

PTEN – BIAŁKO SUPRESOROWE: REGULACJA AKTYWNOŚCI BIAŁKA I EKSPRESJI GENU*

PTEN – TUMOUR SUPPRESSOR PROTEIN: REGULATION OF PROTEIN ACTIVITY AND GENE EXPRESSION

Barbara KRAWCZYK, Piotr RYCHLEWSKI,
Krystyna FABIANOWSKA-MAJEWSKA

Zakład Chemii Biomedycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Streszczenie: PTEN (nazywany także MMAC1 lub TEP1) jest białkiem supresorowym z aktywnością fosfatazy o podwójnej specyficzności zarówno wobec substratu lipidowego, jak i substratów białkowych. Jako fosfataza lipidowa, PTEN defosforyluje fosfatydyloinozitol-3,4,5-trifosforan (PIP-3), co prowadzi do negatywnej regulacji aktywności serynowo-treoninowej kinazy Akt (PKB). Jako fosfataza białek, PTEN poprzez defosforylację kinazy białkowej FAK i białka Shc uczestniczy w regulacji szlaku sygnałowego zależnego od kinazy MAP. Lipidowo-białkowa aktywność fosfatazowa PTEN powoduje, że białko to jest modulatorem dwóch głównych wewnątrzkomórkowych szlaków przekazu sygnału: czynniki wzrostu/PI3K/Akt oraz Shc/Ras/Raf/MAPK, tj. szlaków kontrolujących wzrost, apoptozę, przeżywalność komórek, adhezję i migrację. Jednocześnie enzymatyczna aktywność białka PTEN, jego stabilność, wewnątrzkomórkowa lokalizacja, jak i ekspresja genu także podlegają kompleksowej kontroli. Badania wielu tkanek rakowych wskazują, że obniżona biologiczna aktywność białka PTEN lub jej całkowity brak mogą być następstwem zaburzenia ekspresji genu *PTEN* w drodze mutacji i/lub zmian epigenetycznych (głównie zwiększenia metylacji regionu promotorowego genu). Wyjaśnienie biologicznej roli białka supresorowego PTEN i powiązanie jej z regulacją jego aktywności i aktywności genu staje się ważne w aspekcie poszukiwania farmakologicznych możliwości hamowania transformacji nowotworowej już we wczesnych etapach tego procesu.

Słowa kluczowe: białko supresorowe PTEN, gen *PTEN*, metylacja promotora *PTEN*.

Summary: The tumour suppressor protein PTEN (also called MMAC1 and TEP1) is a dual specificity phosphatase, recognizing both lipid and protein substrates. By its lipid phosphatase activity, PTEN dephosphorylates phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP-3), which leads to negative regulation of serine-threonine kinase Akt (PKB). By its protein phosphatase activity, PTEN participates in regulation of MAP kinase signalling pathway through dephosphorylation of FAK and Shc proteins. PTEN protein, with the lipid and protein phosphatase activity, contributes to modulation of two main intracellular signal transduction pathways: growth factors/PI3K/Akt and Shc/Ras/Raf/MAPK, involved in regu-

*Praca finansowana przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi, temat własny nr 502-12-302.

lation of cell growth, apoptosis, viability, adhesion and cell migration. PTEN is a crucial protein for normal cell development. Simultaneously, enzymatic activity of PTEN, its stability, subcellular localization and gene expression are under tight control. Studies on many cancer tissues imply that a decrease of biological activity of PTEN or complete lack of its function may result from alteration of *PTEN* gene expression due to mutation and/or epigenetic modification (mainly hypermethylation of promoter region of the gene). The explanation of the biological role of PTEN tumour suppressor protein and relationship between the protein activity and gene expression has great significance in searching for pharmacological strategies of inhibition of carcinogenesis at early steps of the process.

Key words: tumour suppressor protein PTEN, *PTEN* gene, methylation of *PTEN* promoter.

WSTĘP

Białko supresorowe PTEN (ang. *Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome ten*), nazywane także MMAC1 (ang. *Mutated in Multiple Advanced Cancers 1*) lub TEP1 (ang. *TGF- β regulated and Epithelial cell enriched Phosphatase 1*) należy do fosfataz o podwójnej substratowej lipidowo-białkowej specyficzności. Jako fosfataza lipidowa, PTEN defosforyluje fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforan (PIP-3, ang. *Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate*), co prowadzi do negatywnej regulacji szlaku sygnałowego: czynniki wzrostu/PI3K (ang. *Phosphatidylinositol 3-kinase*)/Akt (PKB, ang. *Protein Kinase B*) [5]. Jako fosfataza białek (zaliczana do białkowych fosfataz tyrozynowych ze zdolnością defosforylacji także seryny i treoniny), PTEN poprzez defosforylację kinazy białkowej FAK (ang. *Focal Adhesion Kinase*) i białka Shc uczestniczy w regulacji szlaku sygnałowego zależnego od kinazy MAP (ang. *Mitogen-Activated Protein*) [22]. Białko PTEN wykazuje dużą homologię z tensyną, białkiem cytoszkieletu komórkowego i z auksyniną, białkiem zaangażowanym w transport pęcherzyków synaptycznych. Białko PTEN pełni istotną rolę w prawidłowym rozwoju zarodka [69] i w prawidłowym funkcjonowaniu komórek poprzez regulowanie podstawowych procesów komórkowych, w tym proliferacji, różnicowania, migracji oraz przeżywalności w wyniku kontroli cyklu komórkowego w punkcie przejścia G₁/S [18,69].

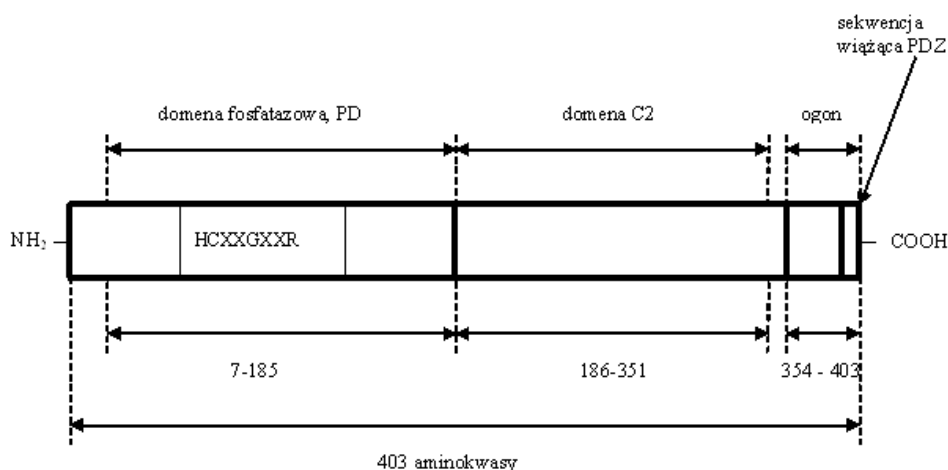
Białko PTEN w komórce występuje w dwóch subfrakcjach, w cytoplazmie i jądrze komórkowym [29]. Cytoplazmatyczna lokalizacja białka jest ściśle związana z jego aktywnością wobec substratu lipidowego [2,12]. W komórkach nowotworowych białko PTEN wykrywane jest głównie w cytoplazmie, w przeciwieństwie do komórek prawidłowych, gdzie występuje głównie w jądrze [17,38,66].

Białko PTEN zostało odkryte w roku 1997 po licznych doniesieniach o mutacjach i delecjach na chromosomie 10 w komórkach ludzkich glejaków złośliwych [42], w raku prostaty [4] i w raku błony śluzowej macicy [57]. Wyniki intensywnych prac badawczych nad rolą i właściwościami białka PTEN w komórkach tkanek rakowych przyczyniły się do zaliczenia go do kluczowych białek supresorowych przeciwdziałających procesowi kancerogenezy ze względu na antagonistyczne działanie wobec aktywności wielu kinaz białkowych promujących proliferację komórek.

