MR. Armstrong M. Flemington E. Distinct Cellular Factors Regulate the c-myb Promoter through Its E2F Element. *Mol. Cell Biol.* 1999, 19 (12), 8442-8450.
93. Golay J. Broccoli V. Lamarte J. Bifulco C. Parravicini C. Pizzey A. Thomas NS. Delia D. Ferranti P. Vitolo D. Introna M. The A-Myb transcription factor is a marker of centroblasts in vivo. *J. of Immunology* 1998, 160 (6), 2786-93.
94. Oh IH. Reddy EP. The C-terminal domain of B-Myb acts as a positive regulator of transcription and modelates its biological function. *Mol. and Cellular Biol.* 1998, 18 (1), 499-51.
95. Johnson TK. Schweppe RE. Septer J. Lewis RE. Phosphorylation of B-Myb Regulates Its Transactivation Potential and DNA Binding. *J. Biol. Chem.* 1999, 274 (15), 36741-36549.
96. Tanaka Y. Patestos NP. Maekawa T. Ishii S. B-Myb is required for inner cell mass formation at an early stage of development. *J. Biol. Chem.* 1999, 274 (40), 28067-70.
97. Burk O. Klempnauer KH. Myb and Ets transcription factors cooperate at the myb-inducible promoter of the tom-1 gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1999, 1446 (3), 243-52.
98. Ratajczak MZ. Perrotti D. Melotti P. Powzaniuk M. Caalabretta B. Onodera K. Kregenow DA. Maachalinski B. Myb and ets proteins are candidate regulators of c-kit expression in human hematopoietic cells. *Blood* 1998, 91 (6), 1934-46.
99. Mink S. Jaswal S. Burk O. Klempnauer K. The v-Myb oncoprotein activates C/EBPbeta expression by stimulating an autoregulatory loop at the C/EBPbeta promoter. *Biochim. Biophys. Acta* 1999, 1447 (2-3), 175-84.
100. Krause DS. Mucenski ML. Lawler AM. May WS. CD34 expression by embryonic hematopoietic and endothelial cells does not requires c-Myb. *Wxperimental Hematology* 1998, 26 (11), 1086-92.
101. Muller C. Yang R. Idos G. Tidow N. Diederichs S. Koch OM. Verbeek W. Bender TP. Koeffler HP. C-myb Transactivates the Human Cyclin A1 Promoter and induces Cyclin A1 Gene Expression. *Blood* 1999, 94 (12), 4255-4262.
102. Bein K. Ware JA. Simons M. Myb-dependent regulation of thrombospondin 2 expression. Role of m RNA stability. *Journal of Biological Chemistry* 1998, 273 (33), 21423-9.
103. Introna M. Golay J. How can oncogenic transcription factors cause cancer: a critical review of the myb story. *Leukemia* 1999, 13 (9), 1301-6.
104. Kasono K. Piche A. Xiang J. Kim HG. Bilbao G. Johnning F. Nawrath M. Moelling K. Curiel DT. Functional knock-out of c-myb by an intracellular anti-c-Myb single-chain antibody. *Biochemical and*

- Biophysical Research 1998, 251 (11), 124-30.
105. Ganter B. Chao ST. Lipsick JS. Transcriptional activation by the myb proteins requires a specific local promoter structure. FEBS Lett. 1999, 460 (3), 401-10.
 106. Tomita A. Watanabe T. Kosugi H. Ohashi H. Uchida T. Kinoshita T. Mizutani S. Hotta T. Hurate T. Seto M. Saito H. Truncated c-Myb expression in the human leukemia cell line TK-6. Leukemia 1998, 12 (9), 1422-9.
 107. Colgin MA. Nyborg JK. The human T-cell leukemia virus type 1 oncoprotein Tax inhibits the transcriptional activity of c-Myb through competition for the CREB-binding protein. Journal of Virology 1998, 72 (11), 9396-9.
 108. Ganter B. Fu SI. Lipsick JS. D-type cyclins repress transcriptional activation by the v-Myb but not c-Myb DNA-binding domain. EMBO Journal 1998, 17 (11), 255-68.
 109. Levenson JD. Ness SA. Point mutations in v-Myb disrupt a cyclophilin-catalyzed negative regulatory mechanism. Molecular Cell 1998, 1 (2), 203-11.
 110. Klepnaner KH. Symonals G. Evan GI. Bishop JM. Subcellular localization of proteins encoded by oncogenes of avian myeloblastosis virus and avian leukemia virus E26 and by the chicken c-myb gene. Cell 1984, 37, 2, 537-547.
 111. Lipsick JS. Ibanez CE. Env-encoded residues are not required for transformation by p48^{vmyb}. J.Virol. 1987, 61, 3, 933-936.
 112. Grasser FA. Lipsick JS. The myb oncogene product is a regulator of gene expression. J. Cell Biochem. 1989, suppl.13B, 51.

REL/ NF-kappaB

Rel (Reticuloendotelioza)

NF-kappaB (Factor nuclear kappa al celulelor B)

Membrii familiei Rel/NF-kB sunt factori de transcriere care intervin în prima linie de apărare contra bolilor infecțioase și stresului celular. Aceste proteine inițiază un răspuns înalt coordonat în numeroase tipuri celulare acționând efectiv în menținerea sănătății organismului. Tulburarea mecanismelor reglatoare care controlează specificitatea și extinderea acestui răspuns rezultă din activitatea aberantă a NF-kB, poate fi însă, una din cauzele primare ale unui larg spectru de boli. Astfel, "tintirea" lui NF-kB ar putea duce la descoperirea unor noi reagenți farmacologici care ar oferi o nouă terapie pentru numeroasele tipuri de afecțiuni inflamatorii (1).

Există o cale majoră de semnalizare, care mediază răspunsul celulelor la stresul mediului, într-o varietate de situații de apărare. NF-kB este astfel un factor cheie reglator ce mediază expresia coordonată a genelor care aparțin mașinării celulare ce funcționează pentru protejarea organismului contra lezării fizice, chimice sau microbiene.

În reacțiile imunitare și inflamatorii, expresia citokinelor, interleukinelor și moleculelor de adeziune în celulele sistemului imunitar, vizează celulele T și B, celulele endoteliale, ca și celulele prezentatoare de antigeni (fagocitice) toate fiind larg reglate de NF-kB. De aici, rolul central al acestui factor de transcriere în reglarea apoptozei, un program celular important, care decide asupra sortii celulelor, nu numai în timpul dezvoltării embrionare, dar de asemenea, și pe parcursul evoluției de la fenotipul normal la cel transformat. NF-kB apare astfel și ca o țintă pentru interferența terapeutică într-o varietate de situații patologice, precum bolile cronice inflamatorii și cele autoimune, infecția HIV sau cancer (2).

Factorii de transcriere Rel/NF-kB se formează din homo- și heterodimeri cu diferite specificități pentru locul de cuplare la DNA. Câteva cai intracelulare evocate de un larg spectru de factori biologici și condiții de mediu, pot duce la activarea diverselor Rel/NF-kB prin semnalizarea degradării proteinelor inhibitorii IkappaB. În nucleu, Rel/NF-kB modulează expresia unui număr variat de gene, inclusiv a celor care codifică diferite citochine, factori de creștere, proteinele ce răspund de fază acută, imunoreceptori, alți factori de transcriere, de adeziune celulară, proteine virale și reglatori ai apoptozei (3,4).

Oncogenul v-Rel a fost descoperit în 1982 într-o tumoră de curcan. Virusul REV-T (virusul reticuloendoteliozei) detine oncogenul v-rel ce induce proliferarea malignă a țesutului reticulohistiocitar din splină și măduva osoasă transformând celulele limfoide. Gena c-rel de la curcan are 8 regiuni omoloage cu v-rel a cărei lungime este de 1,55 kb, în timp ce gena c-rel este de 1,65 kb; această diferență este datorată adăugării intronilor care se pierd din genomul viral.

Gena v-rel codifică o fosfoproteină de 59 kb (pp59 kD), pe când produsul c-rel este de 75 kD. Gena v-rel apare din c-rel prin deleția unor componente structurale ale acesteia din urmă (5, 6, 7, 8, 9).

Tulpina Rev-T a virusului reticuloendoteliozei este foarte oncogenă, inducând la puii

tinere tumori letale ale celulelor limfoide. Oncoproteina v-rel apartine familiei Rel/NF-kB de factori de transcriere eucarioti în care se înscrie și omologul sau c-rel și proteinele Rel înrudite – Rel-A, Rel-B, NF-kB1, NF-kB2-. Toti acesti factori detin o regiune omoloaga Rel NH2-terminal înalt înrudita, necesara pentru cuplarea la DNA, dimerizare, transportul nuclear, cât și pentru reglarea proteinelor Rel de catre reprezentatii familiei inhibitorilor IκB. COOH-terminal este implicat în activarea transcriptionala și în reglarea functiei proteinei Rel, prin secvente omoloage cu acelea gasite în factorii IκB.

v-Rel are abilitatea de a inhiba competitiv activarea transcriptionala a omologilor sai celulari, ceea ce ridica problema posibilitatii blocarii diferentierii celulelor limfoide și odata cu aceasta, anuleaza activitatea proteinelor Rel endogene.

În procesul transformarii, v-rel defectiv trebuie sa se asocieze cu el însusi sau cu alti membri ai familiei Rel, pentru formarea dimerului. Interactiunea proteina-proteina este importanta pentru functionarea sa, fapt dovedit prin aceea ca v-Rel se asociaza cu câtiva membri cunoscuti ai familiei Rel cum sunt c-Rel, p124/NF-kB1 și p115/NF-kB2 (10).

În concluzie, retrovirusul aviar Rev-T codifica o proteina v-Rel care este membru al familiei factorilor de transcriere Rel/NF-KB. v-Rel induce un rapid și fatal limfom/leucemie la pasarile tinere și poate transforma și immortaliza in vitro o varietate de tipuri celulare aviare.

Factorii de transcriere ai familiei Rel/NF-kB au fost asociati și cu oncogeneza la mamifere, v-rel fiind singurul membru clar oncogenic în modelele animale.

Oncogenicitatea sa potentă este consecinta unui numar de mutatii care-i altereaza activitatea și reglarea. De exemplu, câteva mutatii îi scad abilitatea de a fi reglata de IκB alfa; schimbându-si specificitatea locului de cuplare la DNA, capata proprietati noi de transactivare.

Studiul v-rel arata cum proteinele celulare Rel contribuie la oncogeneza prin afectarea cresterii celulelor, alterarea reglarii ciclului celular și blocarea apoptozei (11). Aceasta oncoproteina retrovirală, v-Rel, ce apartine, cum mentionam, familiei factorilor de transcriere Rel/NF-kB, arata multiple schimbari care o fac, comparativ cu protooncogenă c-Rel, înalt oncogenă în celulele limfoide aviare. Sunt însa necesare 3 reziduuri mutante din 11 amino-acizi derivati din anvelopa (env) virală la N-terminus al v-rel. Pentru deplina oncogenicitate, aceste mutante env capateaza secvente în jumătatea N-terminală a v-rel pentru a activa transcrierea atât în celulele de drojdie cât și în cele de pui, în conditiile în care secvente analoge de c-Rel, fie ca nu activeaza transcrierea, fie ca o activeaza slab.

Îndepartarea aminoacizilor env de v-rel sau a mutatiilor directionate care acopera cele trei reziduuri mutante prezente în proteina env Rev-A helper virus aboleste abilitatea de transactivare a v-rel. Adăusul de aminoacizi env c-rel mutant la c-rel, nu este suficient pentru restaurarea deplina a functiilor transactivatoare. Celelalte secvente din jumătatea N-terminală a NF-kB, respectiv p100 (p85) produsă în celulele leucemice umane HUT-78 activeaza, de asemenea, transcrierea în drojdie în conditiile în care proteinele normale p52 și p100 n-o fac. Activarea transcriptionala de catre p85 în drojdie se pare ca apare prin secventele N-terminal.

Este astfel prezentat un model în care transactivarea secventelor domeniilor N-terminal Rel omoloage (RH) din familia proteinei Rel oncogenă, sunt influentate de secventele din afara domeniului RH (12).

Oncoproteina retrovirală v-Rel este o proteina himerică care detine 11 aminoacizi din anvelopa virusului adăugati la N-terminus. În acest N-terminal env v-Rel exista trei aminoacizi substituiti în comparatie cu virusul Rev-A helper. Aceste substitutii determina un numar de proprietati unice în v-Rel cum sunt abilitatea crescută de transactivare și transformare. Reziduurile aminoacizilor de la 3 la 9 sunt critice pentru functia de

transactivare N-terminal paralela cu transformarea de catre v-Rel.

Substituirea aminoacizilor conservativi ca leucina si tirozina cu Phe 3 si Phe 9 este tolerata în transactivarea fibroblastelor embrionare de pui si în transformarea celulelor splenice ale acestora. Dimpotriva, substituirea a 10 reziduuri Phe din N-terminus al v-rel nu permite transactivarea, indicând ca o structura distincta din jurul Phe 3 si Phe 9 este esentiala pentru functia v-rel. Adausul amino-acizilor env-v-rel la N-terminus al proteinei c-rel umana o poate face activa în transformare. Deci, reziduurile Phe la pozitiile 3 si 9 sunt selectate pentru a amplifica oncogenicitatea v-Rel prin cresterea abilitatii acesteia de a activa transcrierea (13).

Oncoproteina virala v-rel este foarte oncogena în modelele aviare. Amplificarea cromosomiala, hiperexpresia si rearanjarea genica care codifica factorii de transcriere Rel/NF-kB se observa în numeroase tumori hematopoietice si solide. Activitatea persistenta a NF-kB se observa si în câteva tipuri celulare de cancer uman, ca rezultat al activarii constitutive a kinazelor de semnalizare amonte, sau al mutatiilor lor ce inactiveaza subunitatile I κ B inhibitorii. Exista o corelatie între activarea expresiei genelor celulare de catre factorul Rel/NF-kB si paticiparea acestora la procesul malign. Experimente ce implica NF-kB în controlul raspunsului apoptotic releva, de asemenea, un rol în oncogeneza si în rezistenta celulelor tumorale la chemoterapie. Apoptoza si progresia în malignizare depind de statutul genelor Rel/NF-kB si I κ B si de activitatea acestora în tumorile umane (14).

Oncoproteina v-Rel transforma o varietate de tipuri celulare atât in vitro cât si in vivo, activitate dependenta de abilitatea genei v-rel de a se cupla la DNA si de a activa transcrierea.

Proteina TRIP-6 a fost identificata initial ca o proteina ce interactioneaza cu receptorul hormonului tiroidian. Este un membru al subfamiliei de proteine ce contin domeniul LIM care se considera ca transporta semnalele de la suprafata celulei la nucleu. S-a demonstrat ca secventa din Trip-6 care include domeniul LIM se comporta ca un coactivator pentru activarea transcrierii de catre v-rel. Astfel, proteina de fuziune GAL4-Trip6 poate detine secventa C-terminal v-rel care actioneaza transcriptional în drojdii. Trip-6 poate amplifica în drojdii activarea de catre v-rel dintr-o plasmida reporter kappaB situs.

Desi trip-6 uman de lungime deplina localizeaza placile de adeziune, deletia secventei N-terminal îi permite sa intre în nucleii celulelor de pui.

Trip-6 mRNA este exprimat în numeroase tesuturi umane. Coexpresia trip-6 v-rel nu afecteaza activitatea transformanta a oncoproteinei. De aici concluzia ca, trip-6 poate fi o proteina importanta pentru abilitatea v-Rel de a activa transcrierea si de a transforma celulele si astfel ar putea fi o potentiala tinta pentru blocarea oncogenezei mediata de rel si pentru activarea transcriptionala (15).

