

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
BIOLOGII  
KOMÓRKI

POLISH  
ANATOMICAL  
SOCIETY

POLISH SOCIETY  
FOR CELL  
BIOLOGY

VOL. 26, ISSUE 3/1999  
(444–696)

Postępy  
Biologii  
Komórki

Advances  
in Cell  
Biology

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki, Polskiej Sieci UNESCO oraz Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej wydawany z częściową pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych.

Quarterly of the Polish Anatomical Society, the Polish Society of Cell Biology, the Polish UNESCO Net, and the Foundation for Cell Biology and Molecular Biology, partially supported by the Committee for Scientific Research (KBN)

Redaguje Kolegium – Editors:

Szczepan BILINSKI (biologia rozwoju, embriologia, cytoskielet, połączenia międzykomórkowe – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*),

Jerzy KAWIAK (immunologia, cytometria, hematologia, biologia nowotworów – *Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*),

Wincenty KILARSKI (mięśnie, skurcz mięśniowy, ruchy komórek – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*),

Jacek KUŹNICKI (biologia molekularna, biochemia – *Instytut Biologii Doświadczalnej PAN*

*im. M. Nenckiego, 02-097 Warszawa, ul. Pasteura 3*).

Jan MICHEJDA (szlaki informacyjne, błony komórek, energetyka komórki – *Zakład Bioenergetyki UAM, 61-701 Poznań, ul. Fredry 10*),

Maria OLSZEWSKA (komórki roślinne, informacja genetyczna w komórkach roślinnych i zwierzęcych – *Zakład Cytologii i Cytochemii Roslin Instytutu Fizjologii i Cytologii UŁ, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16*),

Barbara PŁYTYCZ (immunologia – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*)

Maciej ZABEL (histologia ogólna, endokrynologia, histochemia (immunocytochemia, hybrydocytochemia), ultrastruktura komórek – *Zakład Histologii AM, 50-368 Wrocław, ul. Chalubińskiego 6a*)

Jan ŻEROMSKI (patologia, immunologia, cytometria – *Katedra i Zakład Immunologii AM 60-355 Poznań, ul. Przybyszewskiego 49*)

Rada Redakcyjna – Advisory Board:

Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca, Mieczysław CHORAŻY, Leszek CIECIURA, Antoni HORST, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŹNICKI, Olgierd NARKIEWICZ, Aleksandra PRZEŁĘCKA, Aleksandra STOJAŁOWSKA, Lech WOJTCZAK

*Adres Redakcji – Editorial Office: Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, Poland, tel. 8340 344, fax 8340470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl.*

© Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej – Foundation for Cell Biology and Molecular Biology

*Wszystkie prawa zastrzeżone. Zabrania się kopiowania części lub całości bez uprzedniego pisemnego zezwolenia Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.*

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced in any form or by any means without the prior written permission of the publisher. Requests to the publisher for permission should be addressed to the Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

## W tym Zeszycie Postępów Biologii Komórki

- W komórkach gametogenicznych, podobnie jak w komórkach hemopoetycznych (PBK 1992; 19, 187), regulacyjne funkcje pełni SCF (*Stem Cell Factor*) stanowiący ligand dla receptora c-Kit. W jądrze komórki Sertoliego mają ekspresję SCF, a receptory c-Kit są na pierwotnych komórkach gametogenicznych, spermatogoniach i innych komórkach. Omówienie tego problemu znajdzie Czytelnik na stronie 461.
- Wielkość genomu komórek roślinnych i zwierzęcych zależy głównie od zawartości powtarzalnych sekwencji DNA. Pewne typy sekwencji są podobne u wszystkich organizmów, podczas gdy inne są specyficzne dla gatunku. Różne typy sekwencji mają charakterystyczne rozmieszczenie w chromosomach, stąd chromosom jest zbudowany z chromatynowych domen. Omówienie tego tematu znajdzie Czytelnik na stronie 507.
- W przejściu komórki przez fazę G1 cyklu komórkowego biorą udział kinazy zależne od cyklin (Cdk): Cdk4 oraz Cdk6, które fosforylują białko Rb. Istotną rolę w regulacji aktywności wspomnianych enzymów odgrywają białka należące do rodziny p16. Wiążą się one z CDK i hamują ich aktywność. W artykule na stronie 539 przedstawiono stan obecnej wiedzy dotyczącej budowy, mechanizmu działania oraz funkcji biologicznej białek rodziny p16.
- Dalszy artykuł w „Postępach” o apoptozie (uprzednie artykuły: 1995; 22: 247; 1996; 23: 299; 1997; 254: 561; 1998; 25: 315; 1998; 25: 649; 1999; 26 285) znajdzie Czytelnik na stronie 561.
- Na stronach: 651 i 667 podsumowano wyniki obserwacji potencjalnych mechanizmów przeciwnowotworowego działania niesteroidowych leków przeciwzapalnych.



## ZESPÓŁ KARTAGENERA JAKO ZESPÓŁ NIERUCHOMYCH RZĘSEK – PRZEGLĄD WIADOMOŚCI

### THE KARTAGENER'S SYNDROME AS AN IMMOTILE CILIA SYNDROME – AN OVERVIEW

Andrzej MARSZAŁEK\*, Małgorzata BŁOTNA-FILIPIAK\*, Michał WITT\*\*,  
Wiesława BICZYSKO\*

\*Katedra i Zakład Patomorfologii Klinicznej Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego; \*\*Zakład Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

*Streszczenie:* Zespół Kartagenera należy do chorób uwarunkowanych genetycznie dziedziczonych autosomalnie recesywnie z różną ekspresją. Po raz pierwszy został opisany na początku naszego wieku jako triada objawów: zapalenie zatok, rozstrzenia oskrzeli i odwrócenie trzew. Podłoże tego zespołu chorobowego zostało wyjaśnione w połowie lat siedemdziesiątych na podstawie badań mikroskopowo-elektronowych. Podstawowym zaburzeniem jest brak ramion zewnętrznych dyneiny w dubletach mikrotubul rzęski. Zespół Kartagenera jest przykładem zespołu nieruchomych rzęsek. Zaburzenia funkcji aksonemy prowadzą do zaburzeń w czasie embriogenezy, a klinicznie głównie do objawów ze strony układu oddechowego. W wielu przypadkach obserwuje się także zaburzenia płodności (u obu płci). Obecnie prowadzone są badania prowadzące do ustalenia zaburzeń genetycznych u chorych mających podobne objawy kliniczne.

(*Postępy Biologii Komórki* 1999; 26: 447–460)

*Słowa kluczowe:* zespół nieruchomych rzęsek, zespół Kartagenera, diagnoza.

*Summary:* The Kartagener's syndrome is an autosomal recessive disease. The clinical presentation is variable. The classic triad of symptoms (*bronchiectasis, sinusitis and situs inversus*) was described at the beginning of that century. However the basic abnormality were found in electron microscopic studies and described in mid 70-ties. As a primary defect the lack of outer arms of dynein within ciliary microtubular doublets was described. Kartagener's syndrome is a part of immotile cilia syndrome. In that group of patients the abnormal ciliary activity is responsible for pulmonary symptoms (mainly), and also affects cells during embryogenesis. Some patients (both sexes) are infertile. Nowadays the genetic studies are done for establishing how many genetic abnormalities may have same clinical presentation.

(*Advances in Cell Biology* 1999; 26: 447–460)

*Key words:* immotile cilia syndrome, Kartagener's syndrome, diagnosis.

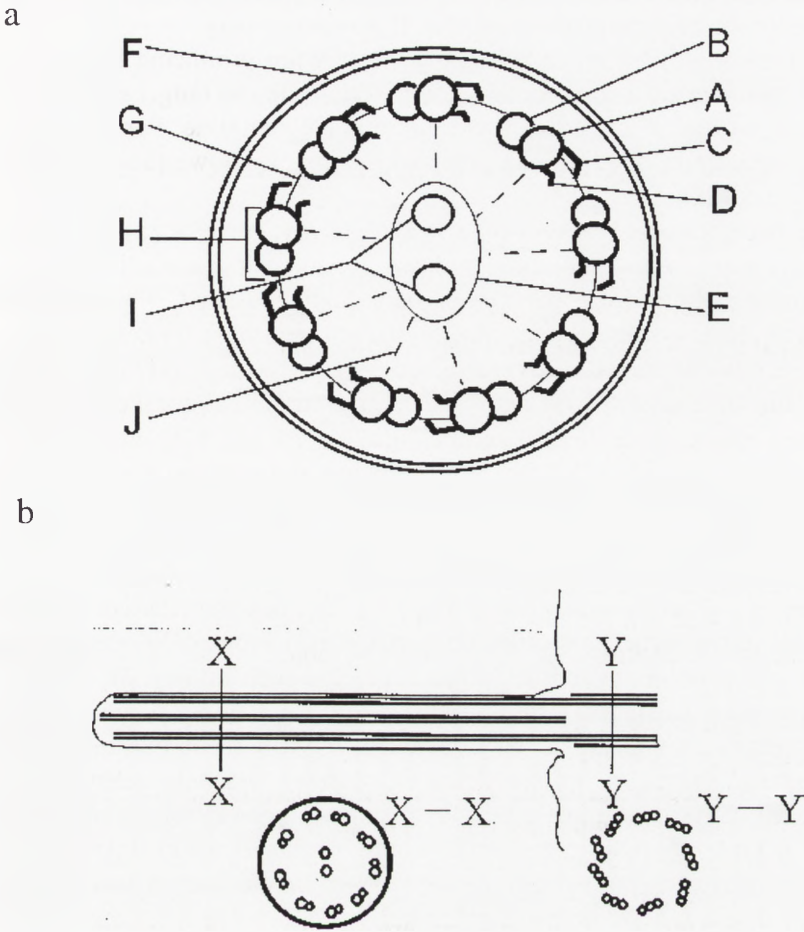
## WSTĘP

Zespół współistnienia triady objawów w postaci: rozstrzenia oskrzeli, przewlekłe zapalenia zatok obocznych nosa oraz przełożenie trzew, został opisany i opublikowany po raz pierwszy w roku 1902, a następnie w 1904 [35]. Pierwsze doniesienie jednak nie zostało dostrzeżone. W roku 1933 Manes Kartagener [20] opisał ponownie taki sam zespół objawów występujący u czterech pacjentów. Ten artykuł zyskał sobie takie uznanie, iż w późniejszych latach wspomnianą triadę objawów przyjęło się nazywać zespołem lub triadą Kartagenera. Kartagener skupił się nad wyjaśnieniem powstawania rozstrzeni oskrzeli u osób z odwróceniem trzew. Podejrzewał, że „osłabienie oskrzeli” u opisanych przez siebie pacjentów związane jest z niedoborem „tkanki elastycznej”. Choć wielu autorów w późniejszych latach opisywało przypadki współistnienia wspomnianych wyżej objawów, to jednak molekularne wytłumaczenie obserwowanych zaburzeń zostało przedstawione dopiero w połowie lat siedemdziesiątych przez zespół Afzeliusa [1, 14]. Podłożem obserwowanych zaburzeń jest nieprawidłowa budowa rzęski. Prowadzi to do zaburzenia jej ruchomości lub nawet do całkowitego braku ruchu. Tylko u około połowy pacjentów z rzęskami o nieprawidłowej budowie występuje odwrócenie trzew (które samo z siebie nie powoduje powikłań). Opublikowano szereg prac dotyczących zaburzeń w budowie rzęski, prowadzących do zespołu nieruchomych rzęsek.

Obecnie zespół Kartagenera jest uznany za jedną z postaci zespołu nieruchomych rzęsek. Synonimy istniejące w piśmiennictwie, to: pierwotna dyskineza rzęsek (*primary ciliary dyskinesia* – PCD, *dyskinetic cilia syndrome*, *immotile-dyskinetic cilia syndrome*, *acilia syndrome*, *immotile-cilia syndrome* – ICS), zespół Ziverta lub Siewert (dwa ostatnie terminy obowiązują na terenie byłego Związku Radzieckiego) [4, 45].

## BUDOWA PRAWIDŁOWEJ RZĘSKI

Prawidłowa rzęska (*cilium*) ma średnicę 0,2–0,25  $\mu\text{m}$ . Długość waha się od 5 do 10  $\mu\text{m}$ , i najczęściej wynosi 6  $\mu\text{m}$ . Na powierzchni jednej komórki może znajdować się do 250 rzęsek. Każda rzęska pokryta jest wypustką błony cytoplazmatycznej, a główną jej część stanowi aksonema (stanowiąca aparat ruchowy) zatopiona w cytoplazmie podstawowej. Podobną budowę ma witka (*flagellum*), jest jednak dłuższa (15–70  $\mu\text{m}$ ; np. witka plemnika ma długość 40  $\mu\text{m}$ ). Witki występują na komórkach pojedynczo.



RYSUNEK 1.a – Schemat przekroju poprzecznego rzęski: A – podjednostka A; B – podjednostka B; C – ramię zewnętrzne dyneiny; D – ramię wewnętrzne dyneiny; E – otoczka centralna; F – wypustka błony cytoplazmatycznej; G – połączenia neksynowe; H – obwodowa para mikrotubul; I – pojedyncze mikrotubule centralne; J – promienie łączące; b – schemat podłużnego przekroju rzęski

Budowę prawidłowej aksonemy rzęskowej (rys. 1) po raz pierwszy opisali Fawcett i Porter [15]. Składa się ona z układu mikrotubul: 9 par + 2 (w sumie 20). Centralnie umieszczone są dwie pojedyncze mikrotubule (ang. *singlets*), natomiast na obwodzie regularnie rozmieszczonych jest 9 par (ang. *doublets*). Każda obwodowo umieszczona para składa się z podjednostki A (zbudowana z 13 protofilamentów tubulinowych) oraz B (zbudowana z 11 protofilamentów tubulinowych), które łączą się przez wspólny odcinek ściany. Na podjednostce A w odstępach co 24 nm umieszczone

są dwa ramiona dyneiny (zewewnętrzne i wewnętrzne), które kierują się zgodnie z ruchem wskazówek zegara do podjednostki B następniej pary.

Obwodowo ułożone pary przez występujące co 29 nm promienie łączące (ang. *radial spoke*) promieniście połączone są z powłoczką środkową (ang. *central sheath*) występującą co 14 nm, a otaczającą dwie mikrotubule centralne. Ponadto dublety obwodowe połączone są między sobą przez wiązania neksynowe (ang. *nexin-link*) występujące co 86 nm.

Aksonema tworząca rdzeń rzęski wnika do ektoplazmy, gdzie łączy się z ciałkiem podstawnym (kinetosomem) mającym budowę zbliżoną do centrioli. W obrębie ciała podstawnego obwodowe pary łączą się z podjednostką C i w ten sposób tworzą tryplety. Nie występuje tutaj natomiast para centralna (rys. 1b).

Ruch rzęsek odbywa się dzięki dyneinie, która ma aktywność ATPazy. Dyneina u ssaków składa się z dwóch łańcuchów ciężkich, o masie cząsteczkowej ok. 450 kDa, ponadto z trzech łańcuchów pośrednich o masie 70–125 kDa oraz wielu łańcuchów lekkich o masie 15–25 kDa [46]. Dyneina aktywowana jest przez jony  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  i wiąże się z neksyną (masa cząsteczkowa 160 000). Pojedynczy cykl ruchowy trwa od 0,1 do 0,2 s. Składa się z dwóch faz. Pierwsza tzw. szybka (w tej fazie następuje przesuwanie materiału umieszczonego na powierzchni nabłonka) polega na gwałtownym zgięciu rzęski u jej podstawy. Druga faza charakteryzuje się powolnym powrotem do pozycji wyjściowej. W czasie ruchu poszczególne mikrotubule wykonują względem siebie ruch falowy. W czasie kolejnych faz powstają i rozpadają się wiązania między dyneiną a podjednostką B. Mechanizm podobny jest do zmian, jakie zachodzą w czasie ruchu mięśni pomiędzy aktyną i miozyną. Zakres ruchu ograniczony jest przez wiązania neksynowe. W podobny sposób odbywa się ruch witek. W warunkach prawidłowych ruch rzęsek na wielu komórkach odbywa się w sposób skoordynowany i ma charakter falowy. Dzięki takiemu ruchowi (porównywany jest czasem do falujących łanów zboża) na przykład w drogach oddechowych przesuwany jest śluz pokrywający nabłonek drzewa oskrzelowego (produkowany w ilości ok. 0,5 ml/kg m.c./d), a szybkość wędrówki zależy od topografii. I tak w oskrzelach wewnątrzplucnych wynosi ona ok. 2 mm/min, natomiast w tchawicy ok. 10 mm/min.

Nabłonki urzęsione są dość licznie reprezentowane w ludzkim organizmie i występują w następującej lokalizacji:

- 1) górne drogi oddechowe: nos (także komórki węchowe), zatoki przynosowe, trąbka Eustachiusza, śluzówka ucha środkowego, nosogardło,
- 2) tchawica i oskrzela (aż do oskrzelików oddechowych)
- 3) woreczek łzowy,
- 4) ependymalna wyściółka ośrodkowego układu nerwowego i kanał centralny,
- 5) endometrialna wyściółka głębszych części szyjki macicy,
- 6) jajowody,
- 7) kanaliki wyprowadzające na granicy jądra i najądrza.



Natomiast nabłonki zbudowane z komórek mających pojedynczą rzęską/witkę spotykane są w następujących narządach:

- 1) tarczyca,
- 2) oko (wewnętrzny śródbłonek rogówki, sieć beleczkowa, naczyniówka),
- 3) wiele z nabłoneków zarodkowych [4, 14].

## ZABURZENIA MORFOLOGICZNE

Na poziomie ultrastrukturalnym podstawowym zaburzeniem jest brak ramion zewnętrznych dyneiny (fot. 2, 3). Powoduje to spowolnienie uderzeń rzęsek. Zwraca się także uwagę na brak ramion wewnętrznych, choć część autorów uważa, iż nie ma to znaczenia czynnościowego [15]. Opublikowano także doniesienia, w których autorzy podkreślają, iż kluczowym dla ruchu rzęski jest ramię wewnętrzne, natomiast zewnętrzne ma znaczenie dla szybkości ruchów [9]. Czynnościowo istotne są zaburzenia związane z obecnością lub nieprawidłowym układem promieni łączących, a także powłóczką środkową oraz wiązaniami neksynowymi. Brak wymienionych struktur powoduje zaburzenia architektury aksonemy (fot. 2). Dublety mikrotubul mogą być rozmieszczone nieregularnie. Obserwuje się także tzw. rzęski olbrzymie (fot. 4). Powstają one ze zlania kilku aksonem, które otoczone są wspólną wypustką cytoplazmatyczną. Takie zjawisko może być szczególnie nasilone przez wtórne infekcje w drogach oddechowych. Obserwuje się także nieprawidłową liczbę mikrotubul. W materiale autorów znajduje się przypadek, w którym dublety są zastąpione pojedynczymi mikrotubulami (fot. 3).

W przypadku prawidłowej budowy pojedynczej aksonemy, dla zespołu nieruchomych rzęsek ważna jest orientacja przestrzenna poszczególnych rzęsek. Linia poprowadzona przez pojedyncze mikrotubule centralne powinna być równoległa do takiej linii w sąsiadujących rzęskach lub tworzyć kąt nie większy niż  $15^{\circ}$  (według różnych autorów od  $5$  do  $25^{\circ}$ ) [5]. W przypadku występowania kąta większego niż  $35^{\circ}$  rzęski danego obszaru można uważać za czynnościowo niewydolne [29]. Opisano występowanie zaburzeń orientacji rzęsek także w innych chorobach, takich jak: astma oraz zakażenia dróg oddechowych [21, 23]. Na podstawie przeprowadzonych i dotychczas opublikowanych badań nie można określić, czy zaburzenie orientacji jest zmianą pierwotną o podłożu genetycznym, czy może rozwijać się w wyniku przewlekłego procesu zapalnego [29].

Nieprawidłowości budowy i funkcji rzęsek można pogrupować w następujące zestawienia: grupa pierwsza – zaburzenia widoczne na poziomie ultrastrukturalnym oraz grupa druga – obejmująca nieprawidłowości rzęsek wykrywane innymi technikami (ta grupa zostanie opisana szczegółowo dalej w części dotyczącej diag-

nostyki). W grupie pierwszej opisywane nieprawidłowości na poziomie mikroskopii elektronowej dotyczą budowy aksonemy i występują jako:

1) brak lub niedobór ramion dyneiny (obu ramion, ramion wewnętrznych, ramion zewnętrznych),

2) nieprawidłowo krótkie ramiona,

3) krótkie promienie łączące,

4) brak otoczki centralnej

5) brak mirotubul centralnych (fot. 1),

6) przemieszczenie mikrotubul w obrębie aksonemy,

7) nieprawidłowa liczba mikrotubul w aksonemie (np.:  $8 + 2$ ,  $9 + 0$ ,  $9 + 1$ ,  $9 + 3$ ,  $9 + 4$ ) (fot. 2),

8) nieprawidłowa liczba obwodowych dubletów (np. 10), a także dodatkowe pojedyncze mikrotubule na obwodzie, zmniejszona liczba obwodowych dubletów (od 2 do 8),

9) nieprawidłowa liczba centralnych singletów (od 1 do 5),

10) nieprawidłowa liczba protofilamentów w podjednostce A ( $N = 13$ , aż do 17),

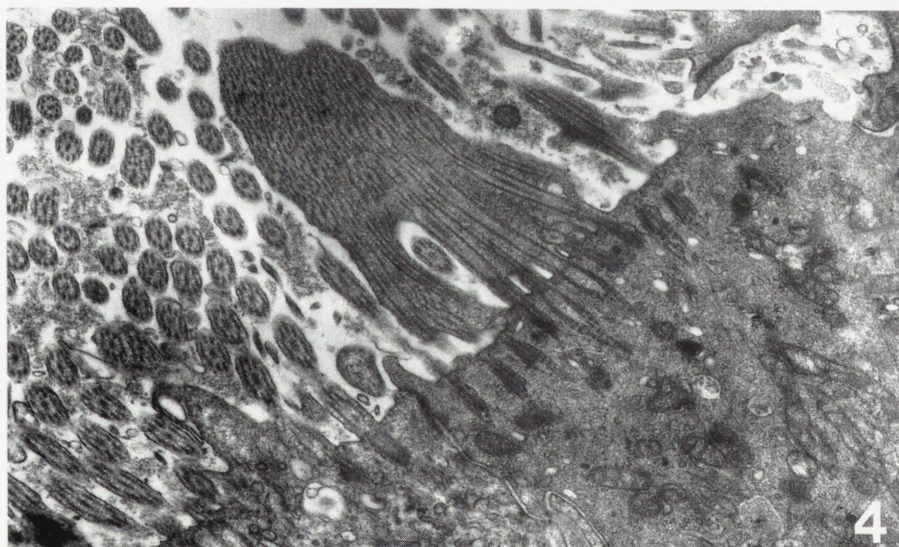
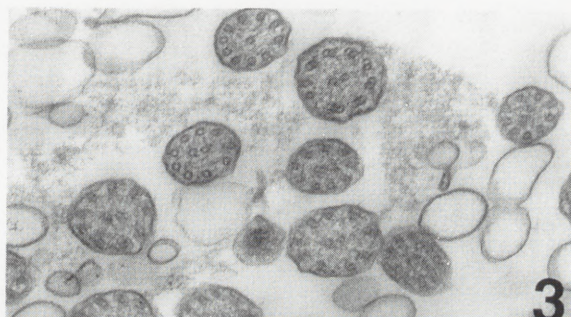
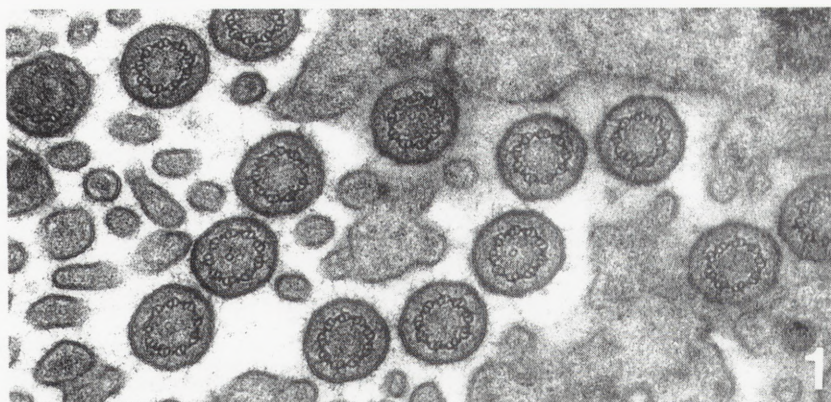
11) nieprawidłowa liczba mikrotubul w aksonemie (od 2 do 20),

12) powstawanie tak zwanych rzęsek złożonych (mega rzęsek, jedna wypustka cytoplazmy obejmuje kilka zespołów aksonemy), zaburzenia te widywane są najczęściej w skojarzeniu z zakażeniami w przewlekłych zapaleniach oskrzeli oraz rakach odoskrzelowych,

13) zmniejszenie liczby rzęsek na komórkach,

14) brak komórek urzęsionych w górnych drogach oddechowych [2, 13, 18, 37, 38, 41].

Wymienione nieprawidłowości doprowadzają do czynnościowych zaburzeń funkcji rzęski, które określić można jako: rzęski nieruchome, słabo ruchome lub nieprawidłowo ruchome. Podejrzuje się, iż w przypadku braku lub obecności nieprawidłowo krótkich ramion dyneiny mamy do czynienia z brakiem ciężkiej podjednostki dyneiny, a przez to z brakiem czynności ATPazowej. Zaburzenia ruchomości rzęsek mają różną ekspresję i obejmują: częstość uderzeń, nieprawidłową koordynację ruchu oraz nieprawidłową amplitudę wychyleń w poszczególnych fazach ruchu. Według doniesień Veermana i wsp., u jednego pacjenta może występować kilka różnych nieprawidłowości [45]. Z drugiej strony zaburzenia występujące w witkach plemników mają bardziej jednorodny charakter [4]. Pamiętać jednak należy, iż wśród osób zajmujących się diagnostyką zespołu nieruchomych rzęsek nie ma jednolitego poglądu na kryteria rozpoznania. Na zjeździe, który odbył się w 1998 r w Asheville (Północna Karolina) w USA wśród obradujących wykrytalizowały się dwie grupy naukowców stosujących odmienne kryteria rozpoznania. Pierwsza grupa (tzw. totalna) przyjmuje, że zaburzenie musi być obecne w całym badanym materiale. Druga natomiast twierdzi, iż dla diagnozy wystarczające jest



FOTOGRAFIE: fot. 1 – na przekrojach poprzecznych w niektórych rzęskach brak pary centralnej lub wstępuje tylko jedna mikrotubula, ponadto brak zewnętrznych, a czasem obu ramion dyneiny (elektronogram, pow. 56 000×); fot. 2 – nieprawidłowa liczba dubletów mikrotubul w aksonemie (elektronogram, pow. 90 000×); fot. 3 – w niektórych rzęskach w miejscu dubletów występują pojedyncze mikrotubule (elektronogram, pow. 60 000×); fot. 4 – zlewianie się rzęsek i powstawanie tzw. megarzęsek (elektronogram, pow. 21 000×)

wystąpienie zaburzeń w przynajmniej 30% badanych struktur (Schroeder J - informacja ustna).

## KLINIKA

Występowanie zespołu Kartagenera w populacji określa się jako 1 na 30 000 do 1 na 60 000. Niektórzy autorzy podają częstość występowania tego zaburzenia jako 1 na 40 000 do 1 na 120 000. Tak duża rozpiętość poglądów wynika z braku ścisłości kryteriów, jakie biorą pod uwagę poszczególni autorzy doniesień. Jeśli rozpatrywać występowanie tego zespołu chorobowego jako współistnienie poszczególnych objawów, to rozpiętość występowania tego zaburzenia w populacji jest jeszcze większa, od 1 na 8 000, aż do 1 na 120 000. Rott [30] w swej pracy podał występowanie zespołu Kartagenera jako 1 na 18 000 do 1 na 229 000, a występowanie zespołu nieruchomych rzęsek jako dwukrotnie częstsze. W populacji japońskiej przełożenie trzew jest znacznie częstsze i występuje 1 na 4 400 [41]. W Europie i Stanach Zjednoczonych przełożenie trzew obserwuje się 1 na 8.000 do 11 000. Z opracowań epidemiologicznych wynika, iż jedynie u 20–25% tych pacjentów występują rozstrzenia oskrzeli i przewlekłe zapalenia zatok obocznych nosa. Przyjmuje się, że rozstrzenia oskrzeli występują w populacji ogólnej jedynie poniżej 0,5% [22]. W grupie noworodków odsetek powikłań ze strony układu oddechowego jest jeszcze wyższy [10]. Jednak ze względu na wyższą umieralność niemowląt i dzieci, w populacji osób dorosłych liczba pacjentów z współistniejącymi zaburzeniami jest stosunkowo niższa.

U zwierząt (psy i myszy) przełożeniu trzew towarzyszy wodogłowie [42].

Prawidłowa funkcja rzęski jest genetycznie uwarunkowana. Do tej pory ustalono, iż odpowiedzialna za to jest heterogenna grupa około 200 polipeptydów. Nieprawidłowości w tej grupie ujawniają się szczególnie w urzęsionych komórkach dróg oddechowych, a także innych narządów (także plemników). Częstość występowania zespołu u mężczyzn i kobiet jest jednakowa, a objawy kliniczne niezależnie od płci są raczej jednolite. Na podstawie wielu opracowań i doniesień ustalono, iż najczęstszą formą dziedziczenia jest dziedziczenie autosomalne recesywne. W rzadkich przypadkach obserwuje się także postać autosomalną dominującą. Opisano także postać rodzinną zespołu, w której objawy obecne były u 50% potomstwa. Natomiast w modelu doświadczalnym (zwierzęcy) obserwuje się dziedziczenie związane z chromosomem X [42]. Większość objawów związanych z zespołem nieruchomych rzęsek obecna jest od dzieciństwa. U noworodków często spotyka się stany niedotlenienia. Wszystkie objawy ze strony układu oddechowego rozwijają się wtórnie. Pierwotnym zaburzeniem jest nieprawidłowa ruchomość (lub jej całkowity brak) rzęsek. W drogach oddechowych gromadzony jest śluz, który ze względu

na brak transportu zalega. Jest on pożywką dla bakterii, które odpowiedzialne są za rozwój zakażeń, przewlekłych zapaleń i związanych z tym powikłań. Typowy wywiad u osoby z zespołem nieruchomych rzęsek jest następujący: nawracające zakażenia układu oddechowego od wczesnego dzieciństwa, nawracające zapalenia płuc, kaszel z wydzieliną w różnej ilości, krwioplucie o zmiennym występowaniu i nasileniu oraz czasami niewydolność oddychania i krążenia, a także zapalenia zatok i ucha środkowego z powikłaniami [34, 36].

Do najczęściej spotykanych powikłań klinicznych należy zaliczyć:

- 1) przewlekły kaszel z odkrztuszaniem,
- 2) rozstrzenia oskrzeli,
- 3) przewlekły nieżyt nosa,
- 4) polipy nosowe,
- 5) przewlekłe i/lub nawracające zapalenia oskrzeli,
- 6) często niedorozwój (hypoplazja lub aplazja) zatok czołowych,
- 7) zapalenie ucha środkowego i trąbki słuchowej,
- 8) rozwój choroby obturacyjnej płuc,
- 9) nadciśnienie płucne,

10) mężczyźni są niepłodni (istnieją doniesienia, z opisem przypadków pacjentów z zespołem nieruchomych rzęsek, lecz bez zaburzeń ruchomości nasienia i odwrotnie), natomiast kobiety tak lub nie [19, 24, 33, 36, 43].

Ponad to istnieją doniesienia o występowaniu innych chorób w skojarzeniu z zespołem nieruchomych rzęsek, są to: wrodzone wady serca (ubytek w przegrodzie międzyprzedsionkowej, ubytek w przegrodzie międzykomorowej, przełożenie wielkich naczyń oraz tetralogia Fallota), wrodzona głuchota, zaburzenie budowy kośćca, schizofrenia, reumatyczne zapalenie stawów, *retinitis pigmentosa*, jednak bezpośredni związek z wymienionymi zaburzeniami nie został jeszcze ostatecznie określony [16, 26, 30]. Być może jest to współistnienie przypadkowe. Także rola zaburzeń ruchomości rzęsek w zespole przełożenia trzew została zasugerowana, lecz dokładne opracowania są nadal na etapie prac [3, 43, 12].

## DIAGNOSTYKA

Podstawowym badaniem potwierdzającym zespół nieruchomych rzęsek jest badanie w transmisyjnym mikroskopie elektronowym. Nie wykryto do tej pory metody równie skutecznej. Wynik badania może być wiarygodny, jeśli liczba badanych rzęsek była wyższa niż 60. Mniejsze znaczenie ma miejsce pobrania materiału [47]. W celu postawienia prawidłowego rozpoznania rzęski powinny być oceniane przy użyciu powiększenia końcowego między 65 000 a 180 000 [16]. Podstawowym poszukiwanym zaburzeniem jest brak ramion dyneiny: zewnętrznych, wewnętrznych

lub obu. Ponadto zwraca się uwagę na zaburzenia w obrębie aksonemy (zmiany wymienione wcześniej w podrozdziale o zaburzeniach rzęskowych). Istotne znaczenie ma także badanie orientacji przestrzennej pary centralnej w sąsiednich rzęskach [28, 38]. Czułość tego badania wynosi ok. 69,8%, natomiast swoistość – 97,5% [29].

Wśród badań prostszych, lecz nie dających całkowitego potwierdzenia są badania ruchomości rzęsek lub plemników. Szczególnie przydatne (choć mniej swoiste) jest badanie ruchomości plemników u mężczyzn, zwłaszcza iż pobranie materiału jest mniej traumatyczne niż biopsja oskrzelowa. Oczywiście należy uprzednio wykluczyć zaburzenia ruchliwości plemników inne niż związane z nieprawidłową budową witki.

Do badań mniej inwazyjnych należy także pomiar wydolności oczyszczania dróg oddechowych ze śluzu. Wykonuje się je polecając choremu wdychanie radioaktywnych cząsteczek (średnicy 6  $\mu\text{m}$ ) znakowanych technetem 99, a następnie badanie radioaktywności nad powierzchnią klatki piersiowej przez 2 godziny. Podstawowym warunkiem prawidłowego wykonania badania jest zalecenie pacjentowi powstrzymanie się od kaszlu w czasie całego testu.

Istnieją doniesienia opisujące fotometryczne pomiary częstości uderzania rzęsek, jednak w celu wykonania badania potrzebny jest wysoce specjalistyczny sprzęt, pozwalający na przyżyciowe oglądanie (czasem także zapis wideo) ruchów rzęsek w świetle stroboskopowym w czasie laryngoskopii lub bronchoskopii [25, 31].

Jako metodę przesiewową (ang.: *screening*) stosuje się test sacharynowy. Jest on prosty i nie obciążający pacjenta. Polega na umieszczeniu cząsteczek sacharyny na dolnej małżowinie nosowej w odległości ok. 10 mm od początku nozdrzy przednich. Następnie mierzy się czas, po którym pacjent zaczyna odczuwać słodki smak w gardle. W warunkach prawidłowych nie powinien on przekraczać 1 godziny.

W celu określenia zaburzeń ruchomości rzęsek stosuje się także inne techniki: badanie ruchu rzęsek błony śluzowej w wycinku pobranym z oskrzela w ciemnym polu (w mikroskopie optycznym), badanie żywotności plemników, badanie transportu śluzowo-rzęskowego (śledząc przesuwanie się śluzu w czasie badania bronchofiberoskopowego). Obecnie zaczęto wprowadzać także bardziej zaawansowane metody diagnostyczne, wśród których są badania immunofluorescencyjne lub techniki PAP z użyciem przeciwciał przeciwko dyneinie. Jednak w tych przypadkach lepiej zastosować niestandardowe techniki utrwalania i zatapiania materiału (*formol calcium* lub metoda AMeX, parafina niskotopliwa) [43]. Są autorzy, którzy w celu stwierdzenia zaburzeń budowy rzęski i jej elementów używali technik *Western Blotting* [43].

Na podstawie długoletnich badań Afzelius stwierdził, iż nie potrzeba żadnych dodatkowych badań, jeśli mamy do czynienia z chorymi o doskonale udokumentowanej klinice [4]. Ma to miejsce w przypadku:

- 1) pełnego zespołu Kartagenera,

2) mężczyzn z przewlekłymi zapaleniami oskrzeli i nieżytem nosa od dzieciństwa i plemnikami o zaburzonej ruchliwości,

3) pacjentów z objawami płucnymi i rodzeństwem z objawami 1 i 2.

W rozważaniach na temat zespołu objawów sugerujących zespół nieruchomych rzęsek należy rozpatrzyć problem diagnostyki różnicowej. Ze względu na objawy płucne zespół Kartagenera należy różnicować z mukowiscydozą oraz niedoborami immunologicznymi. Przewlekłe zapalenia zatok i/lub oskrzeli z nieplodnością (azoospermia z niedrożnością) są typowe dla zespołu Younga. Ponadto ze względu na obecność rozstrzeni oskrzeli należy różnicować z zespołem Swyer-James i zespołem MacLeod.

## BADANIA GENETYCZNE

Ustalono, iż zespół Kartagenera dziedziczy się najczęściej w sposób autosomalny recesywny (o innych sposobach dziedziczenia wspomniano powyżej). Jednak wciąż prowadzone są badania w celu określenia genów odpowiedzialnych za powstawanie poszczególnych postaci zespołu nieruchomych rzęsek. Od początku lat dziewięćdziesiątych wykorzystywane są do tego również modele doświadczalne (zwierzęce, np.: szczury, psy) [42]. Zauważono także, iż zaburzenia budowy rzęsek przypominają nieprawidłowości spotykane w genetycznie zmutowanych organizmach niższych (*Chlamydomonas*, *Drosophila*, *Paramecium*) [7, 32].

Do tej pory zidentyfikowano u ssaków 15 różnych genów odpowiedzialnych za kodowanie ciężkich łańcuchów dyneiny [6, 39, 40, 44]. Dyneina występująca w komórkach została podzielona na dwie klasy/rodziny. Pierwsza tzw. cytoplazmatyczna, odpowiedzialna między innymi za wsteczny transport pęcherzyków, utrzymywanie położenia organelli komórkowych (np. aparat Golgiego) oraz przemieszczanie chromosomów, kodowana jest przez dwa geny. Natomiast druga klasa/rodzina, występująca w aksonemii rzęski lub witki, na podstawie dotychczas przeprowadzonych badań stwierdzono, iż może być kodowana przez 13 różnych genów. Łańcuchy ciężkie ramienia zewnętrznego i wewnętrznego dyneiny kodowane są przez różne (odpowiednio: cztery i dziewięć) geny. Zostały one zlokalizowane na chromosomach: 3, 7, 12, 14, 16, 17 [11]. W świetle ostatnio opublikowanych badań podejrzewa się, iż u ludzi zostaną odkryte jeszcze trzy geny kodujące łańcuchy ciężkie dyneiny w aksonemii (jeden dla ramienia zewnętrznego i dwa dla wewnętrznego) [11, 27].