W niniejszej pracy przeglądowej na temat właściwości białka PTEN i regulacji jego aktywności szczególną uwagę zwrócono na zaburzenia funkcji tego białka, obserwowane w wielu typach ludzkich nowotworów, zaburzenia będące wynikiem wyciszenia aktywności genu *PTEN* w drodze epigenetycznych zmian.

BUDOWA BIAŁKA PTEN I REGULACJA JEGO AKTYWNOŚCI

PTEN jest białkiem o masie około 50 kDa, zbudowanym z 403 aminokwasów [2,18] (ryc. 1). Białko to może występować w dwóch subfrakcjach komórki: w cytoplazmie i jądrze komórkowym [29]; przy czym tylko niewielka ilość białka cytoplazmatycznego jest związana z błoną komórkową. Na podstawie badań zdrowych i rakowych komórek tarczycy wykazano (na podstawie immunohistochemicznego oznaczenia), że w komórkach prawidłowych PTEN znajduje się w przeważającej części w jądrze komórkowym i otoczce jądra oraz, w mniejszym stężeniu, w cytoplazmie [17,38]. Natomiast w komórkach rakowych tarczycy białko PTEN wykrywano głównie w cytosolu, przy czym ekspresja genu kodującego to białko była obniżona w obu frakcjach lub całkowicie wyciszona w jądrze [17]. Analogiczne spostrzeżenia na temat lokalizacji PTEN i poziomu ekspresji w cytosolu i jądrze dały wyniki badań komórek raka trzustki i prostaty [38,66]. Do chwili obecnej nie jest znany mechanizm przejścia białka PTEN z cytoplazmy do jądra, ponieważ białko to nie ma sygnału jądrowej lokalizacji (NLS, ang. *Nuclear Localization Signal*). Możliwe, że w translokacji białka z cytoplazmy do jądra bierze udział białko MDM2 (ang. *Murine Double Minute 2*) i ten transport może być zależny od fazy cyklu komórkowego, jak i może być odpowiedzią na podział i wzrost komórki [66]. Funkcjonalne regiony białka PTEN przedstawiono na rycinie 1.



RYCINA 1. Budowa białka PTEN (wg [59] zmienione)

Na końcu $-NH_2$, pomiędzy 7 i 185 aminokwasem znajduje się domena fosfatazowa (PD, ang. *Phosphatase Domain*) homologiczna do cytoszkieletowego białka tensyny. Domena ta zawiera sekwencję HCXXGXXRS/T charakterystyczną dla białkowych fosfataz tyrozynowych oraz fosfataz o podwójnej specyficzności [59]. W domenie fosfatazowej wokół tej sekwencji znajdują się zasadowe aminokwasy, co razem tworzy zwiększone centrum aktywne, zdolne do przyjęcia kwaśnych substratów – fosfoinozytoli [27]. Domena ta katalizuje defosforylację fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforanu (PIP-3), który jest substratem lipidowym dla PTEN [5,12,18]. Mutacyjna zmiana centrum aktywnego jest przyczyną braku aktywności fosfatazowej wobec substratu lipidowego, co jest ściśle związane z właściwościami supresorowymi PTEN wobec szlaku sygnałowego: czynniki wzrostu/PI3K/Akt, sprzyjającego przeżywalności i proliferacji komórek [34]. Spostrzeżenie to podkreśla ważność centrum aktywnego w domenie fosfatazowej dla aktywności wobec PIP-3, jak i ważność reakcji defosforylacji PIP-3 w kontroli prawidłowego rozwoju komórek. Środkowa domena białka PTEN, zwana domeną C2, znajduje się pomiędzy 186 i 351 aminokwasem, jest ona homologiem domeny obecnej w kinazie białkowej C. Domena C2 jest odpowiedzialna za wiązanie substratu lipidowego i właściwe jego zorientowanie w stosunku do domeny fosfatazowej oraz za wiązanie PTEN do błony komórkowej [16,68]. Przypuszcza się, że domena C2 odgrywa także rolę w zależnej od jonów Ca^{2+} interakcji z lipidami, choć prawdopodobnie nie wiąże bezpośrednio jonów Ca^{2+} [59]. Koniec $-COOH$ łańcucha peptydowego PTEN (tzw. „ogon”, rozpoczynający się od 354 aminokwasu) ma dwie domeny PEST (ang. *proline (P), glutamate (E), serine (S), and threonine (T)*), pomiędzy 370 i 375 aminokwasem oraz 379 i 386 aminokwasem) i sekwencję konsensusową wiążącą domeny PDZ innych białek. Skrót domeny PDZ jest utworzony z pierwszych liter białek, w których po raz pierwszy zidentyfikowano tę domenę: PSD-95 (ang. *Post-Synaptic Density protein*); Dlg (ang. *Drosophila disco large protein*); ZO1 (ang. *Zonula Occludens 1 protein*). W drugiej domenie PEST znajdują się trzy potencjalne miejsca fosforylacji białka PTEN: seryna w pozycji 380 oraz treoniny w pozycji 382 i 383. Fosforylacja/defosforylacja tych aminokwasów odgrywa kluczową rolę w regulacji stabilności i aktywności białka [54,59].

Sekwencja wiążąca PDZ, kończąca „ogon” jest odpowiedzialna za wiązanie PTEN z domenami PDZ białek należących do powierzchniowego cytoszkieletu komórkowego; sekwencja ta odpowiada m.in. za interakcję z białkiem MAGI-2 (ang. *Membrane Associated Guanylate kinase Inverted 2*), należącym do rodziny MAGUK (ang. *Membrane-Associated Guanylate Kinase*) [59,68]. W odpowiedzi na bodźce sygnałowe w komórce (do chwili obecnej nierozpoznane) PTEN łączy się z jedną z domen PDZ białka MAGI-2 i wtedy jest transportowany do błony komórkowej. Przy błonie komórkowej katalizowana jest reakcja defosforylacji PIP-3. Interakcję PTEN z MAGI-2 stymuluje defosforylacja końca C („ogona”) białka PTEN [68].

Aktywność białka PTEN jest głównie regulowana poprzez reakcję fosforylacji i defosforylacji końca C zawierającego domeny PEST i sekwencję wiążącą PDZ. Jest to konsekwencją faktu, że 28% aminokwasów tworzących „ogon” stanowią seryna i treonina (aminokwasy z grupą OH, która może ulegać fosforylacji). Fosforylacja końca C wpływa także na stabilność białka PTEN, jak i moduluje interakcję z innymi białkami,

a bezpośrednie zmiany elektrostatyczne zmieniają zdolność wiązania PTEN do błony komórkowej [8]. Tolkacheva i wsp. w badaniach z komórkami 293T (są to komórki nerki płodu ludzkiego) i PC3 (są to komórki raka gruczołu krokowego) wykazali, że około 95% białka PTEN podlega fosforylacji i ta fosforylowana forma stanowi pulę stabilnego cytoplazmatycznego białka, lecz funkcjonalnie nieczynnego [54]. PTEN jest fosforylowany głównie przez kinazę kazeinową typu 2 (CK2, ang. *Casein Kinase 2*) i ta fosforylacja może być regulowana przez serynowo-treoninową kinazę Akt w drodze: (i) kontrolowania przez Akt niezidentyfikowanej fosfatazy oddziałującej na PTEN lub (ii) inicjowania przez Akt zmian w PTEN, które skutkują mniejszym powinowactwem do CK2 [12,55]. Regulacja ta stanowi przypuszczalny mechanizm negatywnej wzajemnej zależności pomiędzy szlakiem PI3K/Akt a aktywnością PTEN [18,55].