Desi NF-kB/Rel se exprima în toate celulele, totusi în majoritatea celor non-B acesti factori sunt sechestrati în complexe citoplasmatiche inactive cu proteine inhibitorii specifice numite I κ B.

Factorii Rel/NF-kappaB sunt activati aberant în celulele canceroase mamare la rozatoare si functioneaza pentru a promota supravietuirea si proliferarea celulelor tumorale. La sobolanii femeli S-D (Spragne-Dawley) activarea de catre Rel/NF-kB este un eveniment timpuriu ce apare înaintea transformarii maligne ca si în cazul celulelor epiteliale mamare umane (HMEC) în cultura.

În extractele nucleare ale glandelor mamare la sobolanii S-D s-a detectat cuplarea crescuta a Rel/NF-kB la 40% din animale 3 saptamâni post-tratament cu DMBA, înaintea formarii tumorii care normal începe sa fie vizibila dupa 7-9 saptamâni.

În celulele MCF-10F netumorogene, transformarea malignă in vitro după tratarea cu DBMA sau benz(a)piren duce la creșterea de 4-12 ori a activității NF-κB clasic (p65/p50). Inducția NF-κB se corelează cu scăderea stabilității proteinei inhibitorii IκB-alfa specifică lui NF-κB. Expresia ectopică a subunității transactivatoare p65 a NF-κB în celulele MCF-10F induce promotorul oncogenei c-myc, care este dirijat de două elemente NF-κB și de nivelele c-myc endogene. Astfel, scăderea HMEC derivate din mamoplast imortalizate după expunere la benz(a)piren arată inducție dereglată a NF-κB clasic înainte de transformarea malignă. Se sugerează ca activarea NF-κB joacă un rol critic timpuriu în transformarea glandelor mamare indusă de carcinogen (16).

Rel A (p65)

NF-κB este un heterodimer al proteinei Rel sechestrat în citoplasma sub formă inactivă datorită interacțiunii cu o proteină inhibitoră kappa B (IκB). Când IκB este degradată, dimerul intra în nucleu pentru a activa genele țintă. Heterodimerul NF-κB este constituit din p65 RelA și p50 RelB, care acționează ca formă activă de transcriere, dar cele două componente pot acționa și independent cu eficiența specifică în funcție de tipul celular și de procesul de activare.

Virusul hepatitei B (HBV) sau virusul hepatitei C (HCV) pot activa NF-κB modulând apoptoza celulară și, de asemenea, asociindu-se cu oncogeneza. NF-κB nuclear este semnificativ mai abundent în tumorile HCC (carcinom hepatocelular) infectate cu HBV și HCV dar și în țesutul hepatic netumoral, în comparație cu normalul. Activitatea de cuplare DNA NF-κB și expresia proteinei nucleare RelA sunt mai ridicate în țesutul tumoral comparativ cu cel netumoral, în timp ce expresia proteinei IκB-alfa citosolică este în general mai ridicată în țesutul normal decât în cel tumoral.

În concluzie, activarea constitutivă a NF-κB este mai frecventă în țesutul tumoral și este posibil ca supraexpresia acestuia însoțită de dereglarea IκB-alfa pot juca un rol în hepatocarcinogeneza cu infecția HBV sau HCV (17).

Soarecii deficienți în NF-κB -gena transactivatoare RelA (p65)- mor în a 14-a, a 15-a zi de dezvoltare embrionară prin apoptoza hepatică masivă. În ficatul adult, activarea NF-κB-heterodimerul lui RelA/p50- poate cauza proliferarea hepatocitelor, apoptoza sau răspunsul genelor fazei acute. Proteina și complexele NF-κB hepatice embrionare la cel puțin două zile înainte de moarte, s-au observat la soarecii fără RelA, sugerându-se că letalitatea nu-i legată de NF-κB. Se crede că în absența RelA, embrionii sunt sensibilizați pentru apoptoza mediată de TNF-1.

S-au generat soareci cu deficiența RelA și TNF-1 pentru a vedea dacă semnalizarea apoptotică prin TNF-1 este responsabilă de fenotipul letal. Acești soareci au supraviețuit în timpul dezvoltării embrionare, s-au născut cu ficat normal și fără semne de apoptoza hepatică crescută. La 10 zile post natal animalele mor datorită hepatitei acute cu infiltrare masivă de neutrofile imature.

Se concluzionează că, RelA și TNF-1 nu sunt necesare pentru dezvoltarea ficatului și că RelA protejează ficatul embrionar de semnalele apoptotice mediate de TNF-1. Totuși, absența semnalizării TNFR-1 și a activității RelA la nou-născuți conferă acestor animale susceptibilitate la infecția hepatică endogenă (18).

Inducerea transcrierii din LTR HIV-1 de către subunitatea NF-κB RelA/p65 este dependentă de interacțiunea cu domeniul zinc finger DNA-binding al Sp-1. Răspunsul de creștere timpurie a factorului de transcriere Egr-1 al cărui domeniu DNA-binding are un înalt

grad de omologie cu Sp-1, poate interactiona in vitro cu RelA si regla in vivo activitatea transcriptionala a NF-kB.

Similar cu interactiunea cu Sp-1, domeniul omolog Rel al RelA interactioneaza cu domeniul zinc-finger al Egr-1. În contrast cu Sp-1, Egr-1 represeaza specific activitatea transcriptionala a RelA prin domeniul sau zinc-finger. Interactiunea dintre RelA zinc-finger al Egr-1 este mutual exclusiva cu cuplarea DNA sugerând un model în care Egr-1 sechestreaza direct NF-kB din promotorul sau tinta. Deoarece Egr-1 este indus de multi asemenea factori care activeaza NF-kB, acest nou mecanism de reglare transcriptionala are multe implicatii pentru cuprinderea ambilor factori în procesele celulare precum apoptoza si raspunsul la stres si infectie (19).

Curcumin (diferuloil metan), pigmentul galben din Curcuma longa este un potent agent chemopreventiv, care induce apoptoza câtorva tipuri de celule canceroase. Multe din acestea se autoprotejeaza contra apoptozei prin activarea Rel/NF-kB, factor de transcriere care faciliteaza supravietuirea celulelor . Activarea NF-kB indusa de semnal este inhibata de curcumin.

În celulele sarcomului de soarece 1-929 si în celulele transfectate RelA s-a stabilit gena Rel transflectata care codifica subunitatea p65/A a NF-kB, celule care s-au dovedit rezistente la variate doze de curcumin. Celulele transfectate cu rel/A releva activitate NF-kB DNA-binding care pe de o parte n-ar putea fi inhibata de curcumin si pe de alta parte nu arata condensare nucleara si fragmentarea DNA dupa tratarea cu curcumin. Când o forma supresoare a IkappaB-alfa (care inhiba NF-kB) este transflectata tranzitoriu în celulele transflectate rel/A, acestea nu rezista îndelung la curcumin. Se subliniaza rolul critic antiapoptotic al NF-kB în apoptoza indusa de curcumin (20).

Rel B (p50)

Generarea factorului de transcriere NF-kB (p50) este mediata de proteosomi. P50 este generata în timpul translocatiei genei NF-kB1 prin procesare cotranslationala care permite producerea dintr-un singur mRNA atât de p50 cât si de p105. Domeniul omolog Rel din p50 sufera dimerizarea cotranslationala, ineractiune reclamata pentru producerea eficienta de p50. Cuplarea cu proteosomi în timpul translocatiei, genereaza heterodimeri p50-p105.

Dupa evenimentul primar cotranslational, trepte postranslationale aditionale regleaza formarea homodimerilor p50 si rata intracelulara a p50 si p105. Aceasta strategie celulara plaseaza biogeneza p50 sub controlul inhibitorului p105 timpuriu, reglând astfel fondul homodimerilor p50 în interesul celulei (21)

Celulele dendritice (DC) si alte celule prezentatoare de antigeni se caracterizeaza prin localizarea nucleara a Rel-B, membru al familiei de factori nucleari Rel/NF-kappaB.

PBDC (celule dendritice din sângele periferic) circulante din artritele reumatoide seamana cu cele normale imature, deoarece nu expun intracelular proteina Rel-B. În sectiunile seriate obtinute din tesutul sinovial al artritelor reumatoide, celulele cu Rel-B nuclear sunt abundente în regiunea perivasculara, iar celulele nRel B+, HLA-DR+ ramase, sunt limfocite B si macrofage. Numai 3% din celulele dendritice sinoviale contin Rel-B nuclear care totusi cupleaza DNA si astfel fiind capabil de activitate transcriptionala.

În concluzie, precursorii celulelor dendritice se diferentiaza si expun Rel-B dupa intrarea în tesutul sinovial reumatoid. Astfel, celulele dendritice diferentiate pot fi identificate

imunohistochimic. Semnalele pentru maturarea lor difera între tesutul sinovial din artritele reumatoide și fluidul sinovial, ducând la localizarea nucleară a Rel-B predominant în tesutul sinovial. Aceasta ar putea avea consecințe pentru celulele dendritice prezente în cele două locuri (22).

Soarecii cu disturbanta Rel-B dezvoltă un fenotip hemopoietic inflamator, anormal. Cei Rel-B (-/-) sunt clinic normali timp de 4-10 săptămâni postnatal, după care apar îngrosarea pielii și caderea parului. Leziunile pielii constau în hiperkeratoza și marcată hiperplazie epidermică, iar în derm se observa numeroase celule T CD4+ și eozinofile mixtate cu mai puține T CD8+ și neutrofile. De asemenea are loc creșterea moderată a MHC cl II, a celulelor dendritice și mastocitelor. În pielea soarecilor Rel-B (-/-) crește și expresia citokinelor Th2 corelat cu creșterea nivelului mRNA de eotaxin și CCR3. La acești soareci încrucisați cu soareci transgenici (care nu au celule T periferice) nu apar dermatite, ceea ce demonstrează că leziunile pielii sunt dependente de limfocitele T.

Dermatitele soarecilor Rel-B deficienți au numeroase similarități cu dermatitele atopice de la om, incluzând infiltrate de T CD4+ și eozinofile în piele și în sânge, ca și Ig E crescute în ser. Deci, soareci Rel-B (-/-) ar putea fi un model de studiu al patogenezei acestor afecțiuni alergice comune la om (23).

Un aspect cheie al maturării celulelor dendritice este scăderea reglării capacității de procesare a Ag și suprareglarea capacității imunostimulatoare. Rel-B este puternic suprareglat în timpul generării celulelor dendritice imature și macrofagelor. Maturarea celulelor dendritice indusă de citokine duce la o creștere a Rel-B nuclear, p50, p52.

Această suprareglare a factorului NF-κB nu se corelează cu nivele mai scăzute ale inhibitorului citosolic al acestuia - IκBα -. În schimb în celulele dendritice mature se exprimă puternic IκB cu Bcl-3 (24).

IκB

(Inhibitor kappa B)

IκB-alfa este un reglator dual al factorului de transcriere Rel/NF-kappaB, care retine inactivi în citoplasma, dimerii NF-kappaB cărora le inhibă cuplarea la DNA și activitățile transcripționale intranucleare.

S-au identificat domenii discrete functionale în IκB-alfa responsabile de reglarea în citoplasma și nucleu a c-Rel. Determinantele necesare pentru reglarea c-Rel în nucleu, s-au cartat în domeniul central ankirin al IκB-alfa și în puțini aminoacizi încarcați negativ din regiunea C-terminal. Dimpotrivă, secvențele implicate în reglarea citoplasmatică a reziduurilor c-Rel se găsesc în domeniul N-terminal, dar și în cel central ankirin al IκB-alfa.

S-au demonstrat prin cartare, determinantele N-terminal ale IκB-alfa necesare reglării citoplasmatică a homodimerilor c-Rel. Astfel, aminoacizii 48-58 din p40/IκB-alfa s-au dovedit esențiali pentru a bloca localizarea nucleară a dimerilor c-Rel, definindu-se o regiune a IκB-alfa, care poate fi reclamată pentru mascarea optimă a c-Rel NLS sau pentru exportul nuclear al complexului c-Rel/IκB-alfa. S-a demonstrat astfel, o nouă funcție a N-terminal al IκB-alfa în controlul localizării subcelulare a dimerilor Rel/NF-kappaB.

Data fiind implicarea activității dereglată a NF-kappaB în tumorile hematopoietice și solide se presupune apariția alterărilor în acest domeniu al inhibitorului IκB-alfa care ar putea avea severe repercusiuni biologice (25).

Analiza cuplării DNA a 3 diferiți NF-κB, homodimerii p50, p65 și heterodimerul

p50/p65 releva ca NF-kB p50/p65 se cupleaza la locul tinta kappaB DNA al enhancerului Ig-kB cu o afinitate de aproximativ 10 nm.

Homodimerii p50 si p65 se cupleaza în acelasi loc cu aproximativ 5- si respectiv 15 ori afinitate mai scazuta.

Natura izotermilor cuplati indica un mod de cooperare pentru toti cei 3 NF-kB catre tinta DNA. S-a analizat rolul pH si temperaturii asupra formarii complexului heterodimer Ig-kB care cupleaza la tinta DNA Ig-kB în functie de pH, cu cea mai înalta afinitate între 7.0 si 7.5.

Sensibilitatea la mediul ionic si insensibilitatea la temperatura arata ca heterodimerii NF-kB p50/p65 formeaza complexe cu DNA specific într-o maniera condusa entropic (26).

În celulele nestimulate, proteinele Rel/NF-kB sunt sechestrate în citoplasma de catre proteinele inhibitorii kappaB (IkB).

Numerosi stimuli extracelulari precum TNF-alfa induce fosforilarea rapida a IkB la N-terminal al reziduurilor serina ducând la degradarea inhibitorilor astfel încât proteina NF-kB se transloca în nucleu si activeaza expresia genei prin elemente de raspuns kappaB. TNF-alfa ca si alti stimuli induce de asemenea fosforilarea proteinei NF-kB, a proteinei RelA/p65 la serina 529, ceea ce creste activitatea transcriptionala a NF-kB asupra unor reporteri exogeni adaugati. Cazeinkinasa 2 (CK II) interactioneaza cu p65 in vivo iar in vitro poate fosforila p65 la serina 529. Inhibitorul CK II (PD144795) inhiba in vivo fosforilarea p65 indusa de TNF-alfa. De asemenea, asocierea IkappaB-alfa-p65 CKII inhiba fosforilarea p65, degradarea IkB alfa permitând enzimei sa fosforileze p65 pentru un potential crescut de transactivare a NF-kappaB. Se explica astfel abilitatea CKII de a modula cresterea celulara si se prezinta un mecanism în care enzima aceasta poate functiona într-o maniera inductibila (27).

Activitatea factorilor de transcriere este modulata de PK ce raspund de semnal. Factorii de transcriere Rel/NF-kB sunt reglati, cum s-a mentionat, de inhibitorii IkappaB a caror fosforilare cauzeaza degradarea lor, rezultând translocatia nucleara a NF-kB si activarea genelor tinta.

O PK mamaliana de 66 kD cupleaza c-Rel murin atât in vitro cât si in vivo. Kinasa are cel putin doua locuri de cuplare la c-Rel: un substrat specific- prolina directionat spre serina/treonina similar cu kinazele MAP si un domeniu specific fosforilat la C-terminal al c-Rel murin la locul consens ERK (receptorul kinazei externe)(28).

