

NUKLEOLINA – CHARAKTERYSTYKA BIAŁKA I JEGO ROLA W BIOLOGII NOWOTWORÓW I INFEKCJACH WIRUSOWYCH

NUCLEOLIN – CHARACTERISTICS OF PROTEIN
AND ITS ROLE IN BIOLOGY OF CANCERS AND VIRAL INFECTIONS

Marek MASIUK

Zakład Patomorfologii PAM w Szczecinie

Streszczenie: Nukleolina jest wielofunkcyjnym, białkiem, w którym można wyróżnić trzy domeny różniące się budową i warunkujące różne funkcje. Białko to zlokalizowane jest głównie w jąderkach, ale występuje również w karioplazmie poza nimi, w cytoplazmie i błonie komórkowej oraz ma zdolność przemieszczania się między tymi przedziałami. Różnorodna lokalizacja przemawia za jego udziałem w komórce w wielorakich procesach fizjologicznych, jak i patologicznych. Jednak główną funkcją nukleoliny jest udział w obróbce rRNA od etapu transkrypcji rDNA po organizację cząstek prerybosomowych. Nukleolina uczestniczy w zmianach struktury chromatyny, wydłużaniu pierwotnego transkryptu rRNA i dojrzewaniu rybosomów. Wykazuje ona ponadto zdolność m.in. stabilizowania mRNA, formowania struktury jąderek czy uczestniczenia w procesie apoptozy. Nukleolina odgrywa rolę w karcynogenezie indukowanej wirusami ludzkiego brodawczaka oraz wpływa na białka supresorowe i czynniki transkrypcyjne. Badania nad ekspresją nukleoliny w rakach sutka wykazały jej związek z typem histologicznym, ekspresją receptora estrogenowego, fazami cyklu komórkowego i obecnością przerzutów w węzłach chłonnych. W ostatnich latach zwrócono również uwagę na rolę nukleoliny zlokalizowanej w obrębie błony komórkowej we wnikaniu cząstek wirusów do komórki. W infekcji wirusem HIV, może stanowić ona potencjalny cel terapeutyczny. Nukleolina wpływa również na replikację wirusów hepatotropowych. Istotną rolę nukleoliny w infekcjach wirusowych potwierdza również fakt jej współwystępowania z antygenami licznych wirusów. W pracy omówiono strukturę nukleoliny, regulację ekspresji i modyfikacje potranslacyjne oraz główne funkcje w komórce. Przedstawiono ponadto najnowsze poglądy na rolę nukleoliny w biologii nowotworów oraz jej udział w infekcjach wirusowych, szczególnie w infekcji wirusem HIV i wirusami hepatotropowymi.

Słowa kluczowe: nukleolina, jąderko, AgNOR, infekcja wirusowa, HIV, nowotwory.

Summary: Nucleolin is a multifunctional nucleolar protein that has three domains of different structure and functions. This protein is located in nucleoli but is also detected in karyoplasm outside nucleoli, in cytoplasm and in the cell membrane. It shuttles between these structures. Different localization of nucleolin in a cell points to its involvement in different physiologic and pathologic processes. The main function of nucleolin is participation in rRNA processing from rDNA transcription to assembly of preribosomal particles. Nucleolin induces changes of chromatin structure, elongation of primary trans-

cript of rRNA and ribosome maturation. It potentially can stabilize mRNA, play a role in formation of nucleoli or apoptosis. Nucleolin is involved in human papilloma virus-induced carcinogenesis and influences suppressor proteins and transcription factors. Results of studies on expression of nucleolin in breast cancers showed its relation to a histological type, estrogen receptor expression, cell cycle phases and lymph nodes metastases. In last years the localization of nucleolin in the cell membrane brought interest to its participation in viral infections. Nucleolin might be a therapeutic target in HIV infection. It also influences the replication of hepatotropic viruses. The essential role of nucleolin in viral infection is also supported by its colocalization with many viral antigens. In the present study the structure, regulation of expression and posttranslational modifications as well as main functions of nucleolin in a cell are discussed. Moreover the latest data on the role of nucleolin in biology of cancers and in viral infections, especially HIV and hepatotropic viruses are presented.

Key words: nucleolin, nucleolus, AgNOR, viral infection, HIV, cancers.

WSTĘP

Jąderko, chociaż nieoddzielone błoną od pozostałej części jądra komórkowego, jest specyficzną strukturą wewnątrzjądrową widoczną w mikroskopie świetlnym w komórkach interfazowych i zawierającą charakterystyczne białka [6,21]. W jego obrębie można wyróżnić trzy regiony o zróżnicowanej gęstości: centra włókniste, gęsty składnik włóknisty i składnik ziarnisty [6]. Centrum włókniste otaczają pasma gęstego składnika włóknistego, który z kolei otoczony jest przez centra ziarniste [57,92]. Jąderko cechuje się dużą dynamiką morfologii w czasie cyklu komórkowego. Podczas profazy następuje rozproszenie składnika włóknistego i ziarnistego, w metafazie jąderko zanika i pojawia się ponownie w anafazie, zaś w późnej telofazie do pętli chromatyny jąderkowej dołączane są elementy włókniste i ziarniste przyszłego jąderka [21].

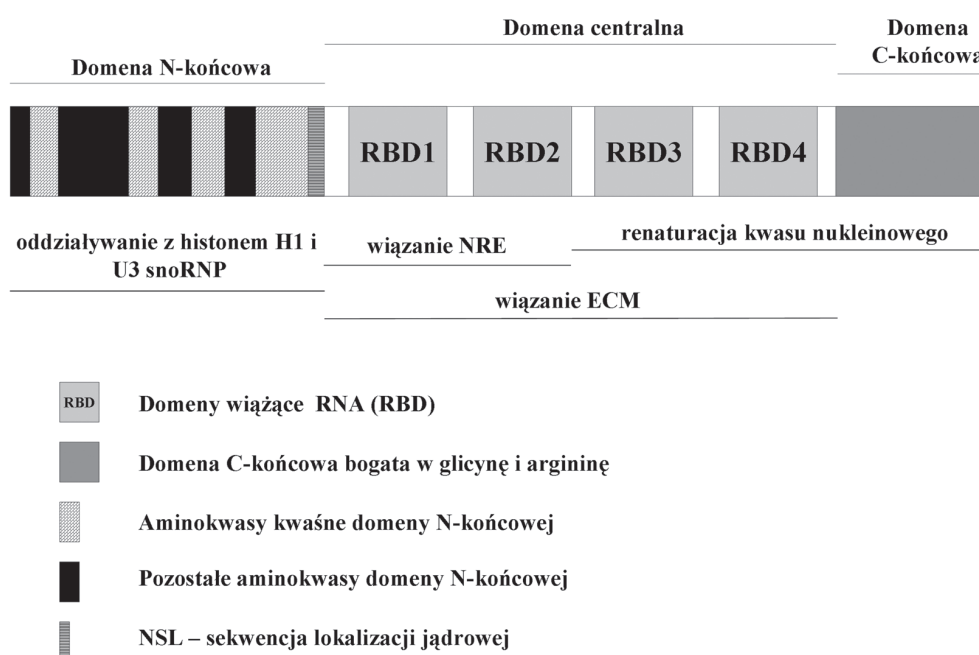
Jąderko jest przede wszystkim miejscem przemian rRNA (ang. *Ribosomal Ribonucleotide Acid* – rybosomowy kwas rybonukleinowy), od etapu transkrypcji po organizację cząstek prerybosomowych. Geny rDNA (ang. *Ribosomal Deoxyribonucleotide Acid* – kwas deoksyrybonukleinowy kodujący geny rybosomowe) zlokalizowane są u człowieka na chromosomach akrocentrycznych w postaci powtarzających się sekwencji. Związane z nimi białka, takie jak: nukleolina, białko B23, polimeraza RNA I, UBF (ang. *Upstream Binding Factor*) – jąderkowy czynnik transkrypcji wiążący się powyżej miejsca startu – wykazują zdolność redukcji jonów srebra, wyznaczając tzw. srebrochłonne organizatory jąderka – AgNOR (ang. *Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions*) [22], których obszar odzwierciedla poziom biogenezy rybosomów [18]. Transkrypcja rDNA zachodzi na granicy centrów włóknistych i gęstego składnika włóknistego, podczas gdy pozostałe etapy obróbki rRNA mają miejsce głównie w składniku ziarnistym [6,18,57,92]. Składniki białkowe jąderka badane są od początku lat siedemdziesiątych ubiegłego stulecia, a ich liczba osiągnęła już ponad 500 dla ludzkich jąderek [55]. O różnorodności funkcji jąderka może również świadczyć fakt, że jedynie 39% jego białek stanowi białka rybosomowe lub bierze udział w biogenezie rybosomów [79]. Do nich należy nukleolina stanowiąca około 10% wszystkich białek jąderka [30].

NUKLEOLINA – STRUKTURA DOMENOWA

Nukleolina (białko C23) została odkryta w 1973 roku przez Orricka i wsp. w pracowni Harrisa Buscha [30], w jąderkach komórek wątrobiaka Novikoffa i prawidłowej wątroby szczura. Jednocześnie stwierdzono, że jest ona wraz z białkiem B23 główną fosfoproteiną jąderkową wiążącą jony srebra po barwieniu preparatów azotanem srebra [30]. Gen ludzkiej nukleoliny znajduje się na ramieniu długim chromosomu 2 (2q12) i składa się z 14 eksonów i 13 intronów [85].

W cząsteczce nukleoliny można wyróżnić trzy domeny, różniące się zarówno składem aminokwasów, jak i funkcją: N-kończową, centralną oraz C-kończową [28,30,36]. Rzeczywista jej masa wynosi 100–110 kDa i jest wyższa niż wartość przewidywana z długości cząsteczki cDNA, co wynika z obecności aminokwasów kwaśnych i zasadowych zmieniających szybkość migracji nukleoliny w żelu w elektroforezie [86].

Region N-końcowy nukleoliny zawiera na przemian występujące ciągi sekwencji aminokwasów kwaśnych i zasadowych analogiczne do sekwencji w histonie H1, które odpowiadają za zdolność nukleoliny do interakcji z tym histonem. Reszty kwasu asparaginowego i glutaminowego N-końca decydują o zdolności wiązania przez nią



RYCINA 1. Budowa domenowa nukleoliny oraz główne funkcje poszczególnych domen (zmodyfikowane wg [23,30])

FIGURE 1. Structure of domains of nucleolin and their main functions (modified from [23,30])

jonów srebra w reakcji z azotanem srebra, pozwalającej uwidocznić AgNOR. Domena ta zawiera około połowy miejsc fosforylacji nukleoliny oraz sekwencję odpowiadającą za lokalizację jądrową tego białka – NLS (ang. *Nuclear Localization Sequence*). Pomimo że nukleolina jest konserwatywnym białkiem, region N-końcowy charakteryzuje się dużą zmiennością pomiędzy różnymi białkami nukleolinopodobnymi u różnych organizmów [30,86]. Domena N-końcowa wykazuje zdolność wiązania białek i uczestniczy w ich transporcie do jąderka. Oddziaływanie z białkami zależy od stanu fosforylacji nukleoliny, nie wymaga jednak obecności kwasów nukleinowych [4].