Defosforylacja PTEN na końcu C z jednoczesnym wzrostem aktywności tego białka, związana jest z interakcją z białkiem MAGI-2 i z przesunięciem białka PTEN, będącego w kompleksie z MAGI-2, w kierunku błony komórkowej oraz z reakcją defosforylacji PIP-3. Uwolnienie PTEN (w niefosforylowanej formie) z kompleksu z MAGI-2 umożliwia jego degradację w proteasomach, prawdopodobnie przez szlak ubikwityna-proteasomy [68]. Ta degradacja może być zahamowana przez białko BMP2 (ang. *Bone Morphogenetic Protein 2*), należące do rodziny transformujących czynników wzrostu beta (TGF- β , ang. *Transforming Growth Factor β*), co wykazano na przykładzie komórek linii MCF-7 [62]. Białko BMP2 osłabia wiązanie PTEN z enzymami sprzężonymi z ubikwitynami, przyczyniając się do wzrostu stężenia PTEN poprzez zmniejszenie jego degradacji [62]. Białko PTEN może być także degradowane przez kaspazę 3, jedną z kluczowych proteaz w czasie apoptozy. Kaspaza 3 rozpoznaje cztery miejsca aminokwasowe (pozycje 301, 371, 375, 384), ale tylko w niefosforylowanej formie białka PTEN [56].

Fosforylacja i aktywność PTEN są także zależne od stężeń hormonów steroidowych, estrogenu i progesteronu, co wykazały badania stanu fosforylacji PTEN w komórkach błony śluzowej macicy w cyklu miesięczkowym i we wczesnym okresie ciąży [33]. W fazie proliferacyjnej cyklu miesięczkowego w obecności estrogenu obserwowano wzrost fosforylacji „ogona” i w konsekwencji spadek aktywności PTEN. W fazie sekrecyjnej cyklu i we wczesnym okresie ciąży w obecności progesteronu odnotowywano wzrost stężenia niefosforylowanego aktywnego PTEN w cytoplazmie. Spadek aktywności białka PTEN w fazie proliferacyjnej może przyczyniać się do zwiększenia przeżywalności komórek na skutek odblokowania pro-proliferacyjnego szlaku sygnałowego PI3K/Akt, co tłumaczy ogólnie małą liczbę komórek apoptotycznych w błonie śluzowej macicy w tej fazie. Wzrost aktywności PTEN w fazie sekrecyjnej i we wczesnym okresie ciąży może z kolei wyjaśniać zwiększenie liczby komórek apoptotycznych, co może być związane z hamowaniem szlaku PI3K/Akt przez PTEN [23,33]. Zatem PTEN może być jednym z białek regulatorowych, poprzez które estrogen i progesteron wpływają na proliferację i apoptozę komórek błony śluzowej macicy. Ponadto w komórkach błony śluzowej macicy obserwowano korelację pomiędzy zmianą lokalizacji PTEN i fazą cyklu miesięczkowego [23].

Ostatnie doniesienia naukowe sugerują, że także fitoestrogeny (np. resweratrol) mogą mieć wpływ na regulację aktywności fosfatazowej PTEN wobec substratu lipidowego [63]. W komórkach raka piersi MCF-7 po hodowli z fitoestrogenami obserwowano zwiększenie poziomu białka PTEN, wzrost stężenia niefosforylowanej kinazy Akt i wzrost stężenia białka p27. Natomiast nie stwierdzano wpływu resweratrolu na aktywność fosfatazową PTEN wobec substratów białkowych, czego dowodem były pozostające bez zmian: poziom cykliny D1 i aktywność szlaku sygnałowego zależnego od kinazy MAP. Autorzy prac sugerują, że ujawnienie właściwości fosfatazowych PTEN wobec substratów białkowych prawdopodobnie wymaga wyższych stężeń PTEN niż wobec substratu lipidowego lub że fitoestrogeny powodują zmiany konformacyjne w białku PTEN, mające wpływ na jego zdolność do wiązania się z substratami białkowymi [63].

ROLA BIAŁKA PTEN W PRAWIDŁOWYM ROZWOJU KOMÓREK

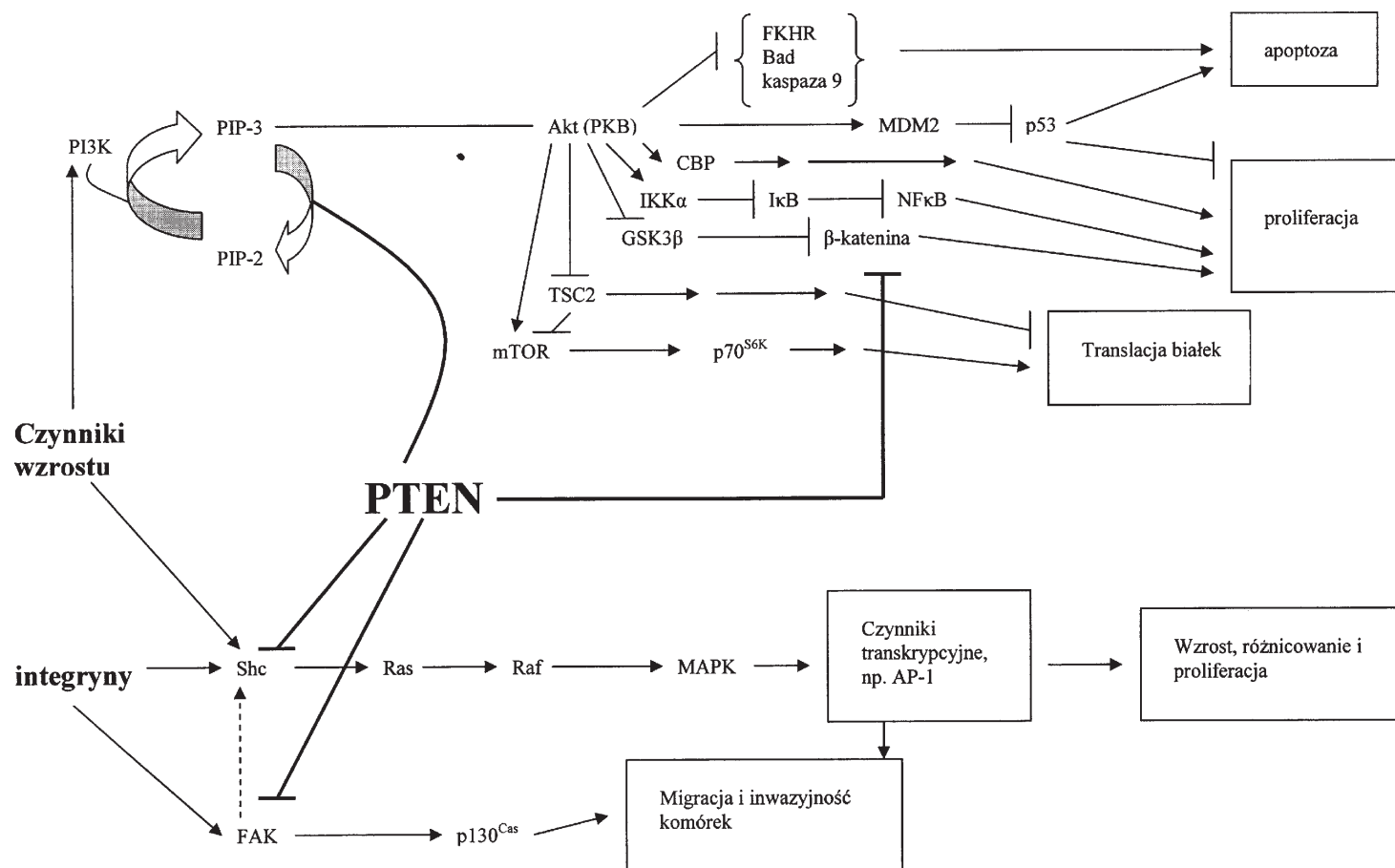
PTEN poprzez swoje lipidowo-białkowe właściwości fosfatazowe bierze udział w regulacji podstawowych etapów rozwoju komórki i jej funkcji (ryc. 2). I tak, do najważniejszych funkcji białka należy udział w regulacji równowagi pomiędzy proliferacją a apoptozą poprzez działanie fosfatazowe zarówno wobec lipidowego substratu, jakim jest PIP-3, jak i substratów białkowych, tj. kinazy FAK i białka Shc. Aktywność fosfatazowa PTEN wpływa pośrednio na wzrost, adhezję i migrację komórek, jak i na regulację przeżywalności komórek poprzez: indukowanie zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G_1 (co daje czas na naprawę uszkodzeń DNA), indukowanie apoptozy (gdy naprawa uszkodzeń DNA nie jest możliwa) lub anoikis (proces indukcji apoptozy w komórkach po utracie kontaktu z macierzą zewnątrzkomórkową, stanowiący fundamentalną cechę zdrowych komórek nabłonkowych i pozwalający na ich wymianę) [69].