S-a mentionat ca o functie majora a proteinei IkappaB este aceea de a retine proteina Rel în citoplasma. În plus, se crede ca IkappaB detine si functii nucleare, respectiv mentinerea transcrierii genei dependente de NF-kB inductibil, si finalizarea transcrierii inductibile.

Proteina IkB-alfa circula între nucleu si citoplasma utilizând receptorul nuclear de export CRM1. Secventa de export care cupleaza CRM1 s-a identificat în domeniul N-terminal a

1

IkB-alfa, dar nu în al IkB beta sau IkB-epsilon. Retentia în citoplasma a p65 (numita si Rel A) de catre IkB-alfa este dependenta de CRM1p.

În celulele mamaliene COS, inhibarea CRM1 de catre leptomicina B duce la localizarea nucleara a p65 cotransfectat si a IkB-alfa si la relocalizarea nucleara amplificata a p65 endogen în celule.

Se sugereaza ca functia principala a IkB-alfa este de export nuclear mai curând decât de sechestrant citoplasmatic. Se sugereaza, de asemenea, ca nucleul este locul major al asocierii p65-IkB-alfa, loc din care acest complex trebuie sa fie exportat pentru a crea fondul citoplasmatic (29).

Factorii de transcriere ai familiei Rel/NF-kappaB sunt reglatori cheie ai raspunsului imun/inflamator si intervin în proliferarea si supravietuirea limfocitelor si în oncogeneza.

Corelatia absoluta dintre activitatile antiapoptotice si oncogeneza ale Rel/NF-kB si oncoproteinele v-rel semnifica importanta antagonistilor mortii aflati sub control NF-kB. Prosupravietuirea omologului Bcl-2 - Bfl-1 (care se mai numeste si A1) este o tinta transcriptionala directa a NF-kB ridicând problema daca acest factor este un reglator specific sau global al autoreglarii mortii în familia Bcl-2. NF-kB regleaza direct expresia inhibitorilor mortii Bcl-2 si activeaza direct expresia Bcl-x(L). În timp ce acesta din urma este supraactivat semnificativ de catre c-Rel si Rel/A, Bcl-2 nu este supraactivat.

Stimulii care activeaza factorii NF-kB endogeni supraregleaza, de asemenea, expresia genei bcl-x, efect antagonizat de un inhibitor al activitatii NF-kB. Expresia lui bcl-x supreseaza apoptoza în prezenta sau absenta activitatii NF-kB. Analiza functionala a bcl-x arata ca acesta este direct controlat de c-Rel.

În concluzie, NF-kB regleaza direct expresia factorilor prosupravietuitori distincti în familia bcl-2, cum sunt Bcl-x(L) si Bfl1/A1, ceea ce creaza posibilitatea ca unii dintre acesti factori sa contribuie la oncogeneza asociati cu activitatea aberanta a Rel/NF-kB (30).

Mecanismele ce controleaza moartea programata a celulelor în timpul dezvoltarii timpurii a limfocitelor B nu sunt deplin înțelese. Membrii ambelor familii Bcl-2 legati de apoptoza si factorii de transcriere ai familiei NF-kB sunt diferit exprimati în timpul dezvoltarii limfocitelor B. Totusi, nu s-au constatat interactiuni directe între aceste doua familii.

Linia FL5.12 este un model pentru dezvoltarea progenitorilor limfocitelor B (celule reproductibile) care sufera moartea programata dupa adausul de IL-3. Semnalul de intrare în calea apoptotica este mediat de raportul ratei Bcl-2/Bax, timp în care nivelul lui Bax ramâne constant, rata transcrierii mRNA bcl-2 stabila, iar nivelul proteinei scade. Promotorul bcl-2 prezinta 3 locuri kappaB functionale cu abilitatea de a cupla factori kappaB din extractele nucleare ale liniei FL5.12. NF-kB poate repera transcrierea bcl-2 mediind astfel moartea programata a celulelor pro-B, prin represiia transcrierii genei de supravietuire bcl-2. Modificarea ratei bcl-2/bax se face astfel în favoarea complexelor care promoveaza moartea celulara (31).

În celulele WEHI-231, tratamentul cu anti-Ig duce la scaderea activitatii de cuplare a DNA de catre complexul proteic p50/c-Rel/p53 si, pe de alta parte, la amplificarea tranzitiei în activitatea de cuplare a DNA de catre proteina homodimerica p50. Ulterior, aceste celule sufera apoptoza. Deoarece I-kappaB-alfa joaca un rol pivotal în reglarea activitatii c o m p l e x u l u i Rel/NF-kB, s-a caracterizat natura si cinetica expresiei acestui inhibitor dupa apoptoza indusa de anti-Ig în celulele WEHI-231. Tratarea acestora cu anti-Ig conduce la scaderea nivelului stabil al mRNA Ikb-alfa, dar amplifica stabilitatea lui Ikb-alfa si prin aceasta, acumularea inhibitorului Ikb-alfa atât în citoplasma cât si în nucleu. Concomitent cu cresterea expresiei Ikb-alfa se constata si un declin gradual în expresia nucleara a c-Rel. Având în vedere ca c-Rel intervine important în supravietuirea celulelor WEHI-231, se sugereaza ca reglarea posttranscriptionala a Ikb-alfa ar putea contribui la apoptoza indusa de anti-Ig în aceste celule (32).

În progenitorii limfocitelor B - model FL5.12 NF-kappa B are o functie apoptotica ca raspuns la TNF-alfa, îndepartarea citokinei inducând translocatia nucleara a NF-kappa B c-Rel unde acesta este apoptotic. Inhibarea activarii NF-kB întârzie moartea programata a celulei indusa de citokina, atât în celulele FL5.12 cât si în celulele B timpurii transgenice. În plus, micromediul medular reconstituit in vitro abroga modelul apoptotic diferit dintre control si

celulele B transgenice.

NF-kappaB protejeaza hepatocitele de apoptoza în timpul dezvoltarii embrionare si al regenerarii ficatului. Activarea lui este mediata prin fosforilarea inhibitorului sau Ikb de catre un complex format din doua kinaze; I-kappaB kinaza-1 (IKK1) si I-kappaB kinaza-2 (IKK2). S-a analizat rolul diferit al celor doua kinaze în activarea lui NF-kB din hepatocitele primare de sobolan, activare mediata de TNF-alfa si IL-1-beta. Inductia maxima a activitatii IKK apare la 5 minute dupa tratamentul cu TNF-alfa si la 15 minute dupa tratamentul cu IL-1-beta. IKK activate fosforileaza substratele GST-I-kappaB (1-54) si GST-p65 (354-551), dar nu substratul GST-p65 (354-551) în care o serina a fost substituata de alanina în pozitia 536.

Se conclude ca, IKK2 îndeosebi este mediatorul principal pentru activarea NF-kB indusa de citokine în hepatocitele primare pe care le protejeaza contra apoptozei indusa de TNF-alfa, în timp ce IKK1 nu este reclamata pentru activarea NF-kB (34).

REL/NF-kB în diferite patii

Artrita reumatoida este o afectiune complexa cu implicare în autoimunitatea sistemica si în inflamatia locala. Inflamarea persistenta a membranei sinoviale din articulatii si din tesuturile sinoviale invazive duce la distructia articulatiei. Boala se caracterizeaza prin productie de mediatori inflamatori din care cei mai multi sunt reglati de factori de transcriere. Rel/NF-kB este implicat în fiziologia normala, astfel ca inhibitia lui globala poate contribui la etiologia artritei reumatoide.

Pentru a se examina rolul direct al c-rel si p50 în modele de artrita inflamanta acuta si cronica, s-au folosit soareci fara mutatii în c-rel sau în NF-kB. Astfel, soarecii c-rel (-/-) s-au dovedit rezistenti la artritele induse de colagen, dar raspund normal în modelul de artrita distructiva acuta indusa de BSA/IL-1 metilat. Aceasta sugereaza ca c-rel este reclamata în artrita sistemica si nu în cea locala. Dimpotriva, soarecii p50 (-/-) sunt refractari la artritele cronica si acuta reiesind faptul ca aceasta proteina este esentiala pentru inflamarea locala a articulatiei si implicit pentru distructia ei. În consecinta s-a propus ca subunitatile Rel/NF-kB au roluri distincte în patogeneză artritelor inflamatorii, ceea ce explica blocada terapeutica indusa de aceste subunitati în artritele reumatoide (35).

Inductia NF-kB DNA-binding de catre heterodimerul p65 (RelA)/p50 apare ca raspuns la incubarea celulelor MonoMac 6 cu fluidul sinovial (20% în mediul de cultura) de la 5 din 8 subiecti cu artrita reumatoida, 4 din 5 cu osteoartrita si de la nici unul din 3 cu oligoartrita seronegativa nediferentiata.

Incubarea fluidului sinovial cu anticorpi neutralizanti anti-TNF-alfa, dar nu cu anticorpi anti-IL-6 reduce semnificativ inductia activitatii de cuplare a p65/p50 în fluidul sinovial de la subiectii cu artrita reumatoida si osteoartrita.

În concluzie, activitatea biologica a TNF-alfa în fluidul sinovial de la pacientii cu artrita reumatoida si osteoartrita poate induce cuplarea p65/p50 NF-kB DNA în macrofage.

Independent de TNF-alfa si de alte citokine, în fluidul sinovial este indus un complex ce cupleaza NF-kB. Astfel mediatorii solubili din fluidul sinovial de la cei cu artrita reumatoida si osteoartrita pot modula cuplarea proteinei nucleare la locul de cuplare NF-kB în macrofage intervenind în expresia genei inflamatorii (36).

În artritele reumatoide efectul trombinei asupra activitatii NF-kB în proliferarea celulelor sinoviale, este tranzitoriu prin cuplarea la DNA cu consecinte în degradarea lui Ikb-alfa, dar nu a lui Ikb-beta. Proliferarea celulelor sinoviale este stimulata în functie de

doza de trombina. Cinetica proliferării celulelor sinoviale indusă de trombina este aproape paralelă cu cea a activării NF- κ B.

Complexele de cuplare la DNA induse de trombina sunt formate în principal din p65 și p50 și aparțin familiei NF- κ B. Inhibitorul PKC-calphostim C – reprezintă activarea NF- κ B indusă de trombina și proliferarea celulelor sinoviale.

În concluzie, trombina stimulează proliferarea celulelor sinoviale implicând activarea NF- κ B, cel puțin în parte, pe o cale mediată de PKC, indicând faptul că trombina joacă un rol important în hiperplazia sinovială în artrita reumatoidă (37).

Proteinele Rel/NF- κ B sunt implicate în limfogeneza și în rezistența tumorilor limfoide la inducția apoptozei. Alterările structurale ale genelor NF- κ B/rel, NF- κ B2, c-rel și bcl3 duc la creșterea activității NF- κ B/rel. În LLC cu B s-a observat o puternică activitate de cuplare constitutivă a NF- κ B/rel care poate contribui la rezistența contra drogurilor citotoxice. În acest sens s-a studiat organizarea genomică a locusurilor celor 3 gene în 81 afecțiuni limfoproliferative cu accent pe LLC cu B (n = 47).

În ciuda rolului NF- κ B/rel în maturarea mieloidă nu există evidente privind apariția de rearanjamente ale NF- κ B/rel în sindroamele cronice mieloproliferative. Pacienții (16) cu asemenea sindroame NHL (limfom non-hodgkinian) și MPS (sindrom mieloproliferativ) dețin o linie germlinală în care au configurat cele 3 gene.

Alterările structurale ale genelor NF- κ B2, c-rel și bcl2 sunt evenimente rare care nu contribuie la transformarea limfoidă sau mieloidă la majoritatea subiecților cu NHL și MPS (38).

Cum s-a menționat, familia factorilor de creștere NF- κ B/rel induce numeroase gene implicate în răspunsul imun și inflamator. Folosirea unui model murin al inflamației pulmonare indusă de alergeni și hiperactivarea căilor aeriene urmărește ideea dacă c-rel promovează astmul alergic.

S-a crezut că c-rel care se exprimă în celulele limfoide este foarte important pentru activarea limfocitelor. Ca răspuns la sensibilizarea alergică, soarecii c-rel (-/-) nu dezvoltă inflamație pulmonară marcată iar în lavajul bronhiolar eozinofilele sau IgE serice totale nu sunt crescute. Pe de altă parte, deficiența în c-rel previne inducția hiperactivării căilor aeriene.

Soarecii de tip-salbatic tratați cu alergeni relevă cuplarea DNA la locusul consens din NF- κ B.

Expresia chemokinei MCP-1 este alterată la soarecii c-Rel (-/-) tratați cu alergeni. La acești soareci, chemokina care este reglată de NF- κ B scade față de soarecii tip-salbatic tratați cu alergeni. Creșterea factorilor de transcriere NF- κ B/rel după aplicarea alergenilor la soarecii de tip-salbatic și scăderea reacției la alergeni la cei deficienți în c-rel sugerează că c-rel promovează inflamația alergică.

Alterarea expresiei chemokinei pulmonare MCP-1 la soarecii c-rel (-/-) poate inhiba inflamația pulmonară și hiperreactivitatea căilor aeriene indusă de alergeni (39).

Yersinia enterocolitica enteropatogenă este o bacterie țintă pentru producerea chemokinei IL-8 proinflamatorie, o importantă chemokina pentru recrutarea leucocitelor polimorfonucleare (PMN). Bacteria este rezistentă la fagocitarea de către PMN, și de asemenea, este importantă pentru recrutarea acestora fiind parte a strategiei ei patogenice.

Aminoacizii carboxil-terminali 195 ai proteinei de membrană legați la paturi de latex sunt suficienți pentru a determina producția de IL-8. S-a identificat regiunea optimă a răspunsului promotorului IL-8 la invazia bacteriană și la elementele de control ce răspund la aceasta. Activarea promotorului IL-8 indusă de invazia bacteriană este mediată de elemente identificate ca fiind NF- κ B. La locul NF- κ B cuplează preferențial homodimerii Rel p65-p65,

dar si unii heterodimeri p50-p65 ca raspuns la stimulul bacterian.

Activarea indusa de invazie se coreleaza cu degradarea I κ B-alfa si cu inhibarea NF- κ B de catre inhibitorii specifici ai activarii, care blocheaza secretia IL-8 indusa de invazie. Aceasta nu depinde însa, de preluarea bacteriei si este independenta de kinaza P13 functionala.

Se descriu în premiera bazele moleculare ale productiei IL-8 determinata de bacteria enteropatogena. Infectia poate avea implicatii pentru desemnarea unei noi terapii directionata contra acestui enteropatogen (40).

*
* *

Factorul de transcriere NF- κ B de la vertebrate este indus de peste 150 diferiti stimuli. În stare activa el participa la controlul transcrierii a peste 150 gene tinta. O larga varietate de bacterii si virusuri activeaza NF- κ B si deoarece acesta regleaza expresia citokinelor inflamatorii, chemokinelor imunoreceptorilor si moleculelor de adeziune celulara, este numit “mediator central al raspunsului imun uman”. În plus, activarea lui blocheaza apoptoza în câteva tipuri celulare. Asocierea raspunsului la stres cu caile antiapoptotice prin folosirea unui factor de transcriere comun, poate duce la supravietuirea îndelunga a celulelor, dupa stres (41).

La mamifere, proteina Rel/NF- κ B reprezinta o mica familie de factori transcriptionali care servesc ca reglatori pivotali ai raspunsului imun, inflamator si de faza acuta. Caile ce duc la activare converg catre un complex molecular citoplasmatic unic ce reuneste câteva kinaze si molecule reglatoare.