Region centralny zawiera cztery odcinki, zwane domenami wiążącymi RNA – RBD (ang. *RNA Binding Domain*) lub motywami rozpoznającymi RNA – RRM (ang. *RNA Recognition Motif*). RBD jest jednym z najczęstszych motywów strukturalnych białek spotykanych w naturze. Domena RBD składa się z 70–100 aminokwasów o charakterystycznym układzie $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ [23]. Odpowiada ona za wiązanie przez nukleolinę pierwotnego transkryptu rRNA (pre-rRNA). Wiązanie to obejmuje dwa miejsca w obrębie pre-rRNA: NRE (ang. *Nucleolin Recognition Element*) oraz ECM (ang. *Evolutionary Conserved Motif*). NRE to mała struktura o budowie drugorzędowej typu ramię - pętla (*stem-loop structure*), która znajduje się w obrębie końca 5' zewnętrznych – ETS (ang. *External Transcribed Spacer*) (u myszy) lub wewnętrznych – ITS (ang. *Internal Transcribed Spacer*) (u człowieka) odcinków transkrybowanych pre-rRNA. Najważniejszą częścią tej struktury jest sekwencja (U/G)CCCG(A/G) w obrębie szczytowej pętli o zmiennej długości 7–14 nukleotydów. Mutacja w obrębie reszt C lub G znosi interakcje nukleoliny z pre-rRNA [48]. Ruchomość tej struktury i tworzenie przez niesparowane nukleotydy pętli E ułatwia stereoskopowe oddziaływanie z nukleoliną o najniższej energii [24]. ECM to krótka sekwencja (długości 11 nukleotydów) położona w odległości 5 nukleotydów poniżej miejsca wycinania 5'ETS, która bierze udział w pierwszym etapie dojrzewania pre-rRNA [29]. Podobnie, jak w przypadku NRE, pojedyncza mutacja w ECM znosi interakcję z nukleoliną [28]. Żaden pojedynczy odcinek RBD nukleoliny samodzielnie nie jest w stanie wiązać NRE rRNA, ale już dwa pierwsze RBD wystarczają do interakcji z pre-rRNA [48]. Natomiast do wiązania ECM wymagana jest obecność wszystkich czterech domen RBD. Prawdopodobnie wiązanie przez nukleolinę NRE i ECM zachodzi w różnym czasie, a ich związek z 5'ETS potwierdza jej udział w procesie wycinania ETS [28,29,92].

Cechą charakterystyczną domeny C-końcowej opisywanego białka jest struktura globularna i występowanie powtarzającej się sekwencji Arg-Gly-Gly (RGG), a czynnościowo – zdolność wiązania kwasów nukleinowych [70]. Aktywność ta szczególnie widoczna jest w stosunku do rDNA, co sugeruje udział nukleoliny w procesie transkrypcji, replikacji i rekombinacji rDNA [37]. Region ten, wykazujący aktywność helikazy DNA, odpowiada za rozplatanie kwasów nukleinowych, a jednocześnie jest krytyczny dla oddziaływania pomiędzy dwoma cząsteczkami nukleoliny w procesie renaturacji DNA, przy czym dla tej funkcji wymagana jest również obecność domen RBD3 i RBD4. W procesie tym w pierwszym etapie dochodzi do wiązania ssDNA przez sekwencję RGG, a następnie oddziaływanie

między dwoma cząsteczkami nukleoliny doprowadza do renaturacji kwasu nukleinowego. Sekwencja RGG warunkuje również zdolność odłączania cząsteczki nukleoliny od DNA po zakończeniu procesu renaturacji. Nukleolina zwiększa szybkość renaturacji DNA, również w przypadku niezgodności pojedynczych nukleotydów [36]. Domena C-końcowa uczestniczy także w transporcie białek do jąderka [30,86] i odpowiada za lokalizację nukleoliny w jąderku wraz z zawartą w obrębie N-końca sekwencją NLS [70].

LOKALIZACJA NUKLEOLINY W KOMÓRCIE, REGULACJA JEJ EKSPRESJI I MODYFIKACJE POTRANSLACYJNE

W komórkach interfazowych nukleolina zlokalizowana jest głównie w jąderkach, w otoczeniu organizatorów jąderek w chromosomach oraz w nukleoplazmie [12,30,31,57,59]. Obecność nukleoliny stwierdzono również w cytoplazmie [57,92], a także na powierzchni komórki [38,42,43,67]. Badania immunofluorescencyjne i immunomikroskopia elektronowa wykazały jej obecność w obrębie centrów włóknistych i gęstego składnika włóknistego jąderka [30,57]. Nie stwierdzono natomiast nukleoliny w dojrzałych rybosomach [23,72].

W jądrach komórek w profazie nukleolina pozostaje w jąderkach, w prometafazie przemieszcza się do cytoplazmy pozostając w części związana z obszarami peryferyjnymi chromosomów i zachowując takie rozmieszczenie w metafazie. W anafazie białko to przemieszcza się do ognisk jąderkowych – NDF (ang. *Nucleolus-Derived Foci*), a we wczesnej telofazie nadal pozostaje w związku z chromosomami oraz ciałkami przedjąderkowymi [57]. Zawartość nukleoliny w obrębie karioplazmy poza jąderkami w jądrach interfazowych jest 15-krotnie niższa niż w obrębie jąderek w komórkach raka sutka [59], a w komórkach linii U2-OS stanowi około 8,5% puli wewnątrzjądrowej nukleoliny [16].

Nukleolina jest białkiem, które przemieszcza się między jąderkiem a nukleoplazmą [12] oraz pomiędzy jądrem a cytoplazmą [42,62]. Tworzy ona kompleks z innymi białkami biorącymi udział w obróbce rRNA (B23, fibrylaryna), którego stabilność nie jest zależna od aktywności transkrypcyjnej polimerazy RNA I [12], ale zahamowanie syntezy rRNA powoduje przemieszczanie się całego kompleksu wraz z nukleoliną do nukleoplazmy [62]. Stwierdzono również, że zmiana lokalizacji nukleoliny pomiędzy jąderkiem a nukleoplazmą zależy od jej cyklicznej fosforylacji [30], co również wpływa na regulację biogenezy rybosomów [53]. Przesunięcie nukleoliny z jąderek do nukleoplazmy obserwowano po ekspozycji komórek na promieniowanie jonizujące, szok cieplny i oksydacyjny oraz kamptotecynę, która powodowała także przemieszczenie nukleoliny do cytoplazmy. Relokalizacja nukleoliny pod wpływem różnych czynników stresowych była ściśle zależna od obecności białka p53 [16]. Nukleolina obecna w cytoplazmie występuje w pęcherzykowych strukturach, które współuczestniczą w jej transporcie do błony komórkowej. Transport

ten jest niezależny od siateczki śródplazmatycznej i aparatu Golgiego i wykorzystuje mikrofilamenty aktynowe [42]. Lokalizacja błonowa stanowi 5% puli nukleoliny w komórce [8] i poniżej 20% nukleoliny zawartej w cytoplazmie [42]. Ekspresja nukleoliny w błonie komórkowej zdaje się być zależna od proliferacji, gdyż obserwowano znaczny spadek jej ekspresji w komórkach zatrzymanych w cyklu komórkowym [51], a jednocześnie może być ona ograniczona do części błony komórkowej, np. części apikalnej komórek nabłonka dróg oddechowych [8]. Występująca w błonie komórkowej nukleolina zlokalizowana jest po jej zewnętrznej stronie i prawdopodobnie różni się modyfikacjami potranslacyjnymi od nukleoliny obecnej w jąderku [42].

Regulacja ekspresji nukleoliny zachodzi zarówno na poziomie transkrypcji, jak i translacji. Fosfoproteina ta należy do dużej grupy białek aktywowanych przed produkt onkogenu *c-myc*. Mechanizm aktywacji polega na bezpośrednim wpływie białka C-MYC na promotor genu nukleoliny [32]. W trakcie dojrzewania kardiomiocytów szczura obserwowano znaczny spadek poziomu mRNA nukleoliny pomiędzy komórkami embrionalnymi a dojrzałymi, co przemawia za rolą nukleoliny przede wszystkim w komórkach dzielących się. Natomiast w czasie wzrostu komórek (hipertrofia) po suplementacji surowicy w środowisku jej pozbawionym, odnotowano wyższe stężenie nukleoliny w komórkach bez zmian poziomu mRNA. Wiązano to z nasileniem translacji mRNA nukleoliny [5]. Zawartość tego białka w komórce podlega samoregulacji przez jego wiązanie z własnym mRNA hamując translację w przypadku jego nadmiaru [50].

Nukleolina ulega licznym modyfikacjom potranslacyjnym, głównie fosforylacji i defosforylacji. Podczas interfazy kinaza kazeinowa typu II (CKII) fosforyluje reszty seryny nukleoliny doprowadzając do jej proteolizy [64] i zwiększając specyficzność jej oddziaływania z polimerazą RNA I i z rDNA [53]. Koreluje to również z aktywnością transkrypcji genów rRNA [26,73]. Towarzyszy temu fosforylacja UBF, co prowadzi do dalszego wzrostu aktywności kompleksu inicjacyjnego polimerazy RNA I [53]. W czasie mitozy reszty treoniny i seryny cząsteczki białka ulegają fosforylacji przez kinazę p34^{cdc2}, co wiąże się ze zmianą aktywności NLS i przemieszczaniem nukleoliny w czasie cyklu komórkowego [26,30]. Fosfoproteina ta stanowi również substrat dla kinazy białkowej C- ξ , która po jej modyfikacji wpływa na przekazywanie sygnału z powierzchni komórki do jądra [30].

Poza fosforylacją i defosforylacją nukleolina ulega również ADP-rybozylacji [63] i metylacji [70]. Reszty argininy domeny C-końcowej ulegają monometylacji lub asymetrycznej dimetylacji, co może wpływać na wiązanie RNA przez nukleolinę, jednak nie wpływa na jej lokalizację jąderkową [70]. Stwierdzono, że nukleolina znajdująca się poza jądrem komórkowym podlega również N- i O-glikozylacji [11].

Zawartość nukleoliny zmienia się z komórce w czasie cyklu komórkowego. Gorczyca i wsp. wykazali, że stymulacja ludzkich limfocytów fitohemaglutyniną powoduje największy wzrost nukleoliny w jądrze komórkowym między fazami G0 i G1 [31]. W komórkach raka sutka zmiany jej poziomu w czasie cyklu komórkowego zależą od ekspresji receptora estrogenowego α – ER (ang. *Estrogen Receptor α*) wykazując stały wzrost w przypadku raków ER-dodatnich [58].