Stale jednak należy pamiętać, że na obserwowane na poziomie ultrastrukturalnym nieprawidłowości w budowie rzęski mają wpływ czynniki środowiskowe (zapalenia, wdychane gazy). Istotny w tych rozważaniach jest także fakt, iż u jednego pacjenta może występować kilka zaburzeń [4, 42]. Ponad to, o czym wspomniano wcześniej,

prawidłowa czynność rzęski zależy nie tylko od dyneiny, lecz także od szeregu innych polipetydów. Istnieją także doniesienia wskazujące na związek zespołu nieruchomych rzęsek z genotypem HLA-DR7 (haplotyp DQW2 lub DQ $\alpha$ ) [8, 17].

## LECZENIE

Leczenie jest jedynie objawowe. W dobie antybiotykoterapii i środków poprawiających ewakuację śluzu z dróg oddechowych kolejne zakażenia mogą być skutecznie leczone. Z tego powodu ryzyko powstawania rozstrzeni oskrzeli jest obniżone. Wszyscy pacjenci podlegają bezwzględnemu zakazowi palenia tytoniu. Rokowanie jest dobre.

Prowadzenie wielu badań pozwoliło na określenie i poznanie przyczyn zaburzeń ruchomości rzęsek. W części przypadków udało się nawet określić geny, które są odpowiedzialne za powstawanie zaburzeń. Jednak do tej pory nie znaleziono metody, która by pozwoliła na uruchomienie rzęsek *in situ*.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] AFZELIUS BA. A human syndrome caused by immotile cilia. *Science* 1976; **193**: 317–319.
- [2] AFZELIUS BA, ELIASSON R. Flagellar mutants in man: On the heterogeneity of immotile cilia syndrome. *J Ultrastruct Res* 1979; **68**: 43–52.
- [3] AFZELIUS BA. Situs inversus and ciliary abnormalities: What is the connection? *Int J Dev Biol* 1995; **39**: 839–844.
- [4] AFZELIUS BA, MOSSBERG B. Immotile-cilia syndrome (primary ciliary dyskinesia), including Kartagener syndrome. [w] Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D [red.] *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York, Graw-Hill Inc. 1995: 3943–3954.
- [5] AFZELIUS BA. The role of cilia in man. [w] Perry SV, Margreth A, Adelstein RES [red.] *Contractile systems in non-muscle tissue*. Amsterdam, Elsevier/North Holland Biomedical Press 1996: 275–282.
- [6] ANDREWS KL, NETTESHEIM P, ASAI DJ, OSTROWSKI LE. Identification of seven rat axonemal dynein heavy chain genes expression during ciliated cell differentiation. *Mol Biol Cell* 1996; **7**: 71–79.
- [7] ASAI DJ, BECKWITH SM, KANDL KA et al. The dynein genes of *Paramecium tetraurelia*. *J Cell Sci* 1994; **107**: 839–847.
- [8] BIANCHI E, SAVASTA S, CALLIGARO A et al. HLA haplotype segregation and ultrastructural study in familial immotile-cilia syndrome. *Hum Genet* 1992; **89**: 270–274.
- [9] BROKAW CJ, MAIYA R. Bending patterns of *Chlamydomonas fagella*: IV. Mutants with defects in inner and outer dynein arms indicate differences in dynein arm function. *Cell Motil Cytoskeleton* 1987; **6**: 68–75.
- [10] CHAPELIN C, COSTE A, RENERT P et al. Incidence of primary ciliary dyskinesia in children with recurrent respiratory diseases. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997; **106**: 854–858.



- [11] CHAPELIN C, DURIEZ B, MAGNINO F et al. Isolation of several human axonemal dynein heavy chain genes: genomic structure of the catalytic site, phylogenetic analysis and chromosomal assignment. *FEBS Letters* 1997; **412**: 325–330.
- [12] CHEN J, KNOWLES HJ, HEBERT JL, HACKETT BP. Mutation of the mouse hepatocyte nuclear factor/forkhead homologue 4 gene results in an absence of cilia and random left-right asymmetry. *J Clin Invest* 1998; **102**: 1077–1088.
- [13] McDOWEL EM, BARRETT LA, HARRIS CC, TRUMP BF. Abnormal cilia in human bronchial epithelium. *Arch Pathol Lab Med* 1976; **100**: 429–36.
- [14] ELIASSON R, MOSSBERG B, CAMNER P, AFZELIUS BA. The immotile-cilia syndrome. A congenital ciliary abnormality as an etiologic factor in chronic airway infections and male sterility. *N Eng J Med* 1977; **277**: 1–6.
- [15] FAWCETT D, PORTER K. A study of the fine structure of ciliated epithelia. *J Morphol* 1954; **94**: 221–281.
- [16] FOX B, BULL TB, ARDEN GB. Variations in the ultrastructure of human nasal cilia including abnormalities found in retinitis pigmentosa. *J Clin Pathol* 1980; **33**: 327–335.
- [17] GASPARINI P, GRIFA A, SAVASTA S et al. The motilin gene: subregional localisation, tissue expression, DNA polymorphisms and exclusion as a candidate gene for the HLA-associated immotile cilia syndrome. *Hum Genet* 1994; **94**: 671–674.
- [18] GORDON RE, KATTAN M. Absence of cilia and basal bodies with predominance of brush border cells in respiratory mucosa from patient with immotile cilia syndrome. *Ultrastruct Pathol* 1984; **6**: 45–49.
- [19] HERZON FS, MURPHY S. Normal ciliary ultrastructure in children with Kartagener's syndrome. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1980; **89**: 81–83.
- [20] KARTAGENER M. Zur Pathogenese der Bronchiektasien: Bronchiektasien bei Situ viscerum inversus. *Beitr Klin Tuberk* 1933; **83**: 489–501.
- [21] LAITINEN LA, HAINO M, LAITINEN A, KAVA T, HAAHTELA T. Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. *Am Rev Respir Dis* 1985; **131**: 599–606.
- [22] LOGAN WD Jr, ABBOTT OA, HATCHER CR Jr. Kartagener's triad. *Dis Chest* 1965; **48**: 613–616.
- [23] LUNGARELLA G, FONZI L, ERMINI G. Abnormalities of bronchial cilia in patients with chronic bronchitis. *Lung* 1983; **161**: 147–156.
- [24] MILLER DR, DIEVERTIE MB. Kartagener's syndrome. *Chest* 1972; **62**: 130–135.
- [25] PALTIELI Y, FRADIS M, BEN-DAVID J et al. In vivo measurement of human nasal mucociliary motility using a laser light scattering instrument. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997; **106**: 859–862.
- [26] PORAWSKA W, ŚWIERKOCCI K, MARSZAŁEK A, MACKIEWICZ S. An unusual case of Kartagener's syndrome associated with rheumatoid arthritis. *Pol Arch Med Wew* 1996; **96**: 577–580.
- [27] PORTER ME, KNOTT JA, MYSTER SH, FARLOW SJ. The dynein gene family in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* 1996; **144**: 569–585.
- [28] RAUTIAINEN ME. Orientation of human respiratory cilia. *Eur Respir J* 1988; **1**: 257–261.
- [29] RAUTIAINEN ME, COLLAN Y, NUUTINEN J, AFZELIUS BA. Ciliary orientation in the immotile cilia syndrome. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1990; **247**: 100–103.
- [30] ROTTH-D. Kartagener's syndrome and the syndrome of immotile cilia. *Hum Genet* 1979; **46**: 249–261.
- [31] RUTLAND J, COLE PJ. Non-invasive sampling of nasal cilia for measurement of beat frequency and study of ultrastructure. *Ancet Sept* 1980; **13**: 564–565.
- [32] RUPP G, O'TOOLE E, GARDNER LC et al. The sup-pf-2 mutations of *Chlamydomonas* alter the activity of the outer dynein arms by modification of the gamma-dynein heavy chain. *J Cell Biol* 1996; **135**: 1853–1865.

- [33] SCHEEBERGER EE, McCORMACK J, ISSENBERG HJ et al. Heterogeneity of ciliary morphology in the immotile cilia syndrome in man. *J Ultrastruct Res* 1980; **73**: 34–43.
- [34] SCHWARZENBERG H, ELFELDT RJ, SCHLUTER E et al. Severe hemoptysis requiring lobectomy in an 11-year-old patient with Kartagener's syndrome. *Ann Thorac Surg* 1997; **64**: 852–854.
- [35] SIEWERT AK. Über einen Fall von Bronchiectasis bei einem Patienten mit situs inversus viscerum. *Berl Klin Wochenschr* 1904; **41**: 139–141.
- [36] SŁODKOWSKA J, SŁUPEK A, BURAKOWSKI J et al. Kartagener syndrome and hemangiomas proliferation of lung capillaries: case report and literature review. *Pneum Alergol Pol* 1996; **64**: 217–224.
- [37] STRUGESS JM, CHAO J, TURNER JA. Transposition of ciliary microtubules. Another cause of impaired ciliary motility. *N Eng J Med* 1980; **303**: 318–322.
- [38] SULIKOWSKA-ROWIŃSKA A, WILCZYŃSKI G. Markham rotation of electron microscopic images of cilia as an accessory method in differential diagnosis between Kartagener syndrome and Sturgess syndrome. *Folia Histochem Cytobiol* 1996; **34** Suppl1: 13–14.
- [39] SUPP DM, WITTE DP, POTTER SP, BRUECKNER M. Mutation of an axonemal dynein affects left-right asymmetry in inversus viscerum mice. *Nature* 1997; **389**: 963–966.
- [40] TANAKA Y, ZHANG Z, HIROKAWA N. Identification and molecular evolution of new dynein-like protein sequences in rat brain. *J Cell Sci* 1995; **108**: 1883–1893.
- [41] TORIKATA C, KAWAI T, NOGAWA S, IKEDA K, SHIMIZU K, KIJIMOTO C. Nine Japanese patients with immotile-dyskinetic cilia syndrome: an ultrastructural study using tannic acid-containing fixation. *Hum Pathol* 1991; **22**: 830–836.
- [42] TORIKATA C, KIJIMOTO C, KOTO M. Ultrastructure of respiratory cilia of WIC-Hyd male rats. *Am J Pathol* 1991; **138**: 341–347.
- [43] UMEDA A, YOSHIDA T, YAMAGUCHI K, KANAZAWA M, TORIKATA C. Immunohistochemical analysis of rat and human respiratory cilia with anti-dynein antibody: comparison between normal cilia and pathological cilia in primary dyskinesia. *Virchows Arch* 1995; **427**: 401–406.
- [44] VAUGHAN KT, MIKAMI A, PASCHAL BM et al. Multiple mouse chromosomal loci for dynein-based motility. *Genomics* 1996; **36**: 29–38.
- [45] VEERMAN AJ, van der BAAN A, WELTEVREDEN EF et al. Cilia: immotile, dyskinetic, dysfunctional. *Lancet* 1980; **2**: 266.
- [46] WITMAN GB. Perspective: Composition and molecular organization of the dynein. [w] Warner FD, Satir P, Gibbons IR [red] The Dynein ATPases. Cell movement. New York, Alan R Liss 1989: 25–35.
- [47] ZAJĄCZEK S, DOMAŃSKI A, MIERZWA A, KAMIŃSKI M. Evaluation of ciliary epithelium cilia in diagnosis of Kartagener syndrome. *Wiad Lek* 1995; **48**: 68–71.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 29.10. 1999 r.

Przyjęto: 11.02. 1999 r.

Adres autoów: ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań.

## ROLA SYSTEMU c-Kit/SCF W REGULACJI PROCESU SPERMATOGENEZY SSAKÓW

### ROLE OF THE c-Kit/SCF SYSTEM IN REGULATION OF MAMMALIAN SPERMATOGENESIS

Jolanta BARTMAŃSKA

Instytut Zoologiczny, Uniwersytet Wrocławski

**Streszczenie:** Receptor c-Kit o aktywności kinazy tyrozynowej, kodowany jest przez protoonkogen *c-kit* usytuowany w locus *W* (*White-Spotting*). Gen ten ulega ekspresji w komórkach gametogenicznych w różnych etapach rozwoju z wyjątkiem spermatogoniów  $A_s$ . SCF (SCF; ang. *Stem Cell Factor*) stanowiący ligand dla receptora c-Kit jest kodowany przez gen leżący w locus *Sl* (*Steel*), ulegający ekspresji w komórkach Sertoliego. W gonadzie męskiej występują dwie formy SCF: mbSCF (ang. *membrane bound SCF*) i sSCF (ang. *soluble SCF*). Obie formy SCF są zdolne do wywołania autofosforylacji receptora c-Kit. Układ c-Kit/SCF reguluje namnażanie i wędrowkę pierwotnych komórek płciowych (PGCs; ang. *Primordial Germ Cells*) i gonocytów oraz namnażanie i przeżywanie spermatogoniów. Ponadto ogranicza apoptozę spermatocytów i spermatyd, a także wpływa na zdolność plemników do ruchu oraz na przebieg reakcji akrosomalnej i kapacytacji. Mutacje w loci *W* i *Sl* wywołują efekty pleiotropowe i prowadzą do zaburzeń w przebiegu gametogenezy, krwiotworzenia i melanogenezy. Zaburzenia funkcjonowania układu c-Kit/SCF mogą prowadzić do powstawania i rozwoju nowotworów jąder. (*Postępy Biologii Komórki* 1999; 26: 461–475)

**Słowa kluczowe:** c-Kit, SCF, spermatogeneza.

**Summary:** The c-Kit a receptor with tyrosine kinase activity is encoded by protooncogen *c-kit* situated in the mouse *W* (*White Spotting*) locus. It is expressed on the surface of gametogenic cells of various developmental stage. The only c-Kit independent cells are  $A_s$  spermatogonia. SCF (*Stem Cell Factor*), which is a ligand for c-Kit receptor is encoded in the *Sl* (*Steel*) locus and expressed in Sertoli cells. In male gonads there are two forms of SCF: mbSCF (*membrane bound SCF*) and sSCF (*soluble SCF*). Both forms are able to induce receptor phosphorylation. The c-Kit/SCF system plays a crucial function in regulation of multiplication and migration of PGCs (*Primordial Germ Cells*) and gonocytes, and also in multiplication and surviving of spermatogonia. It acts to prevent spermatocytes and spermatids apoptosis. The system serves also as a factor facilitating motility, capacitation and acrosomal reaction of spermatozoa. Mutations at the mouse *W* and *Sl* locus lead to pleiotropic effects including reduced fertility or sterility and severe disturbances in hemopoiesis and melanogenesis. The c-Kit/SCF may be involved

in the initiation or progression of some testis tumors.  
(*Advances in Cell Biology* 1999; 26: 461–475)

**Key words:** c-Kit, SCF, spermatogenesis.

**Wykaz stosowanych skrótów:** **dpc** – (ang. *day post coitum*) – dzień po kopulacji, **dpp** – (ang. *day post partus*) – dzień po urodzeniu, **GFs** – (ang. *Growth Factors*) – czynniki wzrostu, **mbSCF** – (ang. *membrane bound Stem Cell Factor*) – forma błonowa SCF, **sSCF** – (ang. *soluble Stem Cell Factor*) – forma „rozpuszczalna” SCF, **PGCs** – (ang. *Primordial Germ Cells*) – pierwotne komórki płciowe, **RTKs** – (ang. *Receptor Tyrosine Kinases*) – receptorowe kinazy tyrozynowe, **SCF (SF, KL, MGF)** – (ang. *Stem Cell Factor*) (ang. *Steel Factor, Kit Ligand, Mastocyte Growth Factor*) – czynnik wzrostowy komórek macierzystych (czynnik Steel, ligand receptora c-Kit, czynnik wzrostowy komórek tucznych).

## 1. WSTĘP

Proces gametogenezy u ssaków rozpoczyna się w okresie embrionalnym. W zarodkach mysich pierwotne komórki płciowe (PGCs – ang. *Primordial Germ Cells*) pojawiają się u podstawy omoczni już w siódmym dniu rozwoju. Wędrują one następnie wzdłuż jelita tylnego do kręzki grzbietowej i kierują się do listew płciowych, które osiągają około 11dpc (dpc – ang. *day post coitum* – dzień po kopulacji). Między 8,5 a 13 dpc pierwotne komórki płciowe intensywnie się namnażają w zarodkach obu płci. Około 13,5 dpc następuje zahamowanie mitoz pierwotnych komórek płciowych i różnicowanie gonad. Spermatogeneza i oogeneza przebiegają dalej w specyficzny dla każdej płci sposób [1, 12, 14, 41, 42].

W embrionalnej gonadzie męskiej myszy pojawiają się sznury płciowe, czyli pozbawione światła przyszłe kanaliki plemnikotwórcze, zawierające powstałe z PGCs, centralnie leżące gonocyty (komórki prekursorowe spermatogoniów) i znajdujące się na obwodzie komórki somatyczne, z których powstaną komórki Sertoliego. W gonadach noworodków gonocyty przechodzą okres wzrostu, a następnie lokują się przy błonie podstawnej przyszłych kanalików plemnikotwórczych nawiązując kontakt z powstającymi komórkami Sertoliego, które będą wywierać decydujący wpływ na ich dalsze losy. W wyniku podziałów gonocytów powstają spermatogonia typu A. Wkrótce rozpoczynają one namnażanie i przechodzą kolejne etapy różnicowania, co w konsekwencji prowadzi do pełnego rozwoju nabłonka plemnikotwórczego i wytworzenia męskich gamet. Mimo ciągłej produkcji plemników, liczba komórek budujących nabłonek plemnikotwórczy dojrzałych płciowo samców pozostaje w stanie dynamicznej równowagi dzięki temu, że część spermatogoniów A zachowuje zarówno zdolność do wytwarzania własnych kopii, jak i spermatogoniów różnicujących się, z których powstają plemniki. Są to komórki macierzyste  $A_s$  ( $A_s$  – ang. *A stem*) nabłonka plemnikotwórczego. Spermatogonia  $A_s$  rzadko ulegają podziałom, podczas gdy pozostałe spermatogonia A namnażają się intensywnie. Nie wiadomo dotychczas, czy komórki te zachowują także cechy komórek

macierzystych [3, 16, 54]. Ostatni podział mitotyczny spermatogoniów A wiąże się z powstaniem spermatogoniów typu In (In – ang. *Intermediate*). Podział spermatogoniów In prowadzi do powstania spermatogoniów typu B. W wyniku podziałów spermatogoniów B powstają spermatocyty I rzędu, w których rozpoczyna się profaza mejozy. Podczas mejozy powstają spermatozyty, które przekształcają się w plemniki opuszczające kanaliki plemnikotwórcze. Rozwój i różnicowanie kolejnych generacji komórek gametogenicznych w nabłonku plemnikotwórczym są ze sobą zsynchronizowane w taki sposób, że produkcja plemników zachodzi nieprzerwanie przez całe życie osobnika.

Do prawidłowego rozwoju i różnicowania komórek gametogenicznych niezbędna jest obecność somatycznych komórek gonady. Szczególną rolę odgrywają komórki Sertoliego. W ciągu ostatnich kilkunastu lat znacznie wzrosła wiedza o wzajemnych oddziaływaniach między komórkami Sertoliego i komórkami gametogenicznymi [5, 21, 22, 25, 29, 42]. Biochemiczne podstawy tych współzależności, natura sygnałów, mechanizmy ich odbierania i przekazywania, jak również pojawiające się w ich następstwie zmiany metabolizmu tych komórek są coraz lepiej poznawane dzięki nowym metodom immunohistochemicznym i technikom molekularnym.

Zasadniczą rolę w procesach regulacji metabolizmu komórek odgrywają białka i peptydy zwane czynnikami wzrostowymi (GFs – ang. *Growth Factors*). Są wśród nich czynniki wydzielane do krwiobiegu oraz działające lokalnie, syntetyzowane przez komórki znajdujące się w bezpośrednim sąsiedztwie komórek docelowych. Podstawą swoistości działania czynników wzrostowych jest występowanie na powierzchni komórek docelowych receptorów zdolnych do rozpoznania i związania określonego czynnika. Zarówno komórki gametogeniczne, jak i somatyczne jąder mają receptory dla wielu czynników wzrostowych [1, 12, 14, 17, 29].

W regulacji procesu spermatogenezy istotną rolę odgrywa receptor c-Kit. Należy on do grupy receptorów transbłonowych, wykazujących aktywność kinazy tyrozynowej [4, 23, 44, 50, 63]. Receptorowe kinazy tyrozynowe (RTKs – ang. *Receptor Tyrosine Kinases*), aktywowane przez czynniki wzrostowe, biorą udział w przenoszeniu sygnałów z mikrośrodowiska do wnętrza komórki, co prowadzi do zmiany ekspresji genów i biosyntezy specyficznych białek. W ten sposób uczestniczą w kontroli przeżywania, proliferacji i różnicowania komórek w czasie rozwoju zarodkowego oraz w okresie postnatalnym. Ligandem receptora c-Kit jest czynnik wzrostowy komórek macierzystych SCF (SCF – ang. *Stem Cell Factor*), znany również jako czynnik Steel (SF – ang. *Steel Factor*), ligand c-Kit (KL – ang. *Kit Ligand*) oraz czynnik wzrostowy komórek tucznych (MGF – ang. *Mastocyte Growth Factor*). W dalszej części pracy będzie używana dla jego określenia nazwa SCF.

W układzie rozrodczym męskim gen kodujący receptor c-Kit ulega ekspresji w komórkach gametogenicznych [18, 36, 47, 48, 57, 60, 61, 63, 67, 70], a gen kodujący ligand c-Kit w komórkach Sertoliego [35, 43, 55, 56, 66].

Duże zainteresowanie wzbudzają mutacje występujące w genach kodujących receptor c-Kit i jego ligand. Są one przyczyną poważnych zaburzeń w przebiegu gametogenezy oraz krwiotworzenia i melanogenezy, co świadczy o pleiotropowym działaniu tych genów. Poznano wiele takich mutacji i opisano ich efekty fenotypowe [4, 50, 53, 58, 65, 66].

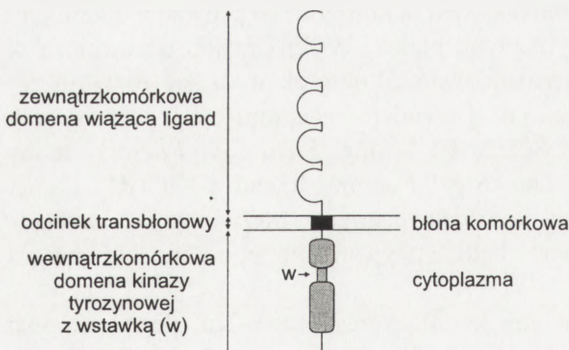
## 2. LOKALIZACJA I STRUKTURA RECEPTORA c-Kit I JEGO LIGANDU

Receptor c-Kit jest kodowany przez protoonkogen usytuowany w locus *W* (*White Spotting*) na 5 chromosomie myszy [23, 44]. U człowieka mieści się on na długim ramieniu chromosomu 4, w pobliżu genów kodujących inne receptory, a także czynniki wzrostowe [50, 53]. Gen *c-kit* obejmuje 65 kpz i składa się z 21 eksonów. Największy z nich ma wielkość 2,3 kpz, rozmiary pozostałych mieszczą się w granicach 100–200 par zasad [4, 24]. Koduje on mRNA, który charakteryzuje się polimorfizmem długości, wynikającym z różnych miejsc inicjacji transkrypcji. W mysich spermatogoniach i spermatocytach wykryto mRNA wielkości 5,5 kpz, a w komórkach postmeiotycznych dwie krótsze formy mRNA o wielkości 3,2 kpz i 2,3 kpz [36, 63]. Prowadzi to do powstania produktów białkowych o zróżnicowanej masie cząsteczkowej w różnych typach komórek gametogenicznych [2, 15, 18, 57, 61].

Receptor c-Kit jest glikoproteiną zbudowaną z pojedynczego łańcucha polipeptydowego. Domena zewnątrzkomórkowa receptora c-Kit składa się z pięciu immunoglobulinopodobnych fragmentów. Fragment hydrofobowy, stanowiący połączenie domeny zewnątrzkomórkowej z odcinkiem wewnątrzkomórkowym, zakotwicza receptor w błonie komórkowej. Domena cytoplazmatyczna jest rozdzielona

wstawką na dwie subdomeny, fragment wiążący ATP i miejsce ulegające autofosforylacji (rys. 1). Wykazuje ono aktywność enzymatyczną kinazy tyrozynowej i zawiera struktury niezbędne do wytworzenia, kontroli i modulacji sygnału przekazywanego do wnętrza komórki [34, 53].

Gen kodujący ligand receptora c-Kit leży w locus *Sl* (*Steel*). Zlokalizowano go u myszy



RYSUNEK 1. Budowa receptora c-Kit

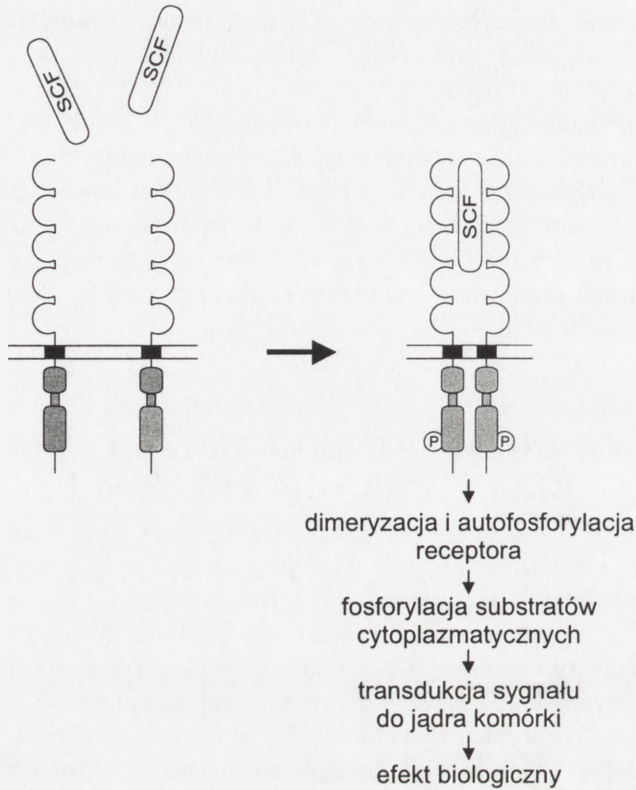
w 10 chromosomie, a u człowieka na długim ramieniu chromosomu 12 [27, 68, 72]. Gen ten składa się z 8 eksonów i koduje mRNA wielkości około 6,5 kbp. SCF jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej ok. 30 kD, zbudowaną z dwu jednakowych, niekowalencyjnie związanych cząsteczek. W rezultacie alternatywnego składania, w komórkach Sertoliego powstają dwie izoformy SCF. Dłuższa forma ligandu (sSCF – ang. *soluble Stem Cell Factor*) w wyniku trawienia proteolitycznego jest uwalniana z powierzchni błony komórek do środowiska. Krótsza izoforma (mbSCF – ang. *membrane bound Stem Cell Factor*) pozostaje związana z błoną komórek Sertoliego, ponieważ nie ma sekwencji aminokwasowych umożliwiających enzymatyczne uwalnianie [4, 20, 38, 56, 65, 66].

### 3. MECHANIZM MOLEKULARNY STYMULACJI RECEPTORA c-Kit PRZEZ SCF

Rozpoznanie i związanie ligandu SCF przez domenę zewnątrzkomórkową receptora c-Kit prowadzi do dimeryzacji receptorów. Odcinek śród błonowy uczestniczy w przekazywaniu sygnału biernie. Powstanie kompleksów ligand-receptor indukuje aktywność kinazy tyrozynowej i powoduje autofosforylację receptora. Zachodzi ona w drodze krzyżowej fosforylacji dwu cząsteczek receptora c-Kit. Do wywołania dimeryzacji i autofosforylacji receptora c-Kit zdolne są obie formy SCF – mbSCF i sSCF. Autofosforylacja umożliwia receptorowi wiązanie i fosforylowanie białek wewnątrzkomórkowych. Białka te biorą udział w przekazaniu sygnału do jądra komórki i mogą się wiązać z chromosomalnym DNA. Powoduje to modyfikację ekspresji genów i zmiany w metabolizmie komórki prowadzące do jej podziału lub różnicowania (rys. 2) [9, 31, 32, 34, 52]. Kompleksy c-Kit/SCF ulegają następnie degradacji przez enzymy lizosomalne [69].

### 4. MUTACJE W LOCI *W* I *Sl*

Pod koniec lat osiemdziesiątych przeprowadzono doświadczenia, dzięki którym dowiedziono, że sterylność gonad myszy noszących mutacje w loci *W* i *Sl* jest spowodowana uszkodzeniem komórek znajdujących się wewnątrz kanalików plemnikotwórczych, a więc komórek gametogenicznych oraz komórek Sertoliego. Wykazano następnie, że sterylność gonad samców myszy noszących mutacje w locus *W* jest wynikiem defektu receptora błonowego komórek gametogenicznych. Może być ona „leczona” przez transplantacje komórek gametogenicznych pochodzących od myszy typu dzikiego bądź też myszy noszących mutacje w locus *Sl*. W gonadach



RYSUNEK 2. Następstwa związania SCF z receptorem c-Kit

tych ostatnich powstają komórki gametogeniczne mające prawidłowe receptory c-Kit. Przyczyną ich bezpłodności jest defekt komórek Sertoliego, które nie wytwarzają biologicznie aktywnego czynnika wzrostowego, przenoszącego sygnały niezbędne dla wzrostu, różnicowania i namnażania komórek gametogenicznych. Potwierdzono to doświadczalnie przeszczepiając komórki gametogeniczne pochodzące z gonad tych myszy do gonad myszy typu dzikiego lub też myszy noszących mutacje w locus *W*. Pozostając w kontakcie z prawidłowo funkcjonującymi, wytwarzającymi SCF komórkami Sertoliego przeszczepione komórki gametogeniczne ulegały namnażaniu i różnicowaniu [4, 30, 50, 65, 66].

W loci *W* i *Sl* myszy wykryto i opisano wiele mutacji dotyczących różnych fragmentów genów kodujących receptor c-Kit i jego ligand SCF. Z reguły wiążą się one z utratą funkcji kompleksu c-Kit/SCF lub z zaburzeniami przenoszenia sygnału do wnętrza komórki. Mutacje w obu genach mają charakter dominacji niekompletnej i są łatwe do rozpoznania, bowiem fenotypowo objawiają się utratą pigmentacji włosów u homozygot i białymi plamami w ubarwieniu heterozygot.



Stopień upośledzenia zależy od miejsca i sposobu uszkodzenia omawianych genów. Niektóre mutacje w genie kodującym receptor c-Kit (np.:  $W^{19H, X}$ ), w stanie homozygotycznym powodują zamieranie zarodków. Mutacje, w których dochodzi do utraty funkcji kinazowej receptora c-Kit (np.:  $W^{37, 42, 55, 41}$ ), również w stanie heterozygotycznym są przyczyną poważnych zaburzeń gametogenezy, ponieważ prowadzą do powstawania niefunkcjonalnych heterodimerów podczas dimeryzacji receptorów c-Kit. Inne zmutowane allele (np.:  $W^{f, 57, sh}$ ) w niewielkim stopniu zaburzają ekspresję genu kodującego c-Kit i nawet u homozygot nieznacznie ograniczają płodność [4].

Szereg mutacji w genie kodującym SCF (np.:  $Sl^{J, gb, SH, 8H, 10H, 12H, 18H}$ ) powoduje również wewnątrzmaciczne zamieranie homozygotycznych zarodków. Mutacja  $Sl^d$  (*Steel Dickie*), powstaje na skutek mikrodelecji wewnątrzgenowej i wiąże się z utratą możliwości wytwarzania mbSCF, podczas gdy zdolność do wytwarzania sSCF pozostaje nienaruszona [20, 65, 66]. Homozygoty  $Sl^d$  są zdolne do życia, ale sterylne. Brak komórek gametogenicznych w gonadach tych myszy wskazuje, że forma sSCF nie jest wystarczająca do normalnego przebiegu gametogenezy. Zmutowane allele  $Sl^{pan}$  (*Steel Panda*) i  $Sl^{17H}$  wywołują zdecydowanie negatywne skutki tylko u jednej płci, podczas gdy płodność drugiej jest upośledzona w niewielkim stopniu. Mutacja  $Sl^{pan}$  powoduje zaburzenia ekspresji genu kodującego SCF na poziomie mRNA, w wyniku czego powstają mniejsze ilości tego czynnika. Fakt, że nawet homozygotyczne samce tych myszy zachowują płodność, wskazuje, że są to nadal ilości wystarczające dla podtrzymania spermatogenezy, natomiast już zbyt niskie dla normalnego wzrostu oocytów, co powoduje bezpłodność samic [26]. Odmienną sytuację zaobserwowano w przypadku mutacji  $Sl^{17H}$ , która powstaje na skutek zmiany fazy odczytu i prowadzi do zatrzymania spermatogenezy i bezpłodności homozygotycznych samców, podczas gdy samice zachowują płodność [4]. Badania prowadzone przy użyciu zwierząt mających zmutowane allele genów kodujących receptor c-Kit i jego ligand pomogły wyjaśnić znaczenie prawidłowo funkcjonującego systemu c-Kit/SCF dla rozwoju i różnicowania komórek gametogenicznych.

## 5. WYSTĘPOWANIE I FUNKCJE RECEPTORA C-KIT I SCF W GONADZIE MĘSKIEJ

Wyniki badań prowadzonych w ostatnich latach wykazały, że zarówno forma, jak i ilość białka c-Kit w komórkach gametogenicznych i SCF w komórkach Sertoliego jest regulowana rozwojowo i może w różny sposób regulować metabolizm tych komórek oraz ich wzajemne oddziaływanie. Wyniki licznych badań wskazują, że system c-Kit/SCF wpływa na przebieg spermatogenezy już od jej najwcześniejszych stadiów [1, 17, 33, 58]. Zarówno u myszy typu dzikiego, jak i myszy

noszących mutacje w genach kodujących receptor c-Kit i jego ligand, w rozwoju zarodkowym wyodrębnia się inicjalna populacja PGCs, obejmująca około 50 komórek [4, 12, 14, 42]. Jednak dalsze losy tych komórek odmiennie układają się w obu przypadkach. W ciągu kilku dni obejmujących wędrówkę w kierunku listew płciowych i ich zasiedlanie, liczba PGCs u myszy typu dzikiego wzrasta wskutek intensywnego namnażania do około 35 000 [1, 12, 14]. W PGCs tych zarodków, już około połowy rozwoju embrionalnego pojawia się mRNA dla receptora c-Kit, a w komórkach fałdów płciowych, mRNA dla SCF [39, 46]. W tym samym czasie w zarodkach mających нефункциональный system c-Kit/SCF większość PGCs podlega apoptozie w drodze do listew płciowych, a nieliczne, które do nich docierają, nie są zdolne do przeżycia, nie namnażają się i giną jeszcze w okresie życia zarodkowego lub w ciągu pierwszych dni po urodzeniu. W doświadczeniach *in vitro* udowodniono, że w okresie wędrówki do listew płciowych PGCs wymagają do przeżycia mbSCF, inkubowane z dodatkiem samej tylko sSCF giną w ciągu pierwszej doby. Taką sytuację obserwuje się również w gonadach homozygot *Sl<sup>fl</sup>* [14, 38, 51, 71].

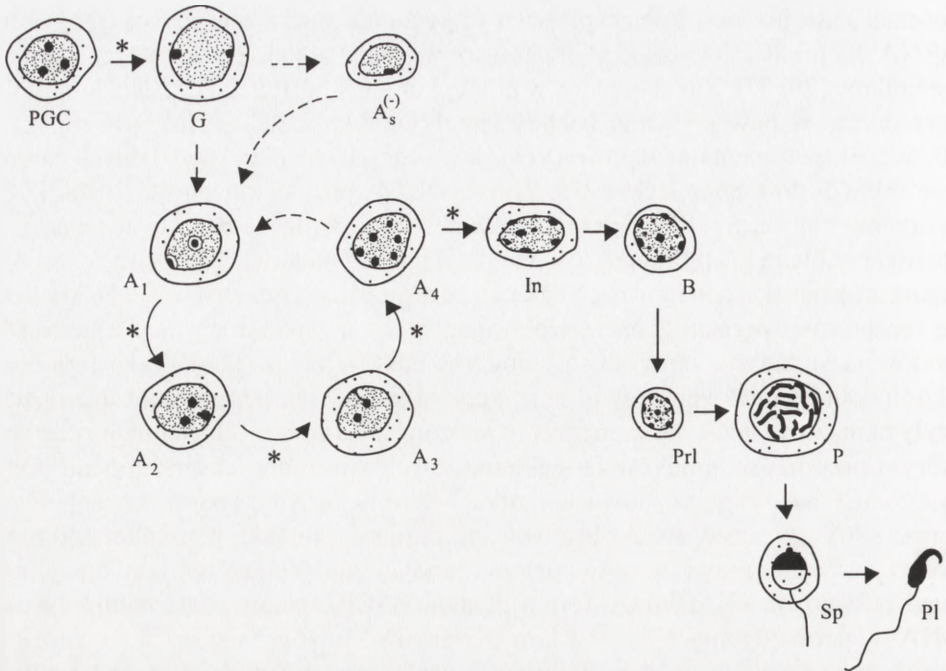
Po namnożeniu, PGCs w mysiej gonadzie przekształcają się w gonocyty, których cykl życiowy zostaje zatrzymany w przedłużonej fazie G<sub>1</sub> aż do narodzin. W tym czasie gonocyty wykształcają pseudopodia i migrują z centrum sznurów płciowych ku ich obwodowi. Dotarcie do błony podstawnej i nawiązanie kontaktu z powstającymi komórkami Sertoliego jest warunkiem ich przeżycia i podjęcia aktywności mitotycznej, w której rezultacie powstają spermatogonia A. Proces migracji gonocytów jest kontrolowany przez system c-Kit/SCF. W błonach gonocytów stwierdzono receptory c-Kit. W doświadczeniach *in vitro*, w czasie których inkubowano mysie gonocyty z przeciwciałami przeciwko c-Kit, obserwowano zanik pseudopodiów i zahamowanie migracji tych komórek. Natomiast dodanie do medium egzogenego SCF stymulowało migrację i powodowało istotny, choć przejściowy wzrost liczby gonocytów wykształcających pseudopodia, nawet w sytuacji, gdy komórki Sertoliego wytwarzały odpowiednie ilości czynnika SCF [47, 48]. Powstające w wyniku podziałów gonocytów spermatogonia A<sub>s</sub> nie mają receptorów c-Kit i namnażają się niezależnie od układu c-Kit/SCF. Receptory c-Kit pojawiają się ponownie w błonach potomnych komórek spermatogoniów A<sub>s</sub>, oznakowanych jako spermatogonia A<sub>1</sub>–A<sub>4</sub>, powstających w gonadach myszy i szczura pod koniec pierwszego tygodnia życia [35, 36, 67, 70]. Eksperymentalne zablokowanie receptorów c-Kit powoduje zahamowanie namnażania tych komórek. Receptory c-Kit występują również w mysich spermatogoniach typu In i B [70]. W ostatnich latach receptory c-Kit wykryto także w spermatogoniach typu A innych gatunków gryzoni oraz człowieka [15, 60, 61].