Experimentele de tintire a genelor au identificat noi roluri pentru NF- κ B în dezvoltarea si maturarea precursorilor hematopoietici ca si în functia celulelor mature din sistemul imunitar. Astfel sunt: reglarea ciclului celular, controlul supravietuirii celulelor si legatura între sistemul imunitar înnascut si adaptativ.

Disturbarea functiei Rel/NF- κ B este asociata cu variate patologii printre care bolile inflamatorii cronice si neoplazice ofera o baza pentru strategiile terapeutice ale acestora (42).

Rel/NF- κ B (Summary)

Rel/NF- κ B is a family of transcription factors proteins which acts on numerous genes implicated in organism defence. The viral partner of c-Rel protooncogene is v-Rel, which produces activ reticuloendoteliosis, leukemias and lymphomas. RelA(p65), one of dimeric constituent of NF- κ B, is complexed with RelB (p50), complex which is bloked in cytoplasm by inhibitory protein I κ B. After I κ B degradation, NF- κ B enters in nucleus where it acts on target genes.

Rel/NF- κ B has antiapoptotic functions in relationships with BCL family proteins. The genes or proteins NF- κ B alterations may disturb cellular cycle, the situations in which appear different diseases like arthritis, inflammations, immunodeficiency or neoplasms.

1. Perkins ND. The Rel/NF- κ B family: friend end foe. Trends. Biochem. Sci. 2000, 25(9),434-40.
2. de Martin R, Schmidt JA, Hofer-Warbinek R, The NF- κ B/Rel family of transcription factors in oncogenic transformation and apoptosis. Mutant. Res. 1999, 437(3), 231-43.
3. Chen FE, Ghosh G, Regulation of DNA binding by Rel/Nef- κ B transcription factors: structural views.

- Oncogene 1999, 18(49), 6845-52.
4. Epinat JC, Gilmore TD, Diverse agents act at multiple levels to inhibit the Rel/NF- κ B signal transduction pathway. *Oncogene* 1999, 18(49), 6896-909.
 5. Wilhelmsen KC, Temin HM. Structure and Dimorphism c-rel (Turkey), the Cellular Homolog to the Oncogene of Reticuloendotheliosis Virus Strain T. *J. Virol.* 1984, vol.49, nr.2, 521-529.
 6. Wilhelmsen KC, Eggleton K, Temin HM, Nuclei Acid Sequences of the Oncogene v-rel in Reticuloendotheliosis Virus Strain T and its Cellular Homolog, the Proto-oncogene c-rel. *J. Virol.* 1984, 52(1), 172-182.
 7. Gilmore TD, Temin HM, v-rel Oncoproteins in the nucleus and in the cytoplasm transform chicken spleen cells. *J. Virol.* 1988, 62(3), 703-714.
 8. Rice NR, Copeland TD, Simek S, Oraszlon St, Golden RV. Detection and characterization of the protein encoded by the v-rel oncogene. *Virology*, 1986, 149(2), 217-229.
 9. Lim MY, Davis N, Zhang J, Bose HR, The v-rel oncogene products is complexed with cellular proteins including its proto-oncogene product and heat shock protein 70. *Virology*, 1990, 175(1), 149-160.
 10. Xu X, Gelinac C, The v-rel Oncoprotein Complexes with New Rel- and RelA-Related Proteins in Transformed Cells. *Virology*, 1995, 207, 362-368.
 11. Gilmore TD. Multiple mutations contribute to the oncogenicity of the retroviral oncoprotein v-Rel. *Oncogene*, 1999, 18(49), 6925-37.
 12. Epinat JC, Kazandjian D, Harkness DD, Petros S, Dave J, White DW, Gilmore TD. Mutant envelope residues confer a transactivation onto N-terminal sequences of the v-Rel oncoprotein. *Oncogene*, 2000, 19(5), 599-607.
 13. Epinat JC, Dvorin EL, Gilmore TD. Envelope-dependent transactivation by the retroviral oncoprotein v-Rel is required for efficient malignant transformation of chicken spleen cells. *Oncogene*, 2000, 19(28), 3131-7.
 14. Rayet B, Gelinac C, Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene*, 1999, 18(49), 6938-47.
 15. Zhao MK, Wang Y, Murphy K, Beckerle MC, Gilmore TD, LIM domain-containing protein trip6 can act as a coactivator for the v-Rel transcription factor. *Gene Expr.* 1999, 8(4), 207-17.
 16. Kim DV, Sovak MA, Zaneski G, Nonet G, Romieu-Mourez R, Lau AW, Hafer LJ, Yaswen P, Stampfer M, Rogers AE, Russo J, Sonenshein GE. Activation of NF- κ B/Rel occurs early during neoplastic transformation of mammary cells. *Carcinogenesis*, 2000, 21(5), 871-9.
 17. Tai DI, Tsai SL, Chang YH, Huang SN, Chen KS, Liaw YF. Constitutive activation of nuclear factor κ B in hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 2000, 89(11), 2274-81.
 18. Rosenfeld ME, Prichard L, Shiojiri N, Fausto N. Prevention of hepatic apoptosis and embryonic lethality in RelA/TNFR-1 double knockout mice. *Am. J. Pathol.* 2000, 156(3), 997-1007.
 19. Chapman NR, Perkins ND. Inhibition of the RelA(p65) NF- κ B subunit by Egr-1. *J. Biol. Chem.* 2000, 275(7), 4719-25.
 20. Anto RJ, Maliekal TT, Karunakaran D. L-929 cells harboring ectopically expressed RelA resist curcumin-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2000, 275(21), 15601-4.
 21. Lin L, DeMartino GN, Greene WC. Cotranslational dimerization of the rel homology domain of NF- κ B1 generates p50-p105 heterodimers and is required for effective p50 production. *EMBO J.* 2000, 19(17), 4712-22.
 22. Pettit AR, MacDonald KP, O'Sullivan B, Thomas R. Differentiated dendritic cells expressing nuclear RelB are predominantly located in rheumatoid synovial tissue perivascular mononuclear cell aggregates. *Arthritis Rheum.* 2000, 43(4), 791-800.
 23. Barton D, HogenEsch H, Weih F. Mice lacking the transcription factor RelB develop T cell-dependent skin lesions similar to human atopic dermatitis. *Eur. J. Immunol.* 2000, 30(8), 2323-32.
 24. Neumann M, Fries H, Scheicher C, Keikavoussi P, Kolb-Maurer A, Brocker E, Serfling E, Kampgen E. Differential expression of Rel/NF- κ B and octamer factors is a hallmark of the generation and maturation of dendritic cells. *Blood*, 2000, 95(1), 277-85.
 25. Luque I, Zong WX, Chen C, Gelinac C. N-terminal determinants of I κ B alpha necessary for the cytoplasmic regulation of c-Rel. *Oncogene*, 2000, 19(9), 1239-44.
 26. Phelps CB, Sengchanthalangsy LL, Malek S, Ghosh G. Mechanism of κ B DNA binding by Rel/NF- κ B dimers. *J. Biol. Chem.* 2000, 275(32), 24392-9.
 27. Wang D; Westerheide SD, Hanson JL, Baldwin AS Jr. TNF α -Induced Phosphorylation of RelA/p65 on

- Ser529 is Controlled by Casein Kinase II. *J. Biol. Chem.* 2000, (epub ahead of print).
28. Fognani C, Rondi R, Romano A, Blasi F, cRel-TD kinase: a serine/threonine kinase bunding in vivo and in vitro c-Rel and phosphorylateing its transactivation domain. *Oncogene*, 2000, 19(18), 2224-32.
 29. Tam Wf, Lee LH, Davis L, Sen R. Cytoplasmic sequestration of rel proteins by IkappaBalpha requires CRM1-dependent nuclear export. *Mol. Cell. Biol.* 2000, 20(6), 2269-84.
 30. Chen C, Edelman LC, Gelinas C. The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Mol. Cell. Biol.* 2000, 20(8), 2687-95.
 31. Sohur US, Dixit MN, Chen CL, Byrom MW, Kerr LA. Rel/NF-kappaB represses bcl-2 transcription in pro-B lymphocytes. *Gene. Expr.* 1999, 8(4), 219-29.
 32. Ku PT, You M, Bose HR Jr. Role and regulation of Rel/NF-kappaB activity in anti-immunoglobulin-induced apoptosis in WEHI-231 B lymphoma cells. *Cell. Signal.* 2000, 12(4), 245-53.
 33. Sohur US, Chen CL, Hickes DJ, Yull FE, Kerr LD. Nuclear factor-kappaB/Rel is apoptogenic in cytokine withdrawal-induced programmed cell death. *Cancer. Res.* 2000, 60(5), 1202-5.
 34. Schwabe RF, Bennett BL, Manning AM, Brenner DA, Differential role of IkappaB kinase 1 and 2 in primary rat hepatocytes. *Hepatology*, 2001, 33(1), 81-90.
 35. Campbell IK, Gerondakis S, O'Donnell K, Wicks IP. Distinct roles for the NF-kappaB1 (p50) and c-Rel transcription factors in inflammatory arthritis. *J. Clin. Invest.* 2000, 105(12), 1799-806.
 36. Lehmann T, Nguyen LQ, Handel ML. Synovial fluid induced nuclear factor-kappaB DNA binding in a monocytic cell line. *J. Rheumatol.* 2000, 27(12), 2769-76.
 37. Maruyama N, Hirano F, Yoshikawa N, Migita K, Tanaka H. Thrombin stimulates cell proliferation in human fibroblast-like synoviocytes in nuclear factor-kappaB activation and protein kinase C mediated pathway. *J. Rheumatol.* 2000, 27(12), 2777-85.
 38. Munzert G, Kreitmeier S, Bergmann L. Normal structure of NFKB2, C-REL and BCL-3 gene loci in lymphoproliferative and myeloproliferative disorders. *Leuk. Lymphoma*, 2000, 38(3-4), 395-400.
 39. Donovan CE, Mark DA, He HZ, Liou HC, Kobzik L, Wang Y, De Sanctis GT, Perkins DL, Finn PW. NF-kappa B/Rel transcription factors: c-Rel promotes airway hyperresponsiveness and allergic pulmonary inflammation. *J. Immunol.* 1999, 163(12), 6827-33.
 40. Schulte R, Grassl GA, Preger S, Fessele S, Jacobi CA, Schaller M, Nelson PJ, Autenrieth IB. *Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers. *FASEB J.* 2000, 14(11), 1471-84.
 41. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, 1999, 18(49), 6853-66.
 42. Grossmann M, Nakamura Y, Grumont R, Gerondakis S, New insights into the roles of Rel/NF-kappa B transcription factors in immune function, hemopoiesis and human disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 1999, 31(10), 1209-19.

GENA EWS (Sarcomul EWING)

Oncoproteina EWS este caracteristica celulelor tumorale ale sarcomului Ewing - o tumora maligna cu structura polimorfa-. În multe cazuri de cancer, rearanjarea cromosomilor specifici tumorali induce aparitia de produse himerice care au abilitatea de a transforma celulele.

Tumorile care apartin familiei Ewing prezinta translocatii recurente constând în fuziunea genei EWS din cromosomul 22q 12 cu diferiti membrii ai factorilor de transcriere FLI-1, ERG, ETV-1, E1AF si FEV. Unii din acesti factori sunt membrii si ai familiei ETS. Transcriptele hibrid cele mai frecvente în celulele tumorale Ewing sunt: EWS/FLI-1. Aceasta gena de fuziune rezultata din translocatia t(11;22) joaca un rol cheie în patogeneza sarcomului Ewing.

Transcripte hibrid s-au detectat si în celulele tumorale gigante dintr-un neoplasm de os, cu caracter intermediar între leziunile benigne si maligne. În 13 din 15 cazuri de asemenea tumori cu celule gigante, prin tehnica PCR "semi-nested" s-au detectat produse himerice dupa doua cicluri de amplificare. Prezenta acestor produse a fost confirmata în 3 din 8 culturi primare din aceste tumori, în care s-a detectat acelasi tip de transcripte hibrid observata si în proba de tumori primare. Secventierea acestor transcripte demonstreaza prezenta componentelor EWS si FLI în produsele himerice.

Aspectele mentionate mai sus ofera un model de studiu pentru mecanismele formarii genelor de fuziune EWS/FLI în tumorile de origine mezenchimala (1). Gena de fuziune EWS/FLI poate functiona ca un factor de transcriere cu aceeasi specificitate de cuplare la DNA ca si FLI-1. Atât EWS cât si gena de fuziune se pot asocia cu holoenzima polimeraza RNA II, ca si cu SF-1 (factor de procesare esential).

Proteina U1C, una din cele trei proteine mici nucleare U1,- specifice ribonucleoproteinelor interactioneaza cu EWS si EWS/FLI, atât in vitro cât si in vivo. De asemenea, U1C interactioneaza si cu alti factori de procesare, intervenind astfel în stadiile timpurii ale dezvoltarii. Coexpresia EWS/FLI-U1C represeaza transactivarea mediata de gena hibrid sugerând ca aceasta interactiune poate avea semnificatii functionale. De aici concluzia ca U1C ca proteina de procesare poate functiona si în reglarea transcriptionala. Se sugereaza astfel ca, gena EWS si gena hibrid EWS/FLI pot functiona atât în procesele de transcriere cât si în cele posttranscriptionale (2).

Familia tumorilor sarcomului Ewing include si tumora neuroectodermica periferica, definita genetic prin translocatii cromosomiale specifice care conduc la fuziunea genei EWS cu un membru al familiei genelor de transcriere ETS cum este FLI-1 (90-95%) sau ERG (5-10%). Tipul cel mai comun al transcrierii prin fuziune este tipul 1 EWS/FLI -1 care este asociat cu o prognoza favorabila, deoarece codifica un activator functional mai slab comparativ cu alte tipuri de fuziune. Indexul proliferarii Ki-67 este mai înalt în cazul EWS/ERG decât în cazul EWS/FLI-1 (3).

Translocatia t(11;22) (q24;q12) este un marker molecular specific pentru tumorile familiei sarcomului Ewing. Pe baza acestei translocatii se presupune ca unele neuroblastoame olfactive apartin, de asemenea, acestei familii. Totusi, din 13 asemenea tumori numai una a prezentat gena de fuziune EWS/FLI-1 (4).

Rearanjarea genei EWS cu FLI-1 apare timpuriu în patogeneza tumorilor din familia sarcomului Ewing, deoarece aberatia cromosomiala este patognomica pentru sarcomul Ewing. Proteina adenovirala Ad.5 E1A induce acest rearanjament în numeroase tipuri celulare, ceea

ce sugereaza un rol etiologic al agentilor virali în generarea aberatiilor cromosomiale oncogenice, dar în acelasi timp, poate avea un impact semnificativ pentru folosirea vectorilor adenovirali în terapia genica. Pe de alta parte, se arata absenta produselor himerice EWS-FLI-1 din culturi pe termen scurt sau lung de linii stabil transformate de adenovirus, ca si din liniile care exprima tranzitoriu E1A. Se demonstreaza si absenta lui E1A din tumorile familiei sarcomului Ewing. De aici, concluzia ca adenovirusul nu intervine în patogeneza acestei tumori si deci, rearanjarea genelor specific tumorale nu este influentata de adenovirus (5).

O alta translocatie t(12;22) constatata frecvent în sarcomul cu celule clare induce fuzionarea genei pentru proteina sarcomului Ewing cu factorul activator al transcrierii (ATF-1). Experimentele cu anticorpi anti-ATF-1 arata ca proteina de fuziune EWS/ATF-1 are un rol direct în mentinerea viabilitatii celulelor acestui tip de sarcom si, de asemenea, ca anticorpii ar putea fi folositi pentru blocarea proteinei tumorale (6).