FUNKCJE NUKLEOLINY W KOMÓRCIE

Zasadniczą funkcją nukleoliny w komórce jest udział w biogenezie rybosomów, o czym świadczy jej lokalizacja w obrębie centrów włóknistych i gęstego składnika włóknistego jąder [30,57], oddziaływania z rDNA i rRNA [23,36,37,48] oraz prerybosomowymi rybonukleoproteinami [8]. Udział nukleoliny w procesie transkrypcji rDNA potwierdza preferencyjne wiązanie z rDNA [37], jej zdolność do modulacji struktury chromatyny przez oddziaływanie z histonem H1 [30,86] i rdzeniem nukleosomu [64] oraz większe powinowactwo do jednoniciowego niż do dwuniciowego DNA [37,48].

Nukleolina bierze udział w usuwaniu histonu H1 przez oddziaływanie aminokwasów kwaśnych jej N-końca z zasadowym regionem histonu H1 i aminokwasów zasadowych tego samego końca nukleoliny z dwuniciowym DNA. Doprowadza to do rozluźnienia wiązań jonowych między histonem H1 a odcinkiem łącznikowym DNA (*linker DNA*), odłączenia histonu i do dekondensacji chromatyny [30]. Tworzenie struktury nukleosomu obejmuje dwa etapy: umieszczenie tetrameru H3-H4 na DNA, a następnie umieszczenie dwóch dimerów H2A-H2B [2]. Początkowo uważano, że nukleolina nie jest w stanie dysocjować rdzenia nukleosomu i jej udział w dekondensacji struktury chromatyny opiera się jedynie na odłączaniu histonu H1. Badania przeprowadzone w ostatnich latach wskazują na zdolność nukleoliny do destabilizacji nukleosomu, także przez odłączanie dimeru H2A-H2B [64]. Nukleolina wiążąc się bezpośrednio z dimerem H2A-H2B przyczynia się do jego dysocjacji, ale jednocześnie może ułatwiać wiązanie nukleosomu z DNA [2]. Wpływając na dynamikę dimerów H2A-H2B białko to destabilizuje oktamer rdzenia nukleosomu i umożliwia „przejście” polimerazy RNA II przez nukleosom [64]. Usunięcie „bariery” nukleosomu powoduje ułatwienie transkrypcji chromatyny i sugeruje, aby zaliczyć nukleolinę do białek o aktywności FACT (ang. *Facilitates Chromatin Transcription*) – ułatwianie transkrypcji chromatyny. Nukleolina wpływa zatem na oddziaływania histon - histon, jak i histon - DNA [2], a także na przyłączanie / odłączanie dimerów H2A-H2B, co może być przyczyną dwojakiego jej działania: indukcji [2,53,75,87,92] lub hamowania transkrypcji rRNA [1,75]. Nukleolina przez domenę N-końcową przyczynia się również do zwiększenia efektywności remodelatorów chromatyny tworząc fizyczny pomost pomiędzy nukleosomem a kompleksem remodelującym [2,64].

Oddziaływanie nukleoliny z pre-rRNA jest przejściowe i specyficzne i wydaje się pełnić ważną rolę w prawidłowym formowaniu jego struktury drugorzędowej. Pętla RNA lokalizuje się pomiędzy dwoma powierzchniami struktury beta dwóch RBD białka za pomocą odcinka łączącego, przy czym pierwszy RBD – wiąże RNA od końca 3', a drugi RBD – od końca 5'. Interakcja tego typu jest charakterystyczna również dla innych białek rozpoznających RNA [48]. Bardzo istotną rolę dla interakcji z RNA odgrywa odcinek łączący dwie domeny RBD1 i RBD2, który zwiększa tysiącrotnie powinowactwo nukleoliny do RNA [23]. Nukleolina uczestniczy w pierwszym, zwanym też wczesnym, rozcinaniu końca 5'ETS w obrębie pre-rRNA wiążąc się wysoce specyficznie z NRE [48]. Oddziaływanie pomiędzy nukleoliną a

NRE, w którym uczestniczą dwie domeny RBD, warunkuje prawidłową strukturę przestrzenną pre-rRNA. Usunięcie jednej domeny RDB obniża znacznie powinowactwo nukleoliny do odcinka NRE [23].

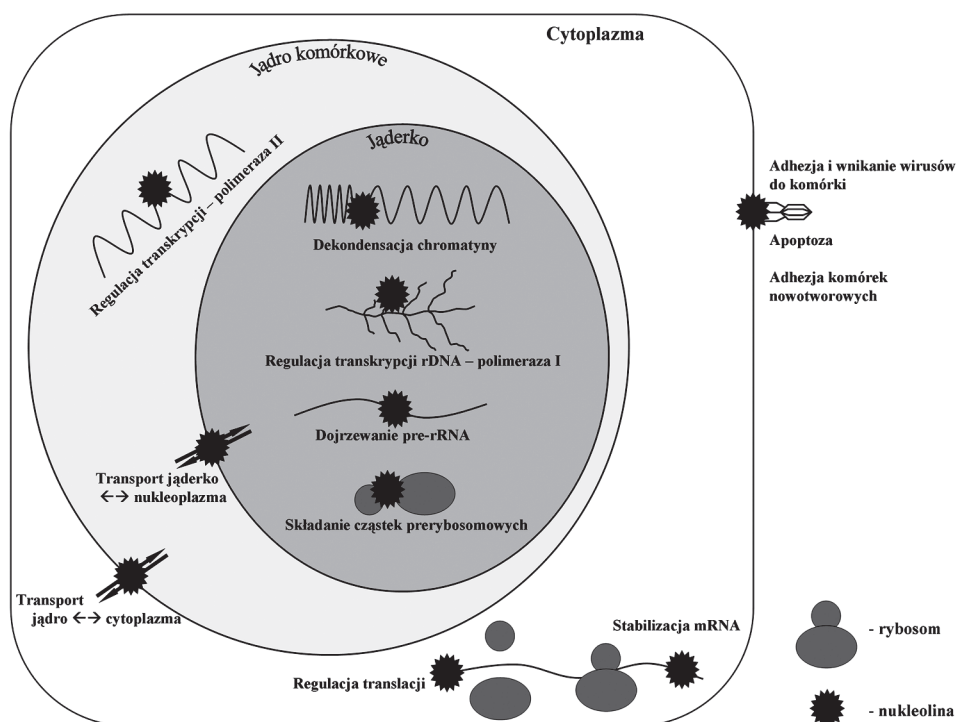
Nukleolina uczestniczy w procesie wydłużania pre-rRNA poprzez wiązanie kompleksu polimerazy RNA I, jak również wpływa na jego aktywność [53,75]. Wiązanie polimerazy RNA I zachodzi w obrębie jej N-końcowego regionu [87], a regulacja procesu transkrypcji rDNA zależy nie tylko od poziomu nukleoliny, ale również od fosforylacji przez CKII prowadzącej do jej proteolizy [64]. Zablokowanie proteolizy [87] lub usunięcie nukleoliny z komórek za pomocą RNAi (ang. *Interfering RNA*) powoduje zahamowanie aktywności polimerazy RNA I [2] i obniżenie transkrypcji rDNA [92]. Nukleolina bierze udział w procesie dojrzewania pre-rRNA oraz przyłącza inne czynniki w trakcie tworzenia się kompleksu biorącego udział w składaniu pre-rRNA (*primary processing complex*), wpływając równocześnie na szybkość wycinania ETS. W pełnieniu takiej funkcji przez nukleolinę nieodzowna jest obecność jej domen RBD i domeny N-końcowej [29]. Po zakończeniu procesu transkrypcji nukleolina oddysocjuje od pre-rRNA, co umożliwia dalsze oddziaływania pomiędzy U3 małym jąderkowym RNA – snoRNA (ang. *Small Nucleolar RNA*) i 18S rRNA. Nukleolina uczestnicząc w wiązaniu U3 snoRNA tworzy kompleks rybonukleoproteinowy [7].

Fosfoproteina ta wpływa na dojrzewanie podjednostki 40S rybosomów zapewniając prawidłową strukturę drugorzędową pre-rRNA i zapobiegając jego degradacji. Ponadto wpływa również na dalsze etapy dojrzewania pre-rRNA przez interakcję z białkami biorącymi w nim udział (białko B23, fibrylaryna) [70]. Wielorakość jej funkcji pozwala sądzić, że jest ona elementem tzw. „chaperonu” (układu opiekuńczego) składania rybosomów u *Eukaryota* [74].

Nukleolina reguluje prawdopodobnie również transkrypcję genów zależną od polimerazy RNA II [35]. Stymuluje ona zależną od niej transkrypcję *in vitro*, ale nie wykazano, aby nukleolina wiązała się z genami transkrybowanymi przez tę polimerazę *in vivo* [73].

Nukleolina uczestniczy w procesie apoptozy, stanowiąc receptor na powierzchni makrofagów i monocytów, rozpoznający polilaktozoaminoglikany, będące częścią białka CD43, występującego na wchodzących na drogę apoptozy komórkach linii T Jurkat. Za oddziaływanie to odpowiada 2/3 C-końca cząsteczki [38]. W komórkach apoptotycznych stwierdzono zjawisko oddziaływania nukleoliny z enzymem naprawczym – PARP-1 (ang. *Poly(ADP-ribose) Polymerase-1*) – polimeraza poli-ADP-rybozy, co prowadzi do spadku poziomu nukleoliny w jądrze i błonie komórkowej oraz jej pojawiania się w ciałkach apoptotycznych [63]. Jednocześnie zdolność nukleoliny do wiązania jonów wapnia może wpływać na zmiany struktury chromatyny w czasie apoptozy [27].

Nukleolina wpływa także na stabilność mRNA. Oddziałuje ona z nieulegającym translacji 3' końcem mRNA *bcl-2* i stabilizuje go [82]. Badania wykorzystujące komórki HL-60 wykazały, że ich ekspozycja na kwas transretinowy czy taksol prowadzi do spadku ilości nukleoliny w cytoplazmie, a następnie do destabilizacji mRNA *bcl-2*, co może skutkować wchodzeniem komórek na drogę apoptozy



RYCINA 2. Lokalizacja wewnątrzkomórkowa nukleoliny i pełnione przez nią funkcje (zmodyfikowane wg [64])

FIGURE 2. Intracellular localization of nucleolin and its functions (modified from [64])

[68,82]. Nukleolina również stabilizuje mRNA *gadd45α* [99]. Stwierdzono, że białko to może destabilizować mRNA ułatwiając jego degradację przez RNazę [93].