Jako fosfataza lipidowa, PTEN defosforyluje PIP-3, wtórny przekaźnik sygnału w komórce (ryc. 2), tym samym uniemożliwia działanie białka Akt, którego aktywacja i transport do błony komórkowej wymagają obecności PIP-3 i odpowiednich kinaz [13]. PIP-3 powstaje (w pobliżu błony komórkowej) w wyniku fosforylacji fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu (PIP-2, ang. *Phosphatidylinositol 4,5-diphosphate*) przez kinazę PI3 (3-kinazę fosfatydyloinozytoli). Kinaza PI3 może być aktywowana albo przez kinazy tyrozynowe receptorowe (RTK, ang. *Receptor Tyrosine Kinase*), albo przez receptory sprzężone z białkiem G (GPCR, ang. *G-Protein-Coupled Receptors*) [36]. Konsekwencją zablokowania aktywacji Akt jest zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G_1 (czemu towarzyszy wzrost stężenia białka p27) i indukowanie apoptozy poprzez zahamowanie antyapoptotycznych, jak i odblokowanie proapoptotycznych szlaków przekazu sygnału [5,7,12,41,51]. Brak aktywacji kinazy Akt prowadzi do szeregu wymienionych poniżej zmian. Następuje aktywacja czynnika transkrypcyjnego FKHR (ang. *Forkhead Homologue in Rhabdomyosarcoma*), należącego do rodziny czynni-

ków transkrypcyjnych Forkhead, który w formie niefosforylowanej aktywuje geny kodujące białka proapoptotyczne, takie jak: FasL, IGBP-1 i Bim [35]. Poza tym dochodzi do zahamowania fosforylacji białka MDM2 ze szlaku ARF/MDM2/p53 (fosforylowana forma onkogennego białka MDM2 uczestniczy w procesie degradacji białka p53) i w konsekwencji zahamowana zostaje degradacja p53, a to prowadzi poprzez wzrost stężenia inhibitorów kinaz cyklinozależnych w komórce (tzn. p21, p27 [50,67]) do zatrzymania podziału komórki i/lub apoptozy [31,36]. Skutkiem braku aktywnej Akt jest zahamowanie fosforylacji i aktywacji białka CBP (ang. *Cyclic AMP-response element Binding Protein*), które zwiększa transkrypcję antyapoptotycznych genów, takich jak *Bcl-2*, *Mcl-1*, jak i samego *Akt* [36]. Zahamowana zostaje również fosforylacja i aktywacja α kinazy I κ B (IKK α , ang. *I κ appaB Kinase α*), co powoduje wzrost stężenia białka I κ B (ang. *Inhibitor of NF- κ B*), które jest inhibitorem czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (ang. *Nuclear Factor kappa B*); skutkiem tego jest obniżenie ekspresji genów antyapoptotycznych i onkogenów regulowanych przez NF- κ B [36]. Brak aktywnej kinazy Akt aktywuje serynowo-treoninową kinazę GSK3 β (ang. *Glycogen Synthase Kinase-3 β*), która fosforyluje, m.in. β -kateninę (kluczowy składnik szlaku sygnałowego Wnt/ β -katenina), co prowadzi do degradacji β -kateniny i osłabienia jej wpływu, m.in. na indukowanie ekspresji onkogenów [40,53]. Aktywacji ulega również białko supresorowe TSC2 (ang. *Tuberous Sclerosis 2*), które reguluje translację wielu genów poprzez hamowanie serynowo-treoninowej kinazy mTOR (ang. *mammalian Target Of Rapamycin*) ze szlaku sygnałowego: czynniki wzrostu/RTK/PI3K/Akt/mTOR/p70^{S6K} [25,36]. Zahamowanie fosforylacji i aktywacji kinazy mTOR następuje również bezpośrednio w wyniku zablokowania aktywacji kinazy Akt [36].

Jak już wspomniano, PTEN hamuje cykl komórkowy w fazie G₁. Towarzyszy temu wzrost poziomu białka p27 i spadek aktywności kinaz cyklinozależnych (m.in. kinazy cyklinozależnej 2), wiążących się z cyklinami E i A, kontrolującymi przejście z fazy G₁ do fazy S cyklu komórkowego [28,64,65]. Weng i wsp. [64,65] w badaniach na komórkach MCF-7 potwierdzili, że zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G₁ jest zależne od białka PTEN zarówno poprzez negatywną regulację szlaku PI3K/Akt (co prowadzi do wzrostu stężenia białka p27 i późniejszej apoptozy komórek), jak i w drodze niezależnej od PI3K/Akt, a mianowicie poprzez negatywną regulację szlaku sygnałowego zależnego od kinazy MAP (co powoduje spadek aktywności cykliny D1).

Jako fosfataza białek, PTEN, poprzez defosforylację kinazy FAK i białka Shc (oba białka są zaangażowane w aktywację dróg przekazu sygnału zależnych od kinazy MAP), reguluje proliferację, różnicowanie i migrację komórek [22] (ryc. 2). FAK jest ważnym białkiem szlaku transdukcji sygnału zależnego od integrzyn, natomiast Shc – od integrzyn i epidermalnych czynników wzrostu. Aktywacja integrzyn (poprzez wiązanie się komórek do macierzy zewnątrzkomórkowej) prowadzi do zwiększenia fosforylacji FAK i wzmocnienia jej kinazowej aktywności [20]. Aktywna FAK wiąże się z kinazami i białkami sygnałowymi, w tym z Grb2, c-Src i Shc, czego następstwem jest aktywacja dalszych elementów szlaku przekazu sygnału Shc/Ras/Raf/MEK/ERK (ang. *Extra-cellular signal-Regulated Kinase*), zależnego od kinazy MAP [45,52] (ryc. 2). Szlak ten może być również uaktywniony bezpośrednio przez fosforylację Shc i aktywację



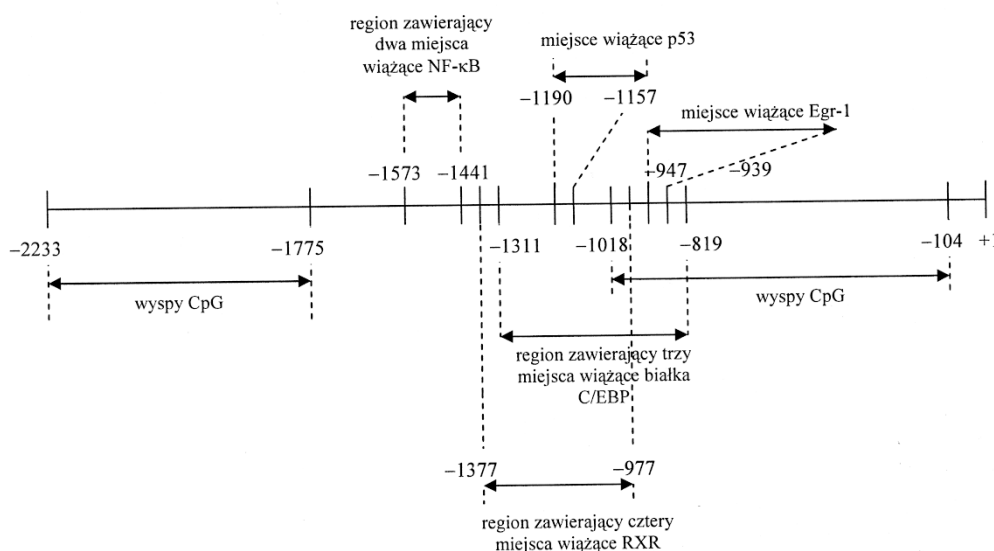
RYCINA 2. Model działania białka supresorowego PTEN

Ras pod wpływem sygnałów zewnątrzkomórkowych. Aktywne fosforylowane białko Shc wiąże się z kompleksem Grb2-Sos przy błonie komórkowej. Szlak Shc/Ras/Raf/MEK/ERK moduluje wzrost, przeżywalność i inwazyjność komórek poprzez aktywację czynników transkrypcyjnych regulujących transkrypcję genów, pobudzających proliferację komórek i/lub zapobiegających ich apoptozie [14,21]. Jednym z aktywowanych czynników jest kompleks transkrypcyjny AP-1 (ang. *Activator Protein 1*), w skład którego wchodzi białko JUN [2,14].

