

Received: 2007.09.05
Accepted: 2007.11.19
Published: 2007.12.10

Aktualne poglądy na mechanizm transformacji nowotworowej komórek w gruczolakoraku płuc owiec

Current views on the mechanism of oncogenic cell transformation in ovine pulmonary adenocarcinoma

Anna Kycko, Michał Reichert

Zakład Anatomii Patologicznej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

Streszczenie

Raki płuc są najczęściej diagnozowane spośród wszystkich nowotworów będących przyczyną śmierci ludzi. Dwadzieścia procent z nich nie jest powiązanych z paleniem papierosów, więc poszukuje się innych przyczyn ich powstawania oraz sposobów wczesnego ich wykrywania. Rak oskrzelikowo-pęcherzykowy będący podtypem najpowszechniejszego pierwotnego raka płuc – gruczolakoraka, jest bardzo podobny do nowotworu występującego u owiec – gruczolakoraka płuc owiec. Jest to nowotwór wywołany przez owczy retrovirus jaagsiekte (jaagsiekte sheep retrovirus – JSRV) należący do rodzaju Betaretrovirus. Wirus ten indukuje transformację nowotworową sekretoryjnych komórek nabłonkowych płuc: pneumocytów II typu i komórek Clara. Jego tropizm do tych komórek jest związany z zależnością aktywacji wirusowych regionów LTR od komórkowych czynników biorących udział w ekspresji genów białek swoistych dla płuc, m.in. białek surfaktantu. Wyniki badań nad mechanizmami wirusowej mutagenyzy dowodzą, że czynnikiem onkogenym jest białko otoczki wirusa – Env, którego region zwany ogonem cytoplazmatycznym powoduje aktywację kaskad enzymatycznych PI3K-Akt i Ras-MEK-MAPK prowadzących do transformacji komórki oraz telomerazy powodującej rozrost nowotworu. Niewykluczona jest też rola mutagenyzy insercyjnej, ponieważ wykazano istnienie co najmniej jednego wspólnego miejsca integracji wirusowego DNA z owczym. Morfologiczne i histologiczne podobieństwa do oskrzelikowo-pęcherzykowego raka płuc człowieka oraz możliwość doświadczalnej indukcji gruczolakoraka płuc u owiec sprawiają, że nowotwór ten stanowi dobry model do badań nad onkogenezą, a w przyszłości celowaną terapią raka płuc.

Słowa kluczowe:

gruczolakorak płuc owiec • rak oskrzelikowo-pęcherzykowy • jaagsiekte • białko otoczki • onkogeneza

Summary

Lung cancer is the most frequently diagnosed of all the human neoplasms leading to death. Because twenty percent of cases are not associated with cigarette smoking, other causes and methods of early diagnosis are being sought. Bronchioloalveolar cancer, which is a subtype of the most common primary lung cancer, adenocarcinoma, is very similar to ovine pulmonary adenocarcinoma (OPA), a naturally occurring lung cancer in sheep. OPA is caused by the virus Jaagsiekte Sheep Retrovirus (JSRV), a member of the genus of beta-retroviruses. The virus induces neoplastic transformation of secretory epithelial cells of the lung, i.e. alveolar type II pneumocytes and Clara cells. JSRV's tropism for these cells is connected with viral LTR regions interacting with cellular factors that play major roles in the expression of lung-specific genes, e.g. those of surfactant proteins. Results of studies on the mechanisms of viral mutagenesis indicate a viral enve-

lope protein (Env) as an oncogenic factor. There are two main enzymatic pathways involved in the cell transformation: PI3K-Akt and Ras-MEK-MAPK, both activated by the cytoplasmic tail of the envelope protein. Tumor development is associated with telomerase activation. Insertional mutagenesis has also been suggested because there is at least one common integration site for JSRV in OPA. Morphological and histological similarities with human bronchioloalveolar cancer and the possibility of experimental induction of the tumor in animals makes OPA a good model for the study of oncogenesis and target therapy of lung adenocarcinoma.

Key words: **ovine pulmonary adenocarcinoma • bronchioloalveolar cancer • jaagsiekte • envelope protein • oncogenesis**

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_61/11519.pdf

Word count: 3667

Tables: –

Figures: –

References: 55

Adres autorki: lek. wet. Anna Kycko, Zakład Anatomii Patologicznej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: anna.kycko@piwet.pulawy.pl

Wykaz skrótów: **Akt** – kinaza białka, serynowo-treoninowa; **c-Src** – kinaza tyrozynowa będąca protoonkogenem; **EnJSRV** – endogeny retrovirus jaagsiekte (endogenic jaagsiekte sheep retrovirus); **ENTV** – wirus enzootycznego guza jamy nosowej (enzootic nasal tumor virus); **ERK1/2** – zewnątrzkomórkowa kinaza sygnałowa 1/2 (extracellular signal-regulator kinase 1/2); **HNF-3** – czynnik jądrowy hepatocytów 3, czynnik transkrypcji (hepatocyte nuclear factor 3); **HYAL 2** – hialuronidaza 2; **JSRV** – retrovirus jaagsiekte (jaagsiekte sheep retrovirus); **LTR** – długie powtarzające się sekwencje końcowe (long terminal repeats); **MAPK** – kinaza białkowa aktywowana mitogenem (mitogen-activated protein kinase); **MMTV** – myszy wirus raka sutka (mouse mammary tumor virus); **MPMV** – małpi wirus Masona-Pfizera (Mason-Pfizer monkey virus); **OPA** – gruczolakorak płuc owiec (ovine pulmonary adenocarcinoma); **PI3K** – kinaza 3 fosfatydyloinozytolu; **Raf** – kinaza serynowo-treoninowa; **Ras** – białko sygnałowe; **SMRV** – retrovirus małp wiewiórkowatych (squirrel monkey retrovirus).