Ważną funkcją nukleoliny jest udział w formowaniu jąder. Wyciszenie ekspresji nukleoliny za pomocą siRNA (ang. *Small Interfering RNA*) – małych cząsteczek RNA wyciszających translację – powoduje zmianę kształtu jąder ze sferycznego na nieregularny. Jednocześnie obserwuje się nieprawidłowe ułożenie chromosomów w płycie metafazalnej, co wynika z zaburzeń wiązania kinetochoru z mikrotubulami. Zatem nukleolina uczestniczy w interakcji kinetochoru i mikrotubul lub stabilizuje takie oddziaływania [57]. Białko to zdaje się również uczestniczyć w formowaniu jądra, gdyż obserwowano powiększenie jądra komórkowego w komórkach ze zmniejszoną ekspresją nukleoliny. Wykazano również obecność mikrojąder lub wielu jąder w komórkach HeLa w przypadku obniżenia poziomu nukleoliny. Ponadto stwierdzono zaburzenia poszczególnych komponentów jąderka. Ośrodki włókniste oraz gęsty składnik włóknisty znajdowały się w części peryferyjnej składnika ziarnistego [92]. Struktura jąderka zależy także od syntezy pre-rRNA. Jej zahamowanie prowadziło do rozpadu jąder i przejścia białek jąderkowych (m.in. nukleoliny) do karioplazmy [44].

Spośród opisanych funkcji nukleoliny na uwagę zasługują:

- ◆ aktywność receptorowa – nukleolina na powierzchni komórek śródbłonna naczyń guza oddziałuje z białkami komórek nowotworowych odpowiedzialnymi za ich osiedlanie się [14],
- ◆ funkcja przekaźnika sygnału – nukleolina pośredniczy w przekazywaniu sygnału między receptorem glikokortykosterydów a jądrem [80],
- ◆ aktywacja ekspresji niektórych genów – nukleolina wpływa na ekspresję genów w czasie różnicowania komórek hematopoetycznych [90], aktywując np. ekspresję *CD34* i *bcl-2* w komórkach CD34+ [33],
- ◆ regulująca aktywność czynników transkrypcyjnych [96],
- ◆ funkcja białka szoku termicznego [15,95],
- ◆ kataliza enzymatyczna – nukleolina współtworzy kompleks pełniący funkcję helikazy DNA wiążąc topoizomerazę I i heksamer antygeny T wirusa SV40 [81],
- ◆ funkcja transportowa – nukleolina bierze udział w transporcie jądrowo-cytoplazmatycznym elementów rybosomów i czynników wzrostu [83].

NUKLEOLINA A NOWOTWORY ZŁOŚLIWE

Za początek badań nad ekspresją nukleoliny w nowotworach złośliwych należy uznać połowę lat osiemdziesiątych ubiegłego stulecia, gdy zastosowano wysrebranie preparatów histologicznych w celu uwidocznienia AgNOR. Należy pamiętać jednak, że metoda ta wykrywa oprócz nukleoliny inne białka jądrowe o zdolności redukcji jonów srebra; wyniki są uzależnione ściśle od stosowanej metodyki, a ich niska powtarzalność powoduje trudności interpretacyjne [71]. Niemniej stosując ocenę parametrów AgNOR, takich jak: ich liczba i powierzchnia w komórce, stwierdzono liczne korelacje między szybkością proliferacji komórek a tempem przyrostu masy guza [18], stopniem histologicznej złośliwości i przeżyciem [71]. Wyniki sugerowały związek nukleoliny z procesem transformacji nowotworowej, jednak w około 30% przypadków parametry AgNOR nie pozwalały rozróżnić nowotworów złośliwych od zmian łagodnych [18]. Wiele badań wskazuje na związek nukleoliny z czynnikami zaangażowanymi w proces karcynogenezy każąc sądzić, iż jest ona więcej niż tylko biernym uczestnikiem nowotworzenia.

Dowodów na aktywny udział nukleoliny w procesie transformacji nowotworowej dostarczyły wyniki doświadczeń nad karcynogenezą indukowaną wirusem HPV18 (ang. *Human Papilloma Virus*) – wirusem brodawczaka ludzkiego. Nukleolina wiąże specyficznie sekwencję wzmacniającą promotora genomu HPV18 powodując rozluźnienie struktury chromatyny i aktywując transkrypcję onkogenów *E6* i *E7* wirusa w fazie S cyklu komórkowego zakażanych komórek. Wykorzystując linie komórkowe zakażone wirusem HPV18 wykazano, że nukleolina wybiórczo kontroluje proliferację tych komórek *in vitro* oraz warunkuje ekspresję onkogenów wirusa w komórkach raka szyjki macicy i podtrzymuje ich proliferację [35]. Ponadto

stwierdzono oddziaływanie nukleoliny z formą nisko ufosforylowaną białka Rb w fazie G1 cyklu komórkowego. Ekspresja onkogenu *E7* wirusa HPV18 w komórkach HeLa powoduje utratę ekspresji białka Rb, co skutkuje równomiernym rozmieszczeniem nukleoliny w obrębie jądra komórkowego w porównaniu z lokalizacją jąderkową w komórkach niezakażonych wirusem. Zatem umiejscowienie wewnątrzjądrowe nukleoliny zależy od białka Rb i jego utrata w komórkach rakowych powoduje odmienne jej rozmieszczenie. Białko Rb wpływa równocześnie na zdolność nukleoliny do wiązania DNA, hamując ją w sposób zależny od jego ilości. Oddziaływanie białka Rb i nukleoliny hamuje aktywację wirusa HPV18, a jednocześnie Rb kontroluje zależną od nukleoliny transkrypcję onkogenów wirusa HPV18 [34].

Pod wpływem stresu mogącego prowadzić do uszkodzenia DNA (promieniowanie jonizujące, stres cieplny i oksydacyjny) obserwowano przejściowe przemieszczanie się nukleoliny z jąderka do nukleoplazmy. Zjawisku temu towarzyszy tworzenie kompleksu z białkiem p53 i mimo że tylko 5% nukleoliny uczestniczy w kompleksie, obecność białka p53 była istotna w jej przemieszczaniu. Mobilizacja nukleoliny zależna była od C-końca białka p53, zatem nie była związana z jego aktywnością transkrypcyjną [16]. Obserwowano również wzrost aktywności wiązania przez nią RNA po ekspozycji komórek jajnika chomika (linia CHO) i fibroblastów płuc chomika (linia V-79) na promieniowanie jonizujące lub czynnik alkilujący. Czynniki te nie powodowały wzrostu poziomu nukleoliny w komórce, ale zwiększały jej zdolność do wiązania RNA. Wśród potencjalnych ligandów nukleoliny znajdowały się RNA peroksyredoksyny i peroksydazy glutationu oraz białka szoku termicznego o masie cząsteczkowej 90 kDa, indukowane przez stres oksydacyjny, co sugeruje jej udział w regulacji potranskrypcyjnej szeregu czynników odpowiedzi na uszkodzenie DNA [95].

Nukleolina oddziałuje z białkiem p53 regulując jego poziom w procesie translacji. Wyniki badań wykazują pewne rozbieżności dotyczące funkcji nukleoliny w relacji z białkiem p53. W badaniach Saxena i wsp. [78] zaobserwowano spadek białka p53 przy hamowaniu ekspresji nukleoliny za pomocą siRNA w komórkach linii U2-OS, co świadczy, że zmiany zawartości nukleoliny powodowały równorzędne zmiany poziomu białka p53. Nasilonej ekspresji nukleoliny towarzyszył spadek białka Hdm2 i wyciszenie jego aktywność jako ligazy ubikwityny, co w konsekwencji prowadziło do spadku ubikwitynacji białka p53 i wydłużenia jego okresu półtrwania. Jednocześnie nukleolina zwiększała ekspresję białka p21^{cip1/waf1}, co wskazuje, że może ona hamować proliferację w sposób zależny od ekspresji p53 [78]. Natomiast transfekcja komórek MCF-7 nukleoliną redukowała poziom białka p53 i jednocześnie hamowała indukowany przez promieniowanie jonizujące wzrost translacji p53. Nukleolina wiążąc się z regionem 5'UTR mRNA p53 (ang. 5'UTR – *5'Untranslated Regions* – sekwencje niekodujące końca 5') i stabilizując jego strukturę ramię-pętla hamowała translację p53. Zakażenie fibroblastów embrionów szczura (linia REF) retrowirusem zawierającym nukleolinę powodowało znaczne zmiany morfologii (zaburzenia kształtu i wielkości komórek) oraz nasilało ich proliferację. Modulacja translacji p53 oraz onkogeny wpływ na komórki REF pozwala uznać nukleolinę za białko o funkcji onkogennej [89], jednak powyższe dane przedstawiają odmienną rolę nukleoliny w komórkach prawidłowych i poddanych

stresowi genotoksycznemu (promieniowanie jonizujące). Nukleolina wpływa również na translację białka GADD45 α , zwiększając stabilność jego mRNA. Białko GADD45 α zaangażowane jest w stabilizację genomu, apoptozę i przeżycie komórek, a jego transkrypcja podlega stymulacji przez białko p53 [99]. Ekspresja białka GADD45 α jest regulowana negatywnie przez jądrowy czynnik kappa B – NF- κ B (ang. *Nuclear Factor Kappa B*), czynnik transkrypcyjny biorący udział w procesie karcynogenezy. Inhibicja NF- κ B powodowała wzrost stabilności mRNA *gadd45 α* poprzez jego wiązanie z nukleoliną [100].

Stwierdzono, że nukleolina wiąże czynniki transkrypcyjne z rodziny MYB (A-MYB, C-MYB) niezależnie od obecności kwasów nukleinowych i innych białek, powodując spadek ich aktywności transkrypcyjnej. Za oddziaływanie to odpowiedzialna jest zapewne pula jądrowa nukleoliny, gdyż białka MYB występują w obrębie jądra poza jąderkami [96]. Biorąc pod uwagę fakt, że MYB mogą działać zarówno jako onkogeny, jak i supresory karcynogenezy [25], nie można wykluczyć, iż obniżenie ich aktywności przez oddziaływanie z nukleoliną przyczynia się do nowotworzenia. Wykazano związek pomiędzy ekspresją receptora estrogenowego i ekspresją C-MYB w rakach sutka. Wyciszenie ekspresji *MYB* prowadziło do zahamowania proliferacji komórek ER-dodatniej linii MCF-7 [20]. Ograniczenie aktywności transkrypcyjnej C-MYB przez nukleolinę [96], a jednocześnie jej dodatnia korelacja z receptorem estrogenowym [59,60] może świadczyć o jej udziale w zależnej od estrogenów karcynogenezie sutka.

Nukleolina oddziałuje z podjednostką katalityczną telomerazy – hTERT (ang. *Human Telomeric Reverse Transcriptase*) zarówno przez bezpośrednią interakcję, jak i poprzez *hTERT* RNA. Oddziaływanie to obejmuje dwa miejsca w cząsteczce nukleoliny (domenę RBD1 oraz region obejmujący domenę RBD4 i jej N-koniec) i nie wpływa na aktywność katalityczną telomerazy jednakże powoduje przemieszczenie kompleksu telomerazy i nukleoliny poza jąderka do nukleoplazmy [49]. Lokalizacja jąderkowa telomerazy w komórkach prawidłowych w porównaniu z „rozlaną”, jądrową w komórkach nowotworowych sugeruje udział zmiany jej lokalizacji w procesie nowotworzenia [49,94]. Zdaje się to potwierdzać lokalizacja hTERT w nukleoplazmie w komórkach transformowanych, jak również indukcja takiej lokalizacji za pomocą onkogenu *T* wirusa SV40 [94].