Wzrost aktywności mitotycznej spermatogoniów A, obserwowany w pierwszym tygodniu życia, wiąże się z wyraźnym wzrostem poziomu mRNA dla SCF w komórkach Sertoliego. Początkowo mRNA dla obu form SCF występuje w jednakowych

ilościach, ale już pod koniec pierwszego tygodnia życia znacznie wzrasta ilość mRNA dla mbSCF, ta postać SCF przeważa również w jądrach dojrzałych płciowo osobników [20, 37]. Zakotwiczone w błonie komórek Sertoliego cząsteczki mbSCF pośredniczą w nawiązywaniu bezpośrednich kontaktów ze spermatogoniami [14, 20, 59]. Eksperymentalne wprowadzenie sekwencji DNA odpowiedzialnych za syntezę mbSCF do komórek Sertoliego myszy *Sl/Sl<sup>d</sup>*, pozbawionych możliwości wytwarzania tej formy SCF, przywraca im zdolność do tworzenia asocjacji ze spermatogoniami [37]. Przypuszczalnie przyleganie umożliwi dwukierunkową wymianę informacji, a ponadto może ograniczać dostęp innych czynników wzrostowych do receptorów spermatogoniów, wpływając w ten sposób na ich metabolizm. Dowodów na istotne znaczenie bezpośrednich kontaktów między komórkami Sertoliego i komórkami gametogenicznymi oraz wpływu mbSCF na ich powstawanie dostarczyły m.in. wyniki doświadczeń przeprowadzonych na dojrzałych płciowo szczurach, którym przy użyciu środków farmakologicznych zmieniono ekspresję genu kodującego SCF w taki sposób, aby w komórkach Sertoliego syntetyzowana była głównie forma sSCF. W następstwie obserwowano regresję nabłonka plemnikotwórczego. Po przywróceniu prawidłowego poziomu mbSCF nabłonek plemnikotwórczy podlegał odbudowie [7]. Dłuższa forma ligandu (sSCF) inicjuje i stymuluje syntezę DNA w spermatogoniach A, co w konsekwencji stanowi sygnał do ich namnażania. Forma ta występuje w znacznych ilościach w komórkach Sertoliego w tych stadiach cyklu nabłonka plemnikotwórczego, w których obserwowana jest wysoka aktywność mitotyczna spermatogoniów [15, 56, 65, 66, 67].

Nie ulega wątpliwości, że układ c-Kit/SCF bierze udział w regulacji postmitotycznej fazy spermatogenezy, chociaż problem ten jest znacznie słabiej poznany. Białka c-Kit wykryto w błonie mysich i szczurzych spermatocytów w fazie preleptotenu [70] i pachytenu [15, 64] oraz w spermatydach i plemnikach [2, 43, 46, 57, 60, 61]. Białka receptorowe zlokalizowane w plemnikach mają związek z ruchliwością oraz prawidłowym przebiegiem kapacytacji i reakcji akrosomalnej. Doświadczalne zablokowanie receptorów c-Kit hamuje reakcję akrosomalną i powoduje aglutynację plemników, a stymulacja czynnikiem SCF istotnie podwyższa procent plemników, w których zachodzi reakcja akrosomalna. Białko c-Kit jest akumulowane w kropli cytoplazmatycznej plemników, w okolicy wstawki [18, 19] i prawdopodobnie może dostawać się do jaja w czasie zapłodnienia. Eksperymentalne wstrzyknięcie białka c-Kit do oocyty zatrzymanego w metafazie II prowadzi do zakończenia podziału i utworzenia partenogenetycznych przedjądrzy oraz pojawienia się ziaren korowych [62]. Pozwala to przypuszczać, że także w warunkach fizjologicznych może ono stanowić czynnik aktywujący komórki jajowe podczas zapłodnienia.

Badania przeprowadzone w ostatnich latach na myszach wykazały, że stymulacja komórek gametogenicznych, mających receptory c-Kit przez SCF, promuje przeżywanie tych komórek przez hamowanie aktywności czynników pro-apoptotycznych



RYSUNEK 3. Schemat ilustrowujący występowanie i funkcje receptora c-Kit w procesie prespermatogenezy i spermatogenezy ssaków: PGC – pierwotne komórki płciowe; G – gonocyty;  $A_s^{(-)}$  – spermatogonia  $A_s$  nie mające receptora c-Kit;  $A_1, A_2, A_3, A_4$  – spermatogonia typu A; In, B – spermatogonia typu In, B; Prl – spermatocyty preleptenowe; P – spermatocyty pachytenowe; Sp – spermatydy; Pl – plemniki; \* – mitozy zależne od układu c-Kit/SCF; ←-- – możliwe drogi odnowy spermatogoniów typu A

[10, 40, 49, 64]. Natomiast po zablokowaniu receptorów, liczba spermatogoniów i spermatocytów podlegających apoptozie wzrasta znacznie ponad poziom normalnie obserwowany [6, 8, 10, 49]. Szereg doświadczeń i obserwacji wskazuje jednocześnie, że zaburzenia funkcjonowania genu kodującego SCF, powodujące zbyt silną supresję czynników pro-apoptotycznych i nadmierne przeżywanie komórek gametogenicznych, mogą prowadzić nawet do rozwoju procesów nowotworowych w gonadzie męskiej [10, 11, 13, 64].

## 6. PODSUMOWANIE

Z dotychczasowych badań nad rolą układu c-Kit/SCF w procesie spermatogenezy ssaków wynika, że bierze on udział w regulacji przeżywania, namnażania i różnicowania komórek gametogenicznych w różnych etapach ich rozwoju, poczynając od PGCs, a kończąc na plemnikach (rys. 3). Nie wykluczone, że wpływa również

na przebieg procesu zapłodnienia. Uzależnienie aktywności mitotycznej spermatogoniów  $A_1$ - $A_4$  od prawidłowego funkcjonowania układu c-Kit/SCF zostało potwierdzone doświadczalnie. Zaburzenia tej aktywności prowadzą nieuchronnie do załamania się całego procesu spermatogenezy i bezpłodności. Obecność receptora c-Kit na spermatogoniach  $A_1$ - $A_4$  i jego brak na spermatogoniach  $A_5$ , stwarza nadzieję na ostateczne rozwiązanie, trwającego od początku lat siedemdziesiątych, sporu o tożsamość komórek macierzystych nabłonka plemnikotwórczego. Jedną z istniejących hipotez zakłada, że wszystkie spermatogonia typu A zachowują charakter komórek macierzystych [3, 14, 16], druga opiera się na założeniu, że komórkami macierzystymi są wyłącznie spermatogonia  $A_5$  [28, 45, 54]. Wykazanie, iż receptor c-Kit jest markerem spermatogoniów  $A_1$ - $A_4$ , pozwala na rozdzielenie obu wymienionych kategorii spermatogoniów oraz zbadanie ich zdolności do samoodnowy, co z kolei dostarczy bezpośrednich dowodów na słuszność jednej z proponowanych koncepcji.

Możliwość rozpoznawania oraz izolowania komórek macierzystych otwiera ponadto nowe, przy szybkim postępie inżynierii genetycznej i transplantologii, może niezbyt odległe perspektywy leczenia niektórych form bezpłodności, chorób genetycznych oraz nowotworów jąder przez terapię genową komórek macierzystych [16, 29]. Do izolowanych komórek macierzystych można będzie wprowadzić gen brakujący lub gen wadliwie działający zastąpić prawidłowym. Po transplantacji zmodyfikowanych komórek macierzystych do gonad geny te będą przekazywane wszystkim komórkom potomnym. Znaczenie możliwości dokonywania takich zabiegów trudno przecenić.

## LITERATURA

- [1] ABE K, KO SH, MACGREGOR GR. A systematic molecular approach to study mammalian germ line development. *Int J Dev Biol* 1998; **42**: 1051–1056.
- [2] ALBANESI C, GEREMIA R, GIORGIO M, DOLCI S, SETTE C, ROSSI P. A cell- and developmental stage-specific promoter drives the expression of a truncated *c-kit* protein during mouse spermatid elongation. *Development* 1996; **122**: 1291–1302.
- [3] BARTMAŃSKA J. Aktualne poglądy na proces odnowy i różnicowania komórek macierzystych nabłonka plemnikotwórczego ssaków. *Post Biol Kom* 1987; **14**: 17–32.
- [4] BESMER P, MANOVA K, DUTTLINGER R, HUANG EJ, PACKER A, GYSSIER C, BACHVAROVA RF. The *kit*-ligand (steel factor) and its receptor *c-kit/W*: pleiotropic roles in gametogenesis and melanogenesis. *Dev Suppl* 1993; 125–137.
- [5] BILIŃSKA B. Współczesne poglądy na interakcje międzykomórkowe w gonadzie męskiej ssaków. *Post Biol Kom* 1992; **19**: 205–220.
- [6] BILLING H, FURUTA I, RIVIER C, TAPANAINEN J, PARVINEN M., HSUEH AJ. Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology* 1995; **136**: 5–12.

- [7] BLANCHARD KT, LEE J, BOEKELHEIDE K. Leuprolide, a gonadotropin-releasing hormone agonist, reestablishes spermatogenesis after 2,5-hexanedione-induced irreversible testicular injury in the rat, resulting in normalized stem cell factor expression. *Endocrinology* 1998; **139**: 236–244.
- [8] BLANCO-RODRIGUEZ J, MARTINEZ-GARCIA C. Spontaneous germ cell death in the testis of the adult rat takes the form of apoptosis: re-evaluation of cell types that exhibit the ability to die during spermatogenesis. *Cell Prolif* 1996; **29**: 13–31.
- [9] BLECHMAN JM, LEV S, GIVOL D, YARDEN Y. Structure-function analysis of the kit receptor for the steel factor. *Stem Cells* 1993; **11**: 12–21.
- [10] BLUME-JENSEN P, JANKNECHT R, HUNTER T. The Kit receptor promotes cell survival via activation of PI3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Curr Biol* 1998; **8**: 779–782.
- [11] BOKEMEYER C, KUCZYK M, DUNN T, SERTH J, HARTMANN K, JONASSON J PIETSCH T, JONAS U, SCHMOLL HJ. Expression of stem-cell factor and its receptor c-kit protein in normal testicular tissue and malignant germ-cell tumours. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996; **122**: 301–306.
- [12] BUEHR M., MCLAREN A, BARTLEY A, DARLING S. Proliferation and migration of primordial germ cells in  $W^u/W^u$  mouse embryos. *Dev Dynamics* 1993; **198**: 182–189.
- [13] CLERMONT Y, BUSTOS-OBREGON E. Re-examination of spermatogonial renewal in the rat by means of seminiferous tubules mounted in toto. *Am J Anat* 1968; **122**: 237–248.
- [14] DONOVAN PJ. The germ cell – the mother of all stem cells. *Int J Dev Biol* 1998; **42**: 1043–1050.
- [15] DYM M, JIA MC, DIRAMI G, PRICE JM, RABIN SJ, MOCCHETTI I, RAVINDRANATH N. Expression of c-kit receptor and its autophosphorylation in immature rat type A spermatogonia. *Biol Reprod* 1995; **52**: 8–19.
- [16] DYM M. Spermatogonial stem cells of the testis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 11287–11289.
- [17] FELICI de M, PESCE M. Growth factors in mouse primordial germ cell migration and proliferation. *Prog Growth Factor Res* 1994; **5**: 135–143.
- [18] FENG H, SANDLOW JI, SANDRA A. Expression and function of the c-kit proto-oncogene protein in mouse sperm. *Biol Reprod* 1997; **57**: 194–203.
- [19] FENG H, SANDLOW JI, SANDRA A. The c-kit receptor and its possible signaling transduction pathway in mouse spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 1998; **49**: 317–326.
- [20] FLANAGAN JG, CHAN DC, LEDER P. Transmembrane form of the kit ligand growth factor is determined by alternative splicing and is missing in the  $Sl^l$  mutant. *Cell* 1991; **64**: 1025–1035.
- [21] FRANCA DE LR, HESS AR, COOKE PS, RUSSELL LD. Neonatal Hypothyroidism Causes Delayed Sertoli Cell Maturation in Rats Treated with Propylthiouracil: Evidence that the Sertoli Cell Controls Testis Growth. *Anat Rec* 1995; **242**: 57–69.
- [22] FRANCA DE LR, BARTKE A, BORG EK, CECIM M, FADDEN CT, YAGI A, RUSSELL LD. Sertoli Cell in Testes Containing or Lacking Germ Cells: A Comparative Study of Paracrine Effects Using the W (c-kit) Gene Mutant Mouse Model. *Anat Rec* 1994; **240**: 225–232.
- [23] GEISLER EN, RYAN MA, HOUSMAN DE. The dominant White Spotting (W) locus of the mouse encodes the c-kit protooncogene. *Cell* 1988; **55**: 185–192.
- [24] GOKKEL E, GROSSMAN Z, RAMOT B, YARDEN Y, RECHAVI G, GIVOL D. Structural organization of the murine c-kit proto-oncogene. *Oncogene* 1992; **7**: 1423–1429.
- [25] GRISWOLD MD. Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biol Reprod* 1995; **52**: 211–216.
- [26] HUANG EJ, MANOVA K, PACKER AI, SANCHEZ S, BACHVAROVA RF, BESMER. The murine steel panda mutation affects kit ligand expression and growth of early ovarian follicles. *Dev Biol* 1993; **157**: 100–109.

- [27] HUANG EJ, NOCKA KH, BEIER DR, CHU TY, BUCK J, LAHM HW, WELLNER D, LEDER P, BESMER P. The hematopoietic growth factor KL is encoded by the *Sl* locus and is the ligand of the *c-kit* receptor, the gene product of the *W* locus. *Cell* 1990; **63**: 225–233.
- [28] HUCKINS C. The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. *Anat Rec* 1971; **169**: 533–558.
- [29] JIANG FX, SHORT RV. Male germ cell transplantation: present achievements and future prospects. *Int J Dev Biol* 1998; **42**: 1067–1073.
- [30] KURODA H, NAKAYAMA H, NAMIKI M., MATSUMOTO K., NISHIMUNE Y, KITAMURA Y. Differentiation of Germ Cells in Seminiferous Tubules Transplanted to Testes of Germ Cell-Deficient Mice of *W/W<sup>v</sup>* and *Sl/Sl<sup>d</sup>* Genotypes. *J Cell Physiol* 1989; **139**: 329–334.
- [31] LEMMON MA, PINCHASI D, ZHOU M, LAX I, SCHLESSINGER J. Kit receptor dimerization is driven by bivalent binding of stem cell factor. *J Biol Chem* 1997; **7**: 6311–6317.
- [32] LEV S, YARDEN Y, GIVOLD D. Dimerization and activation of the kit receptor by monovalent and bivalent binding of the stem cell factor. *J Biol Chem* 1992; **267**: 15970–15977.
- [33] LOVELAND KL, SCHLATT S. Stem cell factor and *c-kit* in the mammalian testis: lessons originating from Mother Nature's gene knockouts. *J Endocrinol* 1997; **153**: 337–344.
- [34] MAJUMDER S, BROWN K, QUI F, BESMER P. *c-kit* protein, a transmembrane kinase: identification in tissues and characterization. *Mol Cell Biol* 1988; **8**: 4896–4903.
- [35] MANOVA K, HUANG EJ, ANGELES M, DE LV, SANCHES S, PRONOVOST SM, BESMER P, BACHVAROVA RF. The expression pattern of the *c-kit* ligand in gonads of mice supports a role for the *c-kit* receptor in oocyte growth and in proliferation of spermatogonia. *Dev Biol* 1993; **157**: 85–99.
- [36] MANOVA K, NOCKA K, BESMER P, BACHVAROVA RF. Gonadal expression of *c-kit* encoded at the *W* locus of the mouse. *Development* 1990; **110**: 1057–1069.
- [37] MARZIALI G, LAZZARO D, SORRENTINO V. Binding of germ cells to mutant *Sl<sup>d</sup>* Sertoli cells is defective and is rescued by expression of the transmembrane form of the *c-kit* ligand. *Dev Biol* 1993; **157**: 182–190.
- [38] MATSUI Y, TOXOS D, NISHIKAWA SI, WILLIAMS D, ZSEBO K, HOGAN BLM. Effect of steel factor and leucaemia inhibitory factor on primordial germ cell culture. *Nature* 1991; **353**: 750–752.
- [39] MATSUI Y, ZSEBO KM, HOGAN BLM. Embryonic expression of a haematopoietic growth factor encoded by a *Sl* locus and the ligand of *c-kit*. *Nature* 1990; **347**: 667–669.
- [40] MATSUI Y. Regulation of germ cell death in mammalian gonads. *APMIS* 1998; **106**: 142–147.
- [41] MCLAREN A. Germ cells and germ cell sex. *Philos Trans R Soc Lond [Biol]* 1995; **350**: 229–233.
- [42] MCLAREN A. Germ cells and germ cell transplantation. *Dev Biol* 1998; **42**: 855–860
- [43] MUNSIE M, SCHLATT S, DEKRETSER DM, LOVELAND KL. Expression of stem cell factor in the postnatal rat testis. *Mol Reprod Dev* 1997; **47**: 19–25.
- [44] NOCKA K, MAJUMDER S, CHABOT B, RAY P, CERVONE M, BERNSTEIN A, BESMER P. Expression of *c-kit* gene products is known cellular targets of *W* mutations in normal and *W* mutant mice—evidence for the impaired *c-kit* kinase in mutant mice. *Genes Dev* 1989; **335**: 816–826.
- [45] OAKBERG EF. Spermatogonial stem cell renewal in the mouse. *Anat Rec* 1971 **169**: 515–532.
- [46] ORR-URTREGER A, AVIVI A, ZIMMER Y, GIVOLD D, YARDEN Y, LONAI P. Developmental expression of *c-kit* a protooncogene encoded by the *W* locus. *Development* 1990; **109**: 911–923.
- [47] ORTH JM, JESTER WF JR, QIU J. Gonocytes in testes of neonatal rats express the *c-kit* gene. *Mol Reprod Dev* 1996; **45**: 123–131.
- [48] ORTH JM, QIU J, JESTER WF JR, PILDER S: Expression of the *c-kit* gene is critical for migration of neonatal rat gonocytes *in vitro*. *Biol Reprod* 1997; **57**: 676–683.

- [49] PACKER AI, BESMER P, BACHVAROVA RF. Kit ligand mediates survival of the type A spermatogonia and dividing spermatocytes in postnatal mouse testes. *Mol Reprod Dev* 1995; **42**: 303–310.
- [50] PAWSON T, BERNSTEIN A. Receptor Tyrosine Kinases. Genetic evidence for their role in *Drosophila* and mouse development. *TIG* 1990; **6**: 350–356.
- [51] PESCE M, DI CARLO A, DE FELICI M. The c-kit receptor is involved in the adhesion of mouse primordial germ cells to somatic cells in culture. *Mech Dev* 1997; **68**: 37–44.
- [52] PHILO JS, WEN J, WYPYCH J, SCHWARTZ MG, MENDIAZ EA, LANGLEY KE. Human stem cell factor dimer forms a complex with two molecules of the extracellular domain of its receptor Kit. *J Biol Chem* 1996; **271**: 6895–6902.
- [53] RATAJCZAK MZ, LUGER SM, GEWIRTZ AM. Rola receptora c-kit i jego ligandu w regulacji procesów krwiotworzenia u człowieka. *Post Biol Kom* 1992; **19**: 3: 187–204.
- [54] ROOIJ DG de, VAN DISSEL-EMILIANI FMF, VAN PELT AMM. Regulation of spermatogonial proliferation. *Ann NY Acad Sci* 1994; **V**: 140–153.
- [55] ROSSI P, ALBANEASI C, GRIMALDI P, GEREMIA R. Expression of the mRNA for the ligand of c-kit in mouse Sertoli cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **176**: 910–914.
- [56] ROSSI P, DOLCI S, ALBANESI C, GRIMALDI P, RICCA R, GEREMIA R. Follicle stimulation hormone induction of steel factor (SLF) mRNA in mouse Sertoli cells and stimulation of DNA synthesis in spermatogonia by soluble SLF. *Dev Biol* 1993; **155**: 68–74.
- [57] ROSSI P, MARZIALI G, ALBANESI C, CHARLESWORTH A, GEREMIA R, SORRENTINO V. A novel c-kit transcript, potentially encoding a truncated receptor, originates within a kit gene intron in mouse spermatids. *Dev Biol* 1992; **152**: 203–207.
- [58] RUSSELL ES. Hereditary anemias of the mouse: a review for genetics. *Adv Genet* 1979; **20**: 357–459.
- [59] RUSSELL LD. Observations on the rat Sertoli ectoplasmic ('junctional') specializations in their association with germ cells of the rat testis. *Tissue Cell* 1976; **9**: 475–498.
- [60] SANDLOW JI, FENG HL, COHEN MB, SANDRA A. Expression of c-kit and its ligand, stem cell factor, in normal and subfertile human testicular tissue. *J Androl* 1996; **17**: 403–408.
- [61] SANDLOW JI, FENG HL, SANDRA A. Localization and expression of the c-kit receptor protein in human and rodent testis and sperm. *Urology* 1997; **49**: 494–500.
- [62] SETTE C, BEVILACQUA A, BIANCHINI A, MANGIA F, GEREMIA R, ROSSI P. Parthenogenetic activation of mouse eggs by microinjection of a truncated c-kit tyrosine kinase present in spermatozoa. *Development* 1997; **124**: 2267–2274.
- [63] SORRENTINO V, GIORGI M, GEREMIA R, BESMER P, ROSSI P. Expression of the c-kit protooncogene in the murine male germ cells. *Oncogene* 1991; **6**: 149–151.
- [64] STROCHMEYER T, REESE D, PRESS M, ACKERMANN R, HARTMANN M, SLAMON D. Expression of the c-kit protooncogene and its ligand stem cell factor (SCF) in normal and malignant human testicular tissue. *J Urol* 1995; **153**: 511–515.
- [65] TAJIMA Y, SAKAMAKI K, WATANABE D, KOSHIMIZU U, MATSUZAWA T, NISHIMUNE Y. Steel Dickie (*Sl<sup>d</sup>*) mutation affects both maintenance and differentiation of testicular germ cells in mice. *J Reprod Fertil* 1991; **91**: 441–449.
- [66] TAJIMA Y, ONOUE H, KITAMURE Y, NISHIMUNE Y. Biologically active kit ligand growth factor is produced by mouse Sertoli cell and is defective in *Sl<sup>d</sup>* mutant mice. *Development* 1991; **113**: 1031–1035.
- [67] TAJIMA Y, SAWADA K, MORIMOTO T, NISHIMUNE Y. Switching of mouse spermatogonial proliferation from the c-kit receptor-independent type to the receptor-dependent type during differentiation. *J Reprod Fertil* 1994; **102**: 117–122.
- [68] WILLIAMS DE, EISENMAN J, BAIRD A, RAUCH C, VAN NES K, MARCH CJ, PARK LS, MARTIN U, MOCHIZUKI DY, BOSWELL HS, BURGESS GS, COSMAN D, LYMAN SD. Identification of a ligand for c-kit protooncogene. *Cell* 1990; **63**: 167–174.



- [69] YEE NS, HSIAU CW, SERVE H, VOSELLER K, BESMER P. Mechanism of down-regulation of *c-kit* receptor. Roles of receptor tyrosine kinase, phosphatidylinositol 3'-kinase, and protein kinase C. *J Biol Chem* 1994; **269**: 31991–31998.
- [70] YOSHINAGA K, NISHIKAWA S, OGAWA M, HYASHI SI, KUNISADA T, FUJIMOTO T, NISHIKAWA S. Role of *c-kit* in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of *c-kit* expression and function. *Development* 1991; **113**: 689–699.
- [71] ZIPARO E, GEREMIA R, RUSSO MA, STEFANINI M. Surface interaction *in vitro* between Sertoli cells and germ cells of different stages of spermatogenesis. *Am J Anat* 1980; **159**: 385–388.
- [72] ZSEBO KM, WILLIAMS DA, GEISLER EN, BROUNDY VC, MARTIN FH, ATKINS HL, HSU RY, BIRKETT NC, OKINO KH, MURDOCK DC, JACOBSEN FW, LANGLEY KE, SMITH KA, TEKEISHI T, CATTANACH BM, GALLI SJ, SUGS SV. Stem cell factor is encoded at the *Sl* locus of the mouse and is the ligand for the *c-kit* tyrosine kinase receptor. *Cell* 1990; **63**: 213–224.

Redaktor prowadzący – S. Biliński

Otrzymano: 02.10.1998 r.

Przyjęto: 17.02.1999 r.

Adres autora: 50-335 Wrocław, ul. Sienkiewicza 21



## SYNDEKANY – PROTEOGLIKANY TRANSMEMBRANOWE

### SYNDECANS – TRANSMEMBRANE PROTEOGLYCANS

Rafał BOBIŃSKI\*, Krystyna OLCZYK\*, Ewa KRZYŻOWSKA-BOBIŃSKA\*\*,  
Włodzimierz JANIC\*\*\*

\*Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej, Śląska Akademia Medyczna, Sosnowiec; \*\*Przedsiębiorstwo Farmaceutyczne JELFA S.A., Jelenia Góra; \*\*\*Oddział Urazowo-Ortopedyczny, Szpital Miejski, Sosnowiec

*Streszczenie:* Proteoglikany – cząsteczki syntetyzowane przez komórki eukariotyczne – obecne są w przestrzeni przykomórkowej oraz w substancji międzykomórkowej. Składają się one z białka rdzeniowego, do którego przyłączone są łańcuchy glikoaminoglikanowe. Jedną z rodzin proteoglikanów jest rodzina syndekanów – transmembranowych proteoglikanów. Cechą charakterystyczną syndekanów jest konserwatywna budowa domeny transmembranowej. Syndekany są receptorami i koreceptorami komórkowymi wielu składników substancji międzykomórkowej, a także kotwiczą komórki we wspomnianej substancji. Syndekany oddziałują z cytokinami oraz innymi (kolagen, fibronektyna, tenascyna) cząsteczkami substancji międzykomórkowej, głównie przez składnik glikanowy.  
(*Postępy Biologii Komórki* 1999; 26: 477–490)

*Słowa kluczowe:* proteoglikany, syndekany.

*Summary:* Proteoglycans are produced by most eukaryotic cells and are versatile components of pericellular and extracellular matrix. They are proteins that have one or more attached glycosaminoglycan chains. There are several families of proteoglycans. Syndecans are a family of integral membrane proteoglycans with conserved membrane-spanning and intracellular domains but with structurally distinct extracellular domains. They are known to function as heparan sulphate receptors and co-receptors for various molecules as well as to link cells directly to the extracellular matrix. These and other biological activities of syndecans involve specific interaction of the heparan sulphate side chains of syndecans with cytokines and extracellular matrix proteins.  
(*Advances in Cell Biology* 1999; 26: 477–490)

*Key words:* proteoglycans, syndecans.

## I. WSTĘP

Proteoglikany (PG) są heterogenną grupą glikoprotein, zbudowanych z białka rdzeniowego, do którego przyłączony jest łańcuch lub łańcuchy glikoaminoglikanów (GAG). Oprócz GAG, do białka rdzeniowego mogą być przyłączone łańcuchy oligosacharydowe. Glikoaminoglikany są liniowymi, nie rozgałęzionymi heteropolisacharydami, zbudowanymi z powtarzających się disacharydowych jednostek złożonych z N-acetylowanej heksozoaminy połączonej wiązaniem glikozydowym z kwasem heksuronowym bądź galaktozą [2,28,36,59]. Białko rdzeniowe może łączyć się z jednym typem GAG lub dwoma i więcej różnymi glikoaminoglikanami. Zarówno składnik białkowy, jak i cukrowy odgrywają ważną rolę w oddziaływaniach PG z otaczającym je środowiskiem, co wynika głównie z silnie anionowego charakteru glikoaminoglikanów [9] oraz zróżnicowanej budowy białek rdzeniowych. Proteoglikany wytwarzane prawdopodobnie przez wszystkie rodzaje komórek zwierzęcych [13,19,23,29,39] występują zarówno w obrębie komórek, jak i w przestrzeni pozakomórkowej [5,7,12,18,31,41,46,57].

W komórkach znajduje się je zarówno w ziarnistościach wydzielniczych, jak i w błonach komórkowych (tzw. proteoglikany transmembranowe), natomiast pozakomórkowo – w substancji międzykomórkowej, jak i w wyspecjalizowanych jej strukturach – błonach podstawnych [33]. Dzięki swoim właściwościom, proteoglikany wpływają na organizację substancji międzykomórkowej. Biorą udział we wzajemnym kontaktowaniu się komórek [20,27,60], a także oddziałują z czynnikami wzrostowymi, regulując tym samym szereg procesów biochemicznych [25,32,44,45].

Grupę syndekanów cechuje znaczne podobieństwo dotyczące zarówno budowy genu, jak i struktury białka rdzeniowego. Wspólną cechą syndekanów jest obecność w ich cząsteczce łańcuchów heparanosiarczanowych (HS) [9,17], choć w niektórych typach omawianych PG wystąpić mogą dodatkowo łańcuchy chondroitynosiarczanowe (CS) [6,52]. Z uwagi na swe usytuowanie na przestrzeni komórka - obszar pozakomórkowy, syndekany stanowią czynnościowy „pomost” między wnętrzem komórki a środowiskiem ją otaczającym [9].

## II. STRUKTURA GENÓW BIAŁEK RDZENIOWYCH SYNDEKANÓW

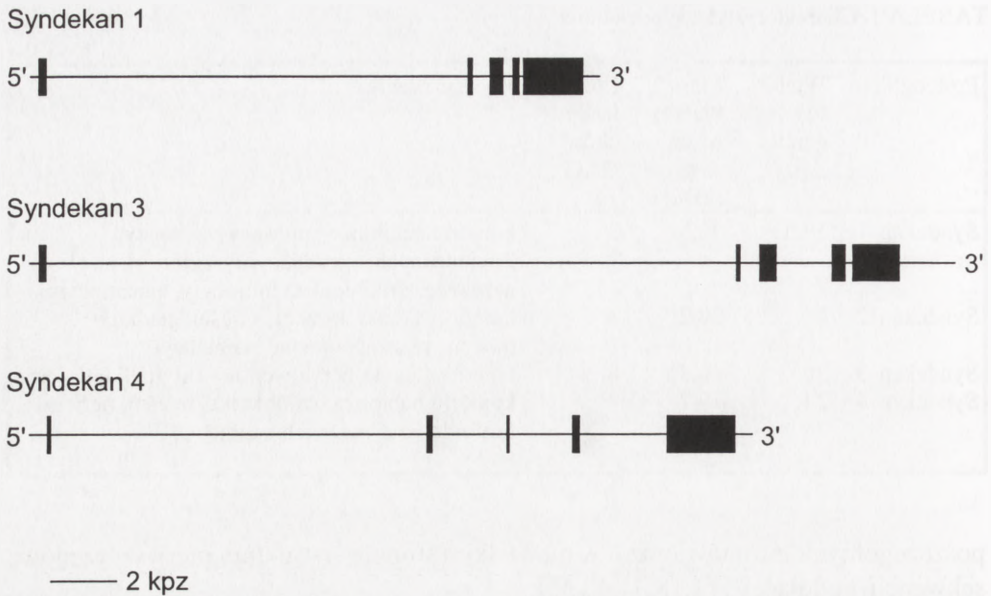
Białka rdzeniowe wszystkich syndekanów kodowane są przez różne geny, rozmieszczone na różnych chromosomach. Zjawisko takie stwierdzono także w genomie człowieka, myszy i szczura [2,10,28,59,60]. Budowa genów kodujących białka rdzeniowe syndekanów jest podobna. Geny te składają się z pięciu eksonów, podobnej wielkości dla wszystkich członków tej grupy PG. Różnią się natomiast wielkością

TABELA 1. Charakterystyka syndekanów

Proteoglikan	Wielkość genu (kpz)	Masa białka rdzeniowego (kDa)	Ilość łańcuchów GAG	Występowanie
Syndekan 1	19,5	30,5	5	komórki nabłonka, mięśniówki naczyń krwionośnych, mezenchymy embrionalnej, nerwowe, śródbłonka, limfocyty, plazmocyty
Syndekan 2	–	20,2	4	komórki tkanki łącznej, mięśni gładkich, mózgu, mezenchymalne, hepatocyty
Syndekan 3	30	40,8	8	komórki tkanki nerwowej, mięśni gładkich, serca
Syndekan 4	24	19,7	4	komórki nabłonka, śródbłonka, mięśni, nerwowe, limfoidalne i mezenchymalne

poszczególnych intronów oraz – w niewielkim stopniu – strukturą pierwszorzędową sekwencji kodującej [11,18,34,42,55].

Gen białka rdzeniowego syndekanu 1 znajduje się na krótkim ramieniu chromosomu 2 (locus 2p24-p23) [57] i zbudowany jest z 19.5 kpz [28,42,55], w tym czterech intronów, wśród których na szczególną uwagę zasługuje intron II, zajmujący około 70% genu (rys. 1). Wielkość sekwencji cDNA wynosi 2430 pz, a w jej skład wchodzi kolejno – licząc od końca 5' – 208-nukleotydowa sekwencja niekodująca, po której rozciąga się otwarta ramka odczytu, o wielkości 930 pz. Koniec 3' cDNA zamyka niekodujący obszar o wielkości 1292 pz, na którego końcu znajduje się sekwencja poli A, składająca się z 27 nukleotydów [42]. Pierwszy z eksonów, licząc od końca 5' omawianego genu, składa się z sekwencji niekodującej, następnie z sekwencji dla peptydu sygnałowego oraz sekwencji kilku pierwszych aminokwasów dojrzałego białka rdzeniowego. Na drugim eksonie zapisana jest informacja o części N-terminalnej domeny pozakomórkowej, zawierającej trzy miejsca przyłączenia łańcuchów glikozoaminoglikanowych. Ekson trzeci koduje pozostałą część domeny pozakomórkowej białka rdzeniowego oraz jeden z dwóch C-terminalnych obszarów przyłączający jeden łańcuch GAG. Charakterystyczną cechą trzeciego eksonu jest duża ilość sekwencji kodujących reszty treoniny i proliny. Drugi, C-terminalny obszar przyłączający ostatni GAG jest zapisany na eksonie czwartym. Dodatkowo, struktura ta koduje obszar wrażliwy na działanie proteaz oraz zawiera 3 i 1/3 kodonu domeny transmembranowej. Na eksonie piątym zawarta jest dalsza część informacji o domenie transmembranowej, informacja o całej domenie cytoplazmatycznej, a także o obszarze 3' nie ulegającym translacji [28]. Region promotora genu bogaty jest w szereg elementów cis-aktywnych, wśród których znajdują się sekwencje TATA i CAAT [28,42,55].



RYSUNEK 1. Budowa genów kodujących białka rdzeniowe syndekanów: liniami zaznaczono introny, natomiast czarnymi polami – eksony; wielkość zarówno sekwencji niekodujących, jak i kodujących jest proporcjonalna do podanej skali, nie zamieszczono schematu budowy genu dla syndekanu 2, z uwagi na nie w pełni opisaną dotąd jego budowę

Spośród genów syndekanów, struktura genu syndekanu 2 jest dotychczas najslabiej poznana. Gen ten znajduje się na długim ramieniu chromosomu 8 (locus 8 q 23) i jak dotąd nie określono dotychczas jego wielkości [43]. Prawdopodobnie, omawiany gen koduje – oprócz białka rdzeniowego syndekanu 2 (48 kDa) – także inne białko, o masie 90 kDa. Nie znany jest jednak mechanizm, jakiemu podlega wspomniany gen w zakresie regulacji ekspresji obydwu wymienionych wyżej białek [43].

Gen kodujący białko rdzeniowe syndekanu 3 (N-syndekanu), znajduje się na krótkim ramieniu chromosomu 1 (locus 1p36-p32) i zbudowany z około 30 kpz. Na pierwszym eksonie zakodowana jest informacja o obszarze 5' nie ulegającym translacji oraz o peptydzie sygnałowym. Ekson drugi koduje dalszą (w odniesieniu do błony komórkowej) domenę przyłączającą łańcuchy GAG. Na eksonie trzecim zapisana jest struktura domeny mucynopodobnej. Ekson czwarty koduje bliższą – w stosunku do błony komórkowej – domenę przyłączającą łańcuchy GAG, zaś piąty – domenę transmembranową oraz cytoplazmatyczną [10].

Gen białka rdzeniowego syndekanu 4 (amfiglikanu, ryudokanu) zbudowany jest z 24 kpz (rys. 1). Na eksonie I zakodowana jest informacja o sekwencji regionu 5' nie ulegającego translacji oraz – o sekwencji peptydu sygnałowego. Ponadto, w skład eksonu I wchodzi dwa pierwsze kodony dojrzałego białka rdzeniowego. Na drugim eksonie zapisana jest informacja o obszarze białka rdzeniowego, przy-

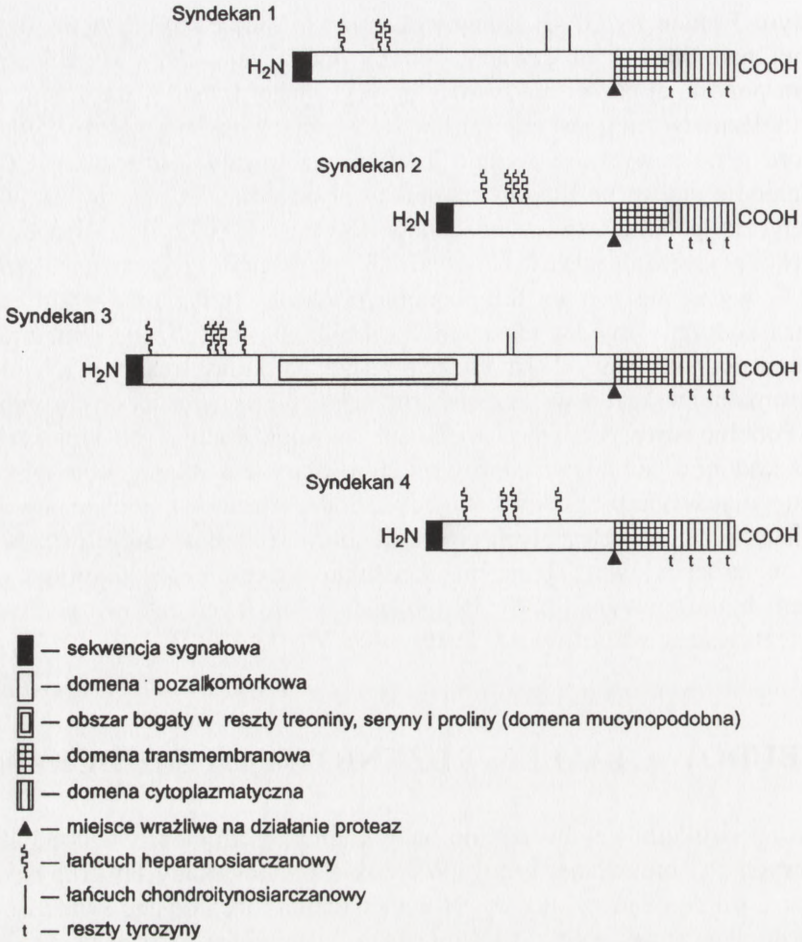
łączającym 3 łańcuchy GAG. Kolejny ekson – 3, koduje środkową część domeny centralnej, natomiast ekson czwarty – obszar przyłączający czwarty łańcuch GAG. Struktura pozostałej części białka rdzeniowego, jego domeny – transmembranowej oraz cytoplazmatycznej, jest zapisana w sekwencjach eksonu piątego [59]. Region promotora genu zawiera sekwencję TATA oraz bogaty jest w pary GC (73%) [59]. Znajduje się on na długim ramieniu chromosomu 20 (locus 20q11-q13).