Oncoproteina celulara a sarcomului Ewing (EWS) si ATF sunt markeri înalt specifici pentru melanomul malign al structurilor moi, fiind în acelasi timp un potent activator al câtorva promotori ce induc cAMP, asa cum este promotorul somatostatin. S-a explorat în celulele melanomului potentialul acestui promotor asupra expresiei toxice a genelor. Când în aceste celule se introduce gena de fuziune somatostatin-TK HSV, aceasta le confera o puternica sensibilitate specifica celulei, la ganciclovir –un prodrog citotoxic-. Aceasta sensibilitate presupune prezenta locului ATF-binding în promotorul somatostatin sugerând ca expresia genei toxice este cauzata de hibridul EWS/ATF-1. Astfel se releva potentialul de utilizare a promotorului somatostatin pentru terapia citotoxica a prodrogului în celulele melanomului malign (7).

Prezenta unor domenii SH3 de interactiune în terminusul NH₂ al EWS creste potentialul hibridului EWS/WT-1 (WT-1 este o gena supresoare de tumori). Se constata ca EWS/WT-1 se poate asocia cu domeniul SH3 al câtorva proteine inclusiv v-src. Expresia ectopica a v-src fosforileaza in vivo EWS/WT-1 si amplifica abilitatea de transactivare a domeniului NH₂-terminal EWS. Alterarea structurii domeniilor v-src SH2 sau SH3 produce mutante care nu pot interactiona cu EWS/WT-1 si nici nu pot creste capacitatea transcriptionala a EWS.

Se sugereaza posibilitatea ca unele proprietati transcriptionale ale EWS/WT-1 ar putea fi reglate pe o cale de semnalizare citoplasmatica. In vivo EWS/WT-1 este fosforilata la reziduurile serina si tirozina, ceea ce afecteaza cuplarea la DNA. Poate, de asemenea, interactiona cu c-abl prin modificarea unor reziduuri de tirozina. Fosforilarea tirozinei EWS/WT-1 de catre c-abl regleaza negativ capacitatea sa de cuplare la DNA. Prin urmare, activitatea biologica a EWS/WT-1 este intim legata de statutul fosforilarii sale (8, 9).

Tot mai frecvent se constataca diferite clase de proteine care cu pleaza la DNA, asa cum sunt ATF-1, WT-1 si CHOP, fuzioneaza cu EWS în diferite fenotipuri tumorale. Astfel, s-a detectat o noua translocatie si anume translocatia t(1;22) (q35.1;q12) cu gena numita ZSG (Zinc finger Sarcoma Gene) ce codifica proteina Zinc-finger- Cys₂-His₂- care contine un domeniu transcriptional represor-like la N-terminus. Rearanjarea implica intronul 8 al EWS si exonul 1 al ZSG creind o secventa lineara ce contine domeniul transactivator al EWS fuzionat cu domeniul Zinc-finger al ZSG. Acestui produs îi lipseste domeniul represor transcriptional la N-terminus al ZSG (10).

S-a demonstrat experimental actiunea proteinelor de fuziune EWS cu un produs ETS. In vitro, liniile policlonale stabilizate exprima doua diferite gene EWS-ETS; fie EWS/FLI-1, fie EWS/ETV-1, care induc expresia genei citocheratinei 15. Injectate la soarecii

SCID-CB-17, ambele gene de fuziune induc si schimbari morfologice, histologice si ultrastructurale în fibroblastele NIH 3T3. Celulele native cu morfologie fusiforma se transforma în celule poligonale cu rata N/P înalta si care exprima abundent citocheratina. Acest model murin creat în celulele NIH 3T3 derivate din mezenchim releva noi caractere ale diferentierii neuroectodermale si epiteliale (11). Se apreciaza astfel ca, translocatiile cromosomiale specifice sarcomului Ewing induc fuzionarea genei EWS cu un subset al membrilor familiei factorilor de transcriere ETS, cea mai comuna fiind gena FLI-1 si mai putin frecvent, genele ERG, ETV-1, E1A-F sau FEV. Aceste proteine de fuziune se crede ca actioneaza ca factori de transcriere aberanti ce cupleaza la DNA prin domeniile de cuplare la DNA-ETS.

Recent s-a relatat ca TGF-beta RII, o gena supresoare de tumori, este o tinta a proteinei de fuziune EWS/FLI-1. Analiza efectelor proteinelor fuzionate EWS-ETV-1 si EWS-ERG asupra expresiei genei TGF-beta RII arata ca în celulele NIH 3T3 exista nivele scazute de mRNA si proteina ale acestei gene, ca de altfel si în liniile celulare cu sensibilitate redusa la TGF-beta. Aceste gene de fuziune supreseaza promotorul TGF-beta RII si activitatea indusa de FLI-1, ERG sau ETV-1. Represia transcriptionala a genei TGF-beta RII reprezinta o tinta importanta a oncogenelor EWS/FLI-1, EWS-ERG sau EWS-ETV-1 si deci, fuziunea proteinelor EWS-ETS poate functiona ca forma dominant negativa a factorilor de transcriere ets (12).

Tumorile Ewing sunt malignitati umane primare ale tesuturilor dure (os) si moi, caracterizate la cel putin 95% din cazuri, prin transcripte specifice de fuziune cu originea în translocatiile cromosomiale recurente. Protocolul clinic pentru tumorile Ewing cu înalt risc de metastazare include chemoterapia si radioterapia cu doze înalte, urmate de reinfuzia cu celule stem din sângele periferic (PBSC).

EWS

Sarcoma Ewing

(Summary)

Oncoproteins which are considered to induce Ewing sarcoma are produced by Ews fused with ETS family genes after chromosomal translocations. The most frequent fusion in Ewing sarcoma is EWS/FLI-1, which appears after t(11;22). Also, there are chimeric products with transforming potential after fusion of EWS gene with ERG, ETV-1, and ATF-1. The combined proteins act on some targets, e.g. TGF-beta R which believe to be a tumoral repressor.

1. Scotlandi K, Chano T, Benini S, Serra M, Manara MC, Cerisano V, Picci P, Baldini N. Identification of EWS/FLI-1 transcripts in giant-cell tumor of bone. *Int. J. Cancer*, 2000, 87(3), 328-335
2. Knoop LL, Beker SJ. The splicing factor U1C represses EWS/FLI-mediated transactivation. *J. Biol. Chem.* 2000, 275(32), 24865-71.
3. De Alava, Paniyo A, Antonescu CR, Huvos AG, Pardo-Mindan FJ, Barr FG, Ladanyi M. Association of EWS-FLI1 type 1 fusion with lower proliferative rate in Ewing's sarcoma. *Am. J. Pathol.* 2000, 156(3), 849-55.
4. Kumar S, Perlman E, Pack S, Davis M, Zhang H, Meltzer P, Tsokos M. Absence of EWS/FLI1 fusion in olfactory neuroblastomas indicates these tumors do not belong to the Ewing's sarcoma family. *Hum. Pathol.* 1999, 30(11), 1356-60.
5. Kovar H, Fallaux FJ, Pribill I, Jugovic D, Bartl S, Ambros PF, Aryee DN, Wiegant JC, Hoeben RC. Adenovirus E1A does not induce the Ewing tumor-associated gene fusion EWS/FLI1. *Cancer Res.* 2000,

- 60(6), 1557-60.
6. Bosilevac JM, Olsen RJ, Bridge JA, Hinrichs SH. Tumor cell viability in clear cell sarcoma requires DNA binding activity of the EWS/ATF1 fusion protein. *J. Biol. Chem* 1999, 274(49), 34811-8.
 7. Lung RW, Lee KA. The cellular oncogene EWS/activating transcription factor 1 is unable to activate adenovirus-borne promoters: implications for cytotoxic prodrug therapy of malignant melanoma of soft parts. *Cancer Gene Ther* 2000, 7(3), 396-406.
 8. Kim J, Lee JM, Branton PE, Pelletier J. Modulation of EWS/WT1 activity by the v-Src protein tyrosine kinase. *FEBS Lett.* 2000, 474(2-3), 121-8.
 9. Kim J, Lee JM, Branton PE, Pelletier J. Modification of EWS/WT1 functional properties by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96(25), 14300-5.
 10. Mastrangelo T, Moden P, Torielli S, Bullrich F, Testi MA, Mezzelani A, Radice P, Azzareli A, Pilotti S, Croce CM, Pierotti MA, Sozzi G. A novel zinc finger gene is fused to EWS in small round cell tumor. *Oncogene* 2000, 19(33), 3799-804.
 11. Teitell MA, Thompson AD, Sorensen PH, Shimada H, Triche TJ, Denny CT. EWS/ETS fusion genes induce epithelial and neuroectodermal differentiation in NIH 3T3 fibroblasts. *Lab. Invest.* 1999, 79(12), 1535-43.
 12. Im YH, Kim HT, Lee C, Poulin D, Welford S, Sorensen PH, Denny CT, Kim SJ. EWS-FLT1, EWS-ERG and EWS-ETV1 oncoproteins of Ewing tumor family all suppress transcription of transforming growth factor beta type II receptor gene. *Cancer Res.* 2000, 60(6), 1536-40.
 13. Montanaro L, Pession A, Trere D, Vici M, Prete A, Paolucci G, Derenzini M. Detection of EWS chimeric transcripts by nested RT-PCR to allow reinfusion of uncontaminated peripheral blood stem cells in high-risk Ewing's tumor in childhood. *Hematologica* 1999, 84(11), 1012-5.

PROTOONCOGENA C-MAF

Protooncogenă c-maf codifică un factor de transcriere specific limfocitelor T helper linia Th2 activând *in vitro* promotorul genei IL-4. *In vivo* hiperexpresia c-maf promovează aceeași linie Th2 careia îi determină producția crescută de citokine Th2 și de imunoglobuline IgG1 și IgE dependent de IL-4. Hiperexpresia acestor Ig-uri la soarecii transgenici CD4 cu promotor / c-maf este dependentă de IL-4, ceea ce nu se constată la animalele deficiente în IL-4 (-/-). Expresia ectopică a c-maf în celulele Th1 mature nu le conferă acestora abilitatea de a produce IL-4, dar induce în schimb, scăderea producției de IFN-gamma. Se sugerează astfel că, c-maf promovează diferențierea limfocitelor Th2 prin mecanisme dependente de IL-4 și, de asemenea, că atenuează diferențierea limfocitelor Th1 prin mecanisme independente de citokinele elaborate de celulele Th2 (1).

În celulele tip Th2 care produc IL-4, această interleukină promovează diferențierea limfocitelor T CD4 + naive. Există date care susțin ideea că factorul de transcriere c-maf direcționează expresia țesut-specifică a IL-4. Astfel s-a elucidat rolul lui c-maf *in vivo* prin examinarea producției de citokine la soarecii c-maf (-/-). La aceste animale, limfocitele T CD4 + și limfocitele T-NK sunt marcate deficitar în producția de IL-4. Totuși, soarecii produc nivele normale de IL-13 și IgE, iar când limfocitele T c-maf (-/-) se diferențiază în prezența IL-4 exogenă, ele produc nivele aproximativ normale de alte citokine tip Th2. Se susține că c-maf *in vivo* exercită o funcție critică și selectivă în transcripția genei IL-4 (2).

Încă nu sunt deplin elucidate mecanismele transcripționale care conduc la orientarea progenitorilor CFU-MG către diferențierea în liniile celulare respective (granulocite sau monocite).

S-a demonstrat că factorii de transcriere c-maf și c-myb interacționează fizic în celulele mieloidă pentru a forma complexe care transactivează genele țintă c-myb prin cuplarea directă la locurile myb. Aceste complexe apar într-un model reglat în timpul dezvoltării cu “vârful” în stadiul de promielocit, sau în sistemul model celular prezent imediat după inducția diferențierii monocitelor. Nivele ridicate de proteina c-Maf duc la creșteri marcate a complexelor myb-maf și, de asemenea, la acumularea celulelor monocite/macrofage urmată de o eventuală apoptoză. Analiza tintelor care ar putea media aceste schimbări fenotipice arată că c-maf joacă un rol cheie în dezvoltarea celulelor mieloidă, printr-un mecanism dual (3).

Pentru a elucidă efectele proteinelor Maf asupra transactivării genelor specific-mieloidă în celulele mieloidă, s-a testat abilitatea protooncogenei c-maf de a influența transcrierea genei reporter CD13/APN dependentă de ets-1 și myb. Expresia lui c-maf în mieloblastele imature umane inhibă în proporție de 85-95% activitatea genei reporter și reclamează cuplarea ets și c-myb, dar nu a lui maf. Inhibarea cu c-maf a expresiei CD13/APN se corelează cu abilitatea sa de a se asocia fizic cu c-myb.

În timp ce nivelele mRNA c-maf și ale proteinei rămân constante în timpul diferențierii mieloidă, formarea complexelor myb –maf este reglată de nivelele cele mai înalte în timpul dezvoltării liniilor mieloidă imature și de nivelele marcate scăzute în liniile târzii. Astfel expresia genei CD13/APN sugerează că modularea activității c-myb via c-maf poate fi un mecanism important în controlul transcrierii genei în timpul dezvoltării celulelor hemopoietice (4).

Factori de transcriere precum Pax6, Sox1 și L-maf reglează dezvoltarea cristalinului.

Soarecii c-maf (-/-) sunt microftalmici datorita defectelor cristalinului manifestate în special prin alungirea insuficienta a “fibrelor” (celule foarte alungite cu aspect de fibra) sale posterioare. Afectarea marcata a expresiei genei cristalinului se explica prin inabilitatea proteinei c-Maf de a transactiva promotorul acestei gene. De aici concluzia ca c-maf este reclamata pentru diferentierea cristalinului vertebratelor (5).

S-au studiat transcriptele maf-1 si maf-2 în cristalinul de sobolan în zilele a 13-a si a 16-a de dezvoltare embrionara (E13 si E16) prin hibridizare in situ folosindu-se probe de RNA unicatenar. Proteinele codificate de gena maf-2 s-au studiat imunohistochimic în cristalinele embrionare (E12, E13, E16 si E19) si în cele postnatale (P14 si P90). În epiteliul cristalinelor embrionare s-a detectat mRNA maf-1 iar în “fibrelor” cristalinelor, un mRNA maf-2 distribuit difuz. Tot imunohistochimic s-a detectat maf-2 în aproape toti nucleii celulelor “pit” ale cristalinelor din ziua a 12-a. În zilele E13, E16 si E19 celulele epiteliale nu sunt totusi imunoreactive dar nucleii “fibrelor” reactioneaza puternic. În ziua P14 nucleii contin proteina Maf-2 în celulele ecuatorului cristalinului, însa la animalele cu vârsta de 3 luni proteina nu mai este detectabila.

În cristalinul sobolanilor, antiserul anti-Maf-2 reactioneaza cu o singura proteina de aproximativ 39 kDa, demonstrându-se astfel reglarea spatiala si temporala a expresiei genei maf si participarea acesteia la reglarea transcriptionala în timpul dezvoltarii cristalinului la aceste animale (6).