Nukleolina bierze również udział w odpowiedzi transkrypcyjnej, w której pośredniczy czynnik regulatorowy interferonu 2 – IRF-2 (ang. *Interferon Regulatory Factor*). Wiąże się ona z acetylowaną postacią białka IRF-2 i nasila jego aktywność transkrypcyjną w komórkach NIH3T3 wiążąc promotor genu *H4*. Zachodzi to jednak tylko w komórkach proliferujących i wskazuje na potencjalne działanie onkogenne nukleoliny i regulację przez nią wzrostu komórek [61].

Badania na komórkach przewlekłej białaczki limfatycznej izolowanych z krwi pacjentów wykazały znacznie wyższy (26-krotnie) poziom nukleoliny w cytoplazmie komórek białaczkowych w porównaniu z limfocytami osób zdrowych, jednakże zawartość nukleoliny w jądrze była porównywalna. Jednocześnie stwierdzono zwiększoną stabilność mRNA *bcl-2*, co powodowało wyższą ekspresję tego białka w komórkach białaczkowych. Równocześnie przeprowadzone badania na linii raka

sutka MCF-7 wykazały, że obniżenie stężenia nukleoliny za pomocą siRNA obniżało stabilność mRNA i ekspresję *bcl-2* [69].

Wyniki badań własnych dotyczące ekspresji i lokalizacji nukleoliny w jądrach dwóch najczęstszych typów naciekającego raka sutka (przewodowego i zrazikowego) wykazały związek tych parametrów z typem histologicznym nowotworu i obecnością przerzutów w węzłach chłonnych pachowych [60], ekspresją ER [59,60] oraz fazami cyklu komórkowego [58]. Naciekające raki przewodowe charakteryzują się wyższą ekspresją wewnątrzjądrową nukleoliny w porównaniu z rakami zrazikowymi, a raki ER-dodatnie wyższą niż raki ER-ujemne [59,60]. Biorąc pod uwagę fakt, że typ histologiczny oraz obecność ER są odpowiednio uznanym czynnikiem prognostycznym i predykcyjnym w raku sutka [9], zaobserwowane różnice w ilości nukleoliny mogą stanowić ważny element biologii tych nowotworów. Dodatnia korelacja pomiędzy poziomem ER i nukleoliny może mieć związek z ekspresją białka C-MYC, która w badanym materiale korelowała z ekspresją jądrową nukleoliny, a jednocześnie była wyższa w rakach przewodowych niż zrazikowych (obserwacje własne autora, niepublikowane). Pozostaje to w zgodzie z danymi z piśmiennictwa wskazującymi na obecność amplifikacji *c-myc* w rakach przewodowych i jej brak w rakach zrazikowych [47] oraz na indukcję ekspresji nukleoliny przez produkt tego genu [32]. Stwierdzono także stymulujący wpływ estrogenów na ekspresję *c-myc* i na proliferację komórek zależną od MYC w liniach komórek rakowych [19]. Obecność receptora estrogenowego w komórkach raka sutka wskazuje natomiast na potencjalną zdolność komórek do reagowania na estrogeny, które stymulują ich przechodzenie z fazy G1 do fazy S cyklu komórkowego aktywując cyklinę D1 i białko C-MYC [19]. W badaniach własnych jądra komórkowe raków ER-dodatnich w fazach S i G2M cechowały się wyższą ekspresją nukleoliny w jądrze i w karioplazmie poza jąderkami niż jądra komórek raków ER-ujemnych [58]. Biorąc pod uwagę rolę estrogenów w promocii cyklu komórkowego [19], większy wzrost nukleoliny w jądrach komórek między fazą G1 i S można wiązać ze stymulującym wpływem estrogenów na jej ekspresję [58]. Wyniki doświadczeń potwierdziły różną zawartość nukleoliny w karioplazmie poza jąderkami w rakach sutka w zależności od obecności przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych, co sugeruje udział tego białka w procesie przerzutowania [60].

NUKLEOLINA A INFEKCJE WIRUSOWE

Cząstki wirusów zakażające komórki rozpoznają antygeny jąderkowe i używają ich do przemieszczania się do jąderka, co ułatwia replikację wirusa, a jednocześnie przyczynia się do zaburzeń funkcji komórki gospodarza [13]. W przypadku większości wirusów RNA to cytoplazma jest miejscem ich replikacji, stąd związek z jąderkiem może wydawać się niejasny. Jednakże sekwestracja w obrębie jąderka białek wirusa potrzebnych dla jego cyklu biologicznego w cytoplazmie może prowadzić do jego zaburzeń. Przeprowadzone badania wykazały, że wiązanie przez cząstki wirusowe nukleoliny nasila jej przesunięcie z jąderka do cytoplazmy [39,40,41,62]. Można sądzić zatem, iż możliwość przemieszczania się tego białka między jąderkiem, jądrem a cytoplazmą jest istotna dla replikacji wirusów RNA [40] oraz że lokalizacja

nukleoliny poza jąderka może zaburzać biosyntezę rybosomów komórki gospodarza, a preferować transkrypcję genomu wirusa [41].

Zakażenie wirusem HIV

Ligandy nukleoliny znajdującej się w błonie komórkowej, takie jak: midkina [10,43,77] plejotrofina [76] czy laktoferyna [54], hamują zakażenie wirusem HIV blokując wiązanie wirusa z receptorami na powierzchni komórek, stąd mogą być rozpatrywane w działaniach terapeutycznych. Dodana do hodowli komórkowej przed ekspozycją na wirusa HIV midkina okazała się skutecznym inhibitorem infekcji działając na wczesnym etapie zakażenia komórki, także komórek CD4(-). Jej powinowactwo do powierzchniowej nukleoliny było niskie, ale oddziaływanie było bezpośrednie i specyficzne [10]. Działanie hamujące ujawniało się przy stężeniu 100-krotnie wyższym niż potrzebne do działania jako czynnik wzrostu, a stopień inhibicji zależny był od jej ilości. Oddziaływanie z midkiną zależne było od domeny RGG C-końca nukleoliny. Midkin a działała ochronnie zarówno przeciwko typom T-tropowym, jak i M-tropowym wirusa HIV [43]. Kolejny czynnik wzrostu - plejotrofina, wykazująca homologię struktury z midkiną i pierwotnie wywołująca efekt mitogenny fibroblastów mysich, hamuje zakażenie komórek wirusem HIV, wiążąc się z powierzchniową nukleoliną zarówno na komórkach CD4+, jak i CD4(-). Podobnie, jak w przypadku midkiny, nukleolina stanowi receptor o niskim powinowactwie dla plejotrofiny, zaś hamowanie zakażenia komórek zależne było od stężenia tego ligandu [76]. Kolejnym specyficznym inhibitorem wnikania wirusa HIV do komórek jest pseudopeptyd HB-19, który wiąże się z nukleoliną znajdującą się na powierzchni limfocytów T i makrofagów i tworzy z nią stabilny kompleks, przemieszczający się do cytoplazmy. Wiązanie peptydu HB-19A zależy od obecności powtórzeń RGG w domenie C-końcowej nukleoliny [67].

Limfocyty krwi obwodowej pacjentów zakażonych wirusem HIV wykazują zaburzenia modyfikacji potranslacyjnych nukleoliny. Nasiloną fosforylacją doprowadza do fragmentacji nukleoliny i jej przemieszczenia poza jąderko, a jednocześnie obserwuje się nasiloną lokalizację błonową nukleoliny w limfocytach ulegających apoptozie [26]. Nukleolina tworzy kompleks z białkami kodowanymi przez gen *gag* wirusa HIV-1. Jednocześnie zaobserwowano włączanie nukleoliny do cząstek podobnych do wirionów – VLP (ang. *Virion Like Particles*) oraz wiązanie się jej z odcinkiem „psi” RNA, odpowiedzialnym za upakowanie kwasu nukleinowego do cząstek wirusa. Obecność odcinka „psi” nasilała włączanie nukleoliny do VLP. Mechanizm ten może zabezpieczać przed uwalnianiem wirionów pozbawionych RNA, przez to niezdolnych do replikacji [91].

Zakażenie wirusami hepatotropowymi

Zakażenie wirusami zapalenia wątroby typu B, C i D niesie różne, częstokrotnie wysokie ryzyko rozwoju przewlekłego procesu zapalnego, powikłanego marskością i rakiem wątroby [3]. Liczne badania wykazały udział nukleoliny w procesie zakażenia komórki przez te wirusy i transporcie cząstek wirusa do jąderka [39,40,41,42,66] oraz ich replikacji [39,46,52,84,97].

Wśród białek niestrukturalnych wirusa HCV na uwagę zasługuje białko NS5B wykazujące aktywność RNA-zależnej polimerazy RNA – RdRp (ang. *RNA-dependent RNA-polymerase*) i odgrywające główną rolę w replikacji RNA wirusa [52]. Doświadczenia wykazały, że związanie białka NS5B przez nukleolinę powoduje jej przemieszczenie z jąderka do obszarów okołojądrowych cytoplazmy, a jednocześnie hamuje aktywność enzymatyczną białka NS5B *in vitro*. Oddziaływanie z nukleoliną zależne jest od dwóch sekwencji białka NS5B, z których jedna jest niezbędna do oligomeryzacji białka, co warunkuje aktywność enzymatyczną RdRp [39]. Sugeruje to, że nukleolina może być elementem kompleksu replikacyjnego HCV. Dalsze badania Shimakami i wsp. [84] wykazały, że wyciszenie endogennej nukleoliny przez siRNA powodowało zahamowanie replikacji HCV. Wykazano, że domena N-końcowa nukleoliny może być odpowiedzialna za stymulację replikacji HCV, podczas gdy RBD4 i domena C-końcowa tej fosfoproteiny mogą być odpowiedzialne za wiązanie białka NS5B. Końcowy efekt oddziaływania nukleolina - białko NS5B zależy może od relacji ilościowych obu białek. Nukleolina może wpływać na stabilizację monomerycznej postaci białka NS5B ułatwiając tworzenie kompleksu oligomerycznego i stymulować jego aktywność polimerazy RNA [84]. Wirus HCV wykorzystuje „wewnętrzne miejsce wejścia” wiązania rybosomów – IRES (ang. *Internal Ribosome Entry Site*) w celu wykorzystania podjednostki 40S rybosomów w czasie translacji. Spektrometria masowa podjednostki 40S związanej z wirusem HCV wykazała obecność nukleoliny, czego nie obserwowano w podjednostce 40S pozbawionej wirusa. Świadczy to o obecności nukleoliny w kompleksie inicjującym translację zależną od IRES [97]. W oddziaływaniu nukleoliny z RNA wirusa odgrywa rolę jej domena N-końcowa, która wydaje się pośredniczyć w dalszych oddziaływaniach białko-białko, co wpływa na IRES-zależną translację. Wydaje się istnieć korelacja między zdolnością wiązania RNA a stopniem inhibicji translacji w mutantach pozbawionych domeny N-końcowej nukleoliny. Oddziaływanie nukleoliny z niepodlegającym translacji regionem 5' mRNA wirusa odgrywa rolę w stymulacji IRES-zależnej translacji, a jednocześnie domeny RBD cząsteczki nukleoliny mogą działać ochronnie na tworzący się kompleks preinicjacyjny, a w konsekwencji stymulować zależną od IRES translację [46].