Genetyczne podobieństwo syndekanów dotyczy nie tylko ilości i wielkości sekwencji kodujących, ale także faz kodonów. U wszystkich przedstawicieli omawianej grupy PG występuje zerowa faza kodonu pomiędzy 1 i 2 oraz 3 i 4 eksonem, zaś I faza kodonu – między eksonem 2 i 3 oraz 4 i 5. Zbliżona struktura genów sugeruje, iż pochodzą one od wspólnego przodka, natomiast różnica w ich lokalizacji chromosomalnej wskazuje na wczesne „rozbiegnięcie się” genów po chromosomach [6,30]. Podobieństwo dotyczące wielkości sekwencji kodujących i niekodujących oraz faz kodonów jest zjawiskiem wspólnym dla wielu rodzin proteoglikanów. I tak, występując w obrębie genów kodujących białka rdzeniowe syndekanów, dotyczy także białek rdzeniowych małych proteoglikanów śródmiażdżowych (małe proteoglikany bogatoleucylowe) [7] oraz białek rdzeniowych proteoglikanów agregujących z kwasem hialuronowym [8,26]. Podobieństwo międzygatunkowe genów syndekanów (człowieka, wołu, myszy, kury) sięga 70–90% [17].

### III. BUDOWA BIAŁEK RDZENIOWYCH SYNDEKANÓW

Zbliżona struktura genów rzutuje na wzajemne podobieństwo budowy białek rdzeniowych PG omawianej grupy. Wszystkie proteoglikany tej grupy wykazują identyczną, trójdomenową budowę. N-koniec białka rdzeniowego syndekanów rozpoczyna domenę pozakomórkową. Domena ta ma największe rozmiary, przejawiając przy tym największy stopień zróżnicowania w porównaniu do pozostałych domen syndekanów (stopień podobieństwa domen pozakomórkowych wynosi około 10–20%) [17]. Różnice w obrębie domeny pozakomórkowej wszystkich czterech syndekanów dotyczą zarówno jej wielkości, jak i struktury pierwszorzędowej. Na końcu aminowym wspomnianej domeny znajduje się krótka sekwencja sygnałowa (rys. 2). Kolejną jest domena transmembranowa, po czym – C-końcowa domena wewnątrzkomórkowa. Dwie ostatnie domeny cechują się dużo większą homogennością, o stopniu podobieństwa rzędu 60–70% [5,17].

Białko rdzeniowe syndekanu 1 zbudowane jest z 310 reszt aminokwasowych. W obrębie domeny pozakomórkowej znajduje się pięć miejsc wiążących łańcuchy glikozoaminoglikanowe, w pozycjach reszty serylowej: 37, 45, 47, 206, 216 (rys. 2) [42]. W pierwszych trzech wymienionych pozycjach reszt seryny, przyłączają się łańcuchy heparanosiarczanowe, zaś w dwóch pozostałych – łańcuchy chon-



RYSUNEK 2. Schemat struktury syndekanów

droitynosiarczanowe. Domena transmembranowa syndekanu 1 – o wybitnie hydrofobowym charakterze – złożona jest z 25 reszt aminokwasowych. C-końcowa domena wewnątrzkomórkowa, składa się z 25 reszt aminokwasowych. W obrębie dwóch ostatnich domen usytuowane są cztery konserwatywne reszty tyrozyny. Pierwsza z nich jest jednocześnie ostatnią resztą aminokwasową domeny transmembranowej, natomiast pozostałe trzy, znajdują się w obszarze domeny wewnątrzkomórkowej [30]. Cecha ta jest uniwersalna dla białek rdzeniowych wszystkich syndekanów [5,6,34].

Syndekan 2 (fibroglikan) ma najmniejsze białko rdzeniowe spośród wszystkich syndekanów, złożone bowiem z 201 reszt aminokwasowych. Do białka tego przyłączone są w pozycjach seryny: 51, 60 i 68 łańcuchy heparanosiarczanowe. Miejsce



przyłączenia czwartego łańcucha heparanosiarczanu nie jest określone. Domeny - transmembranowa i cytoplazmatyczna utworzone są kolejno z 24 i 33 reszt aminokwasowych (rys. 2) [43,49].

Syndekan 3 (N-syndekan) jest największym z PG omawianej grupy. Ma bowiem białko rdzeniowe o największej masie, jak i największą ilość przyłączonych łańcuchów GAG. Składnik białkowy utworzony jest z 443 reszt aminokwasowych. Cechą odróżniającą syndekan 3 od pozostałych PG tej grupy jest również obecność w jego domenie pozakomórkowej dużego, złożonego z około 200 reszt aminokwasowych obszaru bogatego w reszty treoniny, seryny i proliny. Obszar ów nazwano domeną mucynopodobną (rys. 2). W obrębie powyższej struktury nie występują sekwencje zdolne do przyłączenia łańcuchów GAG. Łańcuchy glikozoaminoglikanowe, występujące jednak w pozostałych obszarach domeny pozakomórkowej, wiążą się z nią – podobnie jak w przypadku innych syndekanów – przez reszty seryny. N-syndekan wiąże aż osiem łańcuchów GAG, z czego 5 w obszarze N-końca domeny pozakomórkowej – w pozycjach 62,78, 80, 82, 88 reszt serylowych oraz 3 łańcuchy GAG – w obrębie C-końca tej domeny – w pozycjach 311, 315, 367 [10]. Pięć pierwszych łańcuchów GAG to heparanosiarczany, natomiast pozostałe trzy – to łańcuchy chondroitynosiarczanowe. Domena transmembranowa – podobnie jak w przypadku syndekanu 1 o silnie hydrofobowym charakterze – oraz domena cytoplazmatyczna, zbudowane są z kolejno z 24 i 34 reszt aminokwasowych [10].

Syndekan 4 (amfiglikan, ryudokan), utworzony jest z 202 reszt aminokwasowych. PG ten wiąże – przez reszty seryny – łańcuchy heparanosiarczanowe, w pozycjach 38, 65, 67 i 91 białka rdzeniowego. Domena transmembranowa składa się z 25 reszt aminokwasowych, natomiast domena wewnątrzkomórkowa – z 28 reszt, przy czym ostatnia z wymienionych odbiega nieco wielkością od pozostałych domen innych przedstawicieli rodziny syndekanów [2,18].

## IV. FUNKCJE SYNDEKANÓW

### 1. Syndekany w embriogenezie

Ekspresja genów poszczególnych syndekanów jest zmienna i początkowo (w okresie wczesnej embriogenezy) zależy od stopnia zróżnicowania komórek, a następnie (w okresie kształtowania się narządów) – od tkanki, w jakiej dany syndekan występuje. Wskazuje się przy tym, że obecność syndekanu wpływa na prawidłowy przebieg morfogenezy [45,52]. Wniosek ten wysunięto na podstawie badań embrionów mysich obarczonych mutacjami, obejmującymi geny syndekanów. W większości przypadków mutacje te były dla embrionów letalne [53].

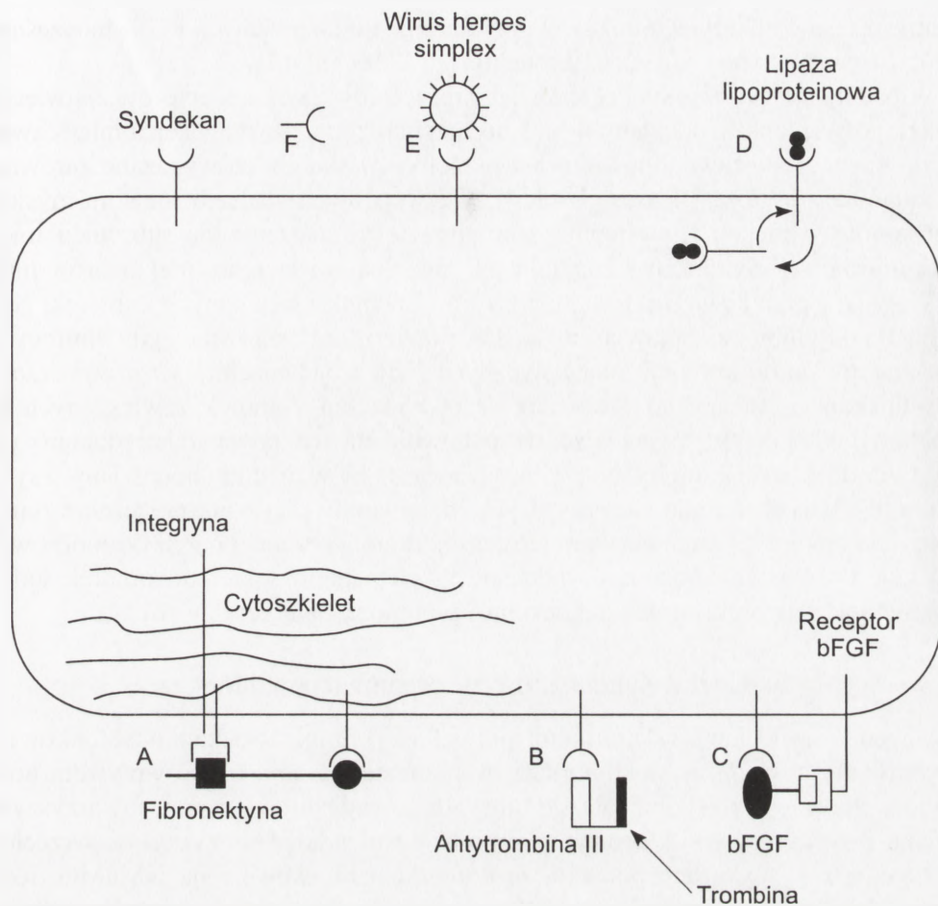
Analiza mysich embrionów wykazała obecność syndekanu 1 w stadium czterokomórkowym, co sugeruje, że już powstanie zygoty aktywuje ekspresję wymienionego PG [6]. W stadium tym syndekan 1 znajduje się jednak wewnątrz komórki,

natomiast dopiero w stadium 8 komórek – umiejscawia się w błonie komórkowej, choć poza miejscem styku komórek. W późniejszym stadium rozwoju embrionalnego – od 16 do 32 komórek, syndekan zaczyna pojawiać się na błonach komórkowych, w obrębie styku blastomerów, umożliwiając tym samym oddziaływanie komórka - komórka. Następnie, omawiany PG umiejscawia się równomiernie w błonach komórkowych wszystkich komórek zarodka. W przebiegu dalszego rozwoju zarodka, syndekan 1 wiąże pierwotną ektodermę z pierwotną endodermą oraz wpływa na kumulację substancji międzykomórkowej w zarodku [6]. Na tym etapie rozwoju, wspomniany PG wytwarzany jest przez pierwotną ektodermę, natomiast nie przez pierwotną endodermę [6,58]. Następnie, syndekan 1 umiejscawia się na podstawno-bocznej powierzchni komórek ektodermalnych, na całej powierzchni komórek endodermy oraz na niezróżnicowanych komórkach mezodermy, pochodzących ze struny grzbietowej [6]. U starszych embrionów, syndekan 1 czasowo produkowany jest przez presomitową mezodermę oraz przez dojrzałe somity. Z kolei, omawiany PG produkowany jest przez całą mezenchymę pozaembrionalną, a następnie powstaje także w komórkach olbrzymich trofoblastu [6].

## 2. Syndekany jako receptory i koreceptory

Cząsteczki macierzy pozakomórkowej łączą się z domeną pozakomórkową syndekanów, głównie poprzez łańcuchy GAG [52,61]. Ligandy dla wspomnianych łańcuchów należą do kilku grup związków, wśród których wyróżnia się cytokiny, cząsteczki substancji międzykomórkowej, enzymy, inhibitory proteaz [16]. Syndekany są także receptorami dla niektórych wirusów, np. wirusa *Herpes simplex* czy HIV (rys. 3) [6,14]. Syndekany cechuje pewien uniwersalizm biochemiczny, dotyczący ich oddziaływań z innymi cząsteczkami, co oznacza, że omawiane PG mogą łączyć się z tymi samymi cząsteczkami. Z kolei, każdy z syndekanów może wykazywać specyficzne powinowactwo do makrocząsteczek, z którymi inni przedstawiciele tej grupy PG nie oddziałują [54].

Syndekan 1 wiąże – przez łańcuchy HS – wiele składników macierzy pozakomórkowej, do których należą kolagen typu I, III, V, fibronektyna, trombospondyna czy tenascyna [6,25,35,40,41,54,56]. Wiązanie to, niezależne od  $\text{Ca}^{+2}$  i  $\text{Mg}^{+2}$ , zanika po zadziałaniu na komórki trypsyną, co różni ten rodzaj oddziaływania z substancją międzykomórkową od oddziaływania (wiązania) przez integryny – heterodimeryczne regulatory białkowe [1]. Wszyscy natomiast przedstawiciele grupy syndekanów nie wiążą się ani z kolagenem typu IV, ani – z wyjątkiem syndekanu 3 – z lamininą [52]. Stwierdzono także, iż syndekan 3 łączy się z kolagenem – choć nie sprecyzowano dotąd z jakim jego typem, fibronektyną, FGF-2 oraz czasowo – z FGF-1. Rola syndekanu 3 jako koreceptora, dla receptora FGF-1, ograniczona jest tylko do okresu rozwoju organizmu [15,24]. Syndekan 3 oddziałuje także z plejotropiną (HB-GAM, ang. *heparin-binding growth-associated molecule*), czą-



**RYSUNEK 3.** Niektóre funkcje syndekanów jako receptorów i koreceptorów błon komórkowych (wg [36], zmodyfikowana): A – wiązanie integryny do błony komórkowej za pośrednictwem domeny RGD fibronektyny oraz łańcuchów HS syndekanu 1; B – połączenie antytrombiny III z syndekaniem 1 lub 4, umożliwiające następnie tworzenie się czwartorzędowych kompleksów syndekanu z trombiną, której aktywność proteolityczna jest wówczas hamowana; C – przyłączenie bFGF do błony komórkowej za pośrednictwem syndekanu 1 oraz FGF-R mającego aktywność kinazy tyrozynowej; D – połączenie lipazy lipoproteinowej z syndekanami, prowadzące do kotwiczenia się enzymu w śródbłonku, w przypadku obniżenia się stężenia substratu dla lipazy, kompleks lipaza-syndekany przemieszcza się do wnętrza komórki, nie podlegając w niej degradacji, z kolei, wzrost stężenia substratu powoduje powrót wspomnianego kompleksu na powierzchnię komórki; E – połączenie wirusa *Herpes simplex* poprzez białka gC i gB z syndekanami, prowadzące do internalizacji wirusa, drogą tą może wnikać do komórki wiele innych wirusów, np. wirus HIV; F – odłączenie części syndekanu od błony komórkowej, po zadziałaniu proteazy w miejscu wrażliwym na działanie proteaz (miejsce to przedstawiono na rys. 1)

steczką regulującą wzrost neuronów [4,24,38]. Jak wcześniej wspomniano, w syndekanie 1 oraz syndekanie 3 znajdują się po dwa skupiska miejsc wiążących GAG, zlokalizowane na przeciwległych biegunach domeny pozakomórkowej (rys. 2). Takie

rozmieszczenie glikanów umożliwia przyłączenie do omawianych PG jednocześnie dwóch ligandów, np. FGF-2 i fibronektyny [37,50,51].

W badaniach nad rolą syndekanów jako receptorów czy koreceptorów, najwięcej uwagi poświęcono syndekaniu 1. I tak, stwierdzono, iż syndekan umiejscawia się na boczno-podstawnej powierzchni nabłonka płaskiego, co wykazano zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo* [54]. We wczesnych stadiach rozwoju mysich embrionów syndekan 1 występuje w miejscach gromadzenia się substancji międzykomórkowej. Syndekan 1 znajduje się także na powierzchni prekursorów limfocytów w szpiku kostnym. Uwalniany z powierzchni wspomnianych komórek, gdy trafią do krwiobiegu, pojawia się na ich powierzchni ponownie, gdy limfocyty B różnicują się do komórek plazmatycznych [53]. W badaniach *in vitro* wykazano, iż syndekan 1 jest szybko „zrzucany” z powierzchni komórek zawieszonych w medium hodowlanym, pojawiając się ponownie na ich powierzchni dopiero po przytwierdzeniu się komórek do podłoża. Zawieszony w medium hodowlanym syndekan 1 łatwo ekstrahuje się przy użyciu detergentów, lecz już połączenie omawianych komórek z przeciwciałami lub cząsteczkami substancji międzykomórkowej indukuje wytworzenie połączeń syndekanu 1 z elementami szkieletu komórek, uniemożliwiając „wyflukiwanie” syndekanu za pomocą detergentów [6].

### 3. Udział syndekanów w organizacji nabłonka

Obecność syndekanów determinuje prawidłową organizację tkanki nabłonkowej. Stwierdzono bowiem, iż w komórkach wspomnianej tkanki – pod wpływem hormonów steroidowych – obniżała się biosynteza syndekanów, czemu towarzyszyła zmiana przestrzennego układu tych komórek z układu płaszczyzny we wrzecionowaty [6,62]. Wykazano ponadto, że komórki nabłonkowe typu NMuMG, różnicujące się w wyniku mutacji w dwie formy morfologiczne, syntetyzowały wadliwy syndekan. I tak, klony komórek zawierających więcej niż 55% wadliwego syndekanu 1 rosły jako wyspy blisko przylegających komórek, podczas gdy klony wykazujące więcej niż 90% wadliwego syndekanu 1 rosły jako indywidualne komórki wrzecionowate, zachodzące na siebie. Pierwsze z wymienionych rosną na żelach kolagenowych w postaci płaszczyzny, zaś drugie – wrzecionowate – tracą nabłonkowopodobną organizację. Ponadto, komórki wrzecionowate wykazują znaczny spadek ekspresji E-kadheryny [6]. Mutacje genetyczne więc, prowadząc do upośledzenia biosyntezy syndekanu 1 powodują jednocześnie zmianę kształtu komórki, związaną z utratą receptorów macierzy (syndekanów) [22]. Syndekan może ponadto tworzyć kompleksy zarówno ze szkieletem komórkowym, jak i cząsteczkami odpowiedzialnymi za adhezję komórek [47]. Kompleksy takie umożliwiają – przez odpowiednią ich lokalizację – pełnienie przez syndekan funkcji receptora substancji międzykomórkowej (na podstawnej części komórki nabłonkowej), jak i funkcji adhezyjnej w punktach przylegania komórek [6]. Dodatkowym dowodem przemawiającym

za udziałem syndekanu 1 w utrzymaniu organizacji nabłonka jest rola omawianego PG w nabłonkowo-mezenchymalnej transformacji opisanej u embrionów gryzoni, a spowodowanej spadkiem zawartości syndekanu w badanych komórkach [22].

#### 4. Funkcje domeny cytoplazmatycznej

Najbardziej konserwatywną częścią białka rdzeniowego syndekanów jest domena wewnątrzkomórkowa. Wysoki stopień konserwatywności tej domeny sugerować może, iż pełni ona ważne funkcje w komórce [9]. Najwięcej badań dotyczących funkcji omawianej domeny skupiło się wokół jej roli w budowaniu i organizacji szkieletu komórkowego oraz przekazu sygnału [9,12,44,48]. Wykazano bowiem zjawisko łączenia się i asocjacji domeny cytoplazmatycznej syndekanu z włóknami aktyny. Proces ten jest przemijający i ulega zakończeniu z chwilą uformowania się dojrzałych wiązek aktynowych [9]. Poparciem tezy o wpływie syndekanu na organizację cytoszkieletu były badania *in vitro*, które wykazały, iż związanie syndekanów przeciwciałami hamowało nie tylko ich interakcję z licznymi makrocząsteczkami podłoża hodowlanego, lecz także prowadziło do znacznej rozbudowy sieci mikrofilamentowej komórek [9]. Konsekwencją oddziaływania domeny cytoplazmatycznej z cytoszkieletem jest często zmiana kształtu komórki. Wykazano, że zmiany ilości i rozmieszczenia syndekanów w błonie komórkowej prowadzą do przebudowy struktury cytoszkieletu. Syndekany, które nie mają domeny wewnątrzkomórkowej, jej części, czy też gdy występują w tej domenie mutacje, nie są zdolne do oddziaływania z włóknami aktyny [12,44].

Badania nad rolą syndekanów w przekazie sygnału do wnętrza komórki wykazały z kolei, iż część domeny wewnątrzkomórkowej omawianych PG ma budowę kinazy, której aktywacja prowadzi do autofosforylacji tyrozyn, po czym aktywacji samego receptora [3,9,48]. Obok wymienionych funkcji domena cytoplazmatyczna prawdopodobnie pełni szereg innych funkcji biologicznych [9,12,44].

### PIŚMIENNICTWO

- [1] ALBEDA SM, BUCK CA. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J* 1990; **4**: 2868–2880.
- [2] BACIU PC, ACASTER C, GOETINCK PF. Molecular cloning and organization of chicken syndecan-4. *J Biol Chem* 1994; **269**: 696–703.
- [3] BACIU PC, GOETINCK PF. Protein kinase C regulates the recruitment of syndecan-4 into focal contact. *Molec Biol Cell* 1995; **6**: 1503–1513.
- [4] BERNFIELD M. Introduction to Ciba Foundation Symposium. In basement membranes and cell movement: Ciba Foundation Symposium. Porter R, Whelan J (red) London: Pitman 1984; **108**: 1–5.
- [5] BERNFIELD M, HINKES MT, GALLO RL. Developmental expression of the syndecans: possible function and regulation. *Development* 1993; Suppl: 205–212.

- [6] BERNFIELD M, KOKENYESI R, KATO M, HINKES MT, SPRING J, GALLO RL, LOSE EJ. Biology of syndecans: A family of transmembrane heparan sulphate proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol* 1992; **8**: 365–393.
- [7] BOBIŃSKI R, OLCZYK K, KRZYŻOWSKA-BOBIŃSKA E. Male proteoglikany śródmiaższowe – genetyczne różnice i podobieństwa. *Post Biochem* 1998; **44**(1): 64–71.
- [8] BOBIŃSKI R, OLCZYK K, KRZYŻOWSKA-BOBIŃSKA E. Proteoglikany agregujące z kwasem hialuronowym. *Post Biochem* 1998; **44**(3): 245–251.
- [9] CAREY DJ. N-Syndecan: structure and function of a transmembrane proteoglycan. *Perspect Develop Neurobiol* 1996; **03**: 331–346.
- [10] CAREY DJ, CONNER K, ASUNDI VK, OMAHONY DJ, STAHL RC, SHOWALTER L, CIZMECI-SMITH G, HARTMAN J, ROTHBLUM LI. cDNA cloning, genomic organization, and *in vivo* expression rat N-syndecan. *J Biol Chem* 1997; **272**: 2873–2879.
- [11] CAREY DJ, EVANS DM, STAHL RC, ASUNDI VK, CONNER KJ, GARBES P, CIZMECI-SMITH G. Molecular cloning and characterization of N-syndecan, a novel transmembrane heparan sulphate proteoglycan. *J Cell Biol* 1992; **117**: 191–201.
- [12] CAREY DJ, STAHL RC, TUCKER B, BENDT KA, CIZMECI-SMITH G. Aggregation-induced association of syndecan-1 with microfilaments mediated by the cytoplasmic domain. *Exp Cell Res* 1994; **214**: 12–21.
- [13] CHANDRASEKHARAN L, TANZER ML. Molecular cloning of chicken aggrecan. *Biochem J* 1992; **288**: 903–910.
- [14] CHANG HC, SAMANIEGO F, NAIR BC, BOUNAGURO L, ENSOLI B. HIV-1 tat protein exist from cells via a leaderless secretory pathway and binds to extracellular matrix-associated heparan sulfate proteoglycans through its basic region. *AIDS* 1997; **11**: 1421–1431.
- [15] CHERNOUSOV MA, CAREY DJ. N-syndecan (syndecan 3) from neonatal rat brain binds basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem* 1993; **268**: 16810–16814.
- [16] COUCHMAN JR, WOODS A. Syndecans, signaling, and cell adhesion. *J Cell Biol* 1996; **61**: 578–584.
- [17] DAVID G. Integral membrane heparan sulfate proteoglycans. *FASEB J* 1993; **7**: 1023–1030.
- [18] DAVID G, VANDEN SCHUEREN B, MARYNEN P, CASSIMAN J-J, VANDEN BERGHE H. Molecular cloning of amphiglycan, a novel integral membrane heparan sulfate proteoglycan expressed by epithelial and fibroblastic cells. *J Cell Biol* 1992; **118**: 961–969.
- [19] DODGE GR, BOESLER EW, JIMENEZ SA. Expression of the basement membrane heparan sulfate proteoglycan (perlecan) in human synovium and in cultured human synovial cells. *Lab Invest* 1995; **73**: 649–657.
- [20] ESKO JD. Genetic analysis of proteoglycan structure, function and metabolism. *Curr Opin Cell Biol* 1991; **3**: 805–816.
- [21] FRANSSON LA. Structure and function of cell-associated proteoglycans. *TIBS* 1987; **12**: 406–411.
- [22] FITCHETT JE, MCALMON KR, HAY ED, BERNFIELD M. Epithelial cells lose syndecan prior epithelial-mesenchymal transformation in the developing rat palate. *J Cell Biol* 1990; **111**: 145a.
- [23] GŁOWACKI A, KOŹMA EM, OLCZYK K, KUCHARZ EJ. Glikozaaminoglikany – struktura i funkcja. *Post Biochem* 1995; **41**: 139–148.
- [24] GOULD SE, UPHOLT WB, KOSHER RA. Syndecan-3: a new member of the syndecan family of membrane-intercalated proteoglycans that is expressed in high amount at the onset of chick limb cartilage differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 3271–3275.
- [25] GRESSNER AM. Mediators of hepatic fibrogenesis. *Hepato-Gastroenterol* 1996; **43**: 92–103.
- [26] GROVER J, ROUGHLEY PI. Versican gene expression in human articular cartilage and comparison mRNA splicing variation with aggrecan. *Biochem J* 1993; **291**: 361–367.
- [27] HARDINGHAM TE, FOSANG AJ. Proteoglycans: many form and many functions. *FASEB J* 1992; **6**: 861–870.

- [28] HINKES MT, GOLDBERGER OA, NEUMANN PE, KOKENYESI R, BERNFIELD M. Murine gene structure suggests that syndecan belongs to an evolutionary distinct class of proteoglycan *J Biol Chem* 1993; **268**: 11440–11448.
- [29] IOZZO RV, COHEN IR, GRASSEL S, MURDOCH AD. The biology of perlecan: the multifaceted heparan sulphate proteoglycan of basement membranes and pericellular matrices. *Biochem J* 1994; **302**: 625–639.
- [30] IOZZO RV, MURDOCH AD. Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB J* 1996; **10**: 598–614.
- [31] KATO M, SAUNDERS S, NGUYEN H, BERNFIELD M. Loss of cell surface syndecan-1 causes epithelia to transform into anchorage-independent mesenchyme-like cells. *Molec Biol Cell* 1995; **6**: 559–576.
- [32] KIMURA F, SUZU S, NAKAMURA Y, WAKIMOTO N, KANATANI Y, YANAI Y, NAGATA N, MOTOYOSHI K. Syndecans, signaling, and cell adhesion *J Biol Chem* 1994; **269**: 19751–19756.
- [33] KJELLEN L, LINDAHL U. Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem* 1991; **60**: 443–475.
- [34] KOKENYESI R, BERFIELD M. Core protein structure and sequence determine the site and presence of heparan sulfate and chondroitin sulfate on syndecan-1. *J Biol Chem* 1994; **269**: 12304–12309.
- [35] KOVALSZKY I, NAGY P, SZENDE B, LAPIS K, SZALAY F, JENEY A, SCHAFF Z. Experimental and human liver fibrogenesis. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1998; **228**: 51–55.
- [36] KOŽMA EM, GŁOWACKI A, OLCZYK K, JAŻWIEC M. Proteoglikany – struktura i funkcje. *Post Biochem* 1997; **43**: 158–172.
- [37] LARRAIN J, CAREY DJ, BRANDAN E. Syndecan-1 expression inhibits myoblast differentiation through a basic fibroblast growth factor-dependent mechanism. *J Biol Chem* 1998; **273**: 32288–32296.
- [38] LAURI SE, KAUKINEN S, KINNUNEN T, YLINEN A, IMAI S, KAILA K, TAIRA T, RAUVALA H. Regulatory role and molecular interactions of a cell-surface heparan sulfate proteoglycan (N-syndecan) in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* 1999; **15**: 1226–1235.
- [39] LI H, SCHWARTZ NB. Gene structure of chick cartilage chondroitin sulfate proteoglycan (aggrecan) core protein. *J Mol Evol* 1995; **41**: 878–885.
- [40] LIU W, LITWACK ED, STANLEY MJ, LANGFORD JK, LANDER AD, SANDERSON RD. Heparan sulfate proteoglycans as adhesive and anti-invasive molecules. *J Biol Chem* 1998; **273**: 22825–22832.
- [41] LIEBERSBACH BF, SANDERSON RD. Expression of syndecan-1 inhibits cell invasion into type I collagen. *J Biol Chem* 1994; **269**: 20013–20019.
- [42] MALI M, JAAKKOLA P, ARVILOMMI A-M, JALKANEN M. Sequence of human syndecans indicates a novel gene family of integral membrane proteoglycans. *J Biol Chem* 1990; **265**: 6884–6889.
- [43] MARYNEN P, ZHANG J, CASSIMAN J-J, VAN DEN BERGHE H, DAVID G. Partial primary structure of the 48- and 90-kilodalton core proteins of cell surface-associated heparan sulfate proteoglycans of lung fibroblasts. *J Biol Chem* 1989; **264**: 7017–7024.
- [44] MIETTINEN HM, JALKANEN M. The cytoplasmic domain of syndecan-1 is not required for association with triton x-100-insoluble material. *J Cell Sci* 1994; **107**: 1571–1581.
- [45] MULHLAUSER J, MARZIONI D, MORRONI M, VUKOVIC M, CRESCIMANNO C, CASTELLUCCI M. Codistribution of basic fibroblast growth factor and heparan sulfate proteoglycans in growth zones of the human placenta. *Cell Tiss Res* 1996; **285**: 101–107.
- [46] NETFIELD JJ, HUBER-BRUNING O, BYLSMA JWJ. Cytokines and proteoglycans. [w] Jolles P [red.] Proteoglycans. Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland 1994: 215–242.

- [47] NUMA F, HIRABAYASHI K, TSUNAGA N, KATO H, OROURKE K, SHAO H, STECHMANN-LEBAKKEN C, VARANI J, RAPRAEGER A, DIXIT VM. Elevated levels of syndecan-1 expression confer potent serum-dependent growth in human 293T cells. *Cancer Res* 1995; **55**: 4676–4680.
- [48] OH ES, WOODS A, COUCHMAN JR. Multimerization of the cytoplasmic domain of syndecan-4 is required for ability to activate protein kinase C. *J Biol Chem* 1997; **272**: 11805–11811.
- [49] PIERCE A, LYON M, HAMPSON IN, COWLING GJ, GALLAGHER JT. Molecular cloning of the major cell surface heparan sulfate proteoglycan from rat liver. *J Biol Chem* 1992; **267**: 3894–3900.
- [50] RAPRAEGER A, JALKANEN M, BERNFIELD M. Integral membrane proteoglycans as matrix receptors: Role in cytoskeleton and matrix assembly at the epithelial cell surface. [w] Wight TN, Mecham RP [red.] In *Biology of extracellular matrix: A series. Biology of proteoglycans*. Orlando Academic 1997; **2**: 129–154.
- [51] ROSKAMS T, DE VOS R, DAVID G, VAN DAMME B, DESMET V. Heparan sulphate proteoglycan in human primary liver tumors. *J Pathol* 1998; **185**: 290–297.
- [52] SALMIVIRTA M, JALKANEN M. Syndecan family of cell surface proteoglycans: developmentally regulated receptors for extracellular effector molecules. *Experientia* 1995; **51**: 863–872.
- [53] SANDERSON RD, SNEED T, YOUNG L, SULIVAN G, LANDER A. Adhesion of B lymphoid (MPC-11) cells to type I collagen is mediated by the integral membrane proteoglycan, syndecan. *J Immunol* 1992; **148**: 3902–3911.
- [54] SAN ANTONIO J, KARNOVSKY MJ, GAY S, SANDERSON RD, LANDER AD. Interactions of syndecan-1 and heparin with human collagens. *Glycobiology* 1994; **4**: 327–332.
- [55] SAUNDERS S, JALKANEN M, OFARRELL S, BERNFIELD M. Molecular cloning of syndecan, an integral membrane proteoglycan. *J Cell Biol* 1989; **108**: 1547–1556.
- [56] SCOTT JE. Proteoglycan – fibrillar collagen interactions. *Biochem J* 1988; **252**: 313–325.
- [57] SPRING J, GOLDBERG OA, JENKINS NA, GILBERT DJ, COPELAND NG, BERNFIELD M. Mapping of syndecan genes in the mouse linkage with members of the *Myc* gene family. *Genomics* 1994; **21**: 597–601.
- [58] SUTHERLAND AE, SANDERSON RD, MAYES M, SEIBERT M, CALARCO PG. Expression of syndecan, a putative low affinity fibroblast growth factor receptor, in the early mouse embryo. *Development* 1991; **113**: 339–351.
- [59] TAKAGI A, KOJIMA T, TSUZUKI S, KATSUMI A, YAMAZAKI T, SUGIURA I, HAMAGUCHI M, SAITO H. Structural organization and promoter activity of the human ryudocan gene. *J Biochem* 1996; **119**: 979–984.
- [60] UMBREIT JN. Proteoglycans and glycosaminoglycans during maturation of the mouse mammary gland. *Anticancer Res* 1996; **16**: 3013–3030.
- [61] WOODS A, OHES, COUCHMAN JR. Syndecan proteoglycans and cell adhesion. *Matrix Biol* 1998; **17**: 477–483.
- [62] YATES J, KING RJ. Correlation of growth properties and morphology with hormone responsiveness of mammary tumor cells in culture. *Cancer Res* 1981; **41**: 258–262.

Redaktor prowadzący – W. Kilariski.

Otrzymano: 17.12.1998 r.

Przyjęto: 12.03.1999 r.

Adres autora: ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec



## ODDZIAŁYWANIA JONÓW $Zn^{2+}$ W ZWIERZĘCYCH KOMÓRKACH NIEPOBUDLIWYCH\*

### ACTION OF $Zn^{2+}$ IONS IN ANIMAL NONEXCITABLE CELLS

Ewa LENARTOWICZ, Grażyna DĘBSKA

Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego, Warszawa

*Streszczenie:* W organizmie zwierzęcym cynk jest ważnym pierwiastkiem śladowym pełniącym liczne funkcje fizjologiczne. Występuje w postaci kationu  $Zn^{2+}$  w przeważającej mierze związanego z białkami. Reakcja cynku z białkami jest zależna od stanu oksydoredukcyjnego glutationu, co stanowi powiązanie homeostazy  $Zn^{2+}$  z metabolizmem energetycznym komórki. Stężenie wolnego  $Zn^{2+}$  w cytoplazmie waha się w granicach  $10^{-12}$ – $10^{-6}$  M, a jego poziom w hepatocytach regulowany jest przez glukagon. W białkach  $Zn^{2+}$  jest ważnym składnikiem strukturalnym, bierze udział w katalizie enzymatycznej i transkrypcji DNA.  $Zn^{2+}$  indukuje metalotioneiny, białka o własnościach detoksyfikacyjnych i antyoksydacyjnych. Wywiera działanie antyoksydacyjne przez hamowanie generacji rodników tlenowych, inhibicję syntazy NO, wypieranie Fe i Cu w błonach i ochronę białkowych grup –SH. Karmienie dietą bezcynkową wywołuje stres oksydacyjny. W mitochondriach nadmiar  $Zn^{2+}$  hamuje łańcuch oddechowy, cykl kwasów trikarboksylowych oraz indukuje otwieranie niespecyficznego megakanatu w błonie wewnętrznej. Wyszukane są sugestie, że zmiany w stężeniu wolnego  $Zn^{2+}$  w komórce pełnią rolę sygnałową.

(*Postępy Biologii Komórki* 1999; 26: 491–506)

*Słowa kluczowe:* cynk, metalotioneiny, enzymy cynkowe, stres oksydacyjny, efekty mitochondrialne.

*Summary:* In animal organism zinc is an important trace element which fulfils many physiological functions. It exists as a divalent cation,  $Zn^{2+}$ , which is mostly bound with proteins. Its interaction with proteins is regulated by the redox state of glutathione and this is a link between the zinc homeostasis and the cellular energetic metabolism. Free cytoplasmic  $Zn^{2+}$  has been found in the concentration range of  $10^{-12}$ – $10^{-6}$  M. In hepatocytes the free  $Zn^{2+}$  level is under the control of glucagon. In proteins  $Zn^{2+}$  is an important structural component, participates in enzymatic catalysis and in DNA transcription.  $Zn^{2+}$  is an inducer of metallothioneins, proteins being a main store of cellular  $Zn^{2+}$ . They are involved in antioxidant defence and detoxification. The antioxidant action of  $Zn^{2+}$  is due to the inhibition of the oxygen radicals generation, the inhibition of nitrogen oxide synthase, displacement of Fe and Cu in

\*Artykuł został sfinansowany przez fundusz statutowy Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego

membranes and protection of -SH groups. Feeding with zinc-deficient diet introduces the oxidative stress. At increased concentration  $Zn^{2+}$  inhibits the mitochondrial respiratory chain and the tricarboxylic acid cycle. Moreover,  $Zn^{2+}$  induces the unspecific megachannel in the inner mitochondrial membrane. Recently, the changes in  $Zn^{2+}$  concentration were suggested to play a signaling role. (*Advances in Cell Biology* 1999; 26: 491–506)

*Key words:* zinc, metallothioneins, zinc enzymes, oxidative stress, mitochondrial effects.