1. WSTĘP

Raki płuc stanowią największy odsetek nowotworów będących przyczyną śmierci ludzi w krajach uprzemysłowionych. Najczęściej kojarzone z paleniem papierosów (stwierdzone są wówczas u osób średnio powyżej 50 roku życia) pojawiają się też jednak u osób niepalących i młodych. Prawie 95% pierwotnych nowotworów płuc wywodzi się z nabłonka oskrzelowego, a najczęstszym typem raka oskrzelopochodnego jest gruczolakorak (pozostałe to: rak płaskonabłonkowy, rak wielkomórkowy nie-różnicowany i rak drobnkomórkowy) [19,50]. Podtyp gruczolakoraka – rak oskrzelikowo-pęcherzykowy – wykazuje najsłabszy związek z paleniem tytoniu i jest najczęściej diagnozowaną postacią nowotworu płuc u osób poniżej 45 roku życia, zwłaszcza u kobiet [29]. Celem poznania mechanizmów kancerogenezy w raku oskrzelikowo-pęcherzykowym przeprowadzono badania na modelu bardzo podobnego pod względem makroskopowym i histologicznym gruczolakoraka płuc owiec (ovine pulmonary adenocarcinoma – OPA). Jest to nowotwór o etiologii wirusowej, wywołany przez betaretrowirus – JSRV (jaagsiekte sheep retrovirus). Nazwa „jaagsiekte” pochodzi od afrykańskich słów *jaag* – polować i *siekte* – choroba (pojawiające się zaburzenia oddychania przypomina-

ją ciężki oddech wyczerpanego pogonią zwierzęcia) [53]. Podobnie jak w ludzkim raku oskrzelikowo-pęcherzykowym, mutagenezie ulegają tu komórki płuc odpowiadające za wytwarzanie surfaktantu (tzn. pneumocyty typu II i sekrecyjne komórki oskrzelików, zwane komórkami Clara), rozrost nowotworu w początkowym stadium choroby jest nieinwazyjny (z zachowaniem architektoniki pęcherzyków płucnych), zaś makroskopowo umiejscawia się na obwodzie płuca jako pojedynczy guzek lub częściej jako mnogie zmiany guzkowate mogące się zlewać [21].

2. GRUCZOLAKOWATOŚĆ PŁUC OWIEC (ADENOMATOZA OWIEC, JAAGSIEKTE)

a. Drogi zakażenia: wirus jaagsiekte jest wydalany z wydzieliną z dróg oddechowych, przenosi się horyzontalnie, przez bliski kontakt. Wnika z aerozolem do tchawicy i płuc. Możliwe są zakażenia okołoporodowe, np. przez karmienie mlekiem, podczas gdy wirus jest obecny w leukocytach, nie wyklucza się też możliwości śródmacicznego zakażenia [6]. Okres inkubacji u eksperymentalnie zakażonych owiec wynosi od 3 tyg. u jagniąt do kilku lat u dorosłych owiec (po zakażeniu nowo narodzonych jagniąt guzki nowotworowe były wykrywane między 10 a 20 dniem). U naturalnie zakażonych okres ten jest dłuższy – zazwyczaj

2–4 lata (zmiany nowotworowe stwierdzano najwcześniej u dwumiesięcznych zwierząt) [38,47].

b. Objawy kliniczne pojawiają się dopiero, kiedy wielkość zmian nowotworowych zaczyna zaburzać prawidłową funkcję płuc: obserwuje się stopniowo nasilającą się duszność, gwałtowne, ciężkie oddychanie często z ewidentnie nasiloną pracą mięśni brzusznych. Wysięk gromadzący się w dolnych drogach oddechowych daje charakterystyczne „świsty” słyszalne podczas osłuchiwania klatki piersiowej. Pomimo zachowanego apetytu obserwowana jest utrata masy i kondycji, postępujące wyniszczenie. Śmierć następuje wskutek niewydolności oddechowej, często w obecności powikłań, np. zakażeniem *Pasteurella haemolytica* [45].

c. Rozpoznanie jest zazwyczaj pośmiertne, opiera się o objawy kliniczne i zmiany sekcyjne, potwierdzone badaniami histopatologicznym i immunohistochemicznym. Niedawno opracowano również wykrywanie wirusowego DNA w leukocytach krwi testem PCR, ale ponieważ jego czułość jest mała, zwłaszcza u osobników we wczesnym stadium choroby, może mieć to znaczenie diagnostyczne tylko w badaniu całego stada, a nie indywidualnego zwierzęcia [11]. Zmiany sekcyjne: charakterystyczne zmiany patomorfologiczne ograniczają się do klatki piersiowej, płuca są powiększone i cięższe ze względu na obecność guzów nowotworowych, mogących przyjmować postać drobnych guzków (1–10 mm średnicy), większych guzów lub rozległych zmian obejmujących całe płaty (konsolidacje płatowe). Zmiany są wieloogniskowe, rozsiane w obu płucach. Przestrzenie powietrzne wypełnione są gęstą wydzieliną wytwarzaną przez komórki nowotworowe, które zachowują swoją sekrecyjną naturę. Towarzyszące węzły chłonne są zazwyczaj powiększone [20,45].

d. Charakterystyka histopatologiczna: Zgodnie z najnowszą klasyfikacją wg WHO dla nowotworów człowieka nowotwór płuc owiec wykazuje cechy gruczolakoraka łączącego 3 podtypy: oskrzelikowo-pęcherzykowy, brodawkowy i groniasty. Podtypy te są określane na podstawie wzrostu komórek i wzorców ich różnicowania się [4,20]. Transformacji nowotworowej ulegają pneumocyty typu II (około 80%) i oskrzelikowe komórki Clara (około 15%). W postaci oskrzelikowo-pęcherzykowej proliferacja komórek przebiega z zachowaniem architektury pęcherzyków płucnych. Komórki rozrastają się tworząc warstwę pokrywającą przegrody pęcherzykowe, które służą jako rusztowanie. Podtyp brodawkowy charakteryzuje się rozrostem komórek w postaci brodawek uwypuklonych do światła pęcherzyków. Dostrzegalny jest też duży pleomorfizm jąder, a obraz struktury pęcherzykowej zaciera się. Podtyp groniasty cechuje obecność struktur przypominających kanałiki albo grona i cewki utworzone przez komórki wyglądające jak komórki nabłonka oskrzeli. Widoczna jest inwazja podścieliska z desmoplazją [19]. W gruczolakoraku wywołanym przez JSRV te 3 podtypy histopatologiczne mogą być obecne w obrębie tej samej tkanki nowotworowej. Badaniem immunohistochemicznym stwierdzono, że komórki nowotworowe wykazują nadekspresję białka CD208/DC LAMP (dendritic cell lysosomal associated membrane protein) – należącego do rodziny LAMP (lysosomal associated membrane protein) początkowo opisanego w aktywowanych komórkach dendrytycznych. Białko CD208/DC

LAMP jest obecne w ludzkich, mysich i owczych pneumocytach typu II i ulega nadekspresji w oskrzelikowo-pęcherzykowym raku płuc człowieka i w gruczolakoraku płuc owiec. W pneumocytach typu II białko CD208 ulega ekspresji w błonach kształtujących ciała blaszkowate, eksiste pęcherzyki wyspecjalizowane w wytwarzaniu surfaktantu. Rola tego białka w rozwoju nowotworu nie została jeszcze wyjaśniona [43].