PTEN, defosforylując FAK i Shc, wpływa na migrację i inwazyjność komórek nie tylko poprzez pośrednie blokowanie szlaku zależnego od kinazy MAP, ale również poprzez blokowanie szlaku FAK/p130^{Cas} (ang. *p130 Crk-associated substrate*) [21,52].

Interesujący jest fakt, że główne miejsce fosforylacji kinazy FAK (tyrozyna w pozycji 397) jest jednocześnie miejscem wiązania nie tylko białka c-Src, ale również kinazy PI3. Kinaza PI3 wiąże się z FAK pod wpływem stymulacji za pośrednictwem czynników wzrostu lub adhezji komórek i może odgrywać ważną (inicjującą) rolę w funkcjonowaniu FAK [43].

Ostatnie wyniki badań wskazują, że PTEN może regulować adhezję i migrację komórek poprzez bezpośrednią defosforylację β -kateniny, co wpływa na utrzymanie kompleksu adhezyjnego E-kadheryna/kateniny z cytoszkieletem aktynowym [61]. Związanie białka PTEN z β -kateniną i jej defosforylacja zwiększa zdolności adhezyjne komórek. Uwolnienie PTEN od β -kateniny pod wpływem TGF- β umożliwia związanie β -kateniny z kinazą PI3 i jej fosforylację przez tę kinazę. Te zmiany w kompleksie adhezyjnym E-kadheryna/kateniny skutkują oderwaniem kompleksu od cytoszkieletu aktynowego i wzrostem migracji komórek [61]. Regulacja adhezji poprzez wiązanie



RYCINA 3. Budowa promotora genu *PTEN*

β -kateniny z białkiem PTEN lub kinazą PI3 jest kolejnym dowodem potwierdzającym antagonistyczny charakter PTEN w stosunku do kinazy PI3.

Wpływ białka PTEN na regulację działania PIP-3, wtórnego przekaźnika sygnału w komórce, odgrywa istotną rolę w kontroli wielkości komórek nerwowych (prawdopodobnie na poziomie translacji białek) [1] oraz w kontroli wielkości i kurczliwości mięśnia sercowego [6]. Istotną rolę w regulowaniu przez PTEN wielkości kardiomiocytów pełni droga sygnałowa: receptor kinazy tyrozynowej p110 α / PTEN [6]. W przypadku kontroli kurczliwości mięśnia sercowego działanie PTEN jest antagonistyczne wobec kinazy γ PI3 (izoformy kinazy PI3), białka, które po aktywacji przez wiązanie się z białkiem G_i prowadzi do zahamowania syntezy cAMP, co skutkuje obniżeniem kurczliwości mięśnia sercowego [6,18].

BUDOWA I REGULACJA AKTYWNOŚCI PROMOTORA GENU *PTEN*

Gen *PTEN/MMAC1/TEP1* zlokalizowany jest na chromosomie 10q23.3. i zawiera 9 eksonów. W regionie promotorowym genu, pomiędzy -2233 a +1 pz [49] znajdują się: (i) liczne sekwencje CpG, (ii) miejsca wiążące czynniki transkrypcyjne: Egr-1, NF- κ B, p53, RXR i CREB, (iii) potencjalne miejsca wiążące czynniki transkrypcyjne: AP-2, AP-4, E2F i Sp1 [19,44]. Promotor genu *PTEN* nie zawiera sekwencji konsensusowej TATA.

W promotorze genu *PTEN* zidentyfikowano wiele ważnych regionów (ryc. 3). Regiony od -2233 do -1775 pz [49] i od -1018 do -104 pz [19,44] są wyjątkowo bogate w sekwencję dinukleotydową CpG. Region pomiędzy -1040 i -817 pz zawiera 9 miejsc inicjujących transkrypcję, z których miejsce w pozycji -1031 uważane jest za najważniejsze [46]. Pomiedzy -1190 i -1157 pz znajdują się dwa miejsca wiążące białko p53 rozdzielone (nietypowo) 14 parami zasad [49]: GAGCAAGCCcaggcagctacactGGGCATGCTC. Według opinii Stambolic i wsp. [49] te miejsca wiążące p53 są istotne dla transaktywacji promotora *PTEN*, chociaż analiza sekwencji ludzkiego genu *PTEN* wykazała istnienie w intronie 1 jeszcze siedmiu dodatkowych sekwencji podobnych do miejsc wiążących p53. Jednak do chwili obecnej nie jest udokumentowana ich istotność w regulacji transkrypcji genu *PTEN* [46]. Pewne geny, których ekspresja jest zależna od transaktywacji przez p53, np. p21 czy cyklina G1, zawierają (także w intronach) wielokrotne powtórzenia sekwencji wiążących białko p53. Należy nadmienić, że rola p53 w regulacji transkrypcji genu *PTEN* jest ciągle dyskutowana i nie wszyscy autorzy badań potwierdzają znaczącą rolę tego białka w aktywacji promotora *PTEN* [46]. Region pomiędzy -947 i -939 pz zawiera sekwencję GCGGCGGCG, która wiąże czynnik transkrypcyjny Egr-1 (ang. *Early growth response 1*) [60]. Badania Virolle i wsp. [60] wykazały, że naświetlanie promieniami UV komórek linii 293T i linii NMuMG (są to prawidłowe nabłonkowe komórki gruczołów mlecznych) stymuluje syntezę endogenego Egr-1 i w konsekwencji ekspresję *PTEN* na poziomie mRNA i białka. Ważność miejsca wiążącego czynnik transkrypcyjny

Egr-1 dla ekspresji *PTEN* podkreślają badania, w których delecja miejsca wiążącego Egr-1 w promotorze *PTEN* indukowała oporność komórek linii nowotworowych (293T) na naświetlanie promieniami UV. Konsekwencją tego było zmniejszenie lub zahamowanie apoptozy komórek [60]. W regionie pomiędzy –1573 i –1441 pz znajdują się dwa potencjalne miejsca wiążące NF-κB: GGAATCTCT (w pozycji od –1573 do –1565 pz) i GGGTATTCCC (w pozycji od –1450 do –1441 pz) [58], przy czym badania Vasudevan i wsp. [58] wykazały, że mechanizm inhibicji transkrypcji genu *PTEN* przez NF-κB jest niezależny od tych miejsc. Podjednostka czynnika transkrypcyjnego NF-κB, białko p65, hamuje aktywność promotora genu *PTEN* w drodze bezpośredniego współzawodnictwa z innymi czynnikami transkrypcyjnymi o wiązanie koaktywatorów transkrypcji, CBP i p300. Wiążąc CBP/p300, białko p65 ogranicza pulę koaktywatorów transkrypcji dla innych czynników transkrypcyjnych, które mogą być zaangażowane w pobudzanie ekspresji genu *PTEN*. Badania ludzkich komórek raka płuc i tarczycy wykazały, że podwyższony poziom białka p65 wiąże się z obniżoną ekspresją *PTEN* [58]. Promotor genu *PTEN* pomiędzy –1311 i –819 pz zawiera trzy miejsca dla białek wiążących się z sekwencją CCAAT (C/EBP, ang. *CCAAT/Enhancer-Binding Protein*) oraz pomiędzy –1377 i –977 pz cztery miejsca wiążące receptor kwasu retinowego RXR [58]. Ponadto badania komórek linii Caco2 (komórki rakowe jelita grubego) i komórek linii MCF-7 wykazały, że ekspresja genu *PTEN* na poziomie mRNA była stymulowana przez receptory aktywowane przez proliferatory peroksisomów typu gamma (PPARγ, ang. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ*), aktywowane selektywnym ligandem, chociaż miejsca wiążące PPARγ: GGGACCAAGGTCA oraz GGGATAAAGGGCA, znajdują się w odległości około 11 000 pz w górę od promotora genu *PTEN*. Stymulacja transkrypcji *PTEN* przez PPARγ korelowała ze spadkiem aktywności kinazy PI3 i ze spadkiem fosforylacji białka Akt [37].