## WSTĘP

Badania ostatnich lat przyniosły znaczny postęp w określeniu wewnątrzkomórkowego stężenia wolnych jonów  $Zn^{2+}$ , co było związane z wynalezieniem przez Zalewskiego sondy fluorescencyjnej reagującej z  $Zn^{2+}$  [68]. Jednocześnie długoletnie badania Vallee [23], Braya [59] i Bettgera [5] doprowadziły do poznania mechanizmów oddziaływania tego jonu w katalizie enzymatycznej, stabilizacji błon i ochronie komórki przed uszkodzeniami oksydacyjnymi.

W ciele człowieka cynk jest jednym z najobficiej występujących pierwiastków śladowych, a zawartość jego sięga 2–3 g [3]. W różnych tkankach zwierząt wyższych cynk występuje w ilości 10–100  $\mu\text{g/g}$  świeżej masy. Najwyższa zawartość tego pierwiastka znajduje się w układzie rozrodczym samców (0,9 i 0,25 mg/g, odpowiednio, prostaty i plemników). Bogate w  $Zn^{2+}$  są również gałki oczne, kości, wątroba (około 40  $\mu\text{g/g}$ ), serce (16  $\mu\text{g/g}$ ), nerki i układ nerwowy [10]. Wśród frakcji subkomórkowych wątroby najwięcej cynku znajduje się w cytozolu i mikrosomach [63]. W mikrosomach  $Zn^{2+}$  wiązany jest przez białka znane z własności wiązania  $Ca^{2+}$ , kalsekwestrynę i kalretikulinę [1,39]. Co więcej, kalsekwestryna, wykazuje wyższe powinowactwo do  $Zn^{2+}$  niż do  $Ca^{2+}$ . W osoczu krwi cynk występuje w stężeniu 15–21  $\mu\text{M}$ , które ulega obniżeniu podczas starzenia.

## WŁASNOŚCI CYNKU WYSTĘPUJĄCEGO W KOMÓRCIE

W materiale biologicznym cynk występuje w postaci kationu, który ma powłokę *d* wypełnioną dziesięcioma elektronami. W związku z tym nie dochodzi do zmian w energii stabilizacji pola przy wiązaniu ligandów [3]. Liczba koordynacyjna dla kationów  $Zn^{2+}$  wynosi najczęściej 4, a zatem przeważnie wytwarzane są związki o konfiguracji tetraedrycznej. Znane są również kompleksy  $Zn^{2+}$  o liczbach koordynacyjnych 5 i 6.

Kation  $Zn^{2+}$  jest stabilny, nie podlega zmianom oksydoredukcyjnym. Odnacza się on małym promieniem, 70 pm, i wysokim stosunkiem ładunku do promienia, co pozwala utrzymać charakter kationowy przy wiązaniach koordynacyjnych [3].

Cynk jest metalem amfoterycznym, może występować w postaci wodzianu i wodorotlenku oraz tworzyć dwa hydroksykompleksy:  $[\text{Zn}(\text{OH})_3]^-$  i  $[\text{Zn}(\text{OH})_4]^{2-}$ . W materiale biologicznym  $\text{Zn}^{2+}$  występuje głównie w kompleksach z białkami. Według klasyfikacji Pearsona określającej własności elektro- i nukleofilowe jonów opartej na teorii znanej jako HSAB (*Hard and Soft Acids and Bases*)  $\text{Zn}^{2+}$  jest „kwasem pośrednim” i dlatego może reagować z ligandami różnego typu: z grupami sulfhydrylowymi reszt cysteinowych, grupami imidazolowymi reszt histydynowych oraz grupami karboksylowymi glutaminianu i asparaginianu oraz tlenem wody. We wszystkich tych miejscach  $\text{Zn}^{2+}$  współzawodniczy z  $\text{H}^+$ . Stabilność kompleksu  $\text{Zn}^{2+}$  z cysteiną jest wyższa niż z histydyną:  $\log K_{\text{st}}$  wynoszą odpowiednio, 9,9 i 6,6 [13]. W konsekwencji wysokiego powinowactwa do cysteiny  $\text{Zn}^{2+}$  jest wiązany również przez zredukowany glutation [8]. W komórkach  $\text{Zn}^{2+}$  wiązany jest ponadto przez niektóre nukleotydy, z których na szczególną uwagę zasługują ADP, ATP i NADPH oraz przez cytrynian [29,36,47]. Silnymi niefizjologicznymi chelatorami  $\text{Zn}^{2+}$  są EDTA i ditiotreitól ( $\log K_{\text{st}}$  tych kompleksów wynoszą odpowiednio, 16,4 i 10,3) [13].

$\text{Zn}^{2+}$  jest kationem hydrofilnym i tylko w znikomym stopniu może dyfundować przez błony biologiczne. Jednak dyfuzja ta jest stymulowana przez utlenienie lipidów błonowych [43]. Przez błony komórkowe  $\text{Zn}^{2+}$  jest przenoszony przez specjalne transportery, których synteza regulowana jest przez zawartość  $\text{Zn}^{2+}$  w diecie [38]. *In vitro* dla przeniesienia  $\text{Zn}^{2+}$  przez błony stosowany jest jonofor 4-Br A23187 [18].

## WYSTĘPOWANIE CYNKU

$\text{Zn}^{2+}$  jest składnikiem ponad 300 enzymów, insuliny, licznych czynników transkrypcyjnych oraz ligandem wielu białek wiążących metale, jak np. metalotioneiny czy kalcyklina [19,31] oraz białek wiążących jedynie  $\text{Zn}^{2+}$ , jak np. wątrobowa paratymozyna [3]. W osoczu  $\text{Zn}^{2+}$  występuje w kompleksach z albuminą i  $\gamma$ -2-makroglobuliną, natomiast w erytrocytach znajduje się głównie w anhidrazie węglanowej.

W wątrobie cynk stanowi 0,1% suchej masy. Brand i Klaineke [9] zauważyli, że całkowita zawartość  $\text{Zn}^{2+}$  w szczurzych hepatocytach, 0,26  $\mu\text{mol/g}$  świeżej masy wzrasta o 60% pod wpływem głodzenia zwierząt przez 1 dobę. Pomiar cytozolowego wolnego  $\text{Zn}^{2+}$  w tych komórkach przy zastosowaniu sondy fluorescencyjnej cynkiny (*zincquin*) wykazały stężenie 1,26  $\mu\text{M}$ , o kilka rzędów wyższe od stężeń pM-nM wykrywanych poprzednio w różnych komórkach przy użyciu absorpcji atomowej i techniką NMR [2,19]. Jednocześnie zaobserwowano, że poziom wolnego  $\text{Zn}^{2+}$

drastycznie spada pod wpływem glukagonu i cAMP: o 75% w ciągu 10 min po dodaniu 1  $\mu\text{M}$  glukagonu lub 0,1 mM 8-bromo-cAMP do medium [9].

Z krwi  $\text{Zn}^{2+}$  jest pobierany głównie przez wątrobę [15,41]. Hepatocyty pobierają  $\text{Zn}^{2+}$  z  $K_{0/5} = 10 \mu\text{M}$  i  $V_{\text{max}} = 10 \text{ pmoli/mg białka/min}$  [41]. Transport ten wydaje się być zależny od energii, ponieważ jest hamowany przez cyjanek, azydek i odczynniki reagujące z grupami -SH [15]. Z wątroby  $\text{Zn}^{2+}$  jest wydalany do żółci i trafia do jelit. Część  $\text{Zn}^{2+}$  zawartego we krwi jest wydalana z moczem.

Badania na hepatocytach ładowanych  $^{65}\text{Zn}$  wykazały 2 pule wewnątrzkomórkowego  $\text{Zn}^{2+}$ :

1) szybkowymienialną, wzrastającą ze wzrostem stężenia  $\text{Zn}^{2+}$  na zewnątrz komórek,

2) wolnowymienialną zależną od uprzedniego traktowania komórek cynkiem i glukokortykoidami [58]. Hepatocyty po naładowaniu  $\text{Zn}^{2+}$  traciły aż do 60% izotopu w ciągu 2 min. Również *in vivo* w wątrobie  $\text{Zn}^{2+}$  ulega szybkiej cyklizacji: cała jego zawartość jest wymieniana w czasie 30 godzin. Wymiana ta jest stymulowana przez glukokortykoidy [58].

Nadmiar  $\text{Zn}^{2+}$  powoduje znaczne zmiany w metabolizmie węglowodanów przez hamowanie działania glukagonu [9]. Badania na hepatocytach wykazały, że w obecności  $\text{Zn}^{2+}$  nie dochodzi do zahamowania przez glukagon lub pochodne cAMP kinazy pirogronianowej i fosfofruktokinazy. W rezultacie proces glikolizy ulegał odpowiednio 2- i 9-krotnej stymulacji w nieobecności i obecności glukagonu (tab. 1), co było związane z osłabieniem glukoneogenezy. Jednocześnie  $\text{Zn}^{2+}$  stymulował rozpad glikogenu przez konwersję fosforylasy do aktywnej formy "a".

TABELA 1. Wpływ  $\text{Zn}^{2+}$  na szybkość glikolizy w hepatocytach

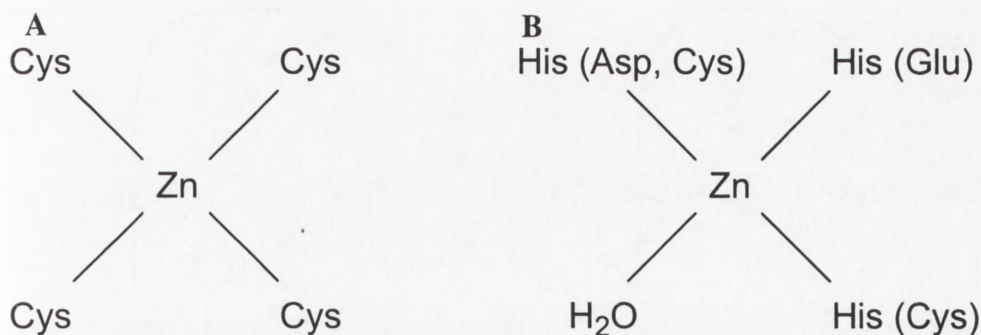
$\text{Zn}^{2+}$	Produkcja mleczanu ( $\mu\text{mol/g}$ św. masy/godz.)	
	Norma	Glukagon ( $10^{-7}$ M)
0	16	3
$10^{-4}\text{M}$	32	28

Dane wg Branda i Kleineke [9]

## KOMPLEKSY $\text{Zn}^{2+}$ Z BIAŁKAMI

### A. Wiadomości ogólne

$\text{Zn}^{2+}$  wiążąc się z białkami stabilizuje ich strukturę, bierze udział w katalizie enzymatycznej, ekspresji genów, procesach transportu i w oddziaływaniach immunologicznych [3]. W wielu białkach  $\text{Zn}^{2+}$  stanowi ważny element strukturalny, który stabilizuje pofałdowaną konformację umożliwiającą interakcję między białkami i innymi makrocząsteczkami, np. DNA. W większości enzymów cynkowych jony



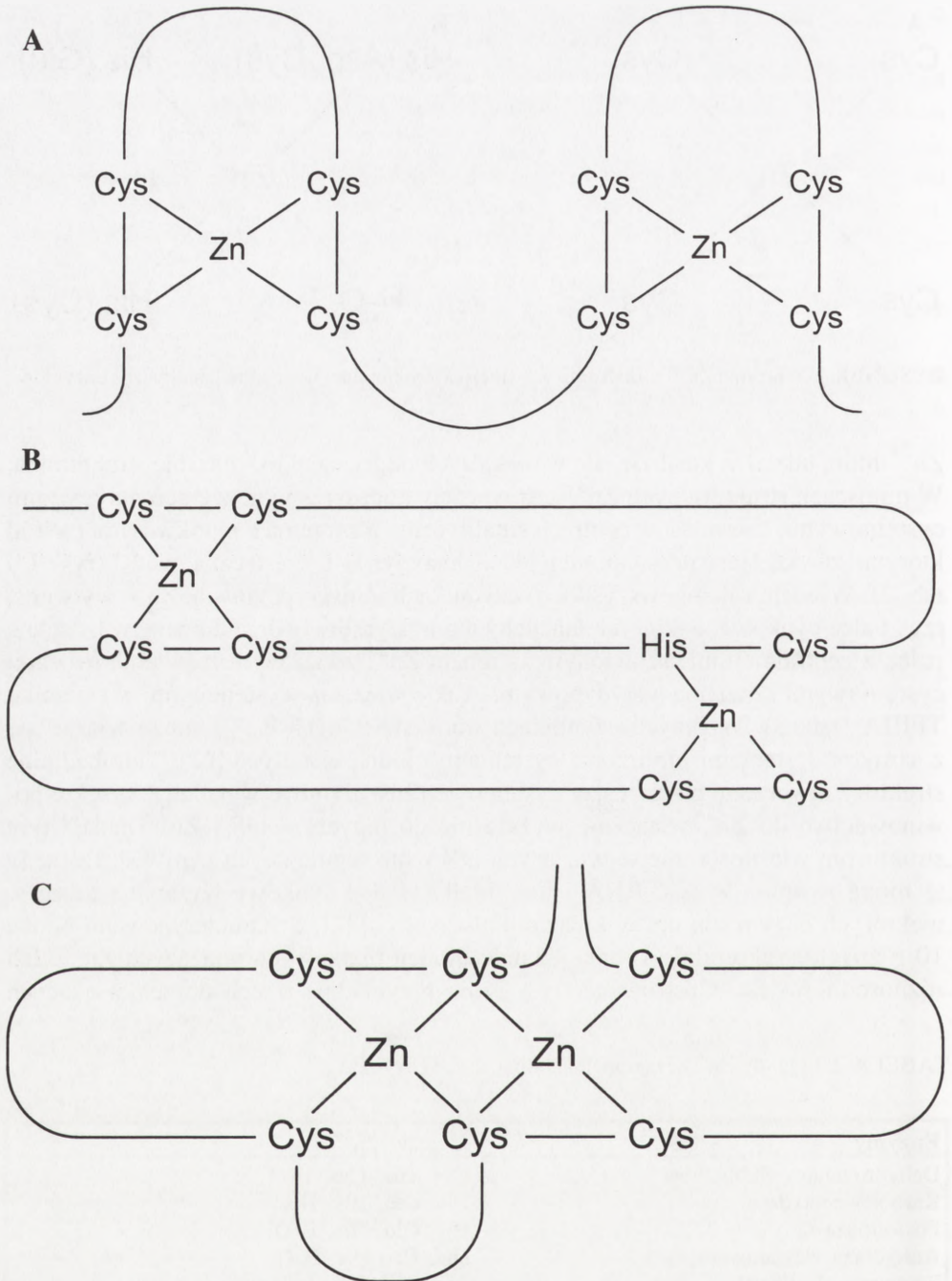
RYSUNEK 1. Wiązanie Zn<sup>2+</sup> z białkami: A – miejsca strukturalne, B – centra katalityczne enzymów

Zn<sup>2+</sup> biorą udział w katalizie, ale w niektórych odgrywają jedynie rolę strukturalną. W miejscach strukturalnych Zn<sup>2+</sup> jest wiązany koordynacyjnie z czterema resztami cysteinowymi, natomiast w centrach katalitycznych z trzema aminokwasami (wśród których zawsze jest przynajmniej jedna histydyna) i cząsteczką wody (rys. 1 i tab. 2). W wielu (ale nie wszystkich) czynnikach transkrypcyjnych, Zn<sup>2+</sup> wytwarza tzw. palce cynkowe, w których łańcuchy aminokwasów tworzą domenę w kształcie palca z centralnie umiejscowionym kationem Zn<sup>2+</sup> związanym z dwiema resztami cysteinowymi i dwiema histydynowymi. Takie wiązania występują np. w czynniku TFIIIA (tab. 3). W innych czynnikach transkrypcyjnych Zn<sup>2+</sup> może wiązać się z samymi cysteinami lub trzema cysteinami i jedną histydyną [62]. Tetrahedralne struktury utworzone przez reszty cysteinowe i histydynowe wykazują wysokie powinowactwo do Zn<sup>2+</sup>, znacznie wyższe niż do innych metali i Zn<sup>2+</sup> nadaje tym strukturom własności miejsc wiążących DNA lub regulujących geny [3]. Domeny te mogą również wiązać RNA i inne białka. Palce cynkowe występują także w niektórych enzymach, np. w kinazie białkowej C [42]. Scharakteryzowano ponad 10 różnych strukturalnie i funkcjonalnie domen białkowych wiążących Zn<sup>2+</sup>. Ich różnorodność jest zilustrowana (rys. 2) na przykładzie trzech domen wiążących

TABELA 2. Ligandy Zn<sup>2+</sup> w centrach katalitycznych enzymów

Enzymy	Ligandy Zn <sup>2+</sup>
Dehydrogenaza alkoholowa	Cys, His, Cys, H <sub>2</sub> O
Karboksypeptydaza	His, Glu, His, H <sub>2</sub> O
Fosfolipaza C	His, Glu, His, H <sub>2</sub> O
Anhidraza węglanowa	His, His, His, H <sub>2</sub> O
Fosfataza alkaliczna	Asp, His, His, H <sub>2</sub> O

Dane wg Vallee i in. [62]



RYSUNEK 2. Różne typy wiązania  $Zn^{2+}$  w białkach transkrypcyjnych (schemat na podstawie danych Berga i Shi [3]): A – receptor steroidowy, B – domena palców RING, C – domena czynnika GAL4

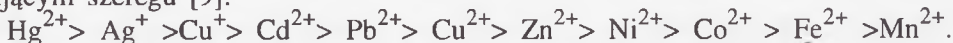
TABELA 3. Ligandy  $Zn^{2+}$  w białkach transkrypcyjnych

Białko	M.cz. $\times 10^{-3}$ (mol/mol białka)	$Zn^{2+}$	Ligandy
TF III A	40	2	4 Cys + 4 His
Receptor glutaminowy	19	2	9 Cys + 1 His
GAL4	17	2	6 Cys
g32P	35	1	3 Cys + 1 His

Dane wg Vallee i in. [62]

dwa kationy  $Zn^{2+}$  [3]. Białka mające domeny cynkowe po usunięciu  $Zn^{2+}$  ulegają rozpadowi.

Kompleksy  $Zn^{2+}$  z białkami są ogromnie czułe na wzrost pH, gdyż pK grup -SH, imidazolowych i karboksylowych wynosi odpowiednio, 8,5, 6,5 i 4,4 (dla grup końcowych 3,1). Z kompleksów tych  $Zn^{2+}$  może być wyparty przez niektóre inne metale, ponieważ trwałość kompleksów metali z białkami maleje w następującym szeregu [9]:



Z czynników transkrypcyjnych, jak również z wielu innych białek  $Zn^{2+}$  może być uwolniony przez czynniki utleniające i nitrozujące grupy -SH. W konsekwencji, podczas stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego w komórce wzrasta poziom jonów  $Zn^{2+}$ . Rozerwanie wiązań cynkowo-siarkowych jest uważane za jeden z głównych elementów patologii związanej ze stresem oksydacyjnym i nitrozacyjnym w komórce [3].

## B. Metalotioneiny

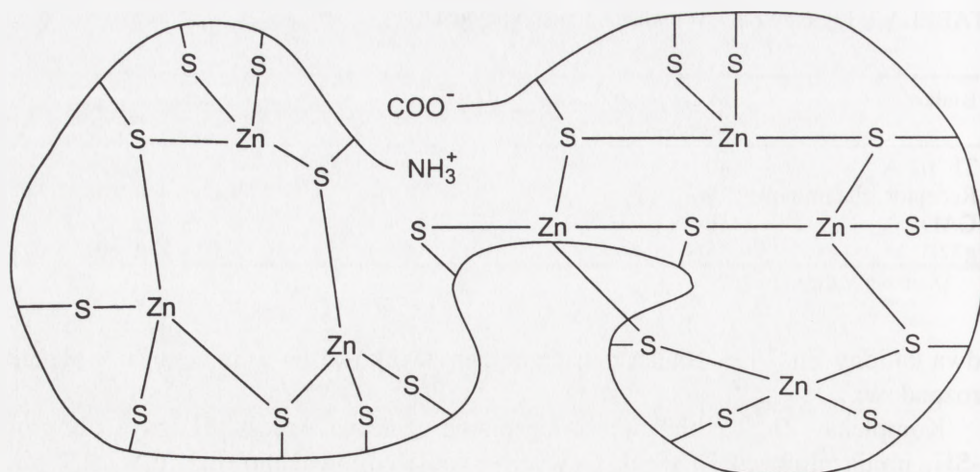
Jedną z ważnych funkcji  $Zn^{2+}$  jest indukcja metalotionein [19]. Są to małe białka o masie 6,7 kDa, złożone z 60 aminokwasów, wśród których 20 stanowią cysteiny. Zawierają one 7 mol  $Zn^{2+}$ /mol białka, tworzącego charakterystyczne dwie domeny, trój- i czterocynkową (rys. 3). Wprawdzie powinowactwo metalotionein do niektórych innych metali jest wyższe niż do  $Zn^{2+}$ , np. do  $Cd^{2+}$   $10^4$  a do  $Pb^{2+}$   $10^2$  razy, jednak w warunkach fizjologicznych wiązany jest niemal wyłącznie  $Zn^{2+}$ , który w rzadkich przypadkach jest zastępowany przez  $Cu^{2+}$  lub  $Cd^{2+}$ . Wiązanie  $Zn^{2+}$  do tionein zależy od dysocjacji grup -SH (pK 8,5) i w związku z tym zależy od pH, co jest zgodne z reakcją [64]:



Kompleksy  $Zn^{2+}$  z tioneinami są termodynamicznie stabilne



ale kinetycznie labilne: wiązania z  $Zn^{2+}$  są stale rozrywane i odtwarzane, z szybkością  $10^3/s$ . Labilność ta wynika ze zmian w stanie oksydo-redukcyjnym atomów siarki.



RYSUNEK 3. Wiązanie  $\text{Zn}^{2+}$  w metalotioneinie schemat na podstawie danych Fishera i Davie [19]

W metalotioneinach kationy  $\text{Zn}^{2+}$  są skoordynowane z anionami tiolanowymi  $\text{S}^-$ , które mogą nawet w tych warunkach ulegać utlenieniu. Potencjał oksydoredukcyjny metalotionein pozwala na utlenienie anionów tiolanowych przez wiele fizjologicznych oksydantów, takich jak np. disulfidy, związki selenu i reaktywne formy tlenu [32,37]. GSSG tworzy z  $\text{Zn}^{2+}$  kompleks z  $K_d$   $5,9 \times 10^{-8}$  M, stabilny w pH 6,0–7,5. Może on transportować  $\text{Zn}^{2+}$  do apoenzymów [37]. Jednak szybkość uwalniania  $\text{Zn}^{2+}$  z metalotionein w komórce znacznie przewyższa szybkość obserwowaną na izolowanej metalotioneinie przy fizjologicznym zakresie stężeń GSSG, co sugeruje, że w komórce działają czynniki bardziej reaktywne. Spośród występujących w komórce disulfidów najsilniej odciągają  $\text{Zn}^{2+}$  cystamina i disulfid CoA, jednak stężenia ich są zbyt niskie, aby spowodować obserwowaną mobilność  $\text{Zn}^{2+}$  [37].

W cząsteczce metalotionein cztery atomy cynku są mobilne (jeden z nich odznacza się wyższą mobilnością niż pozostałe trzy) i mogą być przenoszone na apoforny enzymów cynkowych oraz na niektóre receptory [11,23,26]. Kierunek przepływu tych kationów zależy od stopnia utlenienia środowiska. Pod wpływem czynników utleniających grupy  $-\text{SH}$ , takich jak: reaktywne formy tlenu, GSSG i związki selenu [24], następuje uwolnienie  $\text{Zn}^{2+}$  z metalotioneiny, a redukcja glutationu stymuluje wiązanie  $\text{Zn}^{2+}$  przez tioneinę. Przeniesienie  $\text{Zn}^{2+}$  uwolnionego z metalotioneiny na apofornę dehydrogenazy sorbitolowej zależy od stosunku GSH/GSSG w środowisku [26]. Trwałe uwolnienie  $\text{Zn}^{2+}$  z metalotionein następuje w wyniku wyparcia przez metal o wyższym powinowactwie. Metalotioneiny występują głównie w wątrobie, nerkach, trzustce i jelitach, a także, w małych ilościach 1–3 ng/ml we krwi [19]. Wewnątrz komórek zlokalizowane są w cytoplazmie, lizosomach i jądrze.



Synteza metalotionein indukowana jest na poziomie transkrypcji mRNA przez metale (Cd, Zn, Cu), glukokortykoidy, interleukinę 1, glukagon, estry forbolu i głódzenie. W obecności czynników indukujących zawartość metalotionein w wątrobie może wzrosnąć aż 24-krotnie, co jest związane ze wzmożonym pobieraniem  $Zn^{2+}$  i kilkukrotnym podniesieniem jego zawartości. Sama dieta bogata w  $Zn^{2+}$  podwyższa zawartość metalotionein 8 razy przy jednoczesnym intensywnym pobieraniu  $Zn^{2+}$  z krwi [16].

Metalotioneiny są komórkowym magazynem  $Zn^{2+}$ , który może być udostępniany innym białkom [19]. Ponadto pełnią one w komórkach dwie ważne funkcje: detoksyfikacyjną i antyoksydacyjną. Po pierwsze, ze względu na wysokie powinowactwo do metali ciężkich uwalniają od nich środowisko wewnątrzkomórkowe [51]. Po drugie, podczas stresu oksydacyjnego w komórce uwolnienie  $Zn^{2+}$  z metalotionein pozostawia wolne aniony tiolanowe, które stają się głównymi substratami w reakcjach z reaktywnymi postaciami tlenu i GSSG. Udowodniono, że wśród wszystkich związków tiolowych w komórce grupy -SH metalotionein są preferencyjnie utleniane przez  $H_2O_2$  [49]. W ten sposób zostaje zaoszczędzony komórkowy GSH i grupy -SH innych białek. Uwolniony  $Zn^{2+}$  może się wiązać do białek błonowych i w ten sposób zabezpieczać błony przed zmianami strukturalnymi [5]. Na szczególną uwagę zasługuje zdolność  $Zn^{2+}$  do wypierania  $Ca^{2+}$  i  $Fe^{2+}$  z wiązań białkowych. Znacznie wyższe powinowactwo białek do  $Zn^{2+}$  niż do  $Ca^{2+}$  pozwala na efektywną konkurencję obu kationów, pomimo wysokiego stosunku  $[Ca^{2+}]/[Zn^{2+}]$ , co może wpływać na liczne procesy regulowane przez  $Ca^{2+}$  [17]. Hamowanie różnych dróg transportu  $Ca^{2+}$  przez  $Zn^{2+}$  zaburza homeostazę  $Ca^{2+}$  w komórce [2]. Natomiast uwolnienie  $Fe^{2+}$  z połączeń białkowych pod wpływem  $Zn^{2+}$  odgrywa istotną rolę w przeciwdziałaniu peroksydacji lipidów błonowych [60].

Poza metalotioneinami  $Zn^{2+}$ , podobnie jak inne metale ciężkie, może indukować syntezę białek szoku cieplnego chroniących komórki przed uszkodzeniami termicznymi oraz oksydacyjnymi [21]. Na uwagę zasługuje synteza białka hsp70, które szczególnie silnie oddziałuje stabilizująco na sąsiadujące białka.

### C. Enzymy cynkowe

Udział  $Zn^{2+}$  w katalizie enzymatycznej polega na aktywacji związanej z nim cząsteczki wody i wytworzeniu miejscowego wzrostu stężenia anionów  $OH^-$ , które w większości przypadków atakują atom węgla grupy karbonylowej [62]. Ten mechanizm został opisany dla anhidrazy węglanowej, dehydrogenaz i proteaz cynkowych. W wielu enzymach cynkowych  $Zn^{2+}$  może być zastępowany przez  $Co^{2+}$  bez utraty aktywności [65]. Podobnie jak w przypadku metalotionein kation  $Zn^{2+}$  może być uwalniany z enzymów cynkowych pod wpływem czynników utleniających, co na ogół prowadzi do utraty aktywności [20].

Aktywność wielu enzymów jest modulowana przez  $Zn^{2+}$ . Na szczególną uwagę zasługuje aktywacja przez  $Zn^{2+}$  fosfodiesterazy specyficznej dla cAMP, enzymu wiążącego mol  $Zn^{2+}$ /mol z  $K_d$  0,4  $\mu M$  [44]. Dla wielu enzymów  $Zn^{2+}$  jest inhibitorem. W komórkach narażonych na stres oksydacyjny ważną rolę odgrywa hamowanie przez  $Zn^{2+}$  reduktaz disulfidowych, regenerujących grupy -SH po utlenieniu ( $IC_{50}$  dla reduktaz glutationowej i tioredoksynowej wynosi około 2  $\mu M$ ) [33]. Wiele komórek ma wrażliwe na  $Zn^{2+}$  endonukleazy katalizujące apoptotyczną fragmentację DNA. W tych komórkach  $Zn^{2+}$  jest czynnikiem hamującym apoptozę [45].

## DZIAŁANIE ANTYOKSYDACYJNE

Antyoksydacyjne działanie  $Zn^{2+}$  znane jest od 20 lat, jednak dopiero badania ostatnich lat udowodniły bezpośrednie hamowanie przez ten kation generacji rodników tlenowych [12]. Podczas reperfuzji serca produkcja rodnika hydroksylowego była hamowana aż o 80% przez dodatek 20  $\mu M$   $Zn^{2+}$  do płynu perfuzyjnego [48], co więcej,  $Zn^{2+}$  w stężeniach mikromolowych hamuje syntazę tlenku azotu i w ten sposób zapobiega wytwarzaniu najgroźniejszego dla komórki rodnika, nadtlenoazotynu, powstającego w reakcji anionorodnika ponadtlenkowego z tlenkiem azotu [46]. Usuwanie anionorodnika ponadtlenkowego w cytoplazmie jest katalizowane przez dysmutazę zależną od miedzi i cynku.

Poza inhibicją generacji rodników tlenowych antyoksydacyjna funkcja  $Zn^{2+}$  związana jest z trzema innymi mechanizmami [10]. Po pierwsze, kation ten konkuruje z  $Fe^{2+}$  i  $Cu^{2+}$  o te same miejsca wiązań do różnych białek, co ma szczególne znaczenie w błonach [6]. Po drugie, wiążąc się z białkowymi grupami -SH chroni je przed utlenieniem i alkilacją [59,61]. Przykładem są bezcynkowe apoenzymy dehydratazy aminolewulinowej i dihydroorotazy, które tracą grupy -SH i aktywność pod wpływem tlenu zawartego w powietrzu, czemu zapobiega dodatek  $Zn^{2+}$ . Jednak  $Zn^{2+}$  może się wiązać jedynie ze zredukowanymi grupami -SH, a zatem nie jest w stanie przywrócić aktywności enzymatycznych utraconych pod wpływem utlenienia [59], co więcej, wysokie stężenia disulfidów i czynniki nitrozylujące rozrywają wiązania cynkowo-siarkowe i uwalniają  $Zn^{2+}$  [4]. Uwolnienie  $Zn^{2+}$  powoduje wzrost wrażliwości grup -SH na utlenienie [30]. Rozerwanie struktury palców cynkowych jest jednym z najgroźniejszych efektów stresu oksydacyjnego w komórce [4]. Trwalszą ochronę przez interakcję z  $Zn^{2+}$  uzyskują grupy -SH narażone na działanie czynników alkilujących [61]. Po trzecie, indukcja metalotionein przeciwdziała utlenieniu GSH i białkowych grup -SH. Konsekwencją tych trzech efektów jest hamowanie procesów peroksydacyjnych, co przyczynia się do utrzymania prawidłowej struktury błon [10,54,59,60]. Należy jednak dodać, że  $Zn^{2+}$ , podobnie

jak  $\text{Cd}^{2+}$  i  $\text{Al}^{3+}$ , stabilizuje rodniki fenoksyłowe i w ich obecności może wzmacniać uszkodzenia oksydacyjne [67].

## ODDZIAŁYWANIE $\text{Zn}^{2+}$ W MITOCHONDRIACH

$\text{Zn}^{2+}$  wchodzi do mitochondriów najprawdopodobniej na uniporterze wapniowym [52]. Nadmiar  $\text{Zn}^{2+}$  powoduje hamowanie oddychania przez wiązanie do kompleksu  $\text{bc}_1$  łańcucha oddechowego [22,35]. Wiązanie to charakteryzuje się  $K_d = 3 \times 10^{-6}$  M, jednak zahamowanie oddychania izolowanych mitochondriów wątroby szczura o 50% obserwowano już przy  $0,1 \mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  w medium inkubacyjnym [55]. W konsekwencji blokady łańcucha oddechowego następuje spadek potencjału błonowego mitochondriów, co hamuje transport jonów zależny od tego potencjału, jak np. pobieranie  $\text{Ca}^{2+}$  [52].  $\text{Zn}^{2+}$  wiąże się także do naturalnego inhibitora mitochondrialnej ATP-azy, co u niektórych gatunków, jak np. królika, powoduje oddysocjowanie inhibitora od enzymu i jego aktywację [50].

Najważniejszym efektem  $\text{Zn}^{2+}$  na metabolizm mitochondriów jest zahamowanie cyklu kwasów trikarboksylowych na skutek specyficznej inhibicji mitochondrialnej akonitazy [14]. Inhibicja ta prowadzi do akumulacji cytrynianu w mitochondriach. W tej sytuacji cytrynian może ulec izomeryzacji do izocytrynianu dopiero po przeniesieniu do cytoplazmy, gdzie działa niewrażliwa na  $\text{Zn}^{2+}$  cytozolowa forma akonitazy.

Innym ważnym efektem  $\text{Zn}^{2+}$  w mitochondriach jest oddziaływanie na kanały błony wewnętrznej. Na szczególną uwagę zasługuje hamowanie przez  $\text{Zn}^{2+}$  kanału anionowego transportującego  $\text{Cl}^-$  [53].  $\text{IC}_{50}$  tej inhibicji,  $1,5 \mu\text{M}$ , mieści się w zakresie stężeń fizjologicznych.  $\text{Zn}^{2+}$  w stężeniach  $2,5\text{--}10 \mu\text{M}$  wiążąc się z resztami cysteinowymi indukuje niespecyficzne uprzepuszczalnienie wewnętrznej błony mitochondrialnej przez otwarcie w niej tzw. megakanałów przepuszczających wszystkie cząsteczki o masie do  $1,5 \text{ kDa}$  [66,69]. Prowadzi to do deenergizacji mitochondriów i wpływu z nich różnych jonów i metabolitów.

## ZABURZENIA HOMEOSTAZY $\text{Zn}^{2+}$ W ORGANIZMIE

Niedobór  $\text{Zn}^{2+}$  w diecie może być przyczyną wielu schorzeń w organizmach zwierząt wyższych. Miarą niedoboru  $\text{Zn}^{2+}$  jest obniżenie aktywności fosfatazy alkalicznej w osoczu [28]. Dziecie bezcynkowej często towarzyszy anoreksja (brak łaknienia) spowodowana prawdopodobnie zanikiem gęstości, polipeptydu śliny zawierającego  $\text{Zn}^{2+}$  [6]. Badania kliniczne dowodzą, że niedobór  $\text{Zn}^{2+}$  w diecie kobiet

ciężarnych podnosi ryzyko wystąpienia komplikacji porodowych i poporodowych [7]. Natomiast niedobór  $Zn^{2+}$  u kobiet karmiących piersią jest przyczyną wystąpienia u niemowląt zespołu *acrodermatitis enteropathica*, czyli zaburzeń jelitowo-skórnych objawiających się zapaleniem jelit, owrzodzeniem skóry kończyn oraz ogólnym wyniszczeniem organizmu [56].

Zależnie od zawartości  $Zn^{2+}$  w diecie stężenie tego kationu w osoczu krwi i wątrobie zmienia się, odpowiednio, w granicach 50–140% i 70–120% normalnego poziomu [57]. Karmienie dietą bezcynkową wywołuje stres oksydacyjny: w osoczu krwi i w wątrobie następuje nagromadzenie produktów peroksydacji lipidów i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. W osoczu krwi drastycznie obniża się aktywność dysmutazy ponadtlenkowej, spada poziom GSH i białkowych grup -SH [54].

Wielu chorobom towarzyszą zmiany zawartości  $Zn^{2+}$  we krwi i różnych tkankach. U chorych na przewlekłe zapalenie wątroby typu C oraz na marskość wątroby obserwuje się spadek stężenia  $Zn^{2+}$  w surowicy [40]. W katarakcie typu starczego stwierdzono niski poziom  $Zn^{2+}$  w soczewce, podczas gdy w katarakcie pourazowej poziom  $Zn^{2+}$  jest znacznie podwyższony [25].

Groźne zatrucia cynkiem występują rzadko, niemniej jednak u ludzi narażonych na działanie pyłu cynkowego obserwuje się zespół chorobowy, zwany gorączką cynkową lub gorączką hutników, objawiający się wysoką temperaturą, zapaleniem płuc, a w konsekwencji prowadzący do zwłóknienia tkanki płucnej [34].

Najbardziej znanym efektem terapeutycznym cynku jest stymulujący wpływ na gojenie się ran. Jest on związany z zahamowaniem wzrostu bakterii i przyspieszeniem cykli komórkowych komórek śródbłonkowych [27].

## UWAGI KOŃCOWE

Ostatnio gwałtownie wzrasta zainteresowanie rolą  $Zn^{2+}$  w komórce. Opisywane są coraz liczniejsze domeny białkowe wiążące ten kation. Są one charakteryzowane metodami krystalograficznymi i metodą rezonansu jądrowego. Nasuwa się pytanie o funkcję tych domen. Wiadomo, że biorą one udział w wiązaniu DNA i aktywacji czynników transkrypcyjnych. Sugeruje się, że palce cynkowe typu RING służą do interakcji między białkami [3].

Wiele aspektów biochemii i fizjologii cynku jest dotychczas niewyjaśnionych. Bardzo niewiele wiadomo o absorpcji, transporcie i wydalaniu tego pierwiastka. Istnieje przypuszczenie, że stężenie  $Zn^{2+}$  w komórce jest precyzyjnie kontrolowane, jednak mechanizm tej kontroli nie jest dotychczas poznany. Co więcej, dotychczasowe ustalenia stężenia  $Zn^{2+}$  w komórce budzą obecnie wątpliwości. Wysokie powinowactwo białek do  $Zn^{2+}$  wydawało się korelować z bardzo niskim stężeniem wolnego kationu, rzędu  $10^{-12}$  M. Jednakże późniejsze pomiary sondą cynkiną przy-

niosły wartości o wiele rzędów wyższe,  $10^{-5}$ – $10^{-4}$  [9]. Ten podstawowy problem wymaga dalszych gruntownych badań.