3. CHARAKTERYSTYKA WIRUSA GRUCZOLAKOWATOŚCI PŁUC OWIEC (JSRV)

a. Budowa wirusa

Wirus adenomatozy owiec należy do rodziny *Retroviridae*, rodzaju *Betaretrovirus*. Do rodzaju tego należą też: wirus enzootycznego raka jamy nosowej (enzootic nasal tumor virus – ENTV) występujący u owiec i kóz, mysy wirus raka sutka (mouse mammary tumor virus – MMTV), małpi wirus Masona-Pfizera (Mason-Pfizer monkey virus – MPMV) i retrowirus małp wiewiórkowatych (squirrel monkey retrovirus – SMRV). Wirion ma budowę sferyczną i zawiera otoczkę, jego średnica wynosi 80–100 nm, wewnątrz znajduje się nukleokapsyd z dwiema niemi RNA (ssRNA). Po wnikięciu wirusa do komórki docelowej RNA jest za pomocą wirusowej odwrotnej transkryptazy przepisywana na DNA, które następnie ulega integracji z genomem gospodarza [47,53].

Budowę genomu opisali w latach dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku niezależnie dwaj różni autorzy - dla izolatów z Afryki uzyskanych z wysięku z płuc i izolatów z Europy uzyskanych z tkanki nowotworowej. Izolaty te wykazywały dużą homologię (93%) [37,54]. Prowirusowy DNA JSRV ma długość 7834 par zasad (pz) [34] i zawiera typowe retrowirusowe geny *gag*, *pro*, *pol* i *env* oraz dodatkowo otwartą ramkę odczytu *orfX* w obrębie genu *pol*. Gen *gag* koduje poliproteinę, która jest dzielona na 3 białka strukturalne rdzenia wirusa: białko macierzy (MA), białko główne kapsydu (CA), białko nukleokapsydu (NC). Gen *pro* koduje białko, w którym wyróżniono 2 domeny: pierwsza wykazuje aktywność proteazy (PRO) i jest odpowiedzialna za cięcie prekursorowych poliprotein, druga jest kompatybilna z dUTP-azą i zapobiega włączaniu przez odwrotną transkryptazę dUTP do łańcucha nukleotydowego podczas transkrypcji. Gen *pol* ulega translacji jako poliproteina, dzielona na 2 białka enzymatyczne: odwrotną transkryptazę (RT), odpowiedzialną za replikację wirusowego RNA i integrację (IN) biorącą udział we włączaniu wirusowego DNA do genomu gospodarza. Gen *env* koduje białka otoczki (po-wierzchniowe i transbłonowe). Sekwencja *orfX* nie koduje żadnego białka, a jej rola w replikacji i ekspresji wirusa nie została jeszcze wyjaśniona.

JSRV zawiera także regiony niekodujące, które są niezbędne do replikacji – są to tzw. długie powtarzające się sekwencje (long terminal repeats – LTR), zlokalizowane na obu końcach zintegrowanego genomu [53].

Na podstawie porównania sześciu szczepów z 3 kontynentów wyodrębniono 2 genotypy JSRV: afrykański (typ 1) i północnoamerykański/europejski (typ 2). Największe różnice między tymi szczepami dotyczyły LTR (89% podobieństwa), w mniejszym stopniu genów *gag* i *env* (91%),

oraz *pol* (96%). Stwierdzono, że JSRV europejski jest o 7 nukleotydów krótszy od afrykańskiego, różnica w regionie kodującym dotyczyła genu *pro* – otwarta ramka odczytu pro zaczyna się 53 nukleotydy dalej niż w izolacie afrykańskim. Nie było różnic w regionie *gag* ani *orf X* [37].

b. Endogenny JSRV

Genom owcy zawiera rodzinę 15–20 endogennych sekwencji retrovirusowych blisko związanych z JSRV (enJSRV). Budowa ich nie wykazuje zróżnicowania zależnego od gatunku, bez względu na to, czy są to zwierzęta hodowlane czy też dzikie, np. owca kanadyjska i muflon. Stąd wniosek, że wirusy te zintegrowały się z genomem tych zwierząt wcześniej w rozwoju filogenetycznym i nie zmieniły się. Endogenne retrowirusy blisko spokrewnione z JSRV znaleziono też u gatunków z rodzaju *Capra* (u kóz dzikich i hodowlanych) i innych z podrodziny *Caprinae* [16]. Celem porównania z postacią egzogenną poddano analizie sekwencje nukleotydów 3 *loci* prowirusowych enJSRV, a za pomocą metod hybrydyzacji *in situ* i Southern blot stwierdzono, że były one umiejscowione w chromosomach 6 i 9. Różniły się od zakaźnego wirusa licznymi mutacjami punktowymi i delecjami, dotyczącymi m.in. regionu LTR [34]. Endogeny JSRV ulega ekspresji w drogach rodnych samicy i w łożysku, więc przypuszcza się, że może mieć znaczenie w kształtowaniu się łożyska [36]. Bliski filogenetycznie wirusowi JSRV jest ENTV, który wywołuje gruczolakoraka gruczołów śluzowych jamy nosowej u owiec i kóz. Stwierdzano równoległe zakażenia obydwoma wirusami [30].

c. Tropizm wirusa

Cechą charakterystyczną w rozwoju adenomatozy płuc owiec jest szybki rozwój choroby u nowo narodzonych jagniąt w przypadku zakażenia izolatami terenowymi. Zwykle jest to około 4-6 tygodni, choć wykazano zmiany nawet po 2 tygodniach po wszczepieniu wirusa. W obrazie sekcyjnym widać wówczas liczne wielogniskowe zmiany – niewielkie guzki [46,51]. Co więcej – jedynymi komórkami organizmu owcy, w których wykrywano jest antygen JSRV są komórki nowotworowe i przylegające do nich niezmiennione pneumocyty typu II (w pęcherzykach) i komórki Clara (w oskrzelikach). Brak ekspresji wirusowych białek w prawidłowych komórkach zakażonego zwierzęcia odróżnia JSRV od wszystkich innych onkogennych retrovirusów, w przypadku których nowotworzenie pojawia się w kontekście wysokiego poziomu wirusowej infekcji i możliwości detekcji antygeny wirusa w niezmiennionych komórkach zarówno tkanki docelowej, jak i innych tkanek [32,40,53]. Retrowirusy są w stanie zakazić jedynie te komórki, w których występuje ekspresja swoistych receptorów. Komórkowy receptor JSRV został zidentyfikowany jako hialuronidaza 2 (HYAL 2) – glikozylfosfatydyloinozytolopochodne białko powierzchniowe. Wiąże ono powierzchniową część białka otoczki (Env) wirusa. Receptor ten jest powszechnie obecny w tkankach, bo w warunkach *in vitro* wirus JSRV może wnikać do komórek różnych gatunków, hodowle komórkowe pochodzące z innych niż płucna tkanek owcy również mogą być zakażane. U naturalnie zakażonych zwierząt wirusowe DNA może być wykrywane w tkance limfatycznej, makrofagach płucnych i komórkach jednojądrzastych krwi – monocytach