ZMIANY EPIGENETYCZNE GENU *PTEN* W LUDZKICH KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH

Zaburzenia ekspresji genu *PTEN* na skutek genetycznych i epigenetycznych zmian zostały stwierdzone w wielu dziedzicznych i sporadycznych nowotworach ludzkich. Mutacje dziedziczne genu w komórkach zarodkowych występują w wielu zespołach chorobowych [24,30,71], są odpowiedzialne m.in. za zespoły chorobowe Cowdena i Bannayan-Zonana [30]. W wielu sporadycznych nowotworach obserwowano brak lub znaczne obniżenie stężenia białka PTEN, co związane było nie tylko ze zmianami genetycznymi, ale również z epigenetycznymi, głównie ze zwiększoną metylacją sekwencji dinukleotydowych CpG w regionie promotorowym genu [26,72]. Związek przyczynowy między zwiększoną metylacją promotora genu *PTEN* a wyciszeniem ekspresji odnotowywano w: raku błony śluzowej macicy [32,44], raku prostaty [10], raku żołądka [26], sporadycznym raku okrężnicy [19], raku niedrobnokomórkowym płuc (NSCLC, ang. *Non-Small Cell Lung Cancer*) [47], czerniaku [48,70], sporadycznym raku piersi [11,15,39].

Salvesen i wsp. [44] oceniają, że 19% przypadków raka błony śluzowej macicy charakteryzuje zwiększona metylacja w regionie promotorowym genu *PTEN*. Ponadto te przypadki raka wykazywały korelację pomiędzy metylacją promotora genu i tworzeniem przerzutów (metastazą) oraz mikrosatelitarną niestabilnością. Podobną zależność obserwowano w sporadycznym raku okrężnicy; w grupie przypadków z wysokim stopniem mikrosatelitarnej niestabilności w 19% wykazano metylację regionu regulatorowego genu [19]. Udziału metylacji w wyciszeniu transkrypcji *PTEN* nie wykluczono także w raku prostaty [10]. Również wyniki badań Kanga i wsp. [26] wykazały zmiany we wzorze metylacji promotora genu *PTEN* w 39% przypadków raka żołądka i utratę ekspresji genu w 73% tych przypadków. Również w raku płuc NSCLC brak białka PTEN może być, w części przypadków, wynikiem zmiany wzoru metylacji w regionie regulatorowym genu *PTEN*, ze względu na rzadkość odnotowywania mutacji w tym genie. Zwiększoną metylację promotora *PTEN* wykrywano w 35% przypadków raka płuc NSCLC i w 69% komórek linii tego raka płuc [47]. Utratę funkcjonalnego białka PTEN obserwowano także w 40–50% przypadków czerniaka [48], przy czym mutacje lub delecje w genie *PTEN* stwierdzano w 60% komórek linii czerniaka, ale tylko w 10% tkanek pobranych od pacjentów z tym nowotworem. Może to wskazywać, że w czerniaku inaktywacja genu w wyniku zmian epigenetycznych (tj. zwiększonej metylacji) albo zaburzenia subkomórkowej lokalizacji białka PTEN może odgrywać ważniejszą rolę niż mutacje [48,70]. W przypadku raka piersi brak (lub zmniejszenie) ekspresji *PTEN* obserwowano w około 33% przypadków i ta dysfunkcja genu korelowała z tworzeniem przerzutów do węzłów chłonnych, brakiem receptora estrogenowego i wysoką śmiertelnością [11,39].

Powyżej przytoczone wyniki badań sugerują, że w wielu typach nowotworów metylacja wysp CpG w regionie regulatorowym genu *PTEN* (jak i innych genów supresorowych lub genów metabolizmu podstawowego) może istotnie wpływać na wyciszenie jego (ich) transkrypcji, a to wyciszenie jest zależne od aktywności i ekspresji metylotransferazy DNA (DNMT1). Jest bardzo prawdopodobne, że pomiędzy aktywnością białka PTEN a ekspresją *DNMT1* istnieje ścisła zależność. Brak aktywnego białka PTEN prowadzi do odblokowania wewnątrzkomórkowego szlaku przekazu sygnału zależnego od kinazy MAP, którego ostatnim elementem jest białko JUN, będące składnikiem kompleksu AP-1 [3,9]. A białko JUN aktywuje aż trzy miejsca inicjujące transkrypcję (P2-P4) w genie *DNMT1*. Zwiększenie ekspresji tego genu może prowadzić do wzmożonej aktywności DNMT1 i związanej z tym wzmożonej metylacji genów supresorowych (w tym także genu *PTEN*), skutkującej ich wyciszeniem na poziomie transkrypcji. Może to być jeden z mechanizmów progresji procesu kancerogenezy.

PODSUMOWANIE

Przedstawiona charakterystyka białka PTEN oraz mechanizm regulacji jego aktywności, jak i aktywności genu *PTEN* w komórkach prawidłowych i nowotworowych podkreślają ważność roli, jaką pełni to białko w utrzymaniu prawidłowych funkcji

życiowych komórki i w hamowaniu procesu kancerogenezy poprzez utrzymanie właściwej proporcji pomiędzy proliferacją i apoptozą.

Na szczególną uwagę zasługują: antagonistyczny charakter fosfatazy PTEN wobec kinazy PI3 oraz regulacja ekspresji genu *PTEN* poprzez epigenetyczne wyciszenie jego transkrypcji. Wyjaśnienie biologicznej roli białka supresorowego PTEN i powiązanie jej z regulacją jego aktywności i aktywności genu staje się ważne w aspekcie poszukiwania farmakologicznych możliwości hamowania transformacji nowotworowej już we wczesnych etapach procesu.