Bardzo szybka wymiana ligandów przez kation  $Zn^{2+}$  daje możliwości funkcjonalne podobne do tych, jakie charakteryzują kation  $Ca^{2+}$ . Regulacja wiązania  $Zn^{2+}$  z białkami przez stan oksydoredukcyjny glutationu wskazuje na zależność stężenia wolnego  $Zn^{2+}$  od energetycznego metabolizmu komórki [19]. Wysuwane są hipotezy o roli sygnałowej zmian w wewnątrzkomórkowym stężeniu wolnego  $Zn^{2+}$ . Współzależność funkcji cynku w strukturze białek, katalizie enzymatycznej i przenoszeniu informacji jest ważnym problemem dla przyszłych badań [3].

## LITERATURA

- [1] BAKSH S, SPAMER S, OIKAWA K, McCUBBIN WD, HEILMANN C, KAY M, MICHALAK M.  $Zn^{2+}$  binding to cardiac calsequestrin. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; **209**: 310–315.
- [2] BENTERS J, FLÖGEL U, SCHÄFER T, LEIBFRITZ D, HECHTENBERG S, BEYERSMAMM D. Study of interactions of cadmium and zinc ions with cellular calcium homeostasis using  $^{19}F$ -NMR spectroscopy. *Biochem J* 1997; **322**: 793–799.
- [3] BERG JM, SHI Y. The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. *Science* 1996; **271**: 1081–1085.
- [4] BERENDJI D, KOLB-BACHOFEN V, MEYER KL, GRAPENTHIN O, WEBER H, WAHN V, KRÖNCKE KD. Nitric oxide mediates intracytoplasmic and intranuclear zinc release. *FEBS Lett* 1997; **405**: 37–41.
- [5] BETTGER WJ. Zinc and selenium, site-specific versus general antioxidant. *Can J Physiol Pharmacol* 1993; **71**: 721–724.
- [6] BETTGER WJ, O'DELL L. A critical physiological role of zinc in the structure and function of biomembranes. *Life Sci* 1981; **28**: 1425–1438.
- [7] BIADIOLI R, BANDIENELLI R, BODDI V, BONIRRARO G, FIMIANI R, PARETT E, LA TORRE P, CHEFFI O. Zinc blood levels in 73 puerperal women. Correlation with obstetric and neonatal complications. *Minerva Ginecol* 1997; **49**: 371–375.
- [8] BITTEL D, DALTON T, SAMSON SL, GEDAMU L, ANDREWS GK. The DNA binding activity of metal response element-binding transcription factor-1 is activated *in vivo* and *in vitro* by zinc, but not by other transition metals. *J Biol Chem* 1998; **273**: 7127–7133.
- [9] BRAND IA, KLEINEKE J. Intracellular zinc movement and its effect on the carbohydrate metabolism of isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1996; **271**: 1941–1949.
- [10] BRAY TM, BETTGER WJ. The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free Rad Biol & Med* 1990; **8**: 281–291.
- [11] CANO-GAUCI DF, SARKAR B. Reversible zinc exchange between metallothionein and the estrogen receptor finger. *FEBS Lett* 1996; **386**: 1–4.
- [12] CAO G, CHEN J. Effects of dietary zinc on free radical generation, lipid peroxidation, and superoxide dismutase in trained mice. *Arch Biochem Biophys* 1991; **291**: 147–153.
- [13] CORNELL NW, CRIVARO KE. Stability constant for the zinc-dithiothreitol complex. *Anal Biochem* 1972; **47**: 203–208.
- [14] COSTELLO LC, LIU Y, FRANKLIN RB, KENNEDY MC. Zinc inhibition of mitochondrial aconitase and its importance in citrate metabolism of prostate epithelial cells. *J Biol Chem* 1997; **272**: 28875–28881.

- [15] COUSINS RJ. Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: Special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol Rev* 1985; **65**: 238–300.
- [16] COYLE P, ZALEWSKI PD, FILCOX JC, FORBES IJ, WARD AD, LINCOLN SF, MAHADEVAN I, ROFE AM. Measurement of zinc in hepatocytes by using a fluorescent probe, zinquin: relationship to metallothionein and intracellular zinc. *Biochem J* 1994; **303**: 781–786.
- [17] CSERMELY P, SANDOR P, RADICS L, SAMOGYI J. Zinc forms complexes with higher kinetic stability than calcium. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **165**: 838–844.
- [18] ERDAHL WL, CHAPMAN CJ, WANG E, TAYLOR RW, PFEIFFER DR. Ionophore 4-BrA23187 transports  $Zn^{2+}$  and  $Mn^{2+}$  with high selectivity over  $Ca^{2+}$ . *Biochemistry* 1996; **35**: 13817–13825.
- [19] FISCHER EH, DAVIE EV. Recent excitement regarding metallothionein. *Proc Natl Acad Sci* 1998; **95**: 3333–3334.
- [20] GERGEL D, CEDENBAUM AJ. Inhibition of the catalytic activity of alcohol dehydrogenase by nitric oxide is associated with s-nitrosylation and the release of zinc. *Biochemistry* 1996; **35**: 16186–16194.
- [21] HATAYAMA T, ASAI Y, WAKATSUKI T, KITAMURA T, IMAHARA H. Regulation of hsp70 synthesis induced by cupric sulfate and zinc sulfate in thermotolerant HeLa Cells. *J Biochem* 1993; **114**: 592–597.
- [22] IVKOVIC-JENSEN MM, ULLMANN GM, YOUNG S, HANSSON Ö, CRNOGORAC MM, EJDEBÄCK M, KOSTIC NM. Effect of single and double mutations in plastocyanin on the rate constant and activation parameters for the rearrangement gating the electron-transfer reaction between the triplet state of zinc cytochrome c cupriplastocyanin. *Biochemistry* 1998; **37**: 9557–9569.
- [23] JACOB C, MARET W, VALLEE BL. Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 3489–3494.
- [24] JACOB C, MARET W, VALLEE BL. Ebselen, a selenium-containing redox drug, releases zinc from metallothionein. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **248**: 569–573.
- [25] JERU I. The role of zinc in the appearance of cataract. *Oftalmologia* 1998; **41**: 329–332.
- [26] JIANG LJ, MARET W, VALLEE BL. The glutathione redox couple modulates zinc transfer from metallothionein to zinc-dependent sorbitol dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 3483–3488.
- [27] KAJI T, FUJIWARA Y, SAKURAI S, YAMAOTO C, KOZUKA H, KOIZUMI F. Zinc promotes the repair of wounded monolayers of cultured vascular endothelial cells. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1995; **89**: 189–198.
- [28] KILIK I, OZALP I, COSCUN T, TOKATLI A, SALDAMLI I, KOKSEL H, OZBOY O. The effect of zinc-supplemented bread consumption on school children with asymptomatic zinc deficiency. *J Pediatr Gastroenterol Nut* 1998; **26**: 167–171.
- [29] KLUSZYNSKI BA, KIM C, FAULK WP. Zinc as a cofactor for heparin neutralization by histidine-rich glycoprotein. *J Biol Chem* 1997; **272**: 13541–13547.
- [30] KNOEPFEL L, STEINKUHLER C, CARRI MT, ROTILIO G. Role of zinc-coordination and of the glutathione redox couple in the redox susceptibility of human transcription factor Sp1. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **201**: 871–877.
- [31] KORDOWSKA J, STAFFORD WF, WANG CLA.  $Ca^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  bind to different sites and induce different conformational changes in human calyculin. *Eur J Biochem* 1998; **253**: 57–66.
- [32] KRONCKE KD, FEHSEL K, SCHMIDT T, ZENKE FT, PASTING J, WASNER JR, BETTERMAUN H, BREUNING KD, KOLB-BACHOFEN V. Nitric oxide destroys zinc-sulfur clusters inducing zinc release from metallothionein and inhibition of the zinc finger-type yeast transcription activator LAC9. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **200**: 1105–1110.
- [33] LENARTOWICZ E, WUDARCZYK J. Enzymatic reduction of 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) by lysate of rat liver mitochondria. *Int J Biochem Cell Biol* 1995; **27**: 831–837.

- [34] LINDAHL M, LEANDERSON P, TAGESSON C. Novel aspect on metal fume fever: zinc stimulates oxygen radical formation in human neutrophils. *Hum Exp Toxicol* 1998; **17**: 105–110.
- [35] LORUSSO M, COCCO T, SARDANELLI AM, MINUTO M, BONOMI F, PAPA S. Interaction of  $Zn^{2+}$  with the bovine-heart mitochondrial bc<sub>1</sub> complex. *Eur J Biochem* 1991; **197**: 555–561.
- [36] LUDWIG JC, MISIOROWSKI RL, CHVAPIL M, SEYMOUR MD. Interaction of zinc ions with electron carrying coenzymes NADPH and NADH. *Chem Biol Interact* 1980; **30**: 25–34.
- [37] MARET W. Oxidative metal release from metallothioneine via zinc- thiol/disulfide interchange. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 237–241.
- [38] McMAHON RJ, COUSINS RJ. Regulation of the zinc transporter ZnT-1 by dietary zinc. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 4841–4846.
- [39] MICHALAK M, MILNER RE, BURNS K, OPAS M. Calreticulin. *Biochem J* 1992; **285**: 681–692.
- [40] NAGAMINTE T, TAKAGI H, HASHIMOTO Y, TAKAYAMA H, SHIMODA R. The possible role of zinc and metallothionein in the liver on the therapeutic effect of IFN-alpha to hepatitis C patients. *Biol Trace Elem Res* 1997; **58**: 65–76.
- [41] PALMITER RD, FINDLEY SD. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *EMBO J* 1995; **14**: 639–649.
- [42] PARKER PJ, COUSSENS L, TOTTY N, RHEE L, YOUNG S, CHEN E, STABEL S, WATERFIELD MD, ULRICH A. The complete primary structure of protein kinase C – the major phorbol ester receptor. *Science* 1986; **233**: 853–859.
- [43] PATTISON SE, TELLES S, FRIAR S, STOWELL C, BECKLEY R. Zinc diffusion through lipid bilayers. *Arch Biochem Biophys* 1998; **351**: 41–46.
- [44] PERCIVAL MD, YEH B, FALGUEYRET JP. Zinc dependent activation of cAMP-specific phosphodiesterase (PDE4A). *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **241**: 175–180.
- [45] PERRY DK, SMYTH MJ, STENNICKE HR, SALVESEN GS, DURIEZ P, POIRIER GG, HANNUN YA. Zinc is a potent inhibitor of the apoptotic protease, caspase-3. *J Biol Chem* 1997; **30**: 8530–8533.
- [46] PERSECHINI A, MCMILLAN K, MASTERS BSS. Inhibition of nitric oxide synthase activity by  $Zn^{2+}$  ion. *Biochemistry* 1995; **34**: 15091–15095.
- [47] PHILLIPS SR. Adenosine and adenine nucleotides. Ionization, metal complex formation, and conformation in solution. *Chem Rev* 1966; **66**: 501–527.
- [48] POWELL SR, HALL D, AIUTO L, WAPNIR RA, TEICHBERG S, TORTOLANI AJ. Zinc improves postischemic recovery of isolated rat hearts through inhibition of oxidative stress. *Am J Physiol* 1994; **266**: H2497–H2507.
- [49] QUESADA AR, BYRNES RW, KREZOSKI SO, PETERING DH. Direct reaction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with sulfhydryl groups in HL-60 cells: zinc-metlothionein and other sites. *Arch Biochem Biophys* 1996; **334**: 241–250.
- [50] ROUSLIN W, BROGE CW. Novel difference in IF1 reactivity to  $Zn^{2+}$  in rabbit versus rat cardiomyocytes, mitochondria, and submitochondrial particles. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **227**: 8–14.
- [51] SAITO S, HUNZIKER PE. Differential sensitivity of metallothionein-1 and -2 in liver of zinc-injected rat toward proteolysis. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1289**: 65–70.
- [52] SARIS NEL, NIVA K. Is  $Zn^{2+}$  transported by the mitochondrial calcium uniporter? *FEBS Lett* 1994; **356**: 195–198.
- [53] SELWYN MJ, LTN NG, CHOO HL. The pH-dependent anion-conducting channel of the mitochondrial inner membrane is potently inhibited by zinc ions. *FEBS Lett* 1993; **31**: 29–133.
- [54] SHAHEEN AA, ABD EL FATTAH AA. Effect of dietary zinc on lipid peroxidation, glutathione, protein thiols and superoxide dismutase activity in rat tissues. *Int J Biochem Cell Biol* 1995; **27**: 89–95.

- [55] SIMPKINS CO, ZHAS HL, TORRENCE LA. Effect of metallothionein 1 on mitochondrial oxygen consumption. *Life Sci* 1994; **55**: 221–226.
- [56] STEVENS J, LUBITZ L. Symptomatic zinc deficiency in bread-fed term and premature infants. *J Pediatr Child Health* 1998; **34**: 97–100.
- [57] TAMURA T, KAISER LL, WATSON JE, HALSTE CH, HURLEY LS, STOKSTAD ELR. Increased methionine synthetase activity in zinc-deficient rat liver. *Arch Biochem Biophys* 1997; **256**: 311–316.
- [58] TAYLOR JA, SIMONS TJB. Effect of dexamethasone on zinc transport in rat hepatocytes in primary culture. *Biochim Biophys Acta* 1994; **1193**: 240–246.
- [59] TAYLOR CG, MCCUTCHON TL, BOERMANS HJ, DISILVESTRO RA, BRAY TM. Comparison of Zn and vitamin E for protection against hyperoxia induced lung damage. *Free Rad Biol & Med* 1997; **22**: 543–550.
- [60] THOMAS JP, BACHOWSKI GJ, GIROTTI AW. Inhibition of cell membrane lipid peroxidation by cadmium- and zinc-metallothioneins. *Biochim Biophys Acta* 1986; **884**:448–461.
- [61] TOBEY RA, ENGER MD, GRIFFITH JK, HILDEBRAND CE. Zinc-induced resistance to alkylating agent toxicity. *Cancer Res* 1982; **42**: 2980–2984.
- [62] VALLEE BL, AULD DS. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry* 1990; **29**: 5647–5659.
- [63] VERBEKE JS, MAY C, DROCHMANS P, MASSART DL. The determination of Cu, Zn, and Mn in subcellular rat liver fractions. *Anal Biochem* 1977; **83**: 743–753.
- [64] WILLIAMS RJP. The mineral elements in homeostasis and morphogenesis. *Bioch Soc Trans* 1990; **18**: 689–704.
- [65] WU HB, TSOU CL. A comparison of Zn(II) and Co(II) in the kinetics of inactivation of aminoacylase by 1,10-phenantroline and reconstitution of the apoenzyme. *Biochem J* 1993; **296**: 435–441.
- [66] WUDARCZYK J, DĘBSKA G, LENARTOWICZ E. Zinc as an inducer of the membrane permeability transition in rat liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 1999; **363**: 1–7.
- [67] YAMASAKI H, GRACE SC. EPR detection of phytophenoxyl radicals by zinc ions: evidence for the redox coupling of plant phenolics with ascorbate in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-peroxidase system. *FEBS Lett* 1998; **422**: 377–380.
- [68] ZALEWSKI PD, FORBES IJ, BETTS WH. Correlation of apoptosis with change in intracellular labile Zn(II) using zinquin[(2-methyl-8-toluenesulphonamido-6-quinolyloxy)acetic acid], a new specific fluorescent probe for Zn(II). *Biochem J* 1993; **296**: 403–408.
- [69] ZORATTI M, SZABO I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1995; **1241**: 139–176.

Redaktor prowadzący – J. Kuźnicki

Otrzymano: 19.01.1999 r.

Przyjęto: 24.03.1999 r.

Adres autora: ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa



## PORÓWNAWCZE BADANIA ORGANIZACJI GENOMU ROŚLINNEGO\*

### COMPARATIVE STUDY OF PLANT GENOME ORGANIZATION

Jolanta MAŁUSZYŃSKA

Katedra Anatomii i Cytologii Roślin, Uniwersytet Śląski, Katowice

*Streszczenie:* Gatunki roślin charakteryzują się ogromną różnorodnością nie tylko na poziomie fenotypu, ale również genomu jądrowego. Genomy roślin różnią się zawartością DNA, liczbą chromosomów i ich morfologią. Wielkość genomu zależy głównie od zawartości powtarzalnych sekwencji DNA. Sekwencje te można podzielić na klasy w zależności od długości, położenia i specyficzności występowania. Pewne typy sekwencji są podobne u wszystkich organizmów, podczas gdy inne są specyficzne dla gatunku lub nawet chromosomu. Poszczególne typy sekwencji mają charakterystyczne rozmieszczenie w chromosomach. W związku z tym struktura chromosomu nie jest homogenna, ale składa się z szeregu chromatynowych domen. Prowadzone w ostatnich latach badania organizacji genomów wykazały, że geny występujące u większości roślin odznaczają się nie tylko podobieństwem struktury, ale również ich układ w chromosomach jest podobny (syntenia). Porównawcze badania genomów różnych gatunków roślin, zarówno na poziomie molekularnym jak i chromosomowym, otwierają nowe możliwości poznawcze i powinny przybliżyć zrozumienie zależności między funkcją genu i organizacją genomu. (*Postępy Biologii Komórki* 1999; 26: 507–522)

*Słowa kluczowe:* chromosomy, centromery, sekwencje powtarzalne, syntenia, telomery, wielkość genomu.

*Summary:* Plant species are different not only at their phenotype but also the genome level. Plant genomes vary greatly in their size (DNA amount), chromosome number and morphology. Repetitive DNA sequences represent the majority of most plant genomes and define some differences between species. Some sequences are highly conserved in many species while other sequences show species or even chromosome specificity. Repetitive sequences have characteristic chromosomal locations and also for this reason, the chromosomes are not homogenous but contain several chromatid domains. Comparative genome analysis has shown that structures of genes are similar in most plants and the ordering of genes is highly conserved across wide taxonomic groups (synteny). Comparative genome investigations at molecular as well as chromosomal level should provide additional information on the relationship

\*Praca dofinansowana z grantu KBN 6P04C06613.

between gene function and genome organisation.  
(*Advances in Cell Biology* 1999; 26: 507–522)

*Key words:* chromosomes, centromeres, genome size, repetitive DNA sequences, synteny, telomeres.

## WSTĘP

Organizmy mimo wielkiej różnorodności charakteryzują się takim samym materiałem (DNA/RNA) i kodem genetycznym. Prowadzone w ostatnich latach porównawcze badania organizacji genomów (*comparative genomics*) w różnych grupach systematycznych roślin wykazały dalszą unifikację genetyczną. Stwierdzono, że geny pełniące podobne funkcje u różnych gatunków roślin zachowują podobne sekwencje. Geny występujące u większości roślin wykazują nie tylko podobieństwo struktury, ale również ich układ jest konserwatywny (ang. *synteny*). Wskazuje to, że w procesie specjacji w obrębie większych grup systematycznych zachowane zostały układy genów ancestralnego przodka [10].

Z drugiej strony rośliny charakteryzują się ogromną różnorodnością (ang. *bio-diversity*) nie tylko na poziomie fenotypu, ale również genomu. Genomy roślin różnią się zawartością DNA, liczbą chromosomów i ich wielkością. Jedną z głównych przyczyn tych różnic jest występowanie powtarzalnych sekwencji DNA, które mogą stanowić ponad 90% genomu jądrowego, podczas gdy większość genów występuje w jednej lub kilku kopiach, stanowiąc niewielki procent genomu. Dla zrozumienia organizacji genomu ważne jest poznanie struktury i funkcji nie tylko genów, ale również sekwencji niekodujących. Znajomość struktury genomu jest istotna w badaniach procesów ewolucji, zachowania się chromosomów w jądrze interfazowym, mitozie i mejozie, jak również w transformacji organizmów drogą wprowadzania obcych genów czy hodowli roślin.

Badania organizacji genomu skupiają się głównie na rozmieszczeniu poszczególnych typów sekwencji w chromosomach oraz na trójwymiarowej organizacji tych sekwencji w jądrze interfazowym, kiedy geny są aktywne transkrypcyjnie i replikowany jest DNA. W badaniach organizacji genomu można wyróżnić dwa aspekty: 1 – rozmieszczenie poszczególnych typów sekwencji w chromosomach, 2 – trójwymiarowa organizacja tych sekwencji w jądrze interfazowym, w czasie kiedy geny są aktywne transkrypcyjnie i DNA jest replikowany. W rozważaniach nad organizacją genomu nasuwają się następujące pytania:

- Jakie elementy powszechnie występują we wszystkich genomach?
- Który typ sekwencji ewoluuje najszybciej?
- Jakie są mechanizmy zmian w sekwencjach, w liczbie ich kopii i rozmieszczeniu w chromosomach?
- Jak poszczególne sekwencje są ułożone w genomie?

– Jakie jest wzajemne położenie genów względem sekwencji regulujących, a jakie względem sekwencji powtarzalnych?

Odpowiedzi na te pytania mogą dostarczyć porównawcze badania genomów poszczególnych gatunków lub większych grup systematycznych.

## WIELKOŚĆ GENOMU

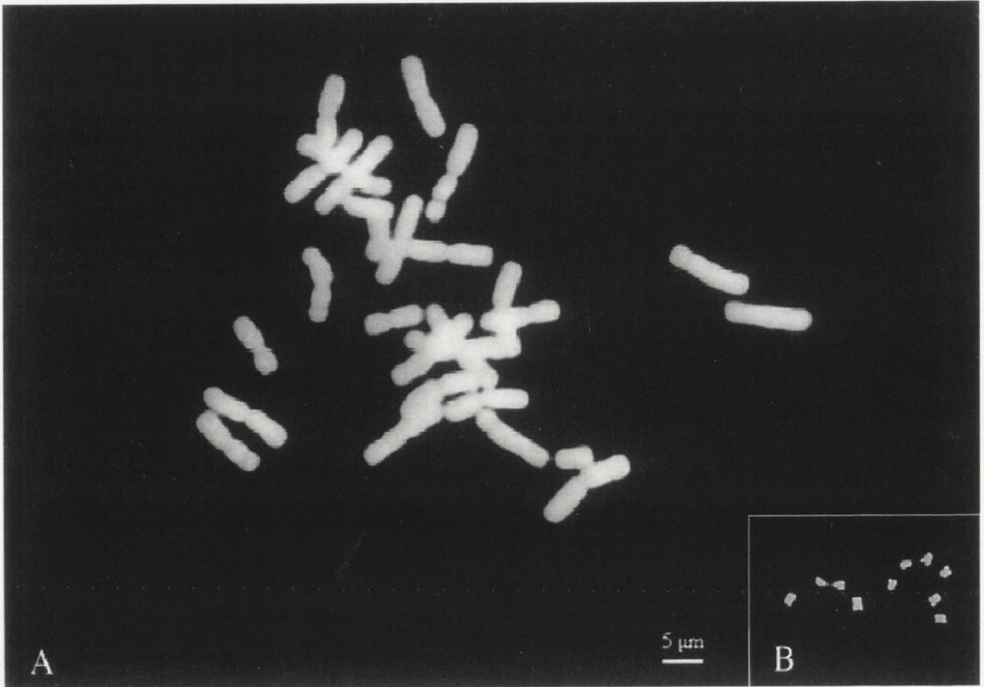
Wielkość genomu jądrowego określona jest dla około 3000 gatunków roślin, tj. dla około 1% roślin okrytonasiennych. Różnice w zawartości DNA u tych gatunków wynoszą blisko tysiąc razy. Rośliną powszechnie znaną z bardzo małego genomu jest *Arabidopsis thaliana* (1C DNA = 0,2 pg), a przykładem rośliny z wyjątkowo dużą zawartością jądrowego DNA może być *Fritilaria assyriaca* (1C DNA = 127 pg) [4].

Podobnie bardzo różna jest u roślin liczba chromosomów; może ona wahać się od 2 do kilkuset, przy czym opisana jest dla około 25% gatunków okrytonasiennych. Nie stwierdzono u roślin gatunku o liczbie chromosomów  $n = 1$ , który byłby szczególnie interesujący w badaniach nad mapowaniem chromosomów. Najmniejszą, równą dwa, haploidalną liczbę chromosomów opisano dla dwóch gatunków roślin dwuliściennych – *Haplopappus gracilis* i *Brachycome dichromosomatica* i dwóch jednoliściennych – *Zingeria biebersteiniana* i *Colpodium versicola* [3]. Maksymalna liczba chromosomów opisana dla roślin okrytonasiennych wynosi  $2n = 600$  u palmy madagaskarskiej *Voanniola gerardii* [18].

Morfologia, a szczególnie rozmiary chromosomów wykazują również dużą różnorodność zarówno w obrębie jednego genotypu, jak i między gatunkami (rys. 1). Chromosomy jednych gatunków są małe i niezróżnicowane morfologicznie, podczas gdy u innych poszczególne pary chromosomów homologicznych różnią się istotnie i są łatwe do identyfikacji.

Wykazano zależność między zawartością DNA i niektórymi cechami fenotypowymi na poziomie komórki. Można wyróżnić dwojaki wpływ jądrowego DNA na fenotyp. Jeden przez ekspresję zawartych w nim genów i drugi fizyczny, warunkujący między innymi wielkość i masę jądra. Bennett [2] wprowadził termin nukleotyp (ang. *nucleotype*) dla określenia cech jądra, które nie wynikają z przekazu informacji genetycznej, ale zależą od ilości DNA.

Ostatnio jest coraz więcej doniesień o zależności między wielkością genomu a cechami na poziomie organizmu, ważnymi w hodowli roślin lub ekologii, często związanymi z odpornością na czynniki środowiskowe. Interesujących danych dostarczyły badania dotyczące słonecznika, u którego stwierdzono prawie trzykrotne różnice w zawartości jądrowego DNA w zależności od rodzaju i intensywności światła [45]. Autorzy wskazują na adaptacyjne znaczenie takiej niestabilności. Zro-

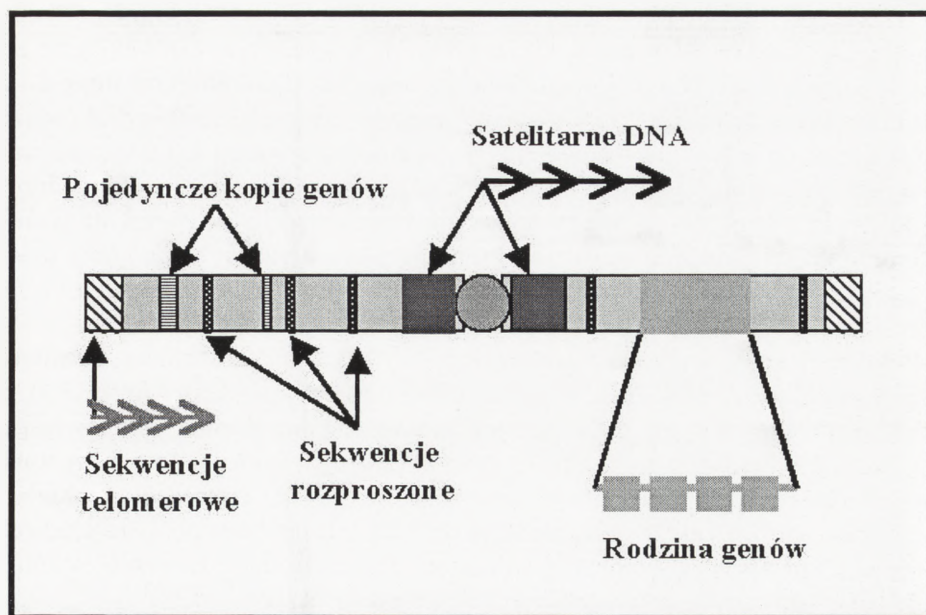


RYSUNEK 1. Porównanie wielkości mitotycznych chromosomów metafazowych, po barwieniu fluorescencyjnym DAPI: A – *Pinus silvestris*  $2n = 24$ ; B – *Arabidopsis thaliana*  $2n = 10$ ; zdjęcia wykonane w tej samej skali

zumienie mechanizmów tego typu zachowań genomu mogłoby być przydatne w modyfikacjach wielkości genomu dla celów praktycznych, na przykład w hodowli roślin.

Mimo tak znacznej różnicy w wielkości genomów wydaje się, że liczba genów jest podobna u różnych gatunków. Na około 60 000 ustalono liczbę genów u tytoniu na podstawie analizy transkryptów [35]. Dla innych gatunków wartość ta waha się od 25000 do 50000. Uściślenie tych danych powinno być łatwiejsze po zakończeniu sekwencjonowania genomów, które aktualnie prowadzone jest dla wielu organizmów, a z roślin – dla *Arabidopsis thaliana*.

Wielkość genomu zależy głównie od zawartości powtarzalnych sekwencji DNA, która może wahać się od 40% u *Arabidopsis* do 90% u pszenicy. Sekwencje powtarzalne można podzielić na klasy w zależności od długości, położenia i specyficzności występowania. Długość sekwencji powtarzalnych może wynosić od dwóch lub kilku nukleotydów, przez sekwencje wynoszące około 180 pb satelitarnego DNA, do kilku tysięcy, jak geny rRNA. Pewne typy sekwencji są podobne u wszystkich organizmów, podczas gdy inne są specyficzne dla gatunku lub nawet chro-



RYSUNEK 2. Schemat struktury chromosomu

mosomu [48]. Sekwencje powtarzalne mogą być rozproszone w genomie lub występować tandemowo w blokach. Poszczególne typy sekwencji mają charakterystyczne rozmieszczenie w chromosomach. W związku z tym struktura chromosomu nie jest homogenna, ale składa się z szeregu chromatynowych domen (rys. 2).

## SEKWENCJE CENTROMEROWE

Obecność sekwencji centromerowych jest niezbędna, aby cząsteczka DNA mogła pełnić funkcję chromosomu w komórce eukariotycznej. Centromer odgrywa istotną rolę w procesie segregacji i prawidłowego rozdziału chromosomów do jąder potomnych. Molekularna struktura centromerów jest lepiej poznana u drożdży, *Drosophila* i człowieka niż u roślin. W odcinkach przy centromerze chromosomów wielu roślin występuje wyraźny blok heterochromatyny, który intensywnie barwi się odczynnikiem Giemsy w metodzie prążków C lub wykazuje jasną fluorescencję po barwieniu DAPI. Obszary te zawierają powtarzalne, satelitarne sekwencje DNA. Sekwencja powtarzana na ogół zawiera 160–180 pz, co opowiada długości DNA związanego z nukleosomem albo wielokrotność tej długości. U *Arabidopsis thaliana*

sekwencja pAL1 [33] o długości 360 pz obecna jest w około 5000 kopii, co stanowi średnio 200 kpz w centromerze. Wiele danych wskazuje, że sekwencje te charakteryzują się niewielką homologią albo jej brakiem między spokrewnionymi gatunkami. I tak centromerowy DNA wyizolowany z *Arabidopsis thaliana* hybrydyzuje z obszarami centromerowymi wszystkich chromosomów tego gatunku, natomiast nie hybrydyzuje z chromosomami innych gatunków *Arabidopsis* ani spokrewnionych gatunków *Brassica* [20, 29–31]. Późniejsze badania wykazały, że przycentromerowa heterochromatyna *Arabidopsis* jest zbudowana nie tylko z tandemowo powtórzonych sekwencji o długości 180 pz, ale również z innych powtarzalnych sekwencji typu mikrosatelitarnego [8].

Powtarzalne sekwencje przycentromerowe wyizolowano i scharakteryzowano dla dwóch gatunków *Brassica*: *B. oleracea* (pBoKB1) i *B. campestris* (pBcKB4). Sekwencje te nie hybrydyzowały z centromerami wszystkich chromosomów własnego genomu, ale hybrydyzowały również z niektórymi chromosomami drugiego gatunku. Stwierdzono brak hybrydyzacji z chromosomami *B. nigra*, trzeciego diploidalnego gatunku *Brassica*. To może wskazywać, że sekwencje te powstały po wyewoluowaniu gatunku *B. nigra* ze wspólnego gatunku ancestralnego, ale przed rozejściem się dróg filogenetycznych *B. campestris* i *B. oleracea* [17].

Wykorzystując sztuczne bakteryjne chromosomy, (BAC) zawierające centromerowy DNA ryżu (*Oryza sativa*), wyizolowano siedem powtarzalnych sekwencji, z czego sześć typu średnio powtarzalnego (50–300 kopii) jest rozproszonych w centromerach wszystkich lub prawie wszystkich gatunków *Gramineae*, podczas gdy siódma sekwencja, o długości 168 pz, występuje tandemowo w 6000 kopii tylko w genomach z rodzaju *Oryza* [11].

## SEKWENCJE TELOMEROWE

Sekwencje telomerowe są krótkimi odcinkami DNA występującymi w wielu kopiach na końcu każdego chromosomu. Pełnią one istotne funkcje w stabilizacji struktury chromosomów, między innymi są odpowiedzialne za rozpoznawanie prawidłowych i uszkodzonych krańców chromosomów, w efekcie czego następuje opóźnienie cyklu komórkowego i naprawa pęknięcia. Sekwencje te nie replikują drogą semikonserwatywną, ale przez dodanie sekwencji do końca chromosomu przez enzym typu odwrotnej transkryptazy – telomerazę. Umożliwia to całkowitą replikację chromosomów [6].

U roślin sekwencje telomerowe zostały wyizolowane z genomu *Arabidopsis thaliana* [46]. Jest to sekwencja TTTAGGG, obecna w 500 kopiach w haploidalnym genomie. Długość telomerowych sekwencji różni się znacznie wśród roślin, od 2–5 kpz w chromosomach *Arabidopsis* do kilkudziesięciu, a nawet kilkuset tysięcy

par zasad u innych roślin. Telomery, tak jak i inne odcinki chromosomu, mają strukturę nukleosomową. Trawienie nukleazami wykazało, że sekwencje nukleosomowe telomerów są krótsze od typowych nukleosomów. U żyta i pszenicy zawierają 160 pz. Telomerowa sekwencja DNA *Arabidopsis* użyta jako sonda do hybrydyzacji *in situ* hybrydyzowała z chromosomami wielu gatunków roślin. Tą drogą zlokalizowano na końcach chromosomów różnej wielkości sygnały, u *Secale cereale* [52], *Vigna unguiculata* [15] i *Crepis capillaris* [32]. Schubert i wsp. [50] stwierdzili obecność sekwencji telomerowych w odcinkach interstycjalnych chromosomów *Vicia faba*, co może wskazywać na wystąpienie fuzji chromosomów podczas ewolucji tego kariotypu. U *Arabidopsis* sekwencje te, poza telomerami, występują również przycentromerowo w chromosomie 1 [47].

Podczas gdy sekwencje telomerowe roślin są wysoce konserwatywne, to sekwencje przy-telomerowe są bardzo zróżnicowane. U *Arabidopsis* stwierdzono występowanie pojedynczych sekwencji przylegających do telomerów. U gatunków z większym genomem, duże bloki tandemowo powtarzalnych sekwencji w subterminalnych odcinkach chromosomów stwierdzono u jęczmienia [7], żyta [1], pomidora [25], ryżu [41]. Sekwencje te są na ogół gatunkowo lub rodzajowo specyficzne i wykazują zmienność między nawet blisko spokrewnionymi gatunkami lub liniami, co wskazuje na ich rolę w specjacji [7]. U żyta opisano trzy, niehomologiczne, powtarzalne rodziny sekwencji DNA (pSc119.2, pSc200 i pSc250), które występują tandemowo w heterochromatynie przy-telomerowej (prążki C) i stanowią około 12–18% genomu [55]. Za pomocą hybrydyzacji *in situ* stwierdzono, że najbardziej terminalnie w heterochromatynie zlokalizowana jest sekwencja pSc200, a pSc119.2 – najbardziej proksymalnie [51].

## ORGANIZATOR JĄDERKOWY I GENY rRNA

W odróżnieniu od centromerów i telomerów, organizator jąderkowy nie jest stałą domeną każdego chromosomu, występuje tylko w niektórych chromosomach zwanych jąderkotwórczymi. Jest to odcinek chromosomu (*Nucleolar Organizing Region* – NOR) zawierający tandemowo ułożone geny rRNA (18S-5,8S-25S), kodujące 45S prerybosomalny RNA.

Geny rRNA są jednymi z najszerzej badanych genów zarówno na poziomie molekularnym, jak i cytogenetycznym [28]. Ich popularność w badaniach wynika z kilku dogodnych cech. Należąc do genów podstawowego metabolizmu (*housekeeping genes*), są obecne we wszystkich komórkach i występują tandemowo w wielu powtórzeniach. Poza tym dostępne klony rDNA mogą być stosowane do badania odległych gatunków ze względu na ich konserwatywny charakter. rDNA

jest dogodnym markerem chromosomów i często jest wykorzystywany w badaniach ewolucji genomów u różnych grup roślin [9, 14].

Dwa rodzaje rDNA, kodujące 5S rRNA i geny 18S-5,8S-25S, są zlokalizowane w genomie niezależnie od siebie. 45S rDNA jest na ogół zlokalizowany w przewężeniu wtórnym chromosomów, zaś 5S rDNA mogą występować w różnych loci wielu chromosomów. Oba rodzaje DNA należą do sekwencji wysoce powtarzalnych występujących tandemowo, w jednym lub wielu loci. Liczba kopii genów, jak i liczba loci jest różna u różnych gatunków roślin, niezależnie od liczby chromosomów i wielkości genomu. I tak na przykład u *Arabidopsis thaliana* ( $2n=10$ ) geny 18S-5,8S-25S rRNA występują w dwóch parach chromosomów, a geny 5S rRNA w trzech parach [29, 40]. U *Brassica campestris* ( $2n=20$ ) zlokalizowane są odpowiednio w pięciu i trzech parach [31], podczas gdy u innego gatunku o tej samej liczbie chromosomów (*Zea mays*,  $2n=20$ ) geny te występują tylko w pojedynczych loci [34].