i limfocytach B i T. Jednak w żadnym z tych przypadków nie dochodzi do ekspresji białek wirusa [38]. HYAL2 jest też receptorem ENTV – retrovirusa typu β , spokrewnionego z JSRV [1], reaguje również z białkiem Env enJSRV. Komórki, w których zachodzi ekspresja endogennego JSRV uruchamiają mechanizm, dzięki któremu stają się odporne na egzogeny JSRV: ich białko Env łączy się z receptorem HYAL2, zarówno w cytoplazmie jak i na powierzchni komórki, blokując dostęp do niego wirusowi egzogennemu i zapobiegając w ten sposób wnikięciu wirusa do komórki. Zatem ekspresja białka Env wirusa endogennego przyczynia się do braku odpowiedzi immunologicznej owiec na zakażenie egzogenną postacią wirusa – stąd brak możliwości serologicznego wykrywania zakażeń JSRV oraz przekonanie o małej skuteczności ewentualnej szczepionki [13,36].

Najistotniejsze znaczenie dla integracji i ekspresji JSRV mają regiony LTR wirusa – są one aktywne jedynie w komórkach, w których zachodzi transformacja. *In vitro* LTR wirusa wykazuje najwyższą aktywność transkrypcyjną w liniach komórkowych wywodzących się z pneumocytów typu II i komórek Clara. Wykazano, że LTR zawiera elementy promotora i wzmacniacza, które po wnikięciu i integracji wirusa reagują ze swoistymi dla tych komórek czynnikami transkrypcji. LTR wirusa adenomatozy ma miejsca wiążące dla czynników transkrypcji, takich jak HNF-3 (hepatocyte nuclear factor 3) odgrywający główną rolę w regulacji ekspresji genów białek surfaktantu [31] i C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein). Badania na liniach komórkowych mysich pneumocytów typu II (MLE-15) wykazały, że mutacje w regionach wiążących NF-1, HNF-3 β i C/EBP redukowały aktywność LTR wirusa nawet o 70% [28,31]. W hodowli mysich komórek Clara (MtCCI-2) C/EBP okazał się również ważnym aktywatorem regionu LTR, zaś HNF-3 nie był istotny [28].

Promotory swoistych genów pneumocytów typu II i komórek Clara, tzn. genów białek surfaktantu: SP-A, SP-B, SP-C, SP-D i CCSP (Clara cell secretory protein albo CC10) do transkrypcji wykorzystują wspólne elementy regulacyjne. Ostatnie dane sugerują, że w pneumocytach typu II białko surfaktantu A (SP-A) reguluje wydzielanie sekrecji surfaktantu przez aktywację szlaku PI3K/Akt (kinazy 3-fosfatydyloinozytolu/kinazy białkowej Akt), który również ma znaczenie w transformacji nowotworowej. SP-A stymuluje transkrypcję następnej proteiny – SP-B, poprzez aktywację czynników transkrypcji swoistych dla płuc, takich jak HNF-3 [48]. Stąd hipoteza, że ekspresja JSRV w pneumocytach typu II zachodzi z udziałem pętli autokrynnej, gdzie czynniki transkrypcji swoiste dla płuc aktywują wirusowe LTR, zaś ekspresja genu *env* prowadzi do aktywacji szlaku PI3K-Akt, który z kolei nasila ekspresję czynników swoistych dla płuc. Na podstawie badań *in vitro* i *in vivo* stwierdzono, że LTR endogennego JSRV aktywowany jest progesteronem (istotna jest też obecność receptora progesteronu – stąd ekspresja enJSRV w macicy i łożysku), zaś nie reaguje na HNF-3. Na egzogeny JSRV natomiast progesteron nie ma wpływu, w przeciwieństwie do czynników transkrypcji białek surfaktantu. Wysłunięto więc przypuszczenie, że enJSRV zintegrował się z genomem owczym dawno temu, a egzogeny JSRV jest relatywnie nowym typem wirusa, który wykształcił inny mechanizm integracji z genomem gospodarza, zależny od

czynników charakterystycznych dla komórek płuc [34]. Po analizie porównawczej budowy regionu U3 LTR owczych betaretrowirusów JSRV, enJSRV i ENTV stwierdzono, że największe różnicowanie wśród nich wykazują sekwencje wzmacniacza i budowa tej właśnie sekwencji decydowała o powinowactwie do określonych czynników transkrypcji. Region U3 wirusa JSRV zawierał miejsca wiążące HNF-3, natomiast żaden z regionów U3 wirusów endogennych ani ENTV nie wykazywał predylekcji do wiązania tego czynnika [27].

4. MECHANIZMY ONKOGENEZY JSRV

a. Mutagenesa insercyjna

U naturalnie zakażonych zwierząt nowotwór rozwija się długo – nawet kilka lat. Mutagenesa wywoływana przez JSRV jest prawdopodobnie bardzo złożonym procesem. Spośród kilku znanych mechanizmów transformacji nowotworowej indukowanych przez inne onkowirusy sprawdzono dwa najbardziej prawdopodobne: aktywację protoonkogenu poprzez insercję za pomocą genu LTR wirusa oraz wprowadzenie wirusowego onkogenu.

W celu sprawdzenia pierwszej hipotezy, sklonowano 70 miejsc integracji pochodzących z 23 przypadków OPA i metodą mapowania chromosomów wykazano, że znajdują się one w 20 z 28 chromosomów owczych. Świadczy to o przypadkowej dystrybucji i braku protoonkogenu w genomie gospodarza. Niedawno jednak zidentyfikowano wspólne miejsca integracji: w chromosomie 16 w pobliżu genu MAPK [8] i w chromosomie 19 w pobliżu sekwencji o dużej homologii z eksonem 2 mysiego i ludzkiego genu fosfatazy γ tyrozyny receptora białkowego [39]. W tym kontekście można więc mówić o udziale insercji w rozwoju gruczolakoraka [12].