Antygen rdzeniowy wirusa HBV – HBcAg współwystępuje z nukleoliną w jąderkach, a zdolność ta zależy głównie od aminokwasu w pozycji 97 HBcAg. Współwystępowanie antygeny rdzeniowego z nukleoliną nie zależy od innych cząstek składowych wirusa i może odpowiadać za transport białek kapsydu. Badania przeprowadzone na linii Huh7 wykazały, że w przypadku obecności antygeny HBcAg i nukleoliny w tej samej lokalizacji, komórki takie stawały się dwujądrowe lub apoptotyczne [66].

Wirus zapalenia wątroby typu D jest wirusem satelitarnym wirusa typu B, zwiększającym ryzyko rozwoju piorunującego zapalenia wątroby, marskości wątroby i raka z komórek wątrobowych [88]. Jedynym białkiem wirusa jest antygen D (HDAg) występujący jako tzw. mały i duży HDAg (o masie cząsteczkowej odpowiednio 24 i 27 kDa). Większość małego antygeny oraz część większego występowała w kompleksie z nukleoliną i białkiem jąderkowym B23. Region N-końcowy HDAg, ważny dla jego oligomeryzacji i dalszej replikacji genomu HDV,

zawiera również miejsca wiązania nukleoliny. Rola małego antygeny w replikacji wirusa HDV i jego związek z nukleoliną sugeruje potencjalną rolę tego kompleksu w replikacji, choć jego aktywność nie została do tej pory określona. Oddziaływanie z nukleoliną może stanowić sposób na przedostawanie się wirusa do jąderka lub do miejsc transkrypcji [45]. Duży antygen zawiera dwa miejsca wiązania nukleoliny, co umożliwia jąderkową lokalizację tego białka [41]. Mutacje sekwencji lokalizacji jąderkowej – NoLS (ang. *Nucleolar Localization Sequence*) powodowały zaburzenie wiązania nukleoliny i zapobiegały wnikaniu wirusa do jądra [40].

Udział nukleoliny w innych zakażeniach wirusowych

Nukleolina wydaje się pełnić rolę w zakażeniu komórek różnymi wirusami od etapu wiązania cząstki wirusa z powierzchnią komórki i jej internalizacji po transport do jąderka. Nukleolina pełni funkcję receptorową dla wirusa Coxackie B [41] i wirusa paragrypy typu 3 [8]. Białko F (*fusion*) wirusa paragrypy typu 3 oddziałuje specyficznie z nukleoliną zlokalizowaną w części apikalnej komórek nabłonkowych linii A549, pełniąc rolę kofaktora wnikania wirusa do komórki. Zablockowanie powierzchniowej nukleoliny ograniczało znacznie wnikanie wirusa do komórek [8]. Wśród innych wirusów wykazujących tropizm do nabłonka dróg oddechowych, wirus infekcyjnego zapalenia oskrzeli [13], wirus grypy typu A [65] i wirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego – SARS (ang. *Severe Acute Respiratory Syndrome*) [98] wykazywały związek z nukleoliną występującą w jąderku. Nukleoproteina N wirusa infekcyjnego zapalenia oskrzeli lokalizuje się w jąderku, oddziałując specyficznie z nukleoliną i interakcja ta była nasiloną dla formy ufosforylowanej białka. Prawdopodobnie uczestniczy w nim domena RDB nukleoliny. Komórki zakażone wirusem wykazywały opóźnienie w podziale komórek na skutek zaburzonej cytokinezy, co należy wiązać z nasiloną transkrypcją genomu wirusa w czasie interfazy [13]. W procesie zakażenia komórek linii A549 wirusem grypy typu A, jego główne białko NS1 i nukleolinę stwierdzano w obrębie jąderek, po 8–24 godzinach od zakażenia komórek. Dotychczas nie ustalono, czy jest to oddziaływanie bezpośrednie, czy z udziałem RNA, jak również nie wyjaśniono jego roli biologicznej. Biorąc natomiast pod uwagę fakt, że białko NS1 jest najważniejszym czynnikiem regulującym ekspresję genomu wirusa grypy typu A i hamującym odpowiedź interferonu, oddziaływanie z nukleoliną może być ważnym etapem regulującym transkrypcję genomu wirusa w zakażonej komórce [65]. Niestrukuralne białko 3b wirusa SARS lokalizuje się w jąderkach fibroblastów nerki małpy (linia COS-7). Podobnie, jak w przypadku wirusa grypy, nieznana jest funkcja lokalizacji jąderkowej białka 3b, ustalono jedynie obecność dwóch sekwencji NoLS w obrębie jego końca C [98].

Przemieszczenie nukleoliny z jąderka do cytoplazmy obserwowano w zakażeniu komórek wirusem *poliomyelitis* [40]. Jednocześnie stwierdzono związek nukleoliny z 5' niekodującym fragmentem genomu tego wirusa, co sugerowało jej wpływ na jego replikację [41] i zostało potwierdzone stymulującym wpływem nukleoliny na zależną od IRES translację genomu wirusa [46]. Podobnie przemieszczenie nukleoliny z jąderka do cytoplazmy obserwowano w zakażeniu komórek adenowirusem. Białko V łączące kapsyd wirusa z kompleksem białek i DNA zawiera liczne miejsca

oddziaływania z nukleoliną w obrębie jej C-końca. Jego wysoka ekspresja w komórce korelowała ze stopniem przemieszczenia nukleoliny z jąderka. Stwierdzono, że powodowało to zaburzenie syntezy rRNA w komórce, co może promować syntezę wirusowego mRNA [62]. Zaburzenia architektury jąderka obserwowano również w zakażeniu komórek wirusem *herpes simplex* typu 1 (HSV1). Gen rdzeniowy UL24, istotny dla replikacji i reaktywacji latentnej formy wirusa w neuronach, współwystępuje z nukleoliną w jąderkach. Po 9 godzinach od zakażenia komórek linii Vero obserwowano bardziej „rozlany” obraz nukleoliny w stosunku do jej obecności w jednym lub dwóch agregatach w komórkach kontrolnych. Może to sugerować wpływ wirusa na biogenezę rybosomów i ułatwiać replikację własnego materiału genetycznego [56].

PODSUMOWANIE I IMPLIKACJE TERAPEUTYCZNE

Lokalizacja w różnych przedziałach komórki i różnorodność funkcji pełnionych przez nukleolinę czyni ją wyjątkowym białkiem, a jednocześnie pozwala myśleć o wykorzystaniu jej do celów diagnostycznych i terapeutycznych.

Dostępność przeciwciał monoklonalnych przeciwko nukleolinie umożliwia wykorzystanie jej jako alternatywnego i bardziej powtarzalnego markera jąderka w stosunku do oceny AgNOR w diagnostyce nowotworów złośliwych [18,71]. Pozwalałoby to na wprowadzenie dodatkowego parametru związanego z potencjałem proliferacyjnym komórki [31,60]. W przypadku terapii nowotworów, zastosowanie bogatych w glicynę aptamerów doprowadzało do zahamowania proliferacji komórek linii nowotworowych, prawdopodobnie przez zdolność nukleoliny do wiązania aptamerów oraz blokowania jej funkcji [17,87]. Może to stanowić alternatywną terapię hamującą proliferację komórek nowotworowych.

Obecność nukleoliny na powierzchni komórek pełniącej rolę receptora dla wirusa HIV oraz istnienie naturalnych [10,43,76] i syntetycznych [67] ligandów ją blokujących może stanowić dodatkową możliwość zapobiegania rozprzestrzenianiu się zakażenia HIV w organizmie. Natomiast oddziaływanie kluczowego dla replikacji wirusa HCV białka NS5B z nukleoliną [39,46,84] pozwala myśleć o możliwości blokowania tej interakcji jako strategii terapeutycznej w zakażeniach wirusem HCV.

Z uwagi na wielorakość funkcji nukleoliny oraz jej kluczowe znaczenie w komórkach, istotne wydaje się opracowanie strategii terapeutycznych wykorzystujących lokalizację nukleoliny w określonym przedziale komórkowym, co wydaje się możliwe uwzględniając jej liczne modyfikacje potranslacyjne [11,30,63,64]. Pozwoliłoby to na wybiórcze zablokowanie danej funkcji nukleoliny z zachowaniem pozostałych, istotnych dla funkcjonowania komórek prawidłowych.