Każda jednostka rDNA kodująca geny 18S-5,8S-25S rRNA składa się z jednostki transkrypcyjnej i sekwencji nietranskrybowanych, tzw. przerywnikowych [22]. W jednostce transkrypcyjnej wyróżnia się sekwencje odpowiadające genom 18S rRNA, 5,8S rRNA i 25S rRNA oraz sekwencje nie odnajdywane w dojrzałych cząsteczkach rRNA oznaczane jako ETS (*external transcribed spacer*) i ITS (*internal transcribed spacer*). Długość jednostki rDNA i liczba kopii może być różna u różnych gatunków, poszczególnych osobników czy nawet w obrębie locus. Różnice te spowodowane są głównie przez odmienną długość sekwencji przerywnikowych. Podobnie 5S rDNA składa się z jednostek transkrybowanych i nietranskrybowanych, których długość i liczba kopii może być różna między chromosomami tego samego genomu. Sekwencje kodujące geny rRNA wykazują wysoki stopień homologii nawet między odległymi ewolucyjnie gatunkami, podczas gdy pozostałe sekwencje jednostki rDNA mogą charakteryzować się dużą zmiennością i są specyficzne gatunkowo. rDNA jest dobrym markerem chromosomów wykorzystywanym w badaniach przemian chromosomowych w procesach specjacji czy w programach hodowlanych roślin [28].

## ELEMENTY RUCHOME GENOMU – RETROTRANSPOZONY

Ruchomymi elementami najpowszechniej występującymi i stanowiącymi istotny składnik genomu roślinnego są retrotranspozony. U kukurydzy około 50% jądrowego DNA stanowią retrotranspozony [36]. Różnią się one od innych ruchomych elementów zdolnością do transpozycji przez RNA i odwrotną transkrypcją do DNA w wyniku działania odwrotnej transkryptazy. Wyróżnia się retrotranspozony LTR



(*long terminal repeat*) i non-LTR. Do najbardziej charakterystycznych LTR retrotranspozonów można zaliczyć grupę *Ty1-copia*, nazwaną tak ze względu na podobieństwo do najlepiej poznanych ruchomych elementów u *Saccharomyces cerevisiae* (*Ty*) i *Drosophila melanogaster* (*copia*) [23].

Kilka rodzajów ruchomych elementów, które są typu retrotranspozonów, zostało zidentyfikowanych u *Arabidopsis thaliana*, wśród nich rodziny *Ta* i *Athila* [57]. Innym ruchomym elementem opisanym u roślin ekotypu Landsberg *erecta* jest *Tag1*, obecny w dwóch kopiach. Stwierdzono, że sekwencja ta występuje tylko u niektórych ekotypów *Arabidopsis thaliana*, ale opisano ją również u czterech innych gatunków *Arabidopsis* [5].

Rozmieszczenie i amplifikacja retrotranspozonów odgrywa istotną rolę w ewolucji genomu roślinnego. Wiele retrotranspozonów jest sekwencjami flankującymi geny, co świadczy o ich wcześniejszej insercji i wskazuje na ich potencjalną rolę w procesach ewolucji danego gatunku [56].

Jedną z pierwszych sekwencji typu retrotranspozonów, zlokalizowanych w chromosomach na drodze hybrydyzacji *in situ* była *BAS1* wyizolowana z jęczmienia, gdzie stanowi około 5% genomu. Jest ona również obecna w genomie pszenicy i żyta. Sekwencja ta hybrydująca raczej z euchromatynowymi odcinkami niż heterochromatynowymi, jest rozproszona wzdłuż chromosomów z wyjątkiem regionów centromeru, telomerów i przewężenia wtórnego [38].

U innych gatunków, hybrydyzacja *in situ* wykazała rozproszenie retrotranspozonów typu *Ty1-copia* wzdłuż chromosomów, raczej w odcinkach euchromatynowych niż heterochromatynowych (*Vicia faba* [43], jęczmień [53], owies [21], *Pinus elliotti* [19], żyto [42]). Wyjątek stanowi *Allium cepa*, gdzie elementy te preferencyjnie związane są z terminalną heterochromatyną wszystkich chromosomów [42], a u *Arabidopsis thaliana* z heterochromatyną centromerową [8, 44]. Liczba kopii retrotranspozonów nie jest skorelowana z wielkością genomu. U *Vicia faba* (1C = 13,3 pg) stwierdzono ok.  $10^6$  kopii sekwencji typu *Ty1-copia*, podczas gdy u innego gatunku o nieco mniejszym genomie, *Vicia melanops* (1C = 11,5 pg) występuje około 1000 kopii [43].

U buraka cukrowego (*Beta vulgaris*) zlokalizowano w drodze FISH retrotranspozony typu LTR – sekwencje *Tbv* typu *Ty-copia* i homologiczną do LINEs rodzinę sekwencji – *BNR1*. *Tbv* i *BNR1* hybrydują ze wszystkimi chromosomami buraka, z wyjątkiem centromeru, subtelerowych odcinków i NOR. Podwójna hybrydyzacja wykazała mały stopień kolokalizacji tych dwóch typów sekwencji. Hybrydyzacja *Tbv* była bardziej równomierna niż *BNR1*, która tworzy skupienia sygnałów, często w odcinkach bogatych w pary AT, tj. DAPI pozytywnych [49].

## GENY OBECNE W POJEDYNCZYCH KOPIACH

Geny w genomie występują najczęściej w pojedynczych lub kilku kopiach. Lokalizowane są w chromosomach na podstawie analizy genetycznej przy wykorzystaniu częstotliwości rekombinacji w mejozie. Tym sposobem są tworzone mapy genetyczne chromosomów dla poszczególnych gatunków. Odległości między zlokalizowanymi genami odpowiadają częstotliwości rekombinacji, a jednostką jest centi-Morgan (cM) równy 1 procentowi *crossing-over*. Inne są mapy cytogenetyczne. Przedstawiają one chromosomy metafazowe z zaznaczeniem ich cech morfologicznych, takich jak: długość, położenie centromeru, wielkość i rodzaj prążków. Rozwój cytogenetyki molekularnej, a szczególnie metody hybrydyzacji *in situ* pozwala określać w chromosomach położenie różnych sekwencji DNA, w tym genów. Geny występujące w wielu kopiach tandemowo są łatwe do wykrycia w drodze hybrydyzacji *in situ*, gdyż reprezentują duże odcinki DNA, należą do nich wcześniej omówione geny rRNA. Jednak ukazuje się coraz więcej doniesień o lokalizacji w chromosomach roślinnych genów występujących w pojedynczych kopiach. Metodą wiodącą w cytogenetycznym mapowaniu genów jest fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH), a ostatnio PCR-FISH, w której łańcuchową reakcją polimerazy wykorzystuje się do lokalizacji poszukiwanej sekwencji DNA i jednocześnie amplifikacji sygnałów [26, 27, 54]. Położenie tych genów odpowiada ich rzeczywistej, fizycznej lokalizacji w chromosomie, która może istotnie różnić się od położenia tego genu na mapie genetycznej.

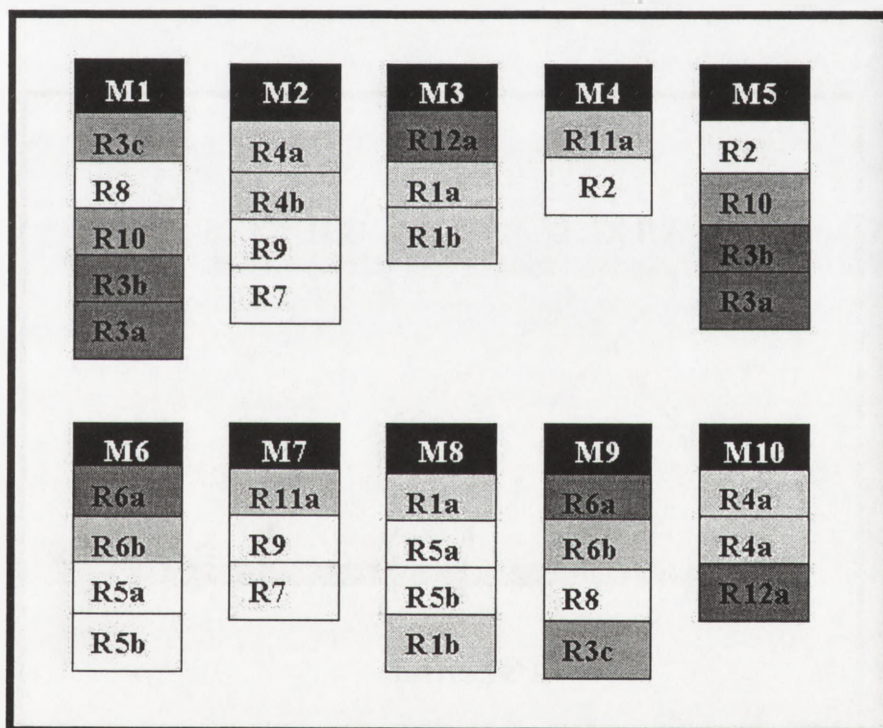
Zależności między genetycznymi i fizycznymi odległościami w genomie oblicza się na podstawie wielkości genomu i długości mapy genetycznej. Jednostka rekombinacyjna może odpowiadać od 10 do 100 000 kbp w zależności od regionu chromosomu i gatunku. U pomidora średnio 1 cM odpowiada 750 kbp, natomiast w pobliżu centromeru chromosomu 9, 1cM odpowiada 4 Mbp [13]. Wynika to z nierównomiernego zachodzenia *crossing-over* wzdłuż chromosomów. Niska częstotliwość rekombinacji występuje szczególnie przy centromerze i regionach zawierających heterochromatynę. Ogólnie można stwierdzić, że odcinki dystalne ramion chromosomów zawierają więcej genów niż odcinki proksymalne [16].

## UKŁAD GENÓW – SYNTENIA

W ostatnim czasie w badaniach genomu roślinnego stosowana jest częściej identyfikacja i mapowanie różnic w chromosomalnym DNA niż mapowanie genów, oparte na różnicach fenotypowych. Polimorfizm DNA może być wykrywany na podstawie długości fragmentów restrykcyjnych (RLFP) lub amplifikacji DNA z wykorzystaniem PCR, metodą RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) czy

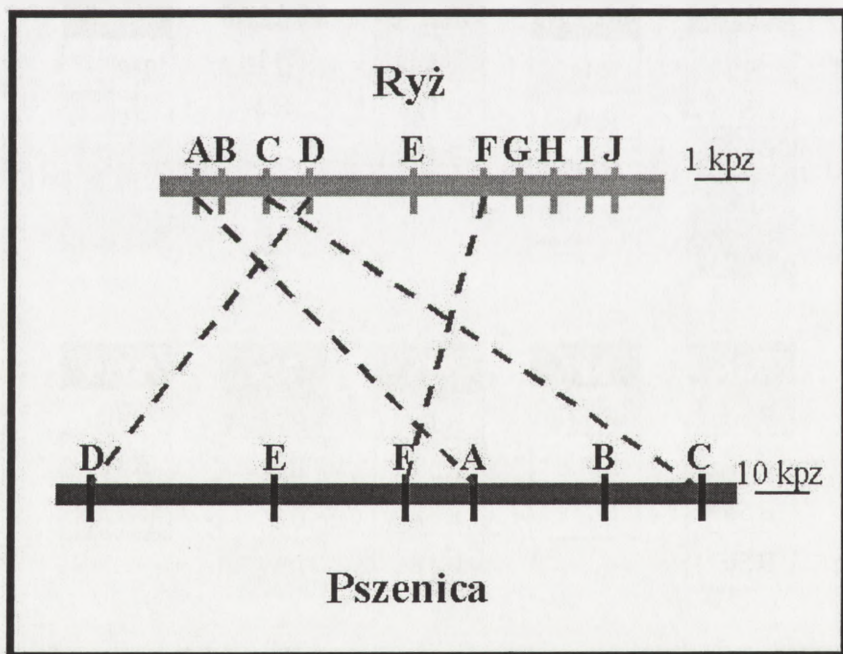
AFLP (*amplified fragment length polymorphism*). Sekwencje DNA, wykorzystywane w tych badaniach jako markery molekularne, nie muszą być sekwencjami transkrybowanymi, ale powinny być obecne w genomie w pojedynczej lub kilku kopiach. O stopniu polimorfizmu DNA decyduje zawartość jądrowego DNA, szczególnie sekwencji powtarzalnych, obecność transpozonów lub krótkich sekwencji występujących tandemowo, takich jak minisatelity. Przyczyną polimorfizmu może być również metylacja cytozyny czy inna modyfikacja DNA [12]. Stopień polimorfizmu molekularnego różni się istotnie między gatunkami. Na przykład kukurydza jest bardzo polimorficzna, podczas gdy pomidor wykazuje tylko niewielki polimorfizm.

Porównując mapy RFLP wielu gatunków roślin wykazano, że zadziwiająco duże fragmenty genomów pozostały niezmienione w czasie ewolucji. Duży stopień homologii stwierdzono między gatunkami w obrębie takich rodzin, jak: *Gramineae*, *Solanaceae* lub *Brassicaceae*. Dotyczy to głównie genów, a nie niekodujących sekwencji DNA, podlegających szybkim przemianom w czasie ewolucji. Homologiczne fragmenty genomu pomidora i ziemniaka wskazują na zachowanie kolejności genów podczas specjacji ze wspólnego ancestralnego przodka dla rodziny



RYSUNEK 3. Syntenia, dziesięć chromosomów kukurydzy (M) złożonych z segmentów opowiadających grupom sprzężeń ryżu (R), wg [37], zmodyfikowane

*Solanaceae*. Podobnie, u dość odległych gatunków, jakimi są kukurydza i ryż, sekwencje cDNA w chromosomie 9 kukurydzy mają taki sam układ, jak w chromosomie 6 i 3 ryżu, a sekwencje w chromosomie 1 ryżu, taki jak w 3 i 8 kukurydzy. Na podstawie porównania map RFLP uprawnych gatunków traw (ryż, pszenica, kukurydza, trzcina cukrowa i inne) wykazano, że jeżeli chromosomy ryżu podzieli się na segmenty odpowiadające grupom sprzężeń, to można z nich, jak z klocków lego, ułożyć mapy genetyczne pszenicy, kukurydzy (rys. 3) i innych zbóż, a również istnieje możliwość rekonstruowania układu genów w odległym ancestralnym przodku dla danych gatunków. Zawartość DNA w poszczególnych segmentach może się zmieniać podczas specjacji na skutek amplifikacji lub delecji powtarzalnych sekwencji DNA. Wynika z tego, że genomy różnych gatunków nie są wynikiem przypadkowych przemian ewolucyjnych, ale wynikiem pęknięć i fuzji w specyficznych miejscach chromosomu. Nie wyklucza to oczywiście wystąpienia różnego typu przemian prowadzących to inwersji, delecji czy duplikacji segmentów chromosomów (rys. 4) [37, 39]. Porównawcze badania genomów *Arabidopsis thaliana* i gatunków *Brassica* wykazały obecność kilku niezmienionych w czasie specjacji segmentów, które są obecne w jednej kopii w genomie *Arabidopsis thaliana* i w trzech kopiach w genomie diploidalnego gatunku *Brassica nigra* [24].



RYSUNEK 4. Hipotetyczne segmenty chromosomów ryżu i pszenicy pokazujące zachowany układ genów i przemiany, jakie zaszły podczas ewolucji (wg [12] zmienione)

Poznanie podobieństwa w układzie genów między gatunkami dostarczyło wielu nowych informacji o genomie i stwarza nowe możliwości badawcze. Możliwe jest, między innymi, przewidywanie struktury i położenia genów warunkujących określoną cechę danego gatunku na podstawie informacji o lokalizacji tego genu u lepiej zmapowanego gatunku. Gen zmapowany i wyizolowany z gatunku o małym genomie, często określanego jako gatunek modelowy, może być łatwo zlokalizowany w drodze homologii w innych gatunkach. Takim gatunkiem modelowym jest *Arabidopsis* dla *Brassicaceae* lub ryż dla *Gramineae*. Ta sama sekwencja DNA (gen) może być wykorzystywana do lokalizacji genów u wielu innych gatunków, często odległych systematycznie. Znajomość syntenii umożliwia również szybkie tworzenie map genetycznych dla różnych gatunków w obrębie określonej grupy taksonomicznej. Porównawcze badania genomów różnych gatunków roślin, zarówno na poziomie molekularnym jak i chromosomowym, otwierają nowe możliwości poznawcze i powinny przybliżyć zrozumienie zależności między funkcją genu i organizacją genomu.

## LITERATURA

- [1] BEDBROOK JR, JONES J, O'DELL M, THOMPSON RD, FLAVELL RB. Molecular characterisation of telomeric heterochromatin in *Secale* species. *Cell* 1980; **19**: 545–560.
- [2] BENNETT MD. The duration of meiosis. *Proc R Soc Lond B* 1971; **178**: 277–299.
- [3] BENNETT MD. Plant genome values: how much do we know? *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 2011–2016.
- [4] BENNETT MD, LEITCH I. Nuclear DNA amounts in Angiosperms. *Ann Bot* 1995; **76**: 113–176.
- [5] BHATT AM, LISTER C, CRAWFORD N, DEAN C. The transposition frequency of *Tag1* elements is increased in transgenic *Arabidopsis* lines. *The Plant Cell* 1998; **10**: 427–434.
- [6] BIESSMANN H, MASON JM. Telomere maintenance without telomerase. *Chromosoma* 1997; **106**: 63–69.
- [7] BRANDES A, RODER MS, GANAL MW. Barley telomeres are associated with two different types of satellite DNA sequences. *Chrom Research* 1995; **3**: 315–320.
- [8] BRANDES A, THOMPSON H, DEAN C, HESLOP-HARRISON JS. Multiple repetitive DNA sequences in the paracentromeric regions of *Arabidopsis thaliana* L. *Chrom Research* 1997; **5**: 338–346.
- [9] CASTILHO A, HESLOP-HARRISON JS. Physical mapping of 5S and 18S-25S rDNA and repetitive DNA sequences in *Aegilops umbellulata*. *Genome* 1995; **38**: 91–96.
- [10] DEVOS KM, GALE MD. Comparative genetics in the grasses. *Plant Mol Biol* 1997; **35**: 3–15.
- [11] DONG F, MILLER JT, JACKSON SA, WANG G-L, RONALD PC, JIANG J. Rice (*Oryza sativa*) centromeric regions consist of complex DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 8135–8140.
- [12] FLAVELL RB, DEAN C, MOORE G. Exploring plant genomes, small and large. The Chromosome, HESLOP-HARRISON JS, FLAVELL RB [Ed.], BOIS, Oxford, 1993; 249–264.
- [13] FRARY A, PRESTING GG, TANKSLEY SD. Molecular mapping of the centromeres of tomato chromosomes 7 and 9. *Mol Gen Genet* 1996; **250**: 295–304.

- [14] GALASSO I, BLANCO A, KATSIOTIS A, PIGNONE D, HESLOP-HARRISON JS. Genomic organization and phylogenetic relationships in the genus *Dasypyrum* analysed by Southern and *in situ* hybridization of total genomic and cloned DNA probes. *Chromosoma* 1995; **106**: 53–61.
- [15] GALASSO I, SCHMIDT T, PIGNONE D, HESLOP-HARRISON JS. The molecular cytogenetics of *Vigna unguiculata* (L.) Walp: the physical organization and characterization of 18S-5.8S-25S rRNA genes, 5S rRNA genes, telomere-like sequences, and a family of centromeric repetitive DNA sequences. *Theor Appl Genet* 1995; **91**: 928–935.
- [16] GILL KS, GILL BS, ENDO TR. A chromosome region-specific mapping strategy reveals gene-rich telomeric ends in wheat. *Chromosoma* 1993; **102**: 374–381.
- [17] HARRISON GE, HESLOP-HARRISON JS. Centromeric repetitive DNA sequences in the genus *Brassica*. *Theor Appl Genet* 1995; **90**: 157–165.
- [18] JOHNSON MAT, KENTON AY, BENNETT MD, BRANDHAM PE. *Voanioala gerardii* has the highest known chromosome number in the monocotyledons. *Genome* 1989; **32**: 328–333.
- [19] KAMM A, DOUDRICK RL, HESLOP-HARRISON JS, SCHMIDT T. The genomic and physical organization of *Tyl-copia*-like sequences as a component of large genomes in *Pinus elliotii* var. *elliottii* and other gymnosperms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 2708–2713.
- [20] KAMM A, GALASSO I, SCHMIDT T, HESLOP-HARRISON JS. Analysis of a repetitive DNA family from *Arabidopsis arenosa* and relationships between *Arabidopsis* species. *Plant Mol Biol* 1995; **27**: 853–862.
- [21] KATSIOTIS A, SCHMIDT T, HESLOP-HARRISON JS. Chromosomal and genomic organization of *Tyl-copia*-like retrotransposon sequences in the genus *Avena*. *Genome* 1996; **39**: 410–417.
- [22] KLYSZEJKO-STEFANOWICZ L. Cytobiochemia. PWN, Warszawa, 1995.
- [23] LABRADOR M, CORCES VG. Transposable element-host interactions: regulation of insertion and excision. *Annu Rev Genet* 1997; **31**: 381–404.
- [24] LAGERCRANTZ U. Comparative mapping between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica nigra* indicates that *Brassica* genomes have evolved through extensive genome replication accompanied by chromosome fusions and frequent rearrangements. *Genetics* 1998; **150**: 1217–1228.
- [25] LAPITAN NLV, GANAL MW, TANKSLEY SD. Somatic chromosome. Karyotype of tomato based on *in situ* hybridization of the TGR I satellite repeat. *Genome* 1989; **32**: 992–998.
- [26] LEHLER H, BUSCH W, MARTIN R, HERRMANN RG. Localization of the B-hordein locus on barley chromosomes using fluorescence *in situ* hybridization. *Chromosoma* 1993; **102**: 428–432.
- [27] LEITCH IJ, HESLOP-HARRISON JS. Physical mapping for four sites of 5S rDNA sequences and one side of the alfa-amylase gene in barley (*Hordeum vulgare*). *Genome* 1993; **36**: 517–523.
- [28] MAŁUSZYŃSKA J, HASTEROK R, WEISS H. rRNA genes – their distribution and activity in plants. Plant Cytogenetics, MAŁUSZYŃSKA J [ed.], Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego, Katowice, 1998; 75–95.
- [29] MAŁUSZYŃSKA J, HESLOP-HARRISON JS. Localization of tandemly repeated DNA sequences in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant J* 1991; **1**(2): 159–166.
- [30] MAŁUSZYŃSKA J, HESLOP-HARRISON JS. Molecular cytogenetics of the genus *Arabidopsis*: *In situ* localization of rDNA sites, chromosome numbers and diversity in centromeric heterochromatin. *Ann Bot* 1993a; **71**: 479–484.
- [31] MAŁUSZYŃSKA J, HESLOP-HARRISON JS. Physical mapping of rDNA loci in *Brassica* species. *Genome* 1993b; **36**: 774–781.
- [32] MAŁUSZYŃSKA J, SCHWEIZER D. B chromosomes of *Crepis capillaris*: structure and behaviour. 1st B-Chromosome Conference, Universidad Autonoma, Madrid, 1993; 52.
- [33] MARTINEZ-ZAPATER JM, ESTELLE MA, SOMERVILLE CR. A highly repeated DNA sequence in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* 1986; **204**: 417–423.

- [34] MCMULLEN MD, PHILLIPS RL, RUBENSTEIN I. Molecular analysis of the nucleolus organizer region in maize. Chromosome Engineering in Plants: Genetics, Breeding, Evolution, Gupta PK, Tsuchiya T [Ed.], Elsevier, Amsterdam-Oxford- New York, 1991; 561–576.
- [35] MEYEROWITZ EM. Structure and organization of *Arabidopsis thaliana* nuclear genome. *Arabidopsis*, Meyerowitz EM, Somerville CHR [ed.], CSHL Press, New York, 1994;
- [36] MILLER JT, DONG F, JACKSON SA, SONG J, JIANG J. Retrotransposon-related DNA sequences in the centromeres of grass chromosomes. *Genetics* 1998; **150**: 1615–1625.
- [37] MOORE G, ARAGON-ALCAIDE L, ROBERTS M, READER S, MILLER T, FOOTE T. Are rice chromosomes components of a holocentric chromosome ancestor? *Plant Mol Biol* 1997; **35**: 17–23.
- [38] MOORE G, CHEUNG W, SCHWARZACHER T, FLAVELL R. BIS 1, a major component of the cereal genome and a tool for studying genomic organization. *Genomics* 1991; **10**: 469–476.
- [39] MOORE G, DEVOS KM, WANG Z, GALE MD. Grasses, line up and form a circle. *Current Biology* 1995; **5**: 737–739.
- [40] MURATA M, HESLOP-HARRISON JS, MOTOYOSHI F. Physical mapping of the 5S ribosomal RNA genes in *Arabidopsis thaliana* by multi-color fluorescence *in situ* hybridization with cosmid clones. *The Plant J* 1997; **12**: 31–37.
- [41] OHMIDO N, FUKUI K. Visual verification of close disposition between a rice A genome-specific DNA sequence (TrsA) and the telomere sequence. *Plant Mol Biol* 1997; **35**: 963–968.
- [42] PEARCE SR, HARRISON G, HESLOP-HARRISON JS, FLAVELL AJ, KUMAR A. Characterization and genomic organization of *Tyl-copia* group retrotransposons in rye (*Secale cereale*). *Genome* 1997; **40**: 617–625.
- [43] PEARCE SR, HARRISON G, LI D, HESLOP-HARRISON JS, KUMAR A, FLAVELL AJ. The *Tyl-copia* group retrotransposons in *Vicia* species: copy number, sequence heterogeneity and chromosomal localisation. *Mol Gen Genet* 1996; **250**: 305–315.
- [44] PELISSIER T, TUTOIS S, TOURMENTE S, DERAGONE JM, PICARD G. DNA regions flanking the major *Arabidopsis thaliana* satellite are principally enriched in *Athila* retroelement sequences. *Genetica* 1996; **97**: 141–151.
- [45] PRICE HJ, JOHNSTON JS. Influence of light on DNA content of *Heliantus annuus* Linnaeus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 11264–11267.
- [46] RICHARDS EJ, AUSUBEL FM. Isolation of higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 1988; **53**: 127–136.
- [47] RICHARDS EJ, CHAO S, VONGS A, YANG J. Characterization of *Arabidopsis thaliana* telomeres isolated in yeast. *Nucleic Acids Res* 1992; **20**: 4039–4046.
- [48] SAKOWICZ T. Sekwencje mikrosatelitarne w genomach roślin. *Post Biol Kom* 1997; **24**: 81–92.
- [49] SCHMIDT T, KUBIS S, HESLOP-HARRISON JS. Analysis and chromosomal localization of retrotransposon in sugar beet (*Beet vulgaris* L.): LINEs and *Tyl-copia*-like elements as major components of the genome. *Chrom Research* 1995; **3**: 335–345.
- [50] SCHUBERT I. Telomeric polymorphism in *Vicia faba*. *Biol Zentralbl.* 1992; **111**: 164–168.
- [51] SCHWARZACHER T. The physical organization of *Triticeae* chromosome. Unifying Plant Genomes, Heslop-Harrison JS [ed.], Cambridge, 1996; 71–75.
- [52] SCHWARZACHER T, HESLOP-HARRISON JS. *In situ* hybridization to plant telomeres using synthetic oligomers. *Genome* 1991; **34**: 317–323.
- [53] SUONIEMI A, ANAMTHAWAT-JONSSON K, ARNA T, SCHULMAN AH. Retrotransposon *BARE-1* is a major, dispersal component of the barley (*Hordeum vulgare* L.) genome. *Plant Mol Biol* 1996; **30**: 1321–1329.
- [54] UCHIUMI T, KUWASHIRO R, MIYAMOTO J, ABE M, HIGASHI S. Detection of the leghemoglobin gene on two chromosomes of *Phaseolus vulgaris* by *in situ* PCR linked-fluorescent *in situ* hybridization (FISH). *Plant Cell Physiol* 1998; **39**: 790–794.

- [55] VERSHININ AV, SCHWARZACHER T, HESLOP-HARRISON JS. The large-scale genomic organization of repetitive DNA families at the telomeres of rye chromosomes. *The Plant Cell* 1995; **7**: 1823–1833.
- [56] WHITE SE, HABERA LF, WESSLER SR. Retrotransposons in the flanking regions of normal plant genes: a role for *copia*-like elements in the evolution of gene structure and expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 11792–11796.
- [57] WRIGHT DA, VOYTAS DF. Potential retroviruses in plants: Tat1 is related to a group of *Arabidopsis thaliana* Ty3/gypsy retrotransposons that encode envelope-like proteins. *Genetics* 1998; **149**: 703–715.

*Redaktor prowadzący – Maria Olszewska*

*Otrzymano: 23.02.1999 r.*

*Przyjęto: 29.03.1999 r.*

*Adres autora: Jagiellońska 28, 40-032 Katowice*

*e-mail: maluszyn@us.edu.pl*



# AKTYWNOŚĆ FIZJOLOGICZNO-BIOCHEMICZNA POLIAMIN W ADAPTACJI ROŚLIN DO STRESÓW

## PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ACTIVITY OF POLYAMINES IN PLANT ADAPTATION TO STRESSES

Romuald CZERPAK, Andrzej BAJGUZ

Zakład Biochemii, Instytut Biologii, Uniwersytet w Białymstoku

*Streszczenie:* Z przeprowadzonych badań na niektórych uprawnych roślinach naczyniowych wynika, że pod wpływem różnorodnych stresów zmienia się zawartość i aktywność fizjologiczno-biochemiczna poliamin: putrescyny, spermidyny i sperminy oraz enzymów bezpośrednio związanych z ich biosyntezą. Mechanizmy działania poliamin w adaptacji do stresów i obronie roślin przed szkodliwym ich działaniem na poziomie molekularnym komórek są poznane w niewielkim stopniu z powodu ich złożonego charakteru działania na procesy fizjologiczno-metaboliczne. Dotychczas pod wpływem stresów najlepiej poznano zmiany w metabolizmie i aktywności regulacyjnej poliamin na różnych etapach ekspresji genów kodujących enzymy bezpośrednio związane z ich biosyntezą.  
(*Postępy Biologii Komórki 1999; 26: 523–538*)

*Słowa kluczowe:* poliaminy, putrescyna, spermidyna, spermina, stresy, dekarboksylazy: argininowa i ornitynowa.

*Summary:* From the investigations conducted on some cultivation vascular plants it appears that under influence of various stresses, the content and physiological and biochemical activity of polyamines change: putrescine, spermidine and spermine and enzymes immediately connected with their biosynthesis. Mechanisms of the activity of polyamines in adaptation to stresses and defence of plants before harmful their activity on the level of molecular cells are recognized to a small degree on account of complicated character of activity on physiological and biochemical processes. Till now under the influence of stresses one best recognized changes in metabolism and regulatory activities of polyamines in different stages of expression of genes coding enzymes immediately connected with their biosynthesis.  
(*Advances in Cell Biology 1999; 26: 523–538*)

*Key words:* polyamines, putrescine, spermidine, spermine, stresses, arginine and ornithine decarboxylases.

*Wykaz skrótów:* **ABA** – kwas abscysynowy; **SA** – kwas salicylowy; **Put** – putrescyna; **Spd** – spermidyna; **Spm** – spermina; **IP<sub>3</sub>** – trifosfoinozytol; **DAG** – diacyloglicerol; **ADC** – dekarboksylaza argininowa;

**ODC** – dekarboksylaza ornitynowa; **LDC** – dekarboksylaza lizynowa; **TMV** – wirus mozaiki tytoniowej; **HR** – reakcja nadwrażliwości; **SAR** – reakcje systemicznej odporności.

## WSTĘP

Wszystkie rośliny żyjące w naturalnych warunkach środowiska i uprawiane przez ludzi, podobnie jak zwierzęta, są ciągle narażone na działanie różnorodnych czynników stresowych o charakterze biotycznym i abiotycznym typu chemicznego bądź fizycznego. Czynniki stresowe, zwłaszcza o dużym natężeniu i długotrwałym działaniu powodują w organizmie odwracalne bądź nieodwracalne zmiany w strukturze i procesach fizjologiczno-metabolicznych komórek, częściowo o charakterze adaptacyjnym i zwiększającym odporność na dalsze ich szkodliwe działanie. W przypadku roślin tego typu reakcje biochemiczne zwiększające odporność na stresse abiotyczne nazwano aklimatyzacją [1, 20].

Pod działaniem czynników stresowych dochodzi do istotnych zmian w strukturze błon komórkowych i ich organelli oraz następuje aktywacja lub inhibicja bądź modyfikacja wielu szlaków metabolicznych, co w efekcie prowadzi do zmian w ekspresji licznych genów i syntezie białek. Tego rodzaju zmiany w strukturze i procesach fizjologiczno-biochemicznych komórek pod wpływem czynników stresowych stanowią odpowiedź roślin i innych mikro- i makroorganizmów na ich drastyczne działanie w celu lepszego dostosowania się bądź przetrwania ich w szkodliwych warunkach środowiska. W mechanizmach adaptacyjnych organizmów do niekorzystnych lub stresowych czynników środowiska ważną rolę spełniają niektóre hormony, np. u roślin: kwas abscysynowy (ABA), etylen, jasmoniany oraz niektóre fenolokwasy, takie jak: kwas salicylowy (SA) i poliaminy. U roślin pod działaniem stresów z reguły dochodzi do znacznego obniżenia w nich ilości fitohormonów stymulujących wzrost i metabolizm, tj. auksyn, cytokinin i giberelin, przy jednoczesnym dużym wzroście poziomu hormonów z grupy: ABA, etylenu i jasmonianów [8, 19, 20, 30, 32].

## AKTYWNOŚĆ MORFOGENETYCZNA I FIZJOLOGICZNO-BIOCHEMICZNA POLIAMIN

W ostatnich latach pojawia się coraz więcej publikacji dotyczących aktywności biochemicznej poliamin, najczęściej putrescyny, sperminy i spermidyny, przy różnego rodzaju stresach abiotycznych oraz biotycznych spowodowanych infekcjami wirusowymi. Poliaminy są polikationowymi związkami azotowymi powszechnie występującymi u wszystkich organizmów pro- i eukariotycznych, należącymi do

specyficznej grupy komórkowych regulatorów wzrostu, rozwoju i metabolizmu, zasadniczo różniącymi się w swoim działaniu w porównaniu z typowymi hormonami. Wiadomo, że poliaminy współdziałają z fitohormonami aktywującymi wzrost i metabolizm roślin, głównie auksynami, cytokininami i giberelinami, przez bezpośrednie lub pośrednie oddziaływanie na wiele procesów fizjologiczno-biochemicznych komórek, zwłaszcza tkanek intensywnie rosnących, takich jak: twórcza, rozrodcza i miękiszowa [38–40].

Dotychczasowe badania wykazały, że poliaminy współuczestniczą w wielu podstawowych procesach biochemicznych ważnych dla życia, podczas podziałów i wzrostu komórek, głównie w stymulacji syntezy DNA, RNA i białek. Poliaminy za pomocą kationowych, dodatnio naładowanych grup aminowych łatwo tworzą połączenia z ujemnymi grupami cząsteczek, np. fosforanowymi znajdującymi się w DNA, RNA, fosfoproteinach, fosfolipidach i fosfosacharydach, lub karboksylowymi zlokalizowanymi głównie w peptydach, białkach i kwaśnych polisacharydach, co sprzyja zmianom w konformacji makromolekuł i struktur cytomembran, a także w ich aktywności fizjologiczno-biochemicznej [4, 19, 28, 29, 40, 47].

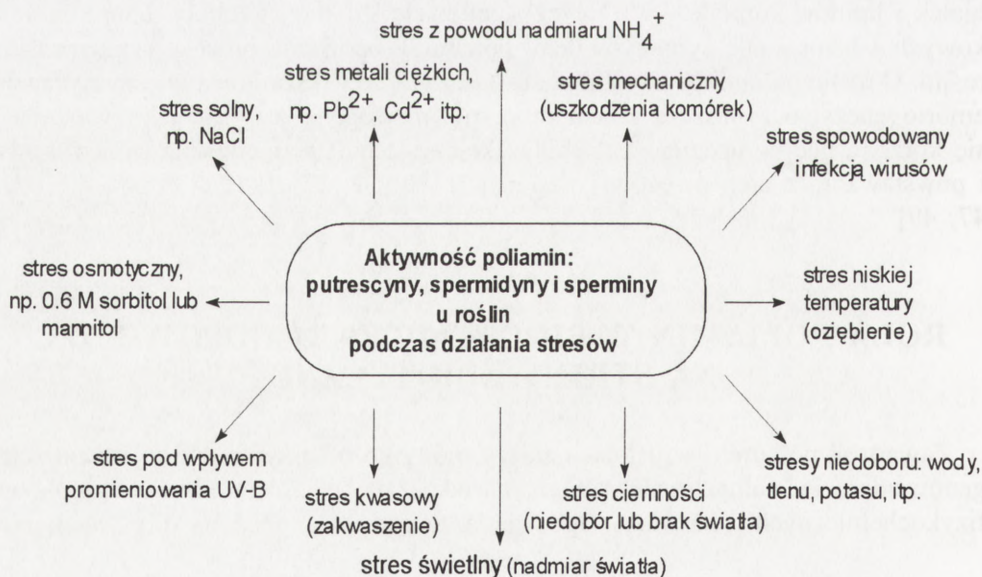
Badania ostatnich lat wskazują na istotną rolę poliamin w regulacji aktywności nie tylko procesów replikacji, transkrypcji i translacji, ale także uczestniczą one w: podziałach komórkowych, przebiegu fotosyntezy, aktywacji kinaz fosforylujących białka: jądrowe, błonowe i obronne oraz w przemianach fosfatydyloinozytoli, stabilności struktury chromatyny i błon komórkowych, w hamowaniu: peroksydacji lipidów i syntezy etylenu oraz w innych przemianach biochemicznych. Stwierdzono również, że spermidyna i spermina mogą aktywować kinazę serynowo-treoninową w obrębie jądra komórkowego, co ma podstawowe znaczenie w regulacji wielu przemian metabolicznych przez reakcje fosforylacji i defosforylacji specyficznych białek i lipidów komórkowych, przez stabilizację struktury i funkcji błon komórkowych i hamowanie syntezy etylenu poliaminy opóźniają procesy starzenia się roślin. U roślin poliaminy aktywnie uczestniczą także w kształtowaniu somatycznej embriogenezy, a zwłaszcza takich procesów morfogenetycznych, jak: tworzenie się korzeni, pędów nadziemnych, bulw, kłączy, cebul, różnicowanie się kwiatów i powstawanie z nich owoców i nasion [10, 15, 19, 27–29, 37, 38, 40, 42, 44, 47, 49].

## **ROLA POLIAMIN W BIOCHEMICZNEJ ODPOWIEDZI NA STRESY ABIOTYCZNE**

Zawartość poliamin w roślinach zależy nie tylko od aktywności odpowiednich genów odpowiedzialnych za ich syntezę, ale także od presji różnorodnych czynników fizykochemicznych środowiska, np. światła, temperatury, odczynu (pH), poziomu

składników mineralnych i wielu innych, zwłaszcza o charakterze toksycznym. Na syntezę i kumulację poliamin w komórkach istotny wpływ mają także czynniki stresowe abiotyczne i biotyczne spowodowane np. infekcją wirusową. Empirycznie wykazano, że wzrost zawartości poliamin i ich aktywność biologiczna w komórkach jest uzależniona w dużym stopniu od działania takich stresów, jak: osmotyczny, solny, świetlny, ciemnościowy, kwasowy, oziębienny, promieniowanie UV-B, metale ciężkie, alkaliczny, np. nadmiar  $\text{NH}_4^+$ , infekcje wirusowe, uszkodzenia struktur subkomórkowych i wielu innych stresorów (rys. 1) [1, 5, 12, 17, 26, 39, 45, 50].