Jednocześnie prowadzono badania mające na celu potwierdzenie, że przyczyną nowotworu jest wirusowy onkogen. Po wprowadzeniu wirusa do mysich fibroblastów NIH-3T3 dochodziło do ich transformacji nowotworowej. Drogą eliminacji kolejnych genów (poprzez wywołanie w nich mutacji) wykazano, że z indukcją transformacji tych komórek związany jest gen *env*. Najnowsze badania wykazały, że samo białko genu *env* (białko otoczki) *in vitro* jest w stanie wywołać transformację nowotworową linii mysich, szczurzych i ptasich fibroblastów [2,26,41,55], komórek nabłonkowych nerki psa i szczura [23,24] oraz ludzkich komórek nabłonka oskrzeli BEAS-2B [9], a *in vivo* indukować nowotworzenie u jagniąt i myszy [7,52] (możliwa jest immunizacja myszy i uzyskanie odporności na zakażenie wirusem, gdyż ich genom nie zawiera endogennych wirusów pokrewnych JSRV).

b. Białko otoczki Env

Gen *env* ulega ekspresji jako poliproteina, która jest cięta na powierzchni komórki przez proteazę komórkową, przez co powstają 2 białka – powierzchniowe (SU) i transbłonowe (TM). SU jest odpowiedzialne za wiązanie do receptora, a TM rozciąga się przez lipidowy płaszcz membrany wirusa albo błonę komórkową i zakotwicza SU do wiriona albo komórki poprzez wiązania dwusiarczkowe. Proteina TM jest zróżnicowana na 3 regiony: region zewnątrzko-

mórkowy, region przenikający błonę i „ogon” cytoplazmatyczny. Wykazano, że ogon ten jest niezbędny do indukcji transformacji szczurzych i mysich fibroblastów oraz komórek MDCK [17,23,35]. Złożony jest on tylko z 46 aminokwasów i nie zawiera widocznych domen enzymatycznych. Przeprowadzono wiele doświadczeń mających wskazać na istotne dla mutagenesy elementy jego budowy.

Po systematycznym wywoływaniu mutacji w ogonie cytoplazmatycznym, opisano 4 rodzaje jego mutantów: nie wywołujące transformacji, wywołujące transformację na poziomie dzikiego szczebu wirusa, wywołujące zmniejszoną transformację oraz wywołujące transformację silniejszą („supertransformery”). Na podstawie transformacji podzielono ten region na 3 części (subdomeny): część N'-końcową złożoną z 18 aminokwasów (od miejsca 570 do 587) tworzącą amfipatyczną helisę, część C'-końcową złożoną z 9 aminokwasów (605 do 615) niemającą znaczenia dla transformacji, oraz część pomiędzy nimi, złożoną z 19 aminokwasów, które obejmują motyw YXXM – region pomiędzy tyrozyną (Y), a metioniną (M), odpowiadający potencjalnemu miejscu wiązania SH2 fragmentu p85 enzymu PI3K (kinazy ważnej dla proliferacji i przetrwania komórki). Mutacje w tej subdomenie dały różnorodne efekty, łącznie ze stworzeniem tzw. supertransformerów. Po porównaniu budowy ogona cytoplazmatycznego z analogiczną częścią białka Env pokrewnego betaretrowirusa – MPMV, wysunięto hipotezę, że jego rola w mutagenезie polega na interakcjach z białkami komórkowymi prowadzącymi do wzrostu i proliferacji, a udział w nich biorą miejsca wewnętrznej subdomeny zawierającej motyw YXXM i/albo hydrofilowe miejsca w amfipatycznej helisie [17]. Env enJSRV różni się od Env JSRV budową końca karboksylowego – nie zawiera sekwencji YXXM potrzebnej do transformacji nowotworowej.

Dwa główne szlaki mogące mieć znaczenie w transformacji nowotworowej indukowanej JSRV to szlak PI3K-Akt i Ras-MEK-MAPK. Kaskada enzymatyczna PI3K-Akt jest istotna dla proliferacji i przetrwania komórki. PI3K (kinaza 3 – fosfatydyloinozytoli) jest stymulowana bodźcami zewnątrzkomórkowymi np. czynnikiem wzrostu wiązany do receptora błonowego i ulega fosforylacji. Aktywowana PI3K fosforyluje następny przekaźnik – PIP2 (fosfatydyloinozytolo-dwufosforan) do PIP3 (fosfatydyloinozytolo-trójfosforan). PIP3 reaguje z PDK1 (1 – kinazą fosfatydyloinozytolo-zależną), która z kolei fosforyluje białko Akt (inaczej PBK – kinaza białkowa B). Kinaza Akt fosforyluje rozmaite substraty włączane w kaskady sygnałowe decydujące o proliferacji, metabolizmie i przeżyciu komórki. Fosforylacja Akt hamuje proteiny, takie jak GSK-3 (glycogen synthase kinase 3 – kinaza 3 syntazy glikogenu), czynnik transkrypcyjny FOXO, czy białko Kip1, aktywuje natomiast mTOR (mammalian target of rapamycin) – regulator wzrostu komórki [20].

Mutacje w regionie YXXM genu *env* znosiły transformację linii komórek NIH-3T3 [23,35] i szczurzych R08F i RK3E [17], a aktywacja Akt też była obserwowana w różnych liniach komórkowych. Ostatnie badania [48] wykazały, że do aktywacji Akt dochodziło w 37% guzów OPA, które pochodziły od zwierząt w zaawansowanym stadium choroby. Wyniki te sugerują, że kaskada sygnałowa Akt bierze udział w rozwoju i utrzymaniu gruczolakoraka, ale może

też występować kaskada niezależna od Akt. Wykazano, że inaktywacja PI3K nie zapobiega transformacji komórki [24], a aktywacja Akt była obserwowana w komórkach NIH 3T3 pozbawionych części p85 kinazy PI3K [25], wysunięto stąd wniosek, że PI3K nie jest niezbędna do aktywacji białka Akt [14,42].

Szlak Ras-MEK-MAPK: MAPK (mitogen-activated protein kinase – kinaza białkowa aktywowana mitogenem) to grupa kinaz biorących udział w transdukcji sygnału, aktywowana przez niewielkie białko Ras. W kaskadzie Ras-MEK-MAPK uczestniczą 4 rodziny białkowe: ERK1/2 (extracellular signal-regulator kinase 1 and 2) zwana też p44/42, SAPK/JNK (stress activatory protein kinase/c-Jun NH2-terminal kinase), MAPK p38 i BMK (big mitogen activated protein kinase). MAPK są regulowane i fosforyzowane przez kinazę MAPK (MAPKK), taką jak MEK1/2, która sama jest aktywowana przez kinazę MAPKK (MAPKKK), czyli białkiem Raf. Kaskada ta prowadzi do translokacji MAPK do jądra, gdzie dochodzi do aktywacji różnych czynników transkrypcyjnych [24].

Aktywacja szlaku Ras – MEK- MAPK była obserwowana w linii komórek NIH 3T3 i RK3E transformowanych przez JSRV. Na podstawie dotychczasowych badań sugeruje się, że szlak ten może w różnym stopniu uczestniczyć w wielu kaskadach sygnałowych w zależności od rodzaju linii komórek użytych w badaniu *in vitro*, natomiast w przypadku naturalnie i eksperymentalnie indukowanego gruczolakoraka MAPK – ERK1/2 wydaje się szlakiem dominującym.