Dereglarea oncogenelor prin translocatia la un locus IgH (14 q32) sau IgL (kappa, 2 p11sau lambda 22 q11) este frecventa în patogeneza tumorilor cu limfocite B. Translocatia implica un locus IgH si locuri cromosomiale întâmplatoare care apar în majoritatea mieloamelor multiple. Analiza a 21 mieloame multiple releva prezenta unei noi translocatii cariotipic silentioasa t (14; 16) (q32.3; q23) în cinci linii celulare cu punctele de rupere în cazul a 4 din aceste linii dispersate pe o regiune centromerica de aproximativ 500 kb catre protooncogenul c-maf la 16 q23. Cealalta linie (a 5-a) arata translocatia t (16; 22) (q23; q11) cu punctul de rupere telomeric la c-maf, asa încât punctele de rupere în translocatiile din aceste 5 linii de mielom multiplu sunt în c-maf. De asemenea, numai aceste 5 linii hiperexprima mRNA c-maf. Dereglarea lui c-maf prin translocatie reprezinta expresia selectiva a unei alele c-maf în doua linii cu translocatii. Mielomul multiplu este prima tumora umana în care factorul de transcriptie bazic zipper c-maf functioneaza ca o oncogenă (7).

PROTOONCOGENA c-MAF

(Summary)

Overexpression of c-maf gene induces Th lymphocytes Th2-type to synthesize cytokines typical for this line, among which IL-4 is dominant one. So, in consequence, there are increased productions of IgG1 and IgE. The Maf protein acts in complex with Myb protein and this complex induces monocytic differentiation. The protooncogenes maf-1 and maf-2 are implicated in regulation of mammalian lens development. On the other hand, the translocations in c-maf gene of B lymphocytes suggest, for first time, their intervention in multiple myeloma induction.

1. Ho IC, Lo D, Glimcher LH. C-maf promotes T helper cell type 2 (Th2) and attenuates Th1 differentiation by both interleukin 4-independent mechanisms. *J. Exp. Med.*, 1998, 188 (10), 1859-66.
2. Kim JI, Ho IC, Grusby MJ, Glimcher LH. The transcription factor c-Maf controls the production of interleukin-4 but not other Th2 cytokines. *Immunity*, 1999, 10 (6), 745-51.
3. Hedge SP, Zhao J, Ashmun RA, Shapiro LH. C-Maf induces monocytic differentiation and apoptosis in bipotent myeloid progenitors. *Blood*, 1999, 94 (5), 1578-89.
4. Hedge SP, Kumar A, Kurschner C, Shapiro JH. c-Maf interacts with c-Myb to regulate transcription of an early myeloid gene during differentiation. *Mol. Cell Biol.*, 1998, 18(5), 2729-37.

5. Kim JI, Li T, Ho IC, Grusby MJ, Glimcher LH. Requirement for the c-Maf transcription factor in crystallin gene regulation and lens development. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA*, 1999, 96(7), 3781-5.
6. Yoshida K, Imaki J, Koyama Y, Harada T, Shinmei Y, Oishi C, Matsushima-Hibiya Y, Matsuda A, Nishi S, Matsuda H, Sakai M. Differential expression of maf-1 and maf-2 genes in the developing rat lens. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1997, 38 (12), 2679-83.
7. Chesi M, Bergsagel PL, Shonukan OO, Martelli ML, Brents LA, Chen T, Schrock E, Ried T, Kuehl WM. Frequent dysregulation of the c-maf proto-oncogene at 16q23 by translocation to an Ig locus in multiple myeloma. *Blood*, 1998, 91 (12), 4457-63.

GENA PAX

(Familia genelor “PAIRED BOX”)

Genele Pax codifica o familie de factori de transcriere din care multi au rol determinant în dezvoltarea animalelor. S-a caracterizat complementul genei Pax al coralului *Acropora millepora*, un cnidar anthozoar care ocupa o pozitie cheie în evolutia lumii animale. Astfel, la *Acropora m.* au fost identificate 4 gene Pax, Pax-Aam si Pax-Bam care corespund genelor identificate la alti cnidari si Pax-Cam si Pax-Dam unice pentru aceasta specie. Pax-Aam poate corespunde cu Pax-neuro de la *Drosophila*, iar Pax-Bam apartine indubitabil clasei Pax-2, 5, 8.

Domeniul Paired Pax-Bam cupleaza specific si preferential la locurile Pax-2, 5, 8. Pax-Cam poate corespunde genei Pax de la vertebratele ancestrale si foarte mult seamana cu Pax-6. Analiza structurii genomice a fiecarei gene Pax de la *Acropora m.* arata ca unele locuri procesate sunt plasate între genele coralilor si între acestea si genele Pax de la metazoarele triploblastice. Aceste date sustin monofilia familiei Pax indicându-le originea ancestrala (1).

Gena Pax-6 este un alt membru al familiei genelor ce contin “paired box” (Pax), gena ce codifica un activator transcriptional cu rol important în dezvoltarea sistemului nervos central (SNC). Diferentierea timpurie a SNC si neuroplasticitatea acestuia la adult sunt modulate de Pax-6. Ripitul functional înalt polimorfic AC/AG din regiunea 5' reglatoare a genei Pax-6, în cazul în care contine 29 sau mai multe ripituri, arata activitate semnificativ crescuta a promotorului, iar genotipul heterozigot releva nivele crescute de mRNA Pax-6 în tesutul cerebral uman. Variatia lungimii segmentului promotor reglator al genei Pax-6 (regiunea polimorfa Pax-6 LPR, Pax-6 gene-linked) confera susceptibilitate la epileptogeneza subtipurilor de epilepsie idiopatica generalizata (IGE). Totusi, distributia lui Pax-6 LPR nu difera semnificativ între control si subiectii cu IGE; astfel nu se probeaza variatia lungimii secventelor polimorfe din Pax-6 LPR în patogenia subtipurilor de IGE (2, 3).

În dezvoltarea creierului soarecilor s-a demonstrat ca dupa structurarea în ziua a 15-a (E15) a circuitului neuronal major hipocampo-mamilar, în zilele a 17-a si a 18-a (E17, E18) se formeaza tractusul mamilo-tegmentar pentru ca în ziua a 20-a (E20) circuitul neuronal sa atinga si talamusul. Daca gena Pax-6 este mutanta, tractusul mamilo-tegmentar se dezvolta, dar nu si cel mamilo-talamic. Anticorpi anti-Pax-6 administrati soarecilor tip-salbatic induc un cluster de celule imunoreactive în jurul punctului de bifurcatie a principalului tract mamilar, agregat celular care poate stopa formarea normala a tractusurilor eferente ale corpilor mamilari (4). Reactivitatea lui Pax se constata exclusiv în zona ventriculilor telencefalului în timpul perioadei fetale la soarecii normali. Gena are rol crucial în formarea cortexului cerebral intervenind în diferentierea si migrarea neuronilor (5).

Gena Pax-6 induce si dezvoltarea ectopica a ochilor sugerându-se ca ar fi o gena master de control a morfogenezei acestora. Se presupune ca variatele tipuri de ochi din lumea animala ar deriva dintr-un prototip comun monofiletic, printr-un mecanism numit evolutie intercelulara (6). Gena este astfel un factor de transcriere reglator, secvential-specific al multor gene ale cristalinelui, care contin box TATA. Gena Pax-6 poate interactiona cu proteine care cupleaza TATA, proteine ce sunt subunitati ce cupleaza DNA. De asemenea, gena Pax-6 interactioneaza si cu proteina Rb prin domeniul sau homeo (homeo-domain). În extractele din nucleul celulelor cristalinelui exista dovada existentei Rb/Pax-6 si astfel, gena detine pe lânga domeniul “paired” si un homeo-domeniu. Se concluda ca, Pax-6 cu proteina Rb intervine pe caile reglatoare ce controleaza diviziunea celulelor epiteliale ale cristalinelui

(fibriforme), exprimându-se în timpul dezvoltării acestuia (7).

Cum mentionam, Pax-6 este un reglator cheie în dezvoltarea ochiului; ea codifica doua tipuri majore de proteine care difera în structura domeniului paired, Pax-6 si Pax-6 (5a). Cresterea ratei Pax-6 (5a)/Pax-6 induce multiple defecte oculare la om. Hiperexpresia proteinei Pax-6 (5a) umana introdusa în cristalinul soarecilor transgenici duce la aparitia cataractei, ca anomalie în formarea celulelor fibriforme inclusiv ale capsulei cristalinelui, ca si în relatiile intercelulare. În acelasi timp însa, structura scheletului de actina este normala. S-a masurat în cristalinele soarecilor transgenici cu cataracta, capacitatea de reglare directa a proteinelor trunchiate Pax-6 si Pax-6 (5a) si abilitatea lor de cuplare la DNA integrinelor, constatându-se prezenta bateriilor de gene reglate direct sau indirect (8).

Liniile de soareci PD (cu Pax-5 trunchiata, lipsita de C-terminus, respectiv domeniul paired) plus HD (homeo-domeniu) exprima cataracte de variata severitate în partea posterioara nucleara si/sau corticala a cristalinelui. La soarecii transgenici cu oricare din gena Pax-6 trunchiata cristalinele sunt mai mici si mai hidratate decât cele normale. Se conchide ca prezenta proteinei Pax-6 trunchiata în cristalin este suficienta pentru a induce cataracte într-un mediu genetic tip- salbatic – desi sunt si alte numeroase mecanisme posibile (9).

Dupa lentectomie se constata existenta unei regiuni mai extinsa decât cea care regenereaza cristalinul ochiului de la Cynops sau Xenopus în care gena Pax-6 se exprima dominant. Dupa exprimarea acesteia urmeaza exprimarea genei Prox-1, în regiunea de regenerare a lentilei. Se presupune ca acelasi program ar exista si în constituirea lentilei embrionului. Dupa regenerare, expresia Pax-6 se restrânge în regiunea dorsala (10).

La pui Pax-6 se exprima în zilele 3, 10, 17 ale dezvoltării embrionare si la nivelul paturilor celulelor ganglionare si amacrine ale retinei si la 2-3 luni dupa eclozare. Pax-6 apare odata cu proliferarea diferitelor tipuri celulare din stratul ganglionar si nuclear intern dar își exprima potentialul pe o perioada extinsa în retina puilor de 2-3 luni dupa eclozare (11).

Se apreciaza ca Pax-6 se exprima si în timpul regenerării retinei la adultul de Cynops. Într-o retina normala, gena actioneaza în zona marginala ciliara, partea interna a paturii nucleare interne si în stratul ganglionar .

Dupa îndepartarea chirurgicala a retinei vizuale, celulele epiteliului pigmentar- sursa celulelor precursorare retiniene, celule care proliferaza – regenereaza o retina deplin functionala. La începutul regenerării retinei Pax-6 se exprima în toate celulele precursorare. În acest stadiu expresia Pax-6 este localizata într-o banda de celule de-a lungul marginii vitreale a retinei regenerate. În stadiul târziu al regenerării, când straturile s-au constituit, modelul expresiei Pax-6 devine similar cu cel al retinei normale (12).

Deci, gena Pax-6 codifica un reglator transcriptional implicat în dezvoltarea ochilor. În neuroretina, gena prezinta un promotor Po si P1, fiind reglata de un enhancer intragenic specific neuroretinei. Factorul Brn-36 care se exprima în variate regiuni ale creierului si retinei, interactioneaza cu enhancerul Pax-6, activând aceasta gena în celulele neuroretinei.

Se apreciaza astfel ca, activitatea genei Pax-6 este posibila numai în urma activării de catre factorul de transcriere Brn-36 (13).

Factorii de transcriere Pax-4 si Pax-6 sunt reglatori cheie implicati în dezvoltarea si diferentierea celulelor pancreatice. La soareci clonarea genei Pax-4 a evidentiat prezenta a 10 exoni. Experimentele demonstreaza însa ca, în ciuda similaritatilor celor doua gene ele nu se pot substitui una pe alta în tesuturile unde actioneaza.

Se crede ca Pax-4 poate actiona ca un factor “supresor” al lui Pax-6 datorita competitiei pentru locurile de cuplare si datorita potentialului transcriptional mai scazut (14).

În insulele pancreatice s-a detectat expresia genei Pax-2 gena prezenta în doua

izoforme procesate alternativ, Pax-2A si Pax-2B. Pax-2 cu “paired-domain” din pancreasul endocrin ar interveni în reglarea expresiei genei glucagonului(15).

În concluzie, genele Pax codifica o familie de factori de transcriere înalt conservati, cu rol cheie în reglarea dezvoltarii vertebratelor. Mutatiile în Pax-6 induc defecte oculare la muste, soareci si om, iar expresia sa ectopica poate determina aparitia ochilor ectopici compusi. De asemenea, mutatiile în alte gene Pax pot determina la muste insuficienta în diferentiere. Astfel, genele Pax-1 cauzeaza defecte ale scheletului, Pax-2 – defecte renale, Pax-3 sau Pax-7 defectiuni în crestele neurale, Pax-4 defecte ale celulelor pancreatice beta, Pax-5 – defecte ale celulelor B, Pax-8 defecte ale tiroidei iar Pax-9 disturba structurarea dintilor.

Desi genele clasei Pax sunt reclamate pentru diferentierea normala a unor organe la vertebrate,ele nu directionaza dezvoltarea acestora.

Pax-8 are totusi un rol în formarea rinichilor pronefrotici embrionari la *Xenopus*, dar pentru aceasta gena reclama cofactori din care unul poate fi factorul de transcriere homeobox X lim-1. Expresia ectopica a fiecarei gene în parte are efect moderat în modelarea pronefrosului, în timp ce coexpresia Pax-8-lim-1 duce la dezvoltarea rinichiului de 5 ori mai rapida. Acest efect este mai curând sinergic decât aditiv. Deci, Pax-8 cu lim-1 actioneaza într-o treapta timpurie în constituirea primordiului pronefrosului pentru ca ulterior dezvoltarea acestuia sa fie sustinuta de Pax-2 cu lim-1 (16).

Gena PAX

(Summary)

Pax-6 gene point out some considerable roles among its intervention in central nervous system regarding neurons' migration in the time of cerebral cortex formation and also in epilepsy. Another essential regulator role is in the eye morphogenesis and evolution, because its alteration leads to abnormally lens development and finally, to cataracte apparition. The gene intervenes in the formation and regeneration of neuroretine and also in embryonic kidney development. The Pax-6 gene can acts synergic or in competition with Pax-4 gene.

The transcriptional factors of Pax genes family were discovered in lower Methazoas, the reason for they are considered ancestral genes, indispensable for animal development.