LITERATURA

- [1] ALVAREZ M, QUEZADA C, NAVARRO C, MOLINA A, BOUVET P, KRAUSKOPF M, VERA MI. An increased expression of nucleolin is associated with a physiological nucleolar segregation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **301**: 152–158.
- [2] ANGELOV D, BONDARENKO VA, ALMAGRO S, MENONI H, MONGÉLARD F, HANS F, MIETTON F, STUDITSKY VM, HAMICHE A, DIMITROV S, BOUVET P. Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes. *EMBO J* 2006; **25**: 1669–1679.
- [3] BARAZANI Y, HIATT JR, TONG MJ, BUSUTTIL RW. Chronic viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *World J Surg* 2007; **31**: 1243–1248.
- [4] BECHEREL OJ, GUEVEN N, BIRRELL GW, SCHREIBER V, SURAWEERAA, JAKOB B, TAUCHER-SCHOLZ G, LAVIN MF. Nucleolar localization of aprataxin is dependent on interaction with nucleolin and on active ribosomal DNA transcription. *Hum Mol Genet* 2006; **15**: 2239–2249.
- [5] BICKNELL K, BROOKS G, KAISER P, CHEN H, DOVE BK, HISCOX JA. Nucleolin is regulated both at the level of transcription and translation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **332**: 817–822.
- [6] BOISVERT FM, VAN KONINGSBRUGGEN S, NAVASCUES J, LAMOND AI. The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**: 574–585.
- [7] BOROVJAGIN AV, GERBI SA. *Xenopus* U3 snoRNA docks on pre-rRNA through a novel base-pairing interaction. *RNA* 2004; **10**: 942–953.
- [8] BOSE S, BASU M, BANERJESS AK. Role of nucleolin in human parainfluenza virus type 3 infection of human lung epithelial cells. *Virol J* 2004; **78**: 8146–8158.
- [9] BUNDRED NJ. Prognostic and predictive factors in breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2001; **27**: 137–142.
- [10] CALLEBAUT C, NISOLE S, BRIAND JP, KRUST B, HOVANESSIAN AG. Inhibition of HIV infection by the cytokine midkine. *Virology* 2001; **281**: 248–264.
- [11] CARPENTIER M, MORELLE W, CODDEVILLE B, PONS A, MASSON M, MAZURIER J, LEGRAND D. Nucleolin undergoes partial N- and O-glycosylations in the extranuclear cell compartment. *Biochemistry* 2005; **44**: 5804–5815.
- [12] CHEN D, HUANG S. Nucleolar components involved in ribosome biogenesis cycle between the nucleolus and nucleoplasm in interphase cells. *J Cell Biol* 2001; **153**: 169–176.
- [13] CHEN H, WURM T, BRITTON P, BROOKS G, HISCOX JA. Interaction of the coronavirus nucleoprotein with nucleolar antigens and the host cell. *J Virol* 2002; **76**: 5233–5250.
- [14] CHRISTIAN S, PILCH J, AKERMAN ME, PORKKA K, LAAKKONEN P, RUOSLAHTI E. Nucleolin expressed at the cell surface is a marker of endothelial cells in angiogenic blood vessels. *J Cell Biol* 2003; **163**: 871–878.
- [15] DANIELY Y, BOROWIEC JA. Formation of a complex between nucleolin and replication protein A after cell stress prevents initiation of DNA replication. *J Cell Biol* 2000; **149**: 799–810.
- [16] DANIELY Y, DIMITROVA DD, BOROWIEC JA. Stress-dependent nucleolin mobilization mediated by p53-nucleolin complex formation. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 6014–6022.
- [17] DAPIĆ V, BATES PJ, TRENT JO, RODGER A, THOMAS SD, MILLER DM. Antiproliferative activity of G-quartet-forming oligonucleotides with backbone and sugar modifications. *Biochemistry* 2002; **41**: 3676–3685.
- [18] DERENZINI M. The AgNORs. *Micron* 2000; **31**: 117–130.
- [19] DOISNEAU-SIXOU SF, SERGIO CM, CARROLL JS, HUI R, MUSGROVE EA, SUTHERLAND RL. Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 2003; **10**: 179–186.
- [20] DRABSCHY, HUGO H, ZHANG R, DOWHAN DH, MIAO YR, GEWIRTZ AM, BARRY SC, RAMSAY RG, GONDA TJ. Mechanism of and requirement for estrogen-regulated MYB expression in estrogen-receptor-positive breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 13762–13767.
- [21] DUNDR M, MISTELI T. Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem J* 2001; **356**: 297–310.
- [22] FATICA A, TOLLERVEY D. Making ribosomes. *Curr Opin Cell Biol* 2002; **14**: 313–318.
- [23] FINGER LD, JOHANSSON C, RINALDI B, BOUVET P, FEIGON J. Contributions of the RNA-binding and linker domains and RNA structure to the specificity and affinity of the nucleolin RBD12/NRE interaction. *Biochemistry* 2004; **43**: 6937–6947.
- [24] FINGER LD, TRANTIREK L, JOHANSSON C, FEIGON J. Solution structures of stem-loop RNAs that bind to the two N-terminal RNA-binding domains of nucleolin. *Nucleic Acids Res* 2003; **31**: 6461–6472.

- [25] FU SL, GANTER B, LIPSICK JS. Myb proteins inhibit fibroblast transformation by v-Rel. *Mol Cancer* 2006; **5**: 54.
- [26] GALATI D, PAIARDINI M, CERVASI B, ALBRECHT H, BOCCHINO M, COSTANTINIA, MONTRO-
NI M, MAGNANI M, PIEDIMONTE G, SILVESTRI G. Specific changes in the posttranslational regula-
tion of nucleolin in lymphocytes from patients infected with human immunodeficiency virus. *Infect Dis*
2003; **188**: 1483-14.
- [27] GILCHRIST JS, ABRENICA B, DIMARIO PJ, CZUBRYT MP, PIERCE GN. Nucleolin is a calcium-
binding protein. *J Cell Biochem* 2002; **85**: 268–278.
- [28] GINISTY H, AMALRIC F, BOUVET P. Two different combinations of RNA-binding domains determine
the RNA binding specificity of nucleolin. *J Biol Chem* 2001; **276**: 14338–14343.
- [29] GINISTY H, SERIN G, GHISOLFI-NIETO L, ROGER B, LIBANTE V, AMALRIC F, BOUVET P.
Interaction of nucleolin with an evolutionarily conserved pre-ribosomal RNA sequence is required for the
assembly of the primary processing complex. *J Biol Chem* 2000; **275**: 18845–18850.
- [30] GINISTY H, SICARD H, ROGER B, BOUVET P. Structure and functions of nucleolin. *J Cell Sci* 1999;
112: 761–772.
- [31] GORCZYCA W, SMOLEWSKI P, GRABAREK J, ARDELT B, ITA M, MELAMED MR, DARZYNKIE-
WICZ Z. Morphometry of nucleoli and expression of nucleolin analyzed by laser scanning cytometry in
mitogenically stimulated lymphocytes. *Cytometry* 2001; **45**: 206–213.
- [32] GREASLEY PJ, BONNARD C, AMATI B. Myc induces the nucleolin and BN51 genes: possible implica-
tions in ribosome biogenesis. *Nucleic Acids Res* 2000; **28**: 446–453.
- [33] GRINSTEIN E, DU Y, SANTOURLIDIS S, CHRIST J, UHRBERG M, WERNET P. Nucleolin regulates
gene expression in CD34-positive hematopoietic cells. *J Biol Chem* 2007; **282**: 12439–12449.
- [34] GRINSTEIN E, SHAN Y, KARAWAJEW L, SNIJDERS PJ, MEIJER CJ, ROYER HD, WERNET P. Cell
cycle-controlled interaction of nucleolin with the retinoblastoma protein and cancerous cell transforma-
tion. *J Biol Chem* 2006; **281**: 22223–22235.
- [35] GRINSTEIN E, WERNET P, SNIJDERS PJ, RÖSL F, WEINERT I, JIA W, KRAFT R, SCHEWE C,
SCHWABE M, HAUPTMANN S, DIETEL M, MEIJER CJ, ROYER HD. Nucleolin as activator of
human papillomavirus type 18 oncogene transcription in cervical cancer. *J Exp Med* 2002; **196**: 1067–
1078.
- [36] HANAKAHI LA, BU Z, MAIZELS N. The C-terminal domain of nucleolin accelerates nucleic acid
annealing. *Biochemistry* 2000; **39**: 15493–15499.
- [37] HANAKAHI LA, SUN H, MAIZELS N. High affinity interactions of nucleolin with G-G-paired rDNA.
J Biol Chem 1999; **274**: 15908–15912.
- [38] HIRANO K, MIKI Y, HIRAI Y, SATO R, ITOH T, HAYASHI A, YAMANAKA M, EDA S, BEPPU M. A
multifunctional shuttling protein nucleolin is a macrophage receptor for apoptotic cells. *J Biol Chem*
2005; **280**: 39284–39293.
- [39] HIRANO M, KANEKO S, YAMASHITA T, LUO H, QIN W, SHIROTA Y, NOMURA T, KOBAYASHI K,
MURAKAMI S. Direct interaction between nucleolin and hepatitis C virus NS5B. *J Biol Chem* 2003;
278: 5109–5115.
- [40] HISCOX JA. RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus. *Nat Rev Microbiol* 2007; **5**: 119–127.
- [41] HISCOX JA. The nucleolus – a gateway to viral infection. *Arch Virol* 2002; **147**: 1077–1089.
- [42] HOVANESSIAN AG, PUVION-DUTILLEUL F, NISOLE S, SVAB J, PERRET E, DENG JS, KRUST B.
The cell-surface-expressed nucleolin is associated with the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res* 2000; **261**:
312–328.
- [43] HOVANESSIAN AR. Midkine, a cytokine that inhibits HIV infection by binding to the cell surface
expressed nucleolin. *Cell Res* 2006; **16**: 174–181.
- [44] HUANG M, JI Y, ITAHANA K, ZHANG Y, MITCHELL B. Guanine nucleotide depletion inhibits pre-
ribosomal RNA synthesis and causes nucleolar disruption. *Leuk Res* 2008; **32**: 131–141.
- [45] HUANG WH, YUNG BY, SYU WJ, LEE YH. The nucleolar phosphoprotein B23 interacts with hepatitis
delta antigens and modulates the hepatitis delta virus RNA replication. *J Biol Chem* 2001; **276**: 25166–
25175.
- [46] IZUMI RE, VALDEZ B, BENERJEE R, SRIVASTAVA M, DASGUPTA A. Nucleolin stimulates viral
internal ribosome entry site-mediated translation. *Virus Res* 2001; **76**: 17–29.
- [47] JANOCKO LE, BROWN KA, SMITH CA, GU LP, POLLICE AA, SINGH SG, JULIAN T, WOLMARK
N, SWEENEY L, SILVERMAN JF, SHACKNEY SE. Distinctive patterns of Her-2/neu, c-myc, and
cyclin D1 gene amplification by fluorescence *in situ* hybridization in primary human breast cancers.
Cytometry 2001; **46**: 136–149.