Wyniki badań przeprowadzonych na liniach komórkowych różnego pochodzenia wskazują, że przebieg transformacji nowotworowej jest zależny od typu komórki i jej pochodzenia, a etapy jej są inne w przypadku różnych komórek [10,17,24]. Tak więc szczerze fibroblasty transformowane przez mutanty ogona cytoplazmatycznego nazwane supertransformerami wykazywały podwyższony poziom ufosforylowanego Akt, co wskazywało na duże znaczenie ścieżki Akt – mTOR w transformacji JSRV. Wykazywały także niewielki stopień aktywacji białka p38. Mimo wszystko supertransformery były nadal zależne od sygnalizacji za pomocą MEK1/2, którego inhibitor hamował transformację. Mutacje w miejscu M593 w motywie YXXM też były znaczące: mutant M593T nie powodował transformacji linii komórkowej NIH-3T3, podczas gdy zredukowana transformacja była widoczna w linii komórkowej szczerzych fibroblastów 208F. Mutant M593A powodował częściową transformację linii komórkowej RK3E (a także w komórkach NIH 3T3 i 208 F). Najbardziej interesujące jest, że mutacja M593I dawała supertransformujący fenotyp, i ta mutacja powodowała też powstanie motywu domeny SH2 wiążącej białko c-Src (kinaza tyrozynowa będąca protoonkogenem). Co więcej, transformacja wywoływana za pomocą tej mutacji była hamowana częściowo przez traktowanie białkiem PP2 (inhibitorem c-Src). To sugeruje, że fenotyp M593I może mieć charakter supertransformera za sprawą nasilonej sygnalizacji za pomocą c-Src. PP2 częściowo hamowała także transformację wywołowaną dzikim typem wirusowego Env, zaś region YXXM jest miejscem wiążącym c-Src o niskim powinowactwie. Stąd wniosek, że JSRV może działać także za pośrednictwem c-Src. Stwierdzono też, że białko c-Src może aktywować Akt niezależnie od PI3K, co tłumaczyłoby fosfo-

rylację Akt w transformowanych przez JSRV komórkach przy obecności dysfunkcyjnej PI3K.

Na podstawie wyników badań dwóch mutantów alaninowych działających transformująco słabiej niż postaci dziki podejrzewano, że mutacje te mogły eliminować sygnalizację przez jedną albo dwie ścieżki aktywowane przez JSRV (H/N – Ras – MEK1/2 – ERK 1/2 i AKT-mTOR). Wykazano, że mutant H587A był oporny na inhibitory FTI – 277 (inhibitor Ras) i rapamycynę (był jednak wrażliwy na inhibitor MEK1/2), a R591A był oporny na rapamycynę, zaś wrażliwszy od typu dzikiego na FTI-277. Dlatego też podejrzewa się, że mutant H587A może działać poprzez zupełnie inną ścieżkę niż wyżej wymienione.

Mutacje alaninowe w amfipatycznej helisie również hamowały transformację, jako że niektóre miejsca w części hydrofilowej helisy mogą reagować z białkami cytoplazmatycznymi podczas transformacji, zaś mutacje w części hydrofobowej mogły zmieniać topologię białka TM. Eksperyment z podstawieniem części przenikającej błonę odpowiednikiem pochodzącym od genu *env* endogennego JSRV wykazał zmiany w transformacji komórek indukowanej utworzonym w ten sposób białkiem Env. Substytucje alaniną miejsc części zarówno hydrofilowej jak i hydrofobowej powodowały niewielką transformację [17].

b. Telomeraza

Niedawno wykazano również istotne znaczenie telomerazy w gruczolakoraku. Telomery są odcinkami chromosomu umieszczonymi na jego końcach – po 2 w każdym chromosomie. Nie zawierają genów, a ich zadaniem jest ochrona DNA przed uszkodzeniami podczas replikacji, przy współpracy z enzymami naprawczymi. Kiedy komórka dzieli się, telomery ulegają skracaniu, a po wielu podziałach ich struktura ulega tak dużej zmianie, że nie są w stanie spełniać swojej funkcji, a wtedy komórka przechodzi w stan replikacyjnego spoczynku i apoptozy. Telomery są więc czynnikiem decydującym o liczbie podziałów komórki i długości jej życia. Telomeraza jest enzymem odpowiedzialnym za utrzymywanie długości telomerów podczas podziału komórki, o aktywności zależnej m.in. od szlaku kinazy Akt i zapobiega zahamowaniu replikacji, starzeniu się i śmierci komórki [5,49]. Aktywna jest w komórkach macierzystych gamet, skóry, jelita, układu immunologicznego, a ponadto w komórkach 85–90% nowotworów [18], także w gruczolakoraku sprzyjając proliferacji i gromadzeniu się komórek rakowych w płucach.

5. PODSUMOWANIE

Przedstawione informacje dotyczące transformacji nowotworowej pneumocytów typu II i komórek Clara w płucach owiec mają charakter ogólny i nadal wiele szczegółów wymaga wyjaśnienia. Głównymi determinantami tropizmu JSRV do tych komórek są gen *env*, receptor HYAL 2 i regiony LTR. Nowotworzenie jest złożonym, wieloetapowym procesem, a ekspresja genu *env* może nie wystarczać do transformacji tych komórek *in vivo*. Nieznana jest rola otwartej bramki odczytu orf-X genomu wirusa, a ponieważ jej sekwencja jest stała u różnych izolatów, podejrzewa się, że może mieć znaczenie w procesie replikacji bądź ekspresji wirusa. Ze wzglę-

du na podobieństwo w morfologii i obrazie klinicznym do oskrzelikowo-pęcherzykowego raka płuc człowieka oraz możliwość doświadczalnego wywołania go u zwie-