1. Miller DJ, Hayward DC, Reece-Hoyes JS, Scholten I, CatmulJ, Gehring WJ, Callaerts P, Larsen JE, Ball EE. Pax gene diversity in the basal cnidarian *Acropora millepora* (Cnidaria, Anthozoa): implications for the evolution of the Pax gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, 97(9), 4475-80.
2. Stober G, Syagailo YV, Okladnova O, Jungkunz G, Knapp M, Beckmann H, Lesch KP, Functinal Pax-6 gene-linked polymorphic region: potential association with paranoid schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 1999, 45(12), 1585-91.
3. Sander T, Syagailo Y, Samochowiec J, Okladnova O, Lesch KP, Janz D. Association analysis of a regulatory promoter polymorphism of the Pax-6 gene with idiopathic generalizied epilepsy. *Epilepsy Res.* 1999, 36(1), 61-7.
4. Valverde F, Garcia C, Lopez-Mascaraque L, De Carlos JA. Development of the mammillothalamic tract in normal and Pax-6 mutant mice. *J. Comp. Neurol.* 2000, 419(4), 485-504.
5. Fukuda T, Kawano H, Osumi N, Eto K, Kawamura K. Histogenesis of the cerebral cortex in rat fetuses with a mutation in the Pax-6 gene. *Brain. Res. Dev. Brain. Res.* 2000, 120(1), 65-75.
6. Gehring WJ, Ikeo K, Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends. Genet.* 1999, 15(9), 371-7.
7. Cvekl A, Kashanchi F, Brady JN, Piatigorsky J. Pax-6 interactions with TATA-box-binding protein and retinoblastoma protein. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1999, 40(7), 1343-50.
8. Duncan MK, Kozmik Z, Cveklova K, Piatigorsky J, Cvekl A. Overexpression of Pax6 (5a) in lens fiber

- cells results in cataract and upregulation of δ agr, 5 (δ bgr), 1 integrin expression. *J. Cell. Sci.* 2000, 113(Pt 18), 3173-85.
9. Duncan MK, Cvekl A, Li X, Piatigorsky J. Truncated forms of Pax-6 disrupt lens morphology in transgenic mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000, 41(2), 464-73.
 10. Mizuno N, Mochii M, Yamamoto TS, Takahashi TC, Eguchi G, Okada TS. Pax-6 and Prox 1 expression during lens regeneration from *Cynops* iris and *Xenopus* cornea: evidence for a genetic program common to embryonic lens development. *Differentiation* 1999, 65(3), 141-9.
 11. Bhat SP, Rayner SA, Huang CM, Ariyasu RG. Quantitative estimation of RNA transcripts suggests persistence of Pax-6 expression in the postembryonic chick retina. *Dev. Neurosci.* 1999, 21(2), 140-6.
 12. Kaneko Y, Matsumoto G, Hanyu Y. Pax-6 expression during retinal regeneration in the adult newt. *Dev. Growth. Differ.* 1999, 41(6), 723-9.
 13. Plaza S, Hennemann H, Moroy T, Saule S, Dozier C. Evidence that POU factor Brn-3B regulates expression of Pax-6 in neuroretina cells. *J. Neurobiol.* 1999, 41(3), 349-58.
 14. Kalousova A, Benes V, Paces J, Paces V, Kozmik Z. DNA binding and transactivating properties of the paired and homeobox protein Pax4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999, 259(3), 510-8.
 15. Ritz-Laser B, Estreicher A, Gauthier B, Philippe J. The paired homeodomain transcription factor pax-2 is expressed in the endocrine pancreas and transactivates the glucagon gene promoter. *J. Biol. Chem.* 2000, 275(42), 32708-15.
 16. Carroll TJ, Vize PD. Synergism between Pax-8 and lim-1 in embryonic kidney development. *Dev. Biol.* 1999, 214(1), 46-59.

PU.1/SPI-1

Factorul de transcriere PU.1 din familia ets este reclamat în dezvoltarea progenitorilor mieloizi și limfoizi.

Procese prin care celulele hematopoietice multipotente disting factorul de transcriere specific PU.1 (cunoscut și ca SPI-1) și GATA-1 conduc la dezvoltarea unor linii mieloide (1, 2).

PU.1 este factorul care reglează expresia multor gene importante în celulele mieloide și limfoide, cu deosebire în celulele B (3).

Gena PU.1 codifică factorul de transcriere din familia Ets, care controlează expresia multor gene specifice limfocitelor B și macrofagelor. Expresia genei este critică pentru dezvoltarea liniilor limfoide și mieloide deoarece soarecii deficienți în PU.1 arată defecte în dezvoltarea acestor linii. Gena PU.1 este identică cu gena SPI-1 (4). PU.1 este crucială pentru dezvoltarea mieloidă normală, determinând unele evenimente moleculare în dezvoltarea neutrofilelor și macrofagelor, evenimente astfel dependente de acest factor (5).

Reprezentanții unor scoli în domeniu aduc informații de mare actualitate, care converg într-o oarecare măsură. Noile date vizează și alte tipuri celulare, investigațiile urmărind în continuare, înlăturarea unor date contradictorii.

Celulele dendritice reprezintă o populație heterogenă specializată în procesarea și prezentarea antigenilor. Ele derivă atât din precursori mieloizi cât și limfoizi. Progenitorii hematopoietici de la soareci cu gena PU.1 afectată nu pot genera *in vitro* nivele înalte de MHC clasa a II-a și nici de CD11c integrină, în celule dendritice mieloide.

Celulele dendritice din timusul de soareci derivă din progenitori limfoizi angajați să evolueze ca limfocite T. La soarecii PU.1 (-/-) celulele TCD4 și TCD8 apar târziu și în număr mic. Timusul acestor soareci la 10-12 zile postnatal arată prezența celulelor dendritice. Deci, PU.1 reglează dezvoltarea populațiilor de celule dendritice derivate din progenitori timici și mieloizi, extinzându-și astfel rolul în dezvoltarea hematopoietică (6).

Genele asupra cărora acționează factorul de transcriere PU.1

Factorul de transcriere specific mieloid și limfoid PU.1 este esențial pentru expresia p47phox, o componentă a NADPH-oxidazei din fagocite, formând superoxid. Secvența de cuplare consens PU.1 (GAGGAA) este localizată pe catena necodificată din poziția -40 la poziția -45 legată de startul transcriptional al promotorului p47phox. Mutatii ale nucleotidelor G la -46 și /sau ale nucleotidelor T la -47 reduc expresia PU.1, în timp ce mutanții la -48 nu au efect.

Studii asupra situsului funcțional PU.1 din promotorul CD18 arată că mutațiile din nucleotidele G și T la pozițiile -76 și -77 (ce corespund la -46 și -47 din promotorul genei p47phox), reduc cuplarea PU.1 și aproape abolesc acțiunea acestuia asupra activității promotorului. De aici, concluzia că nucleotidele care flanchează imediat situsul consens PU.1

au efecte semnificative asupra aviditatii cuplării și activității PU.1 și ca, de asemenea, această regiune este elementul cis dominant în reglarea expresiei p47phox (7).

IFN-gamma induce transcrierea genelor care codifica p67phox (gena NCF-2) și gp91phox (gena CYBB) în timpul diferentierii monocitelor dar și în cele mature. S-a identificat un element cis NCF2 necesar pentru expresia p67phox indusa de IFN-gamma în cooperare cu PU.1, factor reglator IFN (IRF1). IFN-gamma induce simultan expresia p67phox și gp91phox în timpul răspunsului inflamator. Se subliniază cooperarea dintre PU.1 și IRF-1 ca un mecanism molecular pentru activarea indusa de IFN-gamma a genelor mioeloide implicate în sistemul de apărare a gazdei (8).

Elementul GGAA este specific recunoscut de PU.1 în monocitele THP-1 și de PU.1 și proteina GABP-related în promielocitele U937. Recunoașterea de către PU.1 nu depinde numai de elementul consens GGAA ci și de secvențele de flancare în expresia de transcriere în celulele HeLa, unde coexpresia PU.1 duce la scăderea semnificativă a activității promotorului CD11c integrina. Se demonstrează astfel că, PU.1 inhibă activitatea acestui promotor prin locul sau de cuplare localizat în situsul major de start transcriptional (PU.1-5')

Acțiunea inhibitoare a PU.1 asupra CD11c este în contrast cu efectul sau reglator pozitiv asupra promotorului genei CD11b și CD18 integrina, contribuind astfel, la expresia diferentiată de reglare a CD11b/CD18 și CD11c/CD18 în timpul extravazării monocitelor și maturării lor finale.

Deoarece activitatea transcriptională a PU.1 se corelează cu proliferarea macrofagelor, acest factor ar putea modula transcrierea genei CD11c în acord cu starea proliferativă a celulei (9).

Gelatinaza A din matricea metaloproteinază joacă un rol cheie în evoluția înjuriei glomerulare având o contribuție majoră în apariția sclerozei glomerulare. Analiza unui element enhancer cis-acting localizat lângă regiunea 5' care flanchează genele gelatinazei A de la sobolani și om, a identificat un element silentios între perechile de baze -1903 și -1847 ale regiunii 5' ce flanchează gena enzimei de sobolan și secvența silentioasă specifică de cuplare a factorului de transcriere hematopoietic PU.1. Activitatea PU.1 este reclamată la modul absolut pentru expresia activității celulelor mezangiale glomerulare transfectate. Proteina PU.1 se găsește în extractele nucleare ale celulelor mezangiale și contransfecția cu un vector ce exprimă PU.1 ridică direct activitatea silentioasă.

Se sugerează că există un model complex al reglării transcriptionale a genei gelatinazei A și că celulele mezangiale glomerulare sunt în final derivate din celulele maduvei osoase (10). Se consideră astfel că, membrii familiei ets au loc specific de cuplare pe DNA dincolo de 5'-GGAA-3' și respectiv 5'GGAA/T3'. Mutatiile induse explică de ce PU.1 tip-salbatec nu recunoaște secvențele 5'-GGAT-3' și în plus argumentează recunoașterea lui 5'-GGAA/T-3' de către membrii familiei de proteine ets (11).

Implicarea lui PU.1 în cancer

Activitatea transcriptională a factorilor de transcriere este reglată prin fosforilare. Expresia necontrolată și activarea constitutivă a reglatorilor transcriptionali determină boli maligne.

S-a urmărit expresia proteinelor de transcriere PU.1 și C/EBP la pacienți cu leucemie mieloidă acută (AML). Expresia acestora a fost detectată în 61% și respectiv 77% din 90 probe fiind întotdeauna însoțite de formele lor fosforilate și nefosforilate. Fosforilarea acestor molecule specifice facilitează înțelegerea caracteristicilor funcționale ale AML (12).

PU.1 este reclamat pentru dezvoltarea normala a multor linii celulare din sânge, astfel hiperexpresia ei în celulele eritroide poate conduce la eritroleucemie. Tratamentele unei linii de limfocite T imature cu 5-azocitidina duce la expresia transcriptelor PU.1. Expresia tesut-specifica a PU.1 este controlata de structura cromatinei si metilarea DNA, ceea ce poate constitui un mecanism pentru PU.1 în timpul hematopoiezei liniilor celulare specifice.

Dezvoltarea limfocitelor B progresa prin stadii discrete caracterizate prin reorganizarea locusurilor Ig din DNA-ul normal, care conduce la transcrierea genelor Ig si la expresia receptorilor antigen ale celulelor B.

Rearanjarea genelor Ig, ale TCR si markerilor de suprafata sunt markeri utili pentru liniile B si T în bolile limfoproliferative. Rearanjarea concomitenta a genelor Ig si TCR (genotip dublu) s-a constatat în majoritatea malignitatilor liniilor limfoide imature, în special în leucemia acuta limfoblastica (ALL) cu celule pre-B. Rearanjarea DNA si a markerilor specifici de suprafata este reglata de câtiva factori de transcriere specifici.

Rearanjari ale genei lantului usor kappa al Ig exista în 37% din probele pre-B ALL si în toate probele de leucemie limfoblastica cronica (LLC) cu celule B. Rearanjarea genei TCR apare în 40% din probele pre-B ALL, dar nu în cele B-LLC. Printre factorii de transcriere asociati celulelor B sunt produsii genelor Pax-5 si E47 care se exprima în ambele tipuri de leucemii.

Gena RAG-1 se exprima în toate probele de pre-B ALL dar nu în cele de B-LLC. Gena oct-2 se exprima în 82% din probele pre-B ALL dar nu în cele de B-CLL. Probele de pre-B ALL care nu exprima gena PU.1 arata o rearanjare semnificativ de înalta a genei TCR-gamma, ceea ce nu se observa în exprimarea genei oct-2. Se sugereaza ca absenta expresiei PU.1 poate duce la promiscuitatea liniilor celulare, în sensul rearanjarii simultane ale genelor Ig si TCR în celulele pre-B din ALL (14).

Interactiunea in vivo între oncoproteina PU.1 (factor de transcriere din familia ets) si proteina GOOSECOID (GSC) intervine în eritropoieza. Aceasta interactiune este specifica, deoarece GSC nu cupleaza la membrii Fli-1 sau Ets-2 ai familiei ets. Deci, celulele eritroleucemice exprima abilitatea GSC de a se diferentia ca raspuns la cuplarea N-terminal GSC cu PU.1. Domeniul N-terminal al PU.1 este regiunea recunoscuta de proteina Rb, o gena supresoare de tumori implicata probabil, în diferentierea eritroida

Prin urmare GSC inhiba competitiv cuplarea Rb la PU.1. De aici ideea ca supresia formarii elementelor figurate ale sângelui de catre GSC ar putea fi, cel puțin în parte, mediata de cuplarea la PU.1 (15)

Factorul de transcriere Spi-1 numit, cum s-a mentionat, si PU.1 este necesar pentru exprimarea si cuplarea la un promotor minimal, oferind astfel un domeniu esential de activare a transcrierii TAD (transcription activation domain). Pe de alta parte, infectia cu HCMV poate activa puternic IL-1beta si elimina enhancerul. Spi-1 este implicat astfel ca un factor gazda. S-au demonstrat bazele moleculare ale implicarii directe a Spi-1 în activarea HCMV care actioneaza asupra IL-1beta.

Transfectarea celulelor HeLa deficitare în Spi-1 arata necesitatea prezentei acestuia pentru activarea proteinei IE si pentru un promotor mai scurt decât cel reclamat în absenta acesteia. În contrast cu normalul, expresia IL-1beta dependenta de enhancer reclama Spi-1 în mod absolut accelerând domeniul helix-helix (wHTH) DNA-binding si Spi-1 TAD. Expresia IL-1beta în prezenta proteinei IE nu reclama însa Spi-1 TAD care are un rol sinergic. O

singura proteina IE si anume proteina IE2 a citomegalovirusului este critica pentru inductia IL-1beta. În interactiunea proteina-proteina s-a demonstrat ca situsul accelerator wHTH din Spi-1 recruteaza direct IE2. În replica, aceasta se asociaza fizic cu Spi-1 accelerator si necesita integritatea cel putin a unei regiuni IE2. În cocsinta se propune ca din transactivarea IL-1beta rezulta o proteina de ancorare în mecanismul de transactivare în care promotorul IL-1beta leaga wHTH la Spi-1 legat la rândul lui de IE2 prevazut cu TAD (16).

PU.1/SPI-1

(Summary)

The transcription factor PU.1/SPI-1 of ets family is essential for early development of numerous cellular types, among hematopoietic ones. It acts on some factors like p47phox, CD18 integrin, gelatinase A and others. Upexpression of PU.1 gene can induce erithroleukemia, but also it express in acute myeloid leukemia (AML), acute lymphoblastic leukemia (ALL) and in chronic lymphoblastic leukemia (LLC) cells.