- [48] JOHANSSON C, FINGER LD, TRANTIREK L, MUELLER TD, KIM S, LAIRD-OFFRINGA IA, FEIGON J. Solution structure of the complex formed by the two N-terminal RNA-binding domains of nucleolin and a pre-rRNA target. *J Mol Biol* 2004; **337**: 799–816.
- [49] KHURTS S, MASUTOMI K, DELGERMAA L, ARAI K, OISHI N, MIZUNO H, HAYASHI N, HAHN WC, MURAKAMI S. Nucleolin interacts with telomerase. *J Biol Chem* 2004; **279**: 51508–51515.
- [50] KIM SK, SRIVASTAWA M. Stability of nucleolin protein as the basis for the differential expression on nucleolin mRNA and protein during serum starvation. *DNA Cell Biol* 2003; **22**: 171–178.
- [51] KRUST B, VIENET R, CARDONA A, ROUGEOT C, JACOTOT E, CALLEBAUT C, GUICHARD G, BRIAND JP, GROGNET JM, HOVANESSIAN AG, EDELMAN L. The anti-HIV pentameric pseudopeptide HB-19 is preferentially taken up *in vivo* by lymphoid organs where it forms a complex with nucleolin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 14090–14095.
- [52] KUSAKAWA T, SHIMAKAMI T, KANEKO S, YOSHIOKA K, MURAKAMI S. Functional interaction of hepatitis C virus NS5B with nucleolin GAR domain. *J Biochem* 2007; **141**: 917–927.
- [53] LEARY DJ, HUANG S. Regulation of ribosome biogenesis within the nucleolus. *FEBS Lett* 2001; **509**: 145–150.
- [54] LEGRAND D, VIGIE K, SAID EA. Surface nucleolin participates in both the binding and endocytosis of lactoferrin in target cells. *Eur J Biochem* 2004; **271**: 303–317.
- [55] LEUNG AK, ANDERSEN JS, MANN M, LAMOND AI. Bioinformatic analysis of the nucleolus. *Biochem J* 2003; **376**: 553–569.
- [56] LYMBEROPOULOS MH, PEARSON A. Involvement of UL24 in herpes-simplex-virus-1-induced dispersal of nucleolin. *Virology* 2007; **363**: 397–409.
- [57] MAN, MATSUNAGA S, TAKATA H, ONO-MANIWA R, UCHIYAMA S, FUKUI K. Nucleolin functions in nucleolus formation and chromosome congression. *J Cell Sci* 2007; **120**: 2091–2105.
- [58] MASIUK M, URASINSKA E, DOMAGALA W. Intranuclear nucleolin distribution during cell cycle progression in human invasive ductal breast carcinomas in relation to estrogen receptor status. *Anticancer Res* 2007; **27**: 3957–3962.
- [59] MASIUK M, URASINSKA E, DOMAGALA W. Simultaneous measurement of nucleolin and estrogen receptor in breast cancer cells by laser scanning cytometry. *Anticancer Res* 2004; **24**: 963–966.
- [60] MASIUK M. Ocena ekspresji nukleoliny i jej wewnątrzjądrowej dystrybucji w estrogeno-ujemnych i estrogeno-dodatnich rakach sutka u kobiet za pomocą laserowego cytometru skaningowego. *Ann Acad Med Stetin* 2006; **52**: 23–32.
- [61] MASUMIA, FUKAZAWA H, SHIMAZU T, YOSHIDA M, OZATO K, KOMURO K, YAMAGUCHI K. Nucleolin is involved in interferon regulatory factor-2-dependent transcriptional activation. *Oncogene* 2006; **25**: 5113–5124.
- [62] MATTHEWS DA. Adenovirus V protein induces redistribution of nucleolin and B23 from nucleolus to cytoplasm. *J Virol* 2001; **75**: 1031–1038.
- [63] MI Y, THOMAS SD, XU X, CASSON LK, MILLER DM, BATES PJ. Apoptosis in leukemia cells is accompanied by alterations in the levels and localization of nucleolin. *J Biol Chem* 2003; **278**: 8572–8579.
- [64] MONGELARD F, BOUVET P. Nucleolin: a multifaceted protein. *TRENDS in Cell Biology* 2006; **17**: 80–86.
- [65] MURAYAMA R, HARADA Y, SHIBATA T, KURODA K, HAYAKAWA S, SHIMIZU K, TANAKA T. Influenza A virus non-structural protein 1 (NS1) interacts with cellular multifunctional protein nucleolin during infection. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **362**: 880–885.
- [66] NING B, SHIH C. Nucleolar localization of human hepatitis B virus capsid protein. *J Virol* 2004; **78**: 13653–13668.
- [67] NISOLE S, SAID EA, MISCHÉ C, PREVOST MC, KRUST B, BOUVET P, BIANCO A, BRIAND JP, HOVANESSIAN AG. The anti-HIV pentameric pseudopeptide HB-19 binds the C-terminal end of nucleolin and prevents anchorage of virus particles in the plasma membrane of target cells. *J Biol Chem* 2002; **277**: 20877–20886.
- [68] OTAKE Y, SENGUPTA TK, BANDYOPADHYAY S, SPICER EK, FERNANDES DJ. Retinoid-induced apoptosis in HL-60 cells is associated with nucleolin down-regulation and destabilization of Bcl-2 mRNA. *Mol Pharmacol* 2005; **67**: 319–326.
- [69] OTAKE Y, SOUNDARARAJAN S, SENGUPTA TK, KIO EA, SMITH JC, PINEDA-ROMAN M, STUART RK, SPICER EK, FERNANDES DJ. Overexpression of nucleolin in chronic lymphocytic leukemia cells induces stabilization of bcl2 mRNA. *Blood* 2007; **109**: 3069–3075.
- [70] PELLAR GJ, DIMARIO PJ. Deletion and site-specific mutagenesis of nucleolin's carboxy GAR domain. *Chromosoma* 2003; **111**: 461–469.

- [71] PICHA, CHIUSAL, MARGARIA E. Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology. *Micron* 2000; **31**: 133–141.
- [72] PINOL-ROMA S. Association of nonribosomal nucleolar proteins in ribonucleoprotein complexes during interphase and mitosis. *Mol Biol Cell* 1999; **10**: 77–90.
- [73] RICKARDS B, FLINT SJ, COLE MD, LEROY G. Nucleolin is required for RNA polymerase I transcription *in vivo*. *Mol Cell Biol* 2007; **27**: 937–948.
- [74] ROGER B, MOISAND A, AMALRIC F, BOUVET P. Nucleolin provides a link between RNA polymerase I transcription and preribosome assembly. *Chromosoma* 2003; **111**: 399–407.
- [75] ROGER B, MOISAND A, AMALRIC F, BOUVET P. Repression of RNA polymerase I transcription by nucleolin is independent of the RNA sequence that is transcribed. *J Biol Chem* 2002; **277**: 10209–10219.
- [76] SAID EA, COURTY J, SVAB J, DELBE J, KRUST B, HOVANESSIAN AG. Pleiotrophin inhibits HIV infection by binding the cell surface expressed nucleolin. *FEBS J* 2005; **272**: 4646–4659.
- [77] SAID EA, KRUST B, NISOLE S, BRIAND JP, HOVANESSIAN AG. The anti-HIV cytokine midkine binds to cell-surface-expressed nucleolin as a low affinity receptor. *J Biol Chem* 2002; **277**: 37492–37502.
- [78] SAXENA A, RORIE CJ, DIMITROVA D, DANIELY Y, BOROWIEC JA. Nucleolin inhibits Hdm2 by multiple pathways leading to p53 stabilization. *Oncogene* 2006; **25**: 7274–7288.
- [79] SCHERLA, COUPE Y, DEON C, CALLE A, KINDBEITER K, SANCHEZ JC, GRECO A, HOCHSTRASSER D, DIAZ JJ. Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Mol Biol Cell* 2002; **13**: 4100–4109.
- [80] SCHULZ M, SCHNEIDER S, LOTTSPREICH F, RENKAWITZ R, EGGERT M. Identification of nucleolin as a glucocorticoid receptor interacting protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **280**: 476–480.
- [81] SEINSOOTH S, UHLMANN-SCHIFFLER H, STAKL H. Bidirectional DNA unwinding by a ternary complex of T antigen, nucleolin and topoisomerase I. *EMBO Reports* 2003; **4**: 263–268.
- [82] SENGUPTA TK, BANDYOPADHYAY S, FERNANDES DJ, SPICER EK. Identification of nucleolin as an AU-rich element binding protein involved in bcl-2 mRNA stabilization. *J Biol Chem* 2004; **279**: 10855–10863.
- [83] SHIBATA Y, MURAMATSU T, HIRAI M, INUI T, KIMURA T, SAITO H, MCCORMICK LM, BU G, KADOMATSU K. Nuclear targeting by the growth factor midkine. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 6788–6796.
- [84] SHIMAKAMI T, HONDA M, KUSAKAWA T, MURATA T, SHIMOTOHNO K, KANEKO S, MURAKAMI S. Effect of hepatitis C virus (HCV) NS5B-nucleolin interaction on HCV replication with HCV subgenomic replicon. *J Virol* 2006; **80**: 3332–3340.
- [85] SRIVASTAVA M, FLEMING PJ, POLLARD HB, BURNS AL. Cloning and sequencing of the human nucleolin cDNA. *FEBS Lett* 1989; **250**: 99–105.
- [86] SRIVASTAVA M, POLLARD HB. Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. *FASEB J* 1999; **13**: 1911–1922.
- [87] STORCK S, SHUKLA M, DIMITROV S, BOUVET P. Functions of the histone chaperone nucleolin in diseases. *Subcell Biochem* 2007; **41**: 125–144.
- [88] SU CW, HUANG YH, HUO TI, SHIH HH, SHEEN IJ, CHEN SW, LEE PC, LEE SD, WU JC. Genotypes and viremia of hepatitis B and D viruses are associated with outcomes of chronic hepatitis D patients. *Gastroenterology* 2006; **130**: 1625–1635.
- [89] TAKAGI M, ABSALON MJ, MCLURE KG, KASTAN MB. Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. *Cell* 2005; **123**: 49–63.
- [90] TU X, BAFFAR, LUKE S, PRISCO M, BASERGAR. Intracellular redistribution of nuclear and nucleolar proteins during differentiation of 32D murine hemopoietic cells. *Exp Cell Res* 2003; **288**: 119–130.
- [91] UENO T, TOKUNAGA K, SAWA H, MAEDA M, CHIBA J, KOJIMAA, HASEGAWA H, SHOYAY, SATA T, KURATA T, TAKAHASHI H. Nucleolin and the packaging signal, psi, promote the budding of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). *Microbiol Immunol* 2004; **48**: 111–118.
- [92] UGRINOVA I, MONIER K, IVALDI C, THIRY M, STORCK S, MONGELARD F, BOUVET P. Inactivation of nucleolin leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest and defects in centrosome duplication. *BMC Mol Biol* 2007; **8**: 66.
- [93] WESTMARK CJ, MALTER JS. Extracellular-regulated kinase controls beta-amyloid precursor protein mRNA decay. *Brain Res Mol Brain Res* 2001; **90**: 193–201.
- [94] WONG JM, KUSDRA L, COLLINS K. Subnuclear shuttling of human telomerase induced by transformation and DNA damage. *Nat Cell Biol* 2002; **4**: 731–736.
- [95] YANG C, MAIGUEL DA, CARRIER F. Identification of nucleolin and nucleophosmin as genotoxic stress-responsive RNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res* 2002; **30**: 2251–2260.

- [96] YING GG, PROOST P, VAN DAMME J, BRUSCHI M, INTRONA M, GOLAY J. Nucleolin, a novel partner for the Myb transcription factor family that regulates their activity. *J Biol Chem* 2000; **275**: 4152–4158.
- [97] YU Y, JI H, DOUDNA JA, LEARY JA. Mass spectrometric analysis of the human 40S ribosomal subunit: native and HCV IRES-bound complexes. *Protein Sci* 2005; **14**: 1438–1446.
- [98] YUAN X, YAO Z, SHAN Y, CHEN B, YANG Z, WU J, ZHAO Z, CHEN J, CONG Y. Nuclear localization of non-structural protein 3b, a protein specifically encoded by the severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Virus Res* 2005; **114**: 70–79.
- [99] ZHANG Y, BHATIA D, XIA H, CASTRANOVA V, SHI X, CHEN F. Nucleolin links to arsenic-induced stabilization of GADD45alpha mRNA. *Nucleic Acids Res* 2006; **34**: 485–495.
- [100] ZHENG X, ZHANG Y, CHEN YQ, CASTRANOVA V, SHI X, CHEN F. Inhibition of NF-kappaB stabilizes gadd45alpha mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **329**: 95–99.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 22.01.2008 r.

Przyjęto: 24.04. 2008 r.

Zakład Patomorfologii Pomorskiej Akademii Medycznej

Ul. Unii Lubelskiej 1, 71-252 Szczecin

e-mail: mmasiuk@med.pam.szczecin.pl