rząt gruczolakorak płuc owiec stanowi model do badań nad onkogenezą [33], a w przyszłości – celowaną terapią raka płuc człowieka.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Alberti A., Murgia C., Liu S.L., Mura M., Cousens C., Sharp M., Miller A.D., Palmarini M.: Envelope-induced cell transformation by ovine betaretroviruses. *J. Virol.*, 2002; 76: 5387–5394
- [2] Allen T.E., Sherrill K.J., Crispell S.M., Perrott M.R., Carlson J.O., DeMartini J.C.: The jaagsiekte sheep retrovirus envelope gene induces transformation of the avian fibroblast cell line DF-1 but does not require a conserved SH2 binding domain. *J. Gen. Virol.*, 2002; 83: 2733–2742
- [3] Anonim, World Organization for Animal Health, Handistatus II – Multiannual Animal Disease Status 2006 Nov 30
- [4] Beasley M.B., Brambilla E., Travis W.D.: The 2004 World Health Organization classification of lung tumors. *Semin. Roentgenol.*, 2005; 40: 90–97
- [5] Brambilla E., Lantuejoul S.: Telomerase activation in adenocarcinoma-bronchioloalveolar carcinoma. *Eur. Respir. J.*, 2006; 27: 1079–1081
- [6] Caporale M., Centorame P., Giovannini A., Sacchini F., Di Ventura M., De las Heras M., Palmarini M.: Infection of lung epithelial cells and induction of pulmonary adenocarcinoma is not the most common outcome of naturally occurring JSRV infection during the commercial lifespan of sheep. *Virology*, 2005; 338: 144–153
- [7] Caporale M., Cousens C., Centorame P., Pinoni C., De las Heras M., Palmarini M.: Expression of the jaagsiekte sheep retrovirus envelope glycoprotein is sufficient to induce lung tumors in sheep. *J. Virol.*, 2006; 80: 8030–8037
- [8] Cousens C., Bishop J.V., Philbey A.W., Gill C.A., Palmarini M., Carlson J.O., DeMartini J.C., Sharp J.M.: Analysis of integration sites of Jaagsiekte sheep retrovirus in ovine pulmonary adenocarcinoma. *J. Virol.*, 2004; 78: 8506–8512
- [9] Danilkovitch-Miagkova A., Duh F.M., Kuzmin I., Angeloni D., Liu S.L., Miller A.D., Lerman M.I.: Hyaluronidase 2 negatively regulates RON receptor tyrosine kinase and mediates transformation of epithelial cells by jaagsiekte sheep retrovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 4580–4585
- [10] De Las Heras M., Ortin A., Benito A., Summers C., Ferrer L.M., Sharp J.M.: *In-situ* demonstration of mitogen-activated protein kinase Erk 1/2 signalling pathway in contagious respiratory tumours of sheep and goats. *J. Comp. Pathol.*, 2006; 135: 1–10
- [11] De Las Heras M., Ortin A., Salvatori D., Perez de Villareal M., Cousens C., Miguel Ferrer L., Miguel Cebrían L., Garcia de Jalon J.A., Gonzalez L., Michael Sharp J.: A PCR technique for the detection of Jaagsiekte sheep retrovirus in the blood suitable for the screening of ovine pulmonary adenocarcinoma in field conditions. *Res. Vet. Sci.*, 2005; 79: 259–264
- [12] DeMartini J.C.: Retroviral Oncogenesis in an Ovine Model of Lung Cancer (13-Nov-2004). In: 55th Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists (ACVP) and 39th Annual Meeting of the American Society of Clinical Pathology (ASVCP), 2004 – Orlando, FL, USA, ACVP and ASVCP (Eds.) Publisher: American College of Veterinary Pathologists & American Society for Veterinary Clinical Pathology, Middleton WI, USA, Internet Publisher: International Veterinary Information Service, Ithaca NY; <http://www.ivis.org> (15.11.2007)
- [13] Dunlap K.A., Palmarini M., Adelson D.L., Spencer T.E.: Sheep endogenous betaretroviruses (enJSRVs) and the hyaluronidase 2 (HYAL2) receptor in the ovine uterus and conceptus. *Biol. Reprod.*, 2005; 73: 271–279
- [14] Filippa N., Sable C.L., Filloux C., Hemmings B., Van Obberghen E.: Mechanism of protein kinase B activation by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol. Cell. Biol.*, 1999; 19: 4989–5000
- [15] Hallwirth C., Maeda N., York D., Fan H.: Variable regions 1 and 2 (VR1 and VR2) in JSRV gag are not responsible for the endogenous JSRV particle release defect. *Virus Genes*, 2005; 30: 59–68
- [16] Hecht S.J., Stedman K.E., Carlson J.O., DeMartini J.C.: Distribution of endogenous type B and type D sheep retrovirus sequences in ungulates and other mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 3297–3302
- [17] Hull S., Fan H.: Mutational analysis of the cytoplasmic tail of jaagsiekte sheep retrovirus envelope protein. *J. Virol.*, 2006; 80: 8069–8080
- [18] Kowalska A., Kowalik A.: Telomer i telomeraza w onkogenezie. *Współcz. Onkol.*, 2006; 10: 485–496
- [19] Kumar V., Cotran R.S., Robbins S.R.: *Patologia Robbinsa; Urban & Partner, Wrocław 2005, wyd. 1*
- [20] Leroux C., Girard N., Cottin V., Greenland T., Mornex J.F., Archer F.: Jaagsiekte Sheep Retrovirus (JSRV): from virus to lung cancer in sheep. *Vet. Res.*, 2007; 38: 211–228
- [21] Lis A., Zalewska A., Nykiel-Nalepa E., Kaznowska E., Kobak G., Rzeszutko-Grabowska M., Kaziród T., Kądziołka W.: Rak oskrzelikowo-pęcherzykowy u osób młodych. *Współcz. Onkol.*, 2002; 6: 391–394
- [22] Liu S.L., Duh F.M., Lerman M.I., Miller A.D.: Role of virus receptor Hyal2 in oncogenic transformation of rodent fibroblasts by sheep betaretrovirus env proteins. *J. Virol.*, 2003; 77: 2850–2858
- [23] Liu S.L., Miller A.D.: Transformation of madin-darby canine kidney epithelial cells by sheep retrovirus envelope proteins. *J. Virol.*, 2005; 79: 927–933
- [24] Maeda N., Fu W., Ortin A., de las Heras M., Fan H.: Roles of the Ras-MEK-mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-mTOR pathways in Jaagsiekte sheep retrovirus-induced transformation of rodent fibroblast and epithelial cell lines. *J. Virol.*, 2005; 79: 4440–4450
- [25] Maeda N., Inoshima Y., Fruman D.A., Brachmann S.M., Fan H.: Transformation of mouse fibroblasts by Jaagsiekte sheep retrovirus envelope does not require phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Virol.*, 2003; 77: 9951–9959
- [26] Maeda N., Palmarini M., Murgia C., Fan H.: Direct transformation of rodent fibroblasts by jaagsiekte sheep retrovirus DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 4449–4454
- [27] McGee-Estrada K., Fan H.: Comparison of LTR enhancer elements in sheep betaretroviruses: insights into the basis for tissue-specific expression. *Virus Genes*, 2007; 35: 303–312
- [28] McGee-Estrada K., Fan H.: *In vivo* and *in vitro* analysis of factor binding sites in Jaagsiekte sheep retrovirus long terminal repeat enhancer sequences: roles of HNF-3, NF-1, and C/EBP for activity in lung epithelial cells. *J. Virol.*, 2006; 80: 332–341
- [29] Morabia A., Wynder E.L.: Relation of bronchioloalveolar carcinoma to tobacco. *BMJ*, 1992; 304: 541–543
- [30] Ortin A., Perez de Villarreal M., Minguñon E., Cousens C., Sharp J.M., De las Heras M.: Coexistence of enzootic nasal adenocarcinoma and jaagsiekte retrovirus infection in sheep. *J. Comp. Pathol.*, 2004; 131: 253–258
- [31] Palmarini M., Datta S., Omid R., Murgia C., Fan H.: The long terminal repeat of Jaagsiekte sheep retrovirus is preferentially active in differentiated epithelial cells of the lungs. *J. Virol.*, 2000; 74: 5776–5787
- [32] Palmarini M., Dewar P., De las Heras M., Inglis N.F., Dalziel R.G., Sharp J.M.: Epithelial tumour cells in the lungs of sheep with pulmonary adenomatosis are major sites of replication for Jaagsiekte retrovirus. *J. Gen. Virol.*, 1995; 76: 2731–2737
- [33] Palmarini M., Fan H.: Retrovirus-induced ovine pulmonary adenocarcinoma, an animal model for lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2001; 93: 1603–1614
- [34] Palmarini M., Fan H.: Molecular biology of jaagsiekte sheep retrovirus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2003; 275: 81–115
- [35] Palmarini M., Maeda N., Murgia C., De-Fraja C., Hofacre A., Fan H.: A phosphatidylinositol 3-kinase docking site in the cytoplasmic tail of the Jaagsiekte sheep retrovirus transmembrane protein is essential for envelope-induced transformation of NIH 3T3 cells. *J. Virol.*, 2001; 75: 11002–11009
- [36] Palmarini M., Mura M., Spencer T.E.: Endogenous betaretroviruses of sheep: teaching new lessons in retroviral interference and adaptation. *J. Gen. Virol.*, 2004; 85: 1–13
- [37] Palmarini M., Sharp J.M., de las Heras M., Fan H.: Jaagsiekte sheep retrovirus is necessary and sufficient to induce a contagious lung cancer in sheep. *J. Virol.*, 1999; 73: 6964–6972
- [38] Palmarini M., Sharp J.M., Lee C., Fan H.: *In vitro* infection of ovine cell lines by Jaagsiekte sheep retrovirus. *J. Virol.*, 1999; 73: 10070–10078