1. Guerriero A, Langmuir PB, Spain LM, Scott EW. PU.1 is required for myeloid-derived dendritic cells. *Blood* 2000, 95(3), 879-85.
2. Zhang P, Behre G, Pan J, Iwama A, Wara-Aswapati N, Radomska HS, Auron PE, Tenen DG, Sun Z. Negative cross-talk between hematopoietic regulators:GATA proteins repress PU.1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96(15), 8705-10.
3. McKercher SR, Henkel GW, Maki RA, The transcription factor PU.1 does not regulate lineage commitment but has lineage-specific effects. *J. Leukoc. Biol.* 1999, 66(5), 727-32.
4. Oikawa T, Yamada T, Kihara-Negishi F, Yamamoto H, Kondoh N, Hitomi Y, Hashimoto Y. The role of Ets family transcription factor PU.1 in hematopoietic cell differentiation, proliferation and apoptosis. *Cell. Death. Differ.* 1999, 6(7), 599-608
5. Anderson KL, Smith KA, Perkin H, Hermanson G, Anderson CG, Jolly DJ, Maki RA, Torbett BE. PU.1 and the granulocyte- and macrophage colony-stimulating factor receptors play distinct roles in late-stage myeloid cell differentiation. *Blood*.1999, 94(7), 2310-8.
6. Anderson KL, Perkin H, Surh CD, Venturini S, Maki RA, Torbett BE. Trnscription factor PU.1 is necessary for development of thymic and myeloid progenitor-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 2000, 164(4), 1855-61.
7. Li SL, Schlegel W, Valente AJ, Clark RA. Critical flanking sequences of PU.1 binding sites in myeloid-specific promoters. *J. Biol. Chem.* 1999, 274(45), 32453-60.
8. Eklund EA, Kakar R. Recruitment of CREB-bindingprotein by PU.1, IFN-regulatory factor-1, and the IFN consensus sequence-binding protein is necessary for IFN-gamma-induced p67phox and gp91phox expression. *J. Immunol.* 1999, 163(11), 6095-105.
9. Lopez-Rodriguez C, Corbi AL. PU.1 negatively regulates the CD11c integrin gene promoter through recognition of the major transcriptional start site. *Eur. J. Immunol.* 1997, 27(8), 1843-7.
10. Harendza S, Lovett DH, Stahl RA, The hematopoietic transcription factor PU.1 represses gelatinase A transcription in glomerular mesangial cells. *J. Biol. Chem.* 2000, 275(26), 19552-9.
11. Pio F, Assa-Munt N, Yguerabide J, Maki RA. Mutants of Ets domain PU.1 and GGAA/T recognition: free energies and kinetics. *Protein. Sci.* 1999, 8(10), 2098-109.
12. Iida H, Towatari M, Iida M, Tanimoto M, Kodaera Y, Ford AM, Saito H, Protein expression and constitutive phosphorylation of hematopoietic transcription factors PU.1 and C/EBP beta in acute myeloid leukemia blasts. *Int. J. Hematol.* 2000, 71(2), 153-8.
13. Amaravadi L, Klemsz MJ. DNA methylation and chromatin structure regulate PU.1 expression. *DNA Cell. Biol.* 1999, 18(12), 875-84.
14. Nshii K, Kita K, Miwa H, Shikami M, Taniguchi M, Usui E, Katayama N, Shiku H, Expression of B cell-associated transcription factors in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells: association with PU.1 expression, phenotype, and immunogenotype. *Int. J. Hematol.* 2000, 71(4), 372-8.
15. Konishi Y, Tominaga M, Watanabe Y, Imamura F, Goldfarb A, Maki R, Blum M, De Robertis EM,

- Tominaga A. GOOSECROID inhibits erythrocyte differentiation by competing with Rb for PU.1 binding in murine cells. *Oncogene* 1999, 18(48), 6795-805.
16. Wara-aswapati N, Yang Z, Waterman WR, Koyama Y, Tetradis S, Choy BK, Webb AC, Auron PE. Cytomegalovirus IE2 protein stimulates interleukin 1beta gene transcription via tethering to Spi-1/PU.1. *Mol.Cell.Biol.* 1999, 19(10), 6803-14.

FAMILIA GENELOR SKI

Din aceasta familie fac parte protooncogenele ski, sno si smad-3.

Gena ski

Protooncogena ski codifica o proteina nucleara care poate actiona ca factor de transcriere. Proteina Ski se exprima în liniile de limfocite B si T, în macrofage mature si în mastocite. Expresia mRNA ski atinge maximum în faza G1 în celulele sincronizate deprivate de leucina în prezenta factorilor de crestere, dar scade rapid când acestia sunt îndepartati. Se sugereaza ca protooncogena ski ca si sno care sunt membri ai acestei familii arata proprietati diferite intervenind în hemopoieza, raspund la factori de crestere si regleaza ciclul celular (1).

Gena ski este localizata pe cromosomul 1(1 q12-q21-c-ski). Analiza acestei gene în 6 linii de melanom nu arata alterarea sa. Transcriptele în liniile celulare normale au nivele sensibil mai scazute decât în celulele liniilor de melanom, astfel ca aceste nivele pot juca un rol în transformarea melanocitelor în celule tumorale de melanom (2).

Protooncogena ski intervine în proliferarea celulelor în timpul morfogenezei si în diferentierea miogenica, exprimându-se astfel în mioblastele embrionare. Transcriptele protooncogenelor pot fi detectate timpuriu în somitele angajate miogenic, ca si în muschii scheletici diferentiatii. Totusi mRNA c-ski exprimat în celulele liniei miogene nu se disting de transcriptele c-ski din alte linii celulare, aparând probabilitatea ca cele specific musculare sa fie exprimate tranzitoriu.

Experimentele efectuate pe liniile aviare QM7 si QM5 în timpul diferentierii musculaturii, au demonstrat ca nivelul expresiei si splicingul (procesarea) alternativ al treptelor c-ski ramân neschimbate atât în timpul opririi ciclului celular, cât si în timpul diferentierii miogenice (3).

S-a constatat ca protooncogena c-ski se exprima în uterul de sobolan în timpul estrului, mRNA c-ski fiind detectat principalmente în epiteliul glandular. În ideea testarii posibilitatii ca expresia mRNA c-ski sa fie indusa de estrogeni, sobolanii au fost ovariectomizati si injectati cu estradiol 17 beta. Expresia mRNA c-ski s-a reglat la 3 ore dupa injectare, atingând maximum la 6 ore si persistând pâna la 24 de ore. De aici concluzia ca c-ski joaca un rol important în proliferarea epiteliului uterin si mediaza activitatea proliferativa a estradiolului 17 beta (4). În ontogenia soarecilor, protooncogena c-ski se exprima la nivele scazute în toate celulele. În unele celule si tesuturi însa, gena se exprima la nivele înalte în câteva stadii atât ale dezvoltarii embrionare cât si a celei postnatale.

La embrion celulele crestelor neurale exprima c-ski în timpul migrarii la 8-9 zile post-coitum. Derivatele crestelor neurale, asa cum sunt ganglionii radacinilor dorsale ale nervilor rahidieni si melanocitele, reactioneaza pozitiv la un anticorp anti-proteina Ski. La 9 zile, întregul tub neural arata înalte nivele ale expresiei genei c-ski, iar la 14-16 zile mRNA c-ski este detectat, de asemenea la nivele înalte, în cortexul telencefalului si în bulbii olfactivi.

La doua si sase saptamâni postnatal, creierul arata tanscripte ale genei c-ski în hipocamp si în stratul granular al cortexului cerebelos.

Se sugereaza ca c-ski joaca un rol atât în proliferarea cât si în diferentierea populatiilor celulare specifice sistemului nervos central si periferic (5).

Tesutul pulmonar neonatal arata nivele ale expresiei genei de doua ori mai crescute decât nivelele prenatale.

Hiperexpresia v-ski blocheaza diferentierea terminala a eritroblastelor de pui si în cooperare cu v-sea cauzeaza transformarea acestor celule sugerând ca c-ski joaca un rol în reglarea proliferarii sau diferentierii celulelor hemopoietice. Actionând cu PMA asupra a 4 linii de celule mieloide s-a demonstrat ca acesta regleaza mRNA c-ski numai în liniile care raspund prin diferentierea seriei megacariocitice. Extinderea diferentierii si cresterea mRNA c-ski se coreleaza cu concentratia PMA folosita pentru inducerea diferentierii. De aici sugestia ca, expresia c-ski se coreleaza cu maturarea magacariocitelor (6).

Gena sno

Gena sno este o noua gena celulara ce apartine familiei ski. Are 12 kb si contine 6 exoni din care primul este necodificant. Secventele aminoacid codificate de primul exon al c-sno, ca de altfel si al c-ski, sunt înalt înrudite. Regiunea promotoriala este bogata în G+C dar nu contine locusurile TATAA sau CAAT. Locurile potentiale de cuplare pentru factorii de transcriere SP1, AP1 si AP2 sunt prezente amonte de startul de transcriere (7).

În celule mature expresia protooncogenei sno este mai limitata decât a lui ski si se exprima în celulele T dar nu în celulele B, iar în progenitorii mieloizi este mai larg exprimata decât protooncogena ski. Expresia mRNA sno este maxima în faza G1 timpurie si ulterior oscileaza pe parcursul ciclului celular.

Protooncogena sno este implicata în dezvoltarea muschilor; ea detine 1330 nucleotide, iar izoformele sale procesate alternativ sunt Sno N de 684 aminoacizi, Sno A de 415 aminoacizi si Sno I de 399 aminoacizi (44, 298 MW). O singura gena sno poate exprima cele trei izoforme prin procesare alternativa si toate trei contin regiunea cu cele mai multe similaritati cu protooncogena ski. Secventa Sno I specific umana este prezenta si la câteva specii de mamifere (maimuta, câine, vaca, iepure, porc), dar nu la rozatoare, în timp ce secventa comuna a acestei gene este conservata la toate speciile de vertebrate terestre.

mRNA sno N, sno A si ski se acumuleaza în multe tesuturi umane printre care si muschii scheletici. mRNA sno I alternativ se acumuleaza mai specific în acestia, dar si în rabdomioscarcom-tumora a muschilor scheletici. Procesarea alternativa tesut-specifica a acestei gene umane rezulta într-un mRNA din familia genei ski/sno, pe de o parte, si prezenta mRNA sno în muschi pe de alta parte, au rol în reglarea genelor responsabile de formarea muschilor (8).

Gena smad-3

TGF-beta induce o varietate de raspunsuri fiziologice cum sunt inhibarea cresterii, a diferentierii si apoptoza. De asemenea, induce fosforilarea si translocatia nucleara a genei smad-3. Ca raspuns la activarea semnalizarii TGF-beta s-a constatat asocierea nucleara a genei

smad-3 cu proteina nucleara a protooncogenei ski. Aceasta asociere reprezinta activitatea transcriptionala indusa de smad-3, ca si hiperexpresia protooncogenei ski, ceea ce confera celulelor rezistenta la efectele lui TGF-beta de inhibare a cresterii. Represia transcriptionala ca si rezistenta la crestere induse de TGF-beta prin hiperexpresia ski, pot fi exprimate prin hiperexpresia lui smad-3. În acest context ski apare ca un nou component al caii de semnalizare TGF-beta relevând astfel mecanismele sale de actiune (9).

Cuplarea TGF-beta la receptorul sau induce fosforilarea lui smad-3 care ulterior migreaza în nucleu unde functioneaza ca un factor de transcriere. Hiperexpresia asocierii lui smad-3 cu proteina de transcriere a protooncogenei sno N reprezinta activarea transcriptionala a smad-3. Activitatea de semnalizare a TGF-beta duce însa, la degradarea rapida a sno N si mai putin a proteinei înrudite ski, degradare mediata de proteosomia celulari (10).

Proteinele Smad sunt mediatori de semnalizare intracelulara ai superfamiliei TGF-beta care regleaza o vasta varietate de procese biologice. Printre acesti mediatori se numara smad-2 si smad-3 care sunt activati specific de TGF-beta. Acesti doi mediatori interactioneaza cu c-ski prin domeniul C-terminal în maniera dependenta de TGF-beta. C-ski detine doua locuri distincte de cuplare pentru smad inhibând astfel puternic transactivarea a variate gene reporter via TGF-beta. C-ski este încorporat în complexe cu smad, complexe care cupleaza la DNA, interfera cu interactiunea smad-3 -p300, un coactivator transcriptional si în replica recruteaza histone deacetilaza (HDAC). Astfel, c-ski devine un corepresor transcriptional care leaga proteinele la HDAC în calea semnalizarii TGF-beta (11).

Complexul N-CoR/SMRT care contine m Sin 3A si HDAC mediaza represia transcriptionala prin receptorul hormonal nuclear si prin Mad. Proteinele codificate de protooncogenele familiei ski cupleaza direct la acest complex si la m Sin 3A formând astfel un complex cu HDAC. C-ski si produsul genei înrudite sno sunt reclamate pentru represia transcriptionala via Mad si receptorului hormonului tiroid (TR beta). Forma oncogena v-ski care nu detine domeniul de cuplare pentru m Sin 3A actioneaza într-o maniera dominant negativa si abroga represia transcriptionala via Mad si TR beta. Astfel, ski devine un component al complexului HDAC si astfel este reclamat pentru represia transcriptionala mediata de acest complex. Implicarea lui c-ski în complexul HDAC indica faptul ca functia acestuia este importanta pentru oncogeneza (12).

Folosindu-se extract nuclear din celulele transformate de ski, s-a identificat un loc de cuplare la DNA specific pentru ski continând secventa consens GTCTAGAC. În extractele nucleare c-ski si v-ski exista componente ale complexelor care cupleaza specific la acest loc. S-a demonstrat ca ski reprezinta transcrierea fie prin copii amonte ale acestui element, fie când promotorul poarta un domeniu heterolog de cuplare la DNA.

1. Pearson White S, Deacon D., Crittenden R., Brady G., Iscove N., Quesenberry PJ. The ski/sno protooncogene family in hematopoietic development, *Blood*, 86(6), 2146-55, 1995.
2. Fumagalli S., Doneda L., Nomura N., Larizza L. Expression of the c-ski protooncogene in human melanoma cell lines, *Melanoma Res*, 3(1), 23-7, 1993.
3. Ambrose MR., Bottazzi ME., Goodenow MM., Expression of the c-ski protooncogene during cell cycle arrest and myogenic differentiation, *DNA cell Biol.*, 14(8), 701-7, 1995.
4. Yamanouchi K., Soeta C., Harada R., Naito K., Tojo H., Endometrial expression of cellular protooncogene c-ski and its regulation by estradiol-17 beta, *FEBS Lett.* 449(2-3), 273-6, 1999.
5. Lyons GE., Micales BK., Herr MJ., Horrigan SK., Nameciu S., Shardy D., Starnezer E., Protooncogene

- c-ski is expressed in both proliferating and postmitotic neuronal populations, *Dev Dyn*, 201(4), 354-65, 1994.
6. Nameciiu S., Lieberman MA., Stavnezer E., Induction of the c-ski protooncogene by phorbol ester correlates with induction of megakaryocytes differentiation, *Oncogene*, 9(5), 1407-16, 1994.
 7. Givol I., Boyer PL., Hughes SH., Isolation and characterization of the chicken c-sno gene, *Gene*, 156(2), 271-6, 1995.
 8. Pearson White S., Sno I, a novel alternatively spliced isoform of the ski protooncogene homolog sno, *Nucleic Acids Res.*, 21(19),1993.
 9. Sun Y., Liu X., Eaton EN., Lanc WS., Lodish HF., Weinberg RA., Interaction of the Ski oncoprotein with Smead 3 regulates TGF-beta signaling, *Biol.Cell*, 4(4), 499-509, 1999.
 10. Sun Y., Liu X., Ng-Eaton E., Lodish HF., Weinberg RA., Sno-N and Ski protooncoproteins are rapidly degraded in response to transforming growth factor beta signaling, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 96(22), 12442-7, 1999.
 11. Akiyoshi S, Inoue H, Hanai Ji, Kusanagi K, Nemoto N, Miyazono K, Kawabata M, c-Ski acts as a transcriptional Co-repressor in transforming growth factor-beta signaling through interaction with smads, *J.Biol.Chem.*, 274(49), 35269- 77, 1999.
 12. Nomura T, Khan MM, Kaul SC, Dong HD, Wadhwa R, Colmenares C, Kohno I, Ishii S, Ski is a component of the histone deacetylase required for transcriptional repression by Mad and thyroid receptor, *Genes Dev*, 13(4), 412-23, 1999.
 13. Nicol R, Stavnezer E, Transcriptional repression by v-Ski and c-Ski mediated by a specific DNA binding site, *J.Biol.Chem.*, 273(6), 3588- 97, 1998.