LITERATURA

- [1] BACKMAN S, STAMBOLIC V, MAK T. PTEN function in mammalian cell size regulation. *Curr Opin Neurobiol* 2002; **12**: 516–522.
- [2] BESSON A, ROBBINS SM, YONG VW. PTEN/MMAC1/TEP1 in signal transduction and tumorigenesis. *Eur J Biochem* 1999; **263**: 605–611.
- [3] BIGEY P, RAMCHANDANI S, THEBERGE J, ARAUJO FD, SZYF M. Transcriptional regulation of the human DNA methyltransferase (*dnmt1*) gene. *Gene* 2000; **242**: 407–418.
- [4] CAIRNS P, OKAMI K, HALACHMI S, HALACHMI N, ESTELLER M, HERMAN JG, JEN J, ISAACS WB, BOVA GS, SIDRANSKY D. Frequent inactivation of PTEN/ MMAC1 in primary prostate cancer. *Cancer Res* 1997; **57**: 4997–5000.
- [5] CANTLEY LC, NEEL BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 4240–4245.
- [6] CRACKOWER MA, OUDIT GY, KOZIERADZKI I, SARA O, SUN H, SASAKI T, HIRSCH E, SUZUKI A, SHIOI T, IRIE-SASAKI J, SAH R, CHENG H-YM, RYBIN VO, LEMBO G, FRATTA L, OLIVEIRA-DOS-SANTOS AJ, BENOVIĆ JL, KAHN CR, IZUMO S, STEINBERG SF, WYMAN MP, BACK XPH, PENNINGER JM. Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell* 2002; **110**: 737–749.
- [7] DAHIA PLM, AGUIAR RCT, ALBERTA J, KUM JB, CARON S, SILL H, MARSH DJ, RITZ J, FREEDMAN A, STILES C, ENG C. *PTEN* is inversely correlated with the cell survival factor Akt/PKB and is inactivated via multiple mechanisms in haematological malignancies. *Hum Mol Genet* 1999; **8**: 185–193.
- [8] DAS S, DIXON JE, CHO W. Membrane-binding and activation mechanism of PTEN. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 7491–7496.
- [9] DENG C, YANG J, SCOTT J, HANASH S, RICHARDSON BC. Role of the ras-MAPK signaling pathway in the DNA methyltransferase response to DNA hypomethylation. *Biol Chem* 1998; **379**: 1113–1120.
- [10] DEOCAMPO ND, HUANG H, TINDALL DJ. The role of PTEN in the progression and survival of prostate cancer. *Minerva Endocrinol* 2003; **28**: 145–153.
- [11] DEPOWSKI PL, ROSENTHAL SI, ROSS JS. Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer. *Mod Pathol* 2001; **14**: 672–676.
- [12] DI CRISTOFANO A, PANDOLFI PP. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell* 2000; **100**: 387–390.
- [13] DOWNWARD J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol* 1998; **10**: 262–267.
- [14] FANG JY, RICHARDSON BC. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol* 2005; **6**: 322–327.
- [15] GARCIA JM, SILVA J, PENA C, GARCIA V, RODRIGUEZ R, CRUZ MA, CANTOS B, PROVENCIO M, ESPANA P, BONILLA F. Promoter methylation of the *PTEN* gene is a common molecular change in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; **41**: 117–124.
- [16] GEORGESCU M-M, KIRSCH KH, KALOUDIS P, YANG H, PAVLETICH NP, HANAFUSA H. Stabilization and productive positioning roles of the C2 domain of PTEN tumor suppressor. *Cancer Res* 2000; **60**: 7033–7038.

- [17] GIMM O, PERREN A, WENG L-P, MARSH DJ, YEH JJ, ZIEBOLD U, GIL E, HINZE R, DELBRIDGE L, LEES JA, MUTTER GL, ROBINSON BG, KOMMINOTH P, DRALLE H, ENG C. Differential nuclear and cytoplasmic expression of PTEN in normal thyroid tissue, and benign and malignant epithelial thyroid tumors. *Am J Pathol* 2000; **156**: 1693–1700.
- [18] GOBERDHAN DCI, WILSON C. PTEN: tumour suppressor, multifunctional growth regulator and more. *Hum Mol Genet* 2003; **12**: R239–R248.
- [19] GOEL A, ARNOLD CN, NIEDZWIECKI D, CARETHERS JM, DOWELL JM, WASSERMAN L, COMPTON C, MAYER RJ, BERTAGNOLLI MM, BOLAND CR. Frequent inactivation of PTEN by promoter hypermethylation in microsatellite instability-high sporadic colorectal cancers. *Cancer Res* 2004; **64**: 3014–3021.
- [20] GUAN JL. Focal adhesion kinase in integrin signaling. *Matrix Biol* 1997; **16**: 195–200.
- [21] GU J, TAMURA M, PANKOV R, DANEN EHJ, TAKINO T, MATSUMOTO K, YAMADA KM. Shc and FAK differentially regulate cell motility and directionality modulated by PTEN. *J Cell Biol* 1999; **146**: 389–404.
- [22] GU J, TAMURA M, YAMADA KM. Tumor suppressor PTEN inhibits integrin- and growth factor-mediated mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling pathways. *J Cell Biol* 1998; **143**: 1375–1383.
- [23] GUZELOGLU-KAYISLI O, KAYISLI UA, AL-REJJAL R, ZHENG W, LULECI G, ARICI A. Regulation of PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) expression by estradiol and progesterone in human endometrium. *J Clin Endocr Metab* 2003; **88**: 5017–5026.
- [24] IIDA S, TANAKA Y, FUJII H, HAYASHI S, KIMURA M, NAGAREDA T, MORIWAKI K. A heterozygous frameshift mutation of the PTEN/MMAC1 gene in a patient with Lhermitte-Duclos disease – only the mutated allele was expressed in the cerebellar tumor. *Int J Mol Med* 1998; **1**: 925–929.
- [25] INOKI K, LI Y, ZHU T, WU J, GUAN K-L. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* 2002; **4**: 648–657.
- [26] KANG Y-H, LEE HS, KIM WH. Promoter methylation and silencing of PTEN in gastric carcinoma. *Lab Invest* 2002; **82**: 285–291.
- [27] LEE JO, YANG H, GEORGESCU M-M, DI CRISTOFANO A, MAEHAMA T, SHI Y, DIXON JE, PANDOLFI P, PAVLETICH NP. Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell* 1999; **99**: 323–334.
- [28] LI D-M, SUN H. PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G₁ cell cycle arrest in human glioblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 15406–15411.
- [29] LI D-M, SUN H. TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res* 1997; **57**: 2124–2129.
- [30] MARSH DJ, COULON V, LUNETTA KL, ROCCA-SERRA P, DAHIA PL, ZHENG Z, LIAW D, CARON S, DUBOUE B, LIN AY, RICHARDSON AL, BONNETBLANC JM, BRESSIEUX JM, CABARROT-MOREAU A, CHOMPRET A, DEMANGE L, EELES RA, YAHANDA AM, FEARON ER, FRICKER JP, GORLIN RJ, HODGSON SV, HUSON S, LACOMBE D, ENG C. Mutation spectrum and genotype-phenotype analyses in Cowden disease and Bannayan-Zonana syndrome, two hamartoma syndromes with germline PTEN mutation. *Hum Mol Genet* 1998; **7**: 507–515.
- [31] MAYO LD, DIXON JE, DURDEN DL, TONKS NK, DONNER DB. PTEN protects p53 from Mdm2 and sensitizes cancer cells to chemotherapy. *J Biol Chem* 2002; **277**: 5484–5489.
- [32] MUTTER GL, LIN M-C, FITZGERALD JT, KUM JB, BAAK JPA, LEES JA, WENG L-P, ENG C. Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. *J Natl Cancer Inst* 2000; **92**: 924–930.
- [33] MUTTER GL, LIN M-C, FITZGERALD JT, KUM JB, ENG C. Changes in endometrial PTEN expression throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocr Metab* 2000; **85**: 2334–2338.
- [34] MYERS MP, PASS I, BATTY IH, VAN DER KAAY J, STOLAROV JP, HEMMINGS BA, WIGLER MH, DOWNES CP, TONKS NK. The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 13513–13518.
- [35] NAKAMURA N, RAMASWAMY S, VAZQUEZ F, SIGNORETTI S, LODA M, SELLERS WR. Forkhead transcription factors are critical effectors of cell death and cell cycle arrest downstream of PTEN. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 8969–8982.
- [36] OSAKI M, OSHIMURA M, ITO H. PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis* 2004; **9**: 667–676.