- [39] Philbey A.W., Cousens C., Bishop J.V., Gill C.A., DeMartini J.C., Sharp J.M.: Multiclonal pattern of Jaagsiekte sheep retrovirus integration sites in ovine pulmonary adenocarcinoma. *Virus Res.*, 2006; 117: 254–263
- [40] Platt J.A., Kraipowich N., Villafane F., DeMartini J.C.: Alveolar type II cells expressing jaagsiekte sheep retrovirus capsid protein and surfactant proteins are the predominant neoplastic cell type in ovine pulmonary adenocarcinoma. *Vet. Pathol.*, 2002; 39: 341–352
- [41] Rai S.K., Duh F.M., Vigdorovich V., Danilkovitch-Miagkova A., Lerman M.I., Miller A.D.: Candidate tumor suppressor HYAL2 is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored cell-surface receptor for jaagsiekte sheep retrovirus, the envelope protein of which mediates oncogenic transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001; 98: 4443–4448
- [42] Sable C.L., Filippa N., Hemmings B., Van Obberghen E.: cAMP stimulates protein kinase B in a Wortmannin-insensitive manner. *FEBS Lett.*, 1997; 409: 253–257
- [43] Salaun B., de Saint-Vis B., Pacheco N., Pacheco Y., Riesler A., Isaac S., Leroux C., Clair-Moninot V., Pin J.J., Griffith J., Treilleux I., Goddard S., Davoust J., Kleijmeer M., Lebecque S.: CD208/dendritic cell-lysosomal associated membrane protein is a marker of normal and transformed type II pneumocytes. *Am. J. Pathol.*, 2004; 164: 861–871
- [44] Salvatori D., González L., Dewar P., Cousens C., de las Heras M., Dalziel R.G., Sharp J.M.: Successful induction of ovine pulmonary adenocarcinoma in lambs of different ages and detection of viraemia during the preclinical period. *J. Gen. Virol.*, 2004; 85: 3319–3324
- [45] Sharp J.M.: Update on sheep pulmonary adenomatosis, Proceedings of the Sheep Veterinary Society, Spring Meeting 1999, Northern Spain; <http://svs.mri.sari.ac.uk/Proc97on/mspaper.htm> (15.11.2007)
- [46] Sharp J.M., Angus K.W., Gray E.W., Scott F.M.: Rapid transmission of sheep pulmonary adenomatosis (jaagsiekte) in young lambs. Brief report. *Arch. Virol.*, 1983; 78: 89–95
- [47] Sharp J.M., DeMartini J.C.: Natural history of JSRV in sheep. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2003; 275: 55–79
- [48] Strayer D.S., Korutla L.: Activation of surfactant protein-B transcription: signaling through the SP-A receptor utilizing the PI3 kinase pathway. *J. Cell. Physiol.*, 2000; 184: 229–238
- [49] Suau F., Cottin V., Archer F., Croze S., Chastang J., Cordier G., Thivolet-Béjui F., Mornex J.F., Leroux C.: Telomerase activation in a model of lung adenocarcinoma. *Eur. Respir. J.*, 2006; 27: 1175–1182
- [50] Travis W.D., Colby T.V., Borrin B., Shimosato Y., Brambilla E.: Histological typing of lung and pleural tumours. International histological classification of tumours. 3rd ed. Geneva (Switzerland): World Health Organization; 1999
- [51] Verwoerd D.W., Williamson A.L., De Villiers E.M.: Aetiology of jaagsiekte: transmission by means of subcellular fractions and evidence for the involvement of a retrovirus. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 1980; 47: 275–280
- [52] Wootton S.K., Halbert C.L., Miller A.D.: Sheep retrovirus structural protein induces lung tumours. *Nature* 2005; 434: 904–907
- [53] York D.F., Querat G.: A history of ovine pulmonary adenocarcinoma (jaagsiekte) and experiments leading to the deduction of the JSRV nucleotide sequence. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2003; 275: 1–23
- [54] York D.F., Vigne R., Verwoerd D.W., Querat G.: Isolation, identification, and partial cDNA cloning of genomic RNA of jaagsiekte retrovirus, the etiological agent of sheep pulmonary adenomatosis. *J. Virol.*, 1991; 65: 5061–5067
- [55] Zavala G., Pretto C., Chow Y.H., Jones L., Alberti A., Grego E., De las Heras M., Palmarini M.: Relevance of Akt phosphorylation in cell transformation induced by Jaagsiekte sheep retrovirus. *Virology*, 2003; 312: 95–105