- [37] PATEL L, PASS I, COXON P, DOWNES CP, SMITH SA, MACPHEE CH. Tumor suppressor and anti-inflammatory actions of PPAR γ agonists are mediated via upregulation of PTEN. *Curr Biol* 2001; **11**: 764–768.
- [38] PERREN A, KOMMINOTH P, SAREMASLANI P, MATTER C, FEURER S, LEES JA, HEITZ PU, ENG C. Mutation and expression analyses reveal differential subcellular compartmentalization of PTEN in endocrine pancreatic tumors compared to normal islet cells. *Am J Pathol* 2000; **157**: 1097–1103.
- [39] PERREN A, WENG L-P, BOAG AH, ZIEBOLD U, THAKORE K, DAHIA PLM, KOMMINOTH P, LEES JA, MULLIGAN LM, MUTTER GL, ENG C. Immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast. *Am J Pathol* 1999; **155**: 1253–1260.
- [40] POLAKIS P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 2000; **14**: 1837–1851.
- [41] RADU A, NEUBAUER V, AKAGI T, HANAFUSA H, GEORGESCU M-M. PTEN induces cell cycle arrest by decreasing the level and nuclear localization of cyclin D1. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 6139–6149.
- [42] RASHEED BK, McLENDON RE, FRIEDMAN HS, FRIEDMAN AH, FUCHS HE, BIGNER DD, BIGNER SH. Chromosome 10 deletion mapping in human gliomas: a common deletion region in 10q25. *Oncogene* 1995; **10**: 2243–2246.
- [43] REISKE HR, KAO S-C, CARY LA, GUAN J-L, LAI J-F, CHEN H-C. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase in focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J Biol Chem* 1999; **274**: 12361–12366.
- [44] SALVESEN HB, MacDONALD N, RYAN A, JACOBS IJ, LYNCH ED, AKSLEN LA, DAS S. PTEN methylation is associated with advanced stage and microsatellite instability in endometrial carcinoma. *Int J Cancer* 2001; **91**: 22–26.
- [45] SCHLAEPFER DD, HUNTER T. Focal adhesion kinase overexpression enhances Ras-dependent integrin signaling to ERK2/Mitogen-activated protein kinase through interactions with and activation of c-Src. *J Biol Chem* 1997; **272**: 13189–13195.
- [46] SHENG X, KOUL D, LIU JL, LIU TJ, YUNG WK. Promoter analysis of tumor suppressor gene PTEN: identification of minimum promoter region. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **292**: 422–426.
- [47] SORIA J-C, LEE H-Y, LEE JI, WANG L, ISSA J-P, KEMP BL, LIU DD, KURIE JM, MAO L, KHURI FR. Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation. *Clin Cancer Res* 2002; **8**: 1178–1184.
- [48] STAHL JM, CHEUNG M, SHARMA A, TRIVEDI NR, SHANMUGAM S, ROBERTSON GP. Loss of PTEN promotes tumor development in malignant melanoma. *Cancer Res* 2003; **63**: 2881–2890.
- [49] STAMBOLIC V, MacPHERSON D, SAS D, LIN Y, SNOW B, JANG Y, BENCHIMOL S, MAK TW. Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell* 2001; **8**: 317–325.
- [50] SU JD, MAYO LD, DONNER DB, DURDEN DL. PTEN and phosphatidylinositol 3'-kinase inhibitors up-regulate p53 and block tumor-induced angiogenesis: evidence for an effect on the tumor and endothelial compartment. *Cancer Res* 2003; **63**: 3585–3592.
- [51] SUN H, LESCHER R, LI D-M, LILIENTAL J, ZHANG H, GAO J, GAVRILOVA N, MUELLER B, LIU X, WU H. PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 6199–6204.
- [52] TAMURA M, GU J, TAKINO T, YAMADA KM. Tumor suppressor PTEN inhibition of cell invasion, migration, and growth: differential involvement of focal adhesion kinase and p130^{Cas}. *Cancer Res* 1999; **59**: 442–449.
- [53] THORSTENSEN L, LIND GE, LOVIG T, DIEP CB, MELING GI, ROGNUM TO, LOTHE RA. Genetic and epigenetic changes of components affecting the WNT pathway in colorectal carcinomas stratified by microsatellite instability. *Neoplasia* 2005; **7**: 99–108.
- [54] TOLKACHEVA T, BODDAPATI M, SANFIZ A, TSUCHIDA K, KIMMELMAN AC, CHAN AM-L. Regulation of PTEN binding to MAGI-2 by two putative phosphorylation sites at threonine 382 and 383. *Cancer Res* 2001; **61**: 4985–4989.
- [55] TORRES J, PULIDO R. The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. *J Biol Chem* 2001; **276**: 993–998.
- [56] TORRES J, RODRIGUEZ J, MYERS MP, VALIENTE M, GRAVES JD, TONKS NK, PULIDO R. Phosphorylation-regulated cleavage of the tumor suppressor PTEN by caspase-3: implications for the control of protein stability and PTEN-protein interactions. *J Biol Chem* 2003; **278**: 30652–30660.
- [57] TASHIRO H, BLAZES MS, WU R, CHO KR, BOSE S, WANG SI, LI J, PARSONS R, ELLENSON LH. Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. *Cancer Res* 1997; **57**: 3935–3940.

- [58] VASUDEVAN KM, GURUMURTHY S, RANGNEKAR VM. Suppression of PTEN expression by NF- κ B prevents apoptosis. *Mol Cell Biol* 2004; **24**: 1007–1021.
- [59] VAZQUEZ F, RAMASWAMY S, NAKAMURA N, SELLERS WR. Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 5010–5018.
- [60] VIROLLE T, ADAMSON ED, BARON V, BIRLE D, MERCOLA D, MUSTELIN T, de BELLE I. The Egr-1 transcription factor directly activates *PTEN* during irradiation-induced signalling. *Nat Cell Biol* 2001; **3**: 1124–1128.
- [61] VOGELMANN R, NGUYEN-TAT M-D, GIEHL K, ADLER G, WEDLICH D, MENKE A. TGF β -induced downregulation of E-cadherin-based cell-cell adhesion depends on PI3-kinase and PTEN. *J Cell Sci* 2005; **118**: 4901–4912.
- [62] WAITE KA, ENG C. BMP2 exposure results in decreased PTEN protein degradation and increased PTEN levels. *Hum Mol Genet* 2003; **12**: 679–684.
- [63] WAITE KA, SINDEN MR, ENG C. Phytoestrogen exposure elevates PTEN levels. *Hum Mol Genet* 2005; **14**: 1457–1463.
- [64] WENG L-P, BROWN JL, ENG C. PTEN induces apoptosis and cell cycle arrest through phosphoinositol-3-kinase/Akt-dependent and -independent pathways. *Hum Mol Genet* 2001; **10**: 237–242.
- [65] WENG L-P, BROWN JL, ENG C. PTEN coordinates G₁ arrest by down-regulation cyclin D1 via its protein phosphatase activity and up-regulating p27 via its lipid phosphatase activity in a breast cancer model. *Hum Mol Genet* 2001; **10**: 599–604.
- [66] WHANG YE, WU X, SUZUKI H, REITER RE, TRAN C, VESSELLA RL, SAID JW, ISAACS WB, SAWYERS CL. Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 5246–5250.
- [67] WU RC, LI X, SCHONTHAL AH. Transcriptional activation of p21WAF1 by PTEN/MMAC1 tumor suppressor. *Mol Cell Biochem* 2000; **203**: 59–71.
- [68] WU X, HEPNER K, CASTELINO-PRABHU S, DO D, KAYE MB, YUAN X-J, WOOD J, ROSS C, SAWYERS CL, WHANG YE. Evidence for regulation of the PTEN tumor suppressor by a membrane-localized multi-PDZ domain containing scaffold protein MAGI-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 4233–4238.
- [69] YAMADA KM, ARAKI M. Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *J Cell Sci* 2001; **114**: 2375–2382.
- [70] ZHOU X-P, GIMM O, HAMPEL H, NIEMANN T, WALKER MJ, ENG C. Epigenetic PTEN silencing in malignant melanomas without *PTEN* mutation. *Am J Pathol* 2000; **157**: 1123–1128.
- [71] ZHOU X-P, MARSH DJ, HAMPEL H, MULLIKEN JB, GIMM O, ENG C. Germline and germline mosaic *PTEN* mutations associated with a Proteus-like syndrome of hemihypertrophy, lower limb asymmetry, arteriovenous malformations and lipomatosis. *Hum Mol Genet* 2000; **9**: 765–768.
- [72] ZYSMAN MA, CHAPMAN WB, BAPAT B. Considerations when analyzing the methylation status of *PTEN* tumor suppressor gene. *Am J Pathol* 2002; **160**: 795–800.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 13.01.2006 r.

Przyjęto: 20.04.2006 r.

ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź

fabian@csk.umed.lodz.pl