Badania przeprowadzone na roślinach uprawnych, głównie zbożowych, wykazały pod działaniem czynników stresowych intensywny wzrost ilości typowych poliamin: putrescyny, spermidyny i sperminy oraz aktywności enzymów uczestniczących w ich syntezie, zwłaszcza dekarboksylazy argininowej (ADC) prowadzącej do syntezy putrescyny. Wzrost poziomu poliamin w komórkach na działanie czynników stresowych jest jedną z wielu odpowiedzi biochemicznych o charakterze głównie adaptacyjnym i obronnym przed szkodliwym ich wpływem na elementy strukturalne i procesy fizjologiczno-metaboliczne organizmów. W mechanizmach adaptacyjnych i obronnych przed stresami poliaminy przeważnie spełniają rolę pośrednią, a rzadziej bezpośrednią, a ich oddziaływanie na poziomie molekularnym komórek nie jest w pełni wyjaśnione. Tego rodzaju mechanizmy adaptacyjno-obronne mają charakter złożony i uczestniczy w nich poza hormonami i poliaminami cały kompleks innych współdziałających ze sobą metabolitów o funkcji regulacyjnej w ścisłej korelacji z odpowiednimi strukturami subkomórkowymi, które stanowią integralną całość



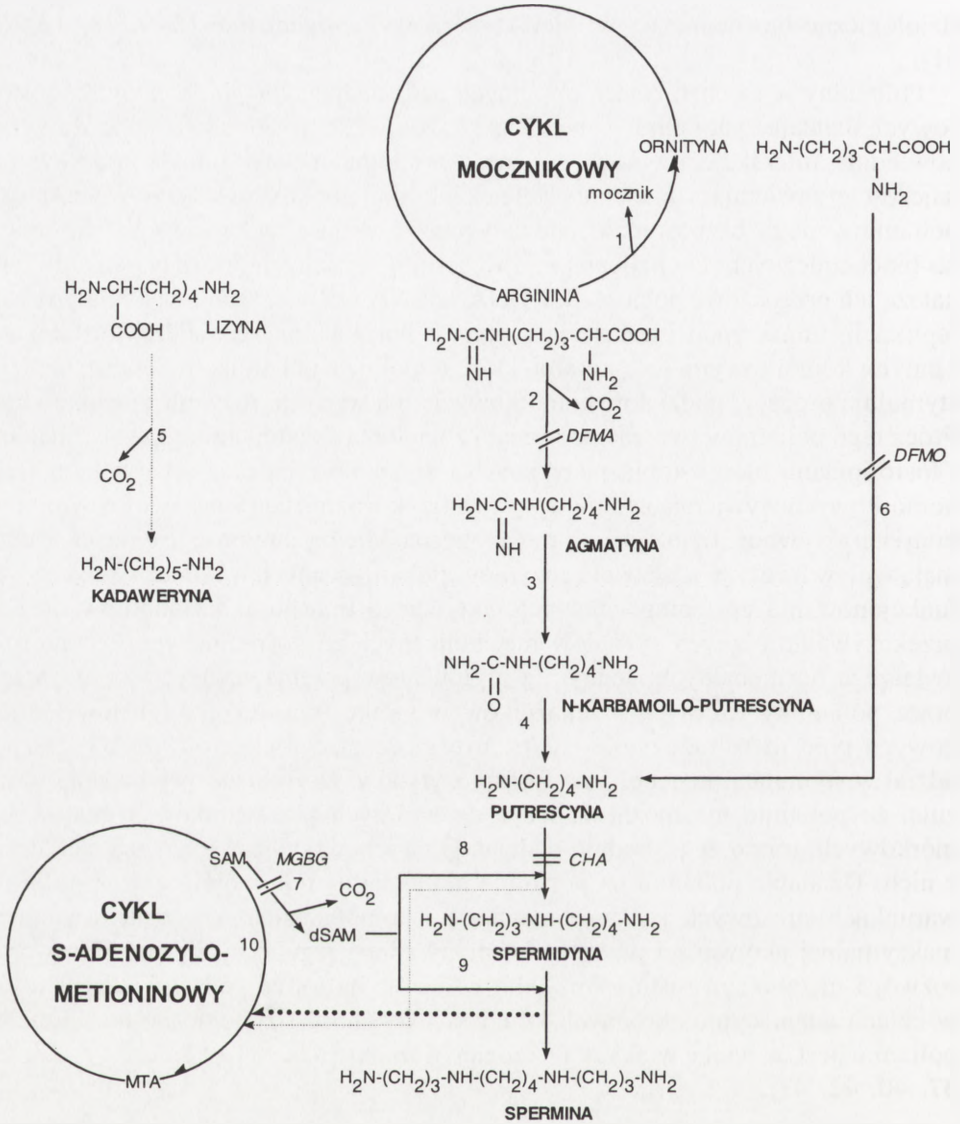
RYSUNEK 1. Rodzaje stresów u roślin, w adaptacji do których aktywnie współuczestniczą poliaminy (na podstawie danych [2,3,5-7,9,11,13,15,16,18,21,23-26,31,32,35,36,41,43,45,46,48,50-52])

fizjologiczno-biochemiczną w wielokomórkowym organizmie [2, 9, 10, 16, 23, 51].

Poliaminy w mechanizmach obronnych bądź adaptacyjnych do czynników stresowych działając jako alifatyczne związki azotowe, polikationowe wchodzą w odpowiednie interakcje fizykochemiczne z wieloma metabolitami komórkowymi, najczęściej zawierającymi ujemny ładunek lub silnie spolaryzowanymi. W ten sposób poliaminy mogą bezpośrednio oddziaływać na zmiany w procesach fizjologiczno-biochemicznych. Do najlepiej i najwcześniej poznanych oddziaływań tego typu należą ich przejściowe połączenia z DNA, mRNA i tRNA, które aktywują procesy: replikacji, transkrypcji i translacji, a także z hormonami, specyficznymi białkami i innymi komórkowymi receptorami, które wspólnie z poliaminami jeszcze bardziej stymulują procesy: podziałów komórkowych, ich wzrostu, rozwoju i metabolizmu. Prócz tego poliaminy tworząc połączenia z wieloma składnikami, głównie białkami i fosfolipidami błon cytoplazmatycznych i organellowych oraz z pektynami ścian komórkowych wywierają istotny wpływ na fizykochemiczne właściwości cytomembran i ich aktywność fizjologiczno-metaboliczną. Między innymi tego typu połączenia mają wpływ na aktywność wielu enzymów zlokalizowanych w błonach dotyczących funkcjonowania np. pomp jonowych, aktywnego transportu metabolitów oraz na przekazywanie różnych sygnałów metabolicznych za pośrednictwem receptorów, zwłaszcza hormonalnych. Jednym z argumentów przemawiających za aktywacją przez poliaminy wtórnych przekaźników w szlaku transdukcji sygnałów komórkowych typu trifosfoinozytolu ( $IP_3$ ) i być może diacyloglicerolu (DAG) jest ich udział w stymulacji metabolizmu fosfoinozytydów. Dotychczasowe badania wskazują, że poliamin nie można zaliczyć do wtórnych przekaźników sygnałów komórkowych, mimo że pośrednio oddziałują na ich aktywność i syntezę niektórych z nich. Działanie poliamin na poziomie molekularnym komórek, a szczególnie w warunkach stresowych jest wspomagające i komplementarne w celu osiągnięcia maksymalnej aktywności przez fitohormony i inne regulatory stymulujące wzrost rozwój i metabolizm roślin. Wszystko wskazuje na to, że pod wpływem stresów w celach adaptacyjno-obronnych komórek aktywność fizjologiczno-metaboliczna poliamin jest o wiele większa i bardziej wszechstronna [1, 12, 17, 19, 27, 28, 37, 40, 42, 47].

## ZMIANY W METABOLIZMIE POLIAMIN POD WPŁYWEM CHEMICZNYCH STRESÓW

Okazało się, że wiele abiotycznych czynników stresowych (rys. 1) powoduje u roślin istotne zmiany w biosyntezie i zawartości poszczególnych poliamin, tj. putrescyny, spermidyny i sperminy. W celu lepszego poznania bezpośrednich me-

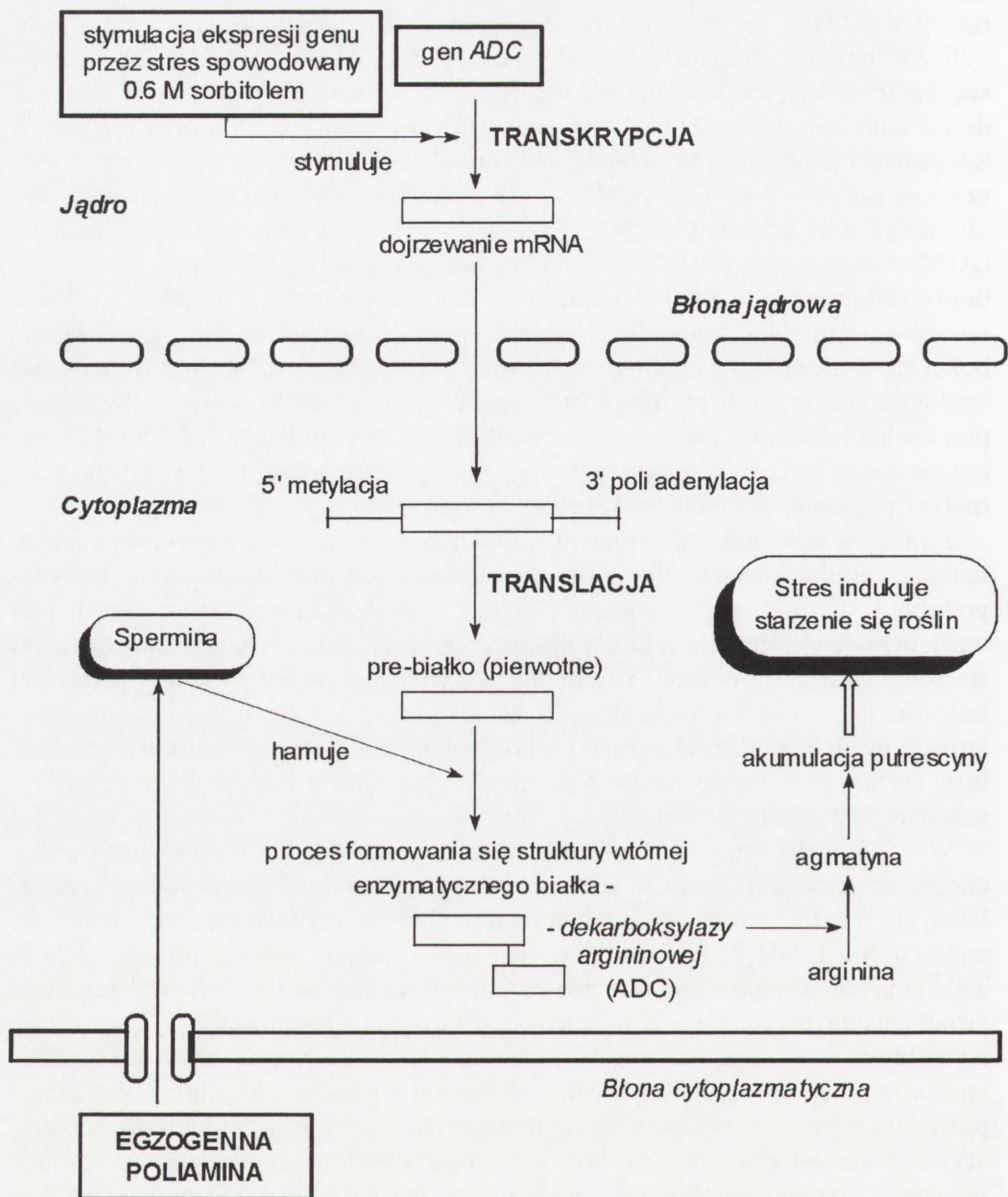


RYSUNEK 2. Szlaki biosyntezy poliamin u roślin z uwzględnieniem możliwości ich regulacji za pomocą inhibitorów enzymatycznych: DFMO – α-difluorometyloornityna, DFMA – α-difluorometyloarginina, MGBG – metyloglioksalo-bis-guanylohydrazon, CHA – cykloheksyloamina (wg [4,10], zmodyfikowany), objaśnienia skrótów: enzymy: 1 – arginaza, 2 – dekarboksylaza argininowa, 3 – iminohydrolaza agmatynowa, 4 – amidohydrolaza N-karbamoilo putrescynowa, 5 – dekarboksylaza lizynowa, 6 – dekarboksylaza ornitynowa, 7 – dekarboksylaza S-adenozylometioninowa, 8 – syntaza spermidynowa, 9 – syntaza sperminowa, 10 – syntaza ACC (ACC – kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksylowy); SAM – S-adenozylometionina, dSAM – dekarboksylowana SAM, MTA – metylotioadenozyna

chanizmów regulujących na szlakach biosyntezy poliamin, będących w ścisłej korelacji z cyklami: mocznikowym i S-adenozylometioninowym zastosowano specyficzne inhibitory enzymatyczne, takie jak: DFMA, DFMO, CHA i MGBG, których szczegółowe miejsca działania przedstawiono na schemacie (rys. 2). Niewiele wiadomo odnośnie mechanizmów regulujących biosyntezę poliamin oraz miejsc ich lokalizacji i działania w strukturach subkomórkowych. Ze schematu przedstawionego na rysunku 2 wynika, że aktywność enzymów bezpośrednio związana z obu alternatywnymi szlakami biosyntezy putrescyny (Put), dekarboksylaz: argininowej (ADC) i ornitynowej (ODC) może być hamowana nieodwracalnie przez antymetabolity: difluorometyloargininę (DFMA) i difluorometyloornitynę (DFMO) działające na zasadzie inhibicji kompetycyjnej. Natomiast aktywność enzymatyczna dekarboksylaz S-adenozylometioninowej i syntazy spermidynowej związanych bezpośrednio z biosyntezą spermidyny (Spd) i sperminy (Spm) jest hamowana odwracalnie przez takie inhibitory, jak: metyloglioksalo-bis-guanylohydrazon (MGBG) i cykloheksaminę (CHA). Stwierdzono, że najbardziej skuteczne jest ich działanie przy małym poziomie poliamin w komórce [4, 10, 40].

Zmiany w metabolizmie poliamin najbardziej drastyczne i analogiczne do działania wyżej omawianych inhibitorów enzymatycznych zachodzą u roślin i prawdopodobnie u mikroorganizmów i zwierząt pod działaniem różnorodnych pod względem fizykochemicznym abiotycznych stresów. Przede wszystkim czynniki stresowe oddziałują w sposób pośredni na szlaki biosyntezy poliamin, a rzadziej bezpośrednio na aktywność enzymów katalizujących ich syntezę. Model molekularnego mechanizmu regulującego ekspresję genu kodującego syntezę dekarboksylazy argininowej bezpośrednio związanej z biosyntezą putrescyny przedstawia schemat na rysunku 3 [16].

W odpowiedzi fizjologiczno-biochemicznej roślin pod działaniem stresów dochodzi do istotnych zmian w strukturze komórek i przebiegu procesów metabolicznych, między innymi przemian poliamin. U roślin czynniki stresowe, takie jak: nadmiar NaCl,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{H}^+$ , sorbitolu, mannitolu, metali ciężkich, np.  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  i innych osmoprotektantów oraz światła, promieniowania UV-B, a także deficyt światła, wody, potasu, tlenu i infekcje wirusowe (rys. 1) indukują zmiany przeważnie stymulujące biosyntezę i zawartość poliamin w komórkach narażonych na działanie stresorów. Najczęściej stwierdzano, że czynniki stresowe oddziałują stymulująco pośrednio na szlak biosyntezy poliamin: arginina - agmatyna - N-karbamilooputrescyna - putrescyna, wzmagając aktywność dekarboksylazy argininowej (ADC), jako głównego enzymu regulującego intensywność tej przemiany biochemicznej. Natomiast wprowadzenie do komórek roślinnych DFMA – inhibitora enzymu ADC spowodowało prawie natychmiastowe zahamowanie odpowiedzi poliaminowej na stresy osmotyczny i kwasowy, głównie przez osłabienie aktywności ADC [2, 6, 7-9, 11, 13, 15-18, 21, 22, 34-36, 41, 43, 45, 48, 52].



RYSUNEK 3. Model regulacji ekspresji genu ADC kodującego syntezę dekarboksylazy argininowej podczas starzenia się liści owsa inkubowanych w ciemności przez indukcję osmotycznym stresem (0,6 M sorbitolem) w obecności lub bez egzogenej sperminy (wg [16], zmodyfikowany)



Obecny stan badań nad poliaminami stawia sporo szczegółowych pytań dotyczących dokładnych miejsc ich biosyntezy w obrębie struktur subkomórkowych, istoty funkcji fizjologiczno-biochemicznych i mechanizmów działania. W badaniach przeprowadzonych na różnorodnych gatunkach roślin, głównie jednoliściennych z rodziny *Graminae* wykazano, że szlak biosyntezy poliamin związany jest głównie z komórkami tkanek aktywnie uczestniczącymi w procesie fotosyntezy. Na przykład stwierdzono, że aktywność enzymu ADC jest największa w chloroplastach, mitochondriach i cytosolu, zaś maksymalną aktywność enzymu ODC wykazano w cytoplazmie, jądrze komórkowym i wakuolach. Z kolei aktywność syntaz: spermidynowej i sperminowej była największa tylko w cytosolu, a aktywność dekarboksylazy lizynowej (LDC) była największa w stromie chloroplastów pochodzących z łubinu [14–16].

Wydaje się, że stesy abiotyczne za pośrednictwem poliamin mogą oddziaływać na różnych etapach i poziomach w regulacji ekspresji genów, tzn. w transkrypcji, translacji i zmianach potranslacyjnych. Jednym z takich modeli przedstawionym na rysunku 3 jest mechanizm regulacji ekspresji genu *ADC* kodującego syntezę dekarboksylazy argininowej z udziałem sperminy w starzejących się liściach owsa spowodowanym stresem osmotycznym, np. indukowanym 0,6 M sorbitolem i ciemnością. Wykazano, że starzenie się liści, zwłaszcza zanik chlorofilu i osłabienie fotosyntezy, pod działaniem wymienionych stresów były znacznie opóźniane i miały bardziej stabilny układ błon tylakoidowych przy wprowadzeniu egzogennej sperminy [2, 7, 13, 14, 16, 33].

Bardziej szczegółowe badania molekularne wykazały, że osmotyczny stres spowodowany 0,6 M sorbitolem powoduje prawie natychmiastowy, znaczny przyrost poziomu dekarboksylazy argininowej i mRNA będącego bezpośrednią matrycą do syntezy tego enzymu. Świadczy to o aktywacji przez stres osmotyczny genu *ADC* kodującego syntezę dekarboksylazy argininowej, która powoduje znaczną akumulację putrescyny w komórkach. Z kolei w obecności egzogennej wprowadzonej do komórek sperminy wzrost zawartości ADC i mRNA następuje dopiero po godzinie inkubacji. Przypuszcza się, że egzogenna spermina działa hamująco na potranslacyjne zmiany w białku enzymatycznym ADC powodując przekształcenie go w formę katalitycznie aktywną. Produktem pierwotnym ekspresji genu *ADC* jest enzymatyczne białko o masie cząsteczkowej w granicach 60 kDa, z którego w wyniku wtórnych przemian powstaje aktywna forma dimerycznej struktury dekarboksylazy argininowej, zapoczątkowującej przekształcenie argininy, przez agmatynę do putrescyny. W przypadku egzogennej sperminy stres osmotyczny i inne rodzaje stresorów aktywując transkrypcję genu *ADC* powodują nagromadzenie sporych ilości nieaktywnego katalitycznie 60 kDa białka pierwotnego dekarboksylazy argininowej [2, 33]. Najnowsze badania wykazały także znaczny wzrost aktywności enzymu ADC i akumulację putrescyny pod działaniem innych czynników stresowych, takich jak: zakwaszenie, nadmiar lub niedobór światła, potasu, tlenu,  $\text{NH}_4^+$  oraz przy

zanieczyszczeniach metalami ciężkimi i prawdopodobnie wieloma innymi stresorami [15, 16, 22].

Również w badaniach wykonanych na innych gatunkach zbóż: pszenicy i kukurydzy oraz roślin dwuliściennych, np. z grupy warzyw: kapuście, pomidorach, ziemniakach, ogórkach i niektórych drzewach i krzewach owocowych, stwierdzono pod działaniem różnorodnych stresów abiotycznych znaczny wzrost w komórkach zawartości putrescyny, a w licznych przypadkach spermidyny i sperminy. Przy stresie oziębieniomym w rozmaitych owocach, np. jabłkach oraz wielu warzywach liściastych, takich jak: kapusta, sałata, pietruszka, szczypior, znacznie wzrasta zawartość putrescyny, która zwiększając żywotność komórek tych roślin chroni je przed ujemnymi skutkami przymrozków. W doświadczeniach wykonanych na siewkach pszenicy wykazano, że spermidyna w stężeniu 5 mM w warunkach stresu wodnego działa stabilizująco na strukturę rybosomów i stan polisomów podczas translacji oraz obniża aktywność cytoplazmatycznych RNaz [13, 17, 18, 23–25, 31, 41, 43, 46].

Przeprowadzono także badania dotyczące wpływu stresu solnego spowodowanego działaniem 100–200 mM NaCl i osmotycznego wywołanego 400 mM mannitolem na wrażliwość liści pomidorów *Lycopersicon esculentum* i hybrydy *L. pennellii* i jednocześnie zawartość w nich poliamin. Okazało się, że *L. esculentum* jest wrażliwy, zaś *L. pennellii* odporny na działanie stresu solnego, zwłaszcza jonów Na<sup>+</sup> i w krótkim czasie gromadzi znaczne ilości putrescyny i spermidyny, przy czym w miarę upływu czasu poziom poliamin zmniejszał się. Największa akumulacja poliamin była przy osmotycznym stresie między 0,5 a 2 godziną, zaś przy solnym już po 15 minutach oddziaływania stresującego. Przypuszcza się, że początkowy wzrost zawartości poliamin jest głównie efektem stresu osmotycznego, a w niewielkim stopniu solnego. Pomidor *L. esculentum* bardziej wrażliwy na zasolenie gromadzi poliaminy znacznie wolniej w porównaniu z bardziej tolerancyjnym na stres solny *L. pennellii* [34–36].

W badaniach wykonanych na kallusie zarodków kukurydzy z małą i dużą zawartością poliamin i poddanych działaniu stresu solnego, tj. 1% roztworu NaCl, stwierdzono że komórki z małą zawartością poliamin były odporniejsze na zasolenie w porównaniu z bogatymi w poliaminy. Prócz tego wykazano, że komórki kallusa bardziej wrażliwe na stres i potraktowane jednocześnie poliaminami przy końcu hodowli zawierały zwiększony poziom putrescyny, natomiast mniej wrażliwe na stres solny utrzymywały stałą zawartość putrescyny [52].

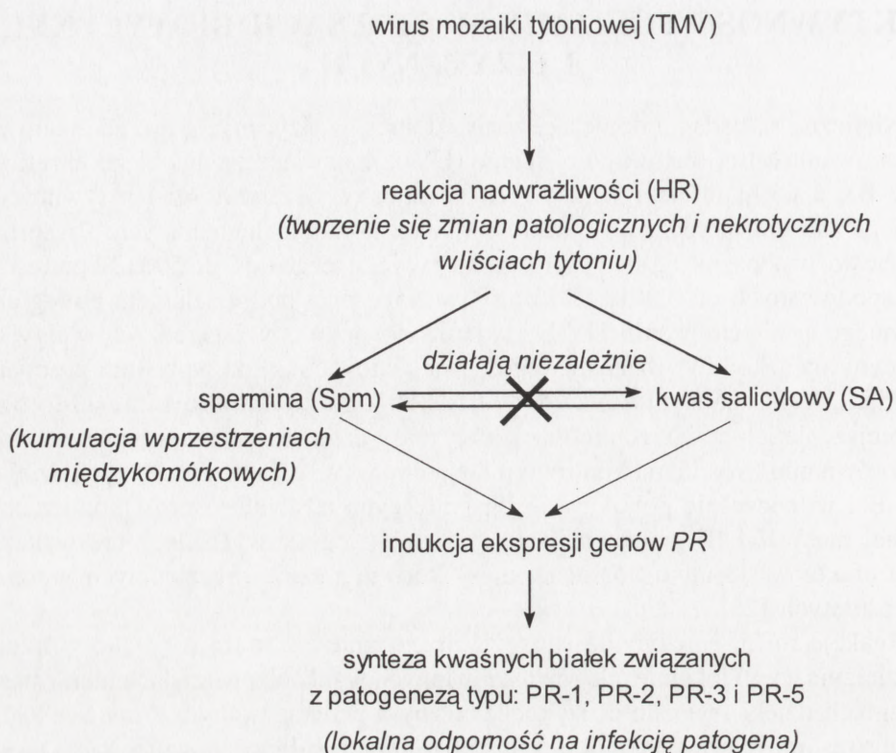
Z kolei w badaniach przeprowadzonych na liściach soi z zastosowaniem egzogennych poliamin: spermidyny i sperminy w stężeniu 1 mM stwierdzono stymulację syntezy etylenu przez wzrost poziomu wolnego kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego (ACC) i aktywację oksydazy ACC, enzymu katalizującego tworzenie się z ACC etylenu. Natomiast diaminy: putrescyna i diaminopropan nie powodowały takiego efektu działania [30, 40].

## AKTYWNOŚĆ POLIAMIN W STRESACH BIOTYCZNYCH I FIZYCZNYCH

Nieliczne są badania dotyczące wpływu stresów fizycznych, np. nadmiaru promieniowania ultrafioletowego bliskiego (UV-A), a zwłaszcza dalekiego ultrafioletu (UV-B), a także infekcji wirusowych na zmiany w zawartości i aktywności fizjologiczno-biochemicznej w zestresowanych komórkach roślinnych. Przeprowadzając doświadczenie na siewkach ogórka zawierającego od 0 do 500  $\mu\text{M}$  putrescyny i eksponowanych od 0,2 do 15  $\text{kJ}\times\text{m}^{-2}$  w ciągu dnia pod działaniem biologicznie czynnego promieniowania UV-B stwierdzono ochronny i łagodzący wpływ putrescyny na szkodliwe działanie tegoż promieniowania. Pod wpływem promieniowania UV-B zaobserwowano w liściach ogórka indukowanie chlorozy i zmniejszenie ich powierzchni oraz suchej masy całej rośliny, a najbardziej korzeni w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Natomiast w roślinach poddanych działaniu UV-B i jednocześnie potraktowanych putrescyną następuje wzrost powierzchni i suchej masy II i III generacji liści oraz odrośli ogórkowych, lecz nie wykazano tego efektu w stosunku do suchej masy korzeni i części nadziemnych wcześniej wyrosniętych [26].

Reakcje roślin na czynniki stresowe przeważnie zachodzą nie tylko w miejscu zadziałania, czyli lokalnie, ale również w innych tkankach i narządach nieraz bardzo odległych dzięki sygnałom fizykochemicznym przekazywanym z miejsca zadziałania stresora. W przypadku odpowiedzi fizjologiczno-biochemicznej roślin na stres biotyczny spowodowany infekcją przez patogeny, np. wirusy, najpierw następuje reakcja miejscowa, którą nazwano mianem nadwrażliwości (ang. *hypersensitive responses*, HR), a następnie systemiczne reakcje odporności nabytej, zwane SAR (ang. *systemic acquired resistance*). Pod działaniem czynników stresowych może dojść do zaburzeń w biopotencjale elektrycznym błon, uwodnieniu komórek, transporcie metabolitów. Ponadto następuje przemieszczanie się do bardziej odległych tkanek i narządów z miejsca zadziałania czynnika stresowego specyficznych przekaźników informacji w celu odpowiedniego przygotowania całego organizmu do grożącego mu niebezpieczeństwa [3, 5, 20].

Okazało się, że w mechanizmach obronnych roślin podczas infekcji patogenami współuczestniczą poliaminy i fenolokwasy, głównie kwas salicylowy (SA). Domniemany model indukcji genów PR odpowiedzialnych za kodowanie syntezy kwaśnych białek związanych z lokalną odpornością liści tytoniu na infekcję wirusem TMV i roli w tym procesie sperminy lub SA przedstawia schemat zamieszczony na rysunku 4. Spermina jako endogenny induktor analogicznie jak SA aktywuje ekspresję genów kodujących syntezę białek: PR-1, PR-2, PR-3 i PR-5 związanych z przebiegiem patogenezą i nabyciem lokalnej odporności na dalsze rozprzestrzenianie się wirusa TMV w liściach tytoniu [45, 48].



RYSUNEK 4. Przepuszczalny model szlaku indukcji ekspresji genów *PR* z udziałem sperminy lub kwasu salicylowego kodujących kwaśne białka związane z patogenezą i nabyciem lokalnej odporności przez liście tytoniu zainfekowane TMV (wg [48], zmodyfikowany)

Równocześnie w liściach tytoniu zainfekowanych wirusem TMV stwierdzono prawie 20-krotny wzrost zawartości i akumulację poliamin: putrescyny, spermidyny i sperminy. Również w międzykomórkowych przestrzeniach miejsc zaatakowanych przez wirus TMV stwierdzono znaczny wzrost aktywności enzymów ADC i ODC, bezpośrednio biorących udział w biosyntezie poliamin, zwłaszcza putrescyny, co stanowi jedną z licznych lokalnych reakcji obronnych typu nadwrażliwości (HR). Doświadczalnie wykazano, że zdrowe liście tytoniu potraktowane SA nieznacznie zwiększają poziom endogennej Spm, zaś Spm wcale nie powoduje wzrostu zawartości SA w roślinach. To wskazuje, że oba wymienione regulatory metabolizmu indukują ekspresję genów kodujących syntezę odpornościowych białek PR przed infekcją wirusem TMV, działają niezależnie od siebie osiągając ten sam cel obronny [3, 45, 48].

## UWAGI KOŃCOWE

Z przedstawionych nielicznych danych literaturowych wynika, że pod wpływem różnorodnych czynników stresowych u roślin dochodzi do istotnych zmian w zawartości i aktywności fizjologiczno-biochemicznej poszczególnych poliamin. Zmiany w metabolizmie poliamin spowodowane presją czynników stresowych, najprawdopodobniej mogą odbywać się na różnych etapach regulacji ekspresji genów kodujących syntezę enzymów odpowiedzialnych za ich wytwarzanie w komórkach.

Poliaminy ze względu na ich polikationową strukturę i specyficzne fizykochemiczne właściwości z łatwością mogą wchodzić w interakcje z ujemnie naładowanymi grupami: kwasów nukleinowych, białek, fosfolipidów, kwaśnych sacharydów i innych metabolitów lub elementów mikrostrukturalnych komórek spełniających ważną rolę w regulacji procesów fizjologiczno-biochemicznych u roślin. Z tego względu ich molekularne mechanizmy regulujące procesy fizjologiczno-metaboliczne w obrębie komórek mają charakter bardzo złożony, dość wszechstronny i kompleksowy w ścisłej korelacji i kooperacji z wieloma innymi regulatorami. Z powodu skomplikowanego charakteru ich działania fizjologiczno-biochemicznego i dużej lotności oraz licznych interakcji z innymi metabolitami, np. hormonami, wtórnymi przekazywaczami sygnałów itp., dotychczasowe badania nad ich mechanizmami regulującymi na poziomie molekularnym komórek następczą sporo trudności.

Wydaje się, że zastosowanie metod immunologicznych, np. przeciwciał dekarboksylaz ADC, ODC i innych enzymów bezpośrednio związanych z biosyntezą poliamin oraz klonów cDNA odpowiedzialnych za ich kodowanie umożliwi dokładne zbadanie molekularnych mechanizmów regulacji ekspresji genów przy różnego rodzaju stresach biotycznych i abiotycznych. Tego typu metody pozwolą w niedalekiej przyszłości precyzyjnie ustalić lokalizację strukturalną i funkcjonalną w biosyntezie poliamin w komórce i ich aktywności fizjologiczno-biochemicznej, jako odpowiedzi molekularnej roślin na różnorodne stresse środowiskowe o charakterze adaptacyjnym i obronnym przed ich szkodliwym działaniem.

## LITERATURA

- [1] ALTMAN A, FRIEDMAN R, AMIR D, LEVIN N. Polyamines effects and metabolism in plants under stress conditions. [w] Wareing PF [red.]. *Plant Growth Substances*. London, New York, Academic Press 1982; 483–494.
- [2] BAGGA S, ROCHFORD J, KLAENE Z, KUEHN GD, PHILLIPS GC. Putrescine aminopropyltransferase is responsible for biosynthesis of spermidine, spermine, and multiple uncommon polyamines in osmotic stress-tolerant alfalfa. *Plant Physiol* 1997; **114**: 445–454.

- [3] BAGNI N. Polyamine synthesis and accumulation in the hypersensitive response to TMV in *Nicotiana tabacum*. *New Phytol* 1997; **135**: 467–473.
- [4] BAJGUZ A, CZERPAK R. Metabolizm poliamin. *Kosmos* 1999; **48** (1): 67–74.
- [5] BELLES JM, CARBONELL J, CONEJERO V. Polyamines in plants infected by citrus exocortis viroid or treated with silver ions and ethephon. *Plant Physiol* 1991; **96**: 1053–1059.
- [6] BENAVIDES MP, AIZENCANG G, TOMARO ML. Polyamines in *Helianthus annuus* L. during germination under salt stress. *J Plant Growth Regul* 1997; **16**: 205–211.
- [7] BESTFORD R, RICHARDSON C, CAMPOS JL, TIBURCIO AF. Effect of polyamines on stabilization of molecular complexes in thylakoid membranes of osmotically-stressed oat leaves. *Planta* 1993; **189**: 201–206.
- [8] BOHNERT MJ, NELSON DE, JENSEN RG. Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* 1995; **7**: 1099–1111.
- [9] BORRELL A, BESTFORD RT, ALTABELLA T, MASGRAU C, TIBURCIO AF. Regulation of arginine decarboxylase by spermine in osmotically-stressed oat leaves. *Physiol Plant* 1996; **98**: 105–110.
- [10] CHATTOPADHYAY MK, GHOSH B. Molecular analysis of polyamine biosynthesis in higher plants. *Curr Sci* 1998; **74**: 517–522.
- [11] DUMORTIER FM, GALSTON AW. The effect of osmotic stress on polyamine biosynthesis as related to protoplast viability. Fed Eur Soc Plant Physiol Abstr Meet, Strasbourg, France 1984.
- [12] FLORES HE. Changes in polyamine metabolism in response to abiotic stress. [w] Slocum RD, Flores HE [red.]. *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*. Boca Raton, CRC Press 1991; 213–226.
- [13] FLORES HE, GALSTON AW. Osmotic stress-induced polyamine accumulation in cereal leaves. I. Physiological parameters of the response. *Plant Physiol* 1984; **75**: 102–109.
- [14] FLORES HE, YOUNG ND, GALSTON AW. Polyamine metabolism and plant stress. [w] Key JL, Kosuge T [red.]. *Cellular and Molecular Biology of Plant Stress*. UCLA Symp Mol Cell Biol 1984; vol. 22.
- [15] GALSTON AW, KAUR-SAWHNEY R. Polyamines as endogenous growth regulators. [w] PJ Davies [red.]. *Plant Hormones Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Dordrecht, Boston, London. Kluwer Academic Publishers. 1995; 158–178.
- [16] GALSTON AW, KAUR-SAWHNEY R, ALTABELLA T, TIBURCIO AF. Plant polyamines in reproductive activity and response to abiotic stress. *Bot Acta* 1997; **110**: 197–207.
- [17] GNIAZDOWSKA-SKOCZEK H, KRZYWAŃSKI Z, KUBIŚ J. The influence of exogenous spermidine on polysomes and RNase activity in wheat leaves under water stress conditions. *Acta Soc Bot Pol* 1994; **63**: 25–28.
- [18] GONZALEZ-AQUILAR GA, ZACARIAS L, LAFUENTI MT. Ripening effects higher-temperature induced polyamines and their changes during cold storage of hybrid fortune mandarins. *J Agr Food Chem* 1998; **46**: 3503–3508.
- [19] JAKUBOWSKA A, MURACH AP, KOWALCZYK S. Nowe cząsteczki sygnałowe i związki regulujące wzrost i rozwój roślin. *Post Biol Kom* 1996; **23**: 657–682.
- [20] KĄCPEŃSKA A. Udział hormonów roślinnych w odpowiedzi roślin na stresowe czynniki środowiska. *Kosmos* 1995; **44**: 623–637.
- [21] KAO CH. Physiological significance of stress-induced changes in polyamines in plants. *Bot Bull Acad Sin* 1997; **38**: 141–144.
- [22] KAUR-SAWHNEY R, GALSTON AW. Interaction of polyamines and light on biochemical processes involved in leaf senescence. *Plant Cell Environ* 1979; **2**: 189–196.
- [23] KRAMER GF, WANG CY, CONWAY WS. Correlation of reduced softening and increased polyamine levels during low oxygen storage and McIntosh apples. *J Amer Soc Hort Sci* 1989; **114**: 942–946.

- [24] KRISHNAMURTHY R. Amelioration of salinity effect in salt tolerant rice (*Oryza sativa* L.) by foliar application of putrescine. *Plant Cell Physiol* 1991; **32**: 699–703.
- [25] KRISHNAMURTHY R, BHAGWAT KA. Polyamines as modulators of salt tolerance in rice cultivars. *Plant Physiol* 1989; **91**: 500–504.
- [26] KRIZEK DT, KRAMER GF, MIRECKI RM. Influence of UV-B radiation and putrescine on shoot and root growth of cucumber seedlings grown in nutrient solution. *J Plant Nutr* 1997; **20**: 613–623.
- [27] LAITINEN J, STENIUS K, ELORANTA TO, HLTTA E. Polyamines may regulate S-phase progression but not the dynamic of chromatin during the cell cycle. *J Cell Biochem* 1998; **68**: 200–212.
- [28] MACURA AB. Występowanie i rola poliamin u organizmów prokariotycznych i eukariotycznych z uwzględnieniem specyficznej pozycji grzybów. *Post Hig Med Dośw* 1980; **34**: 410–429.
- [29] NIKLAS A, BUTOWT R, JAŹDŹEWSKA E, MAJEWSKA-SAWKA A. Poliaminy w komórce roślinnej: synteza, mechanizmy działania i funkcje. *Post Biol Kom* 1998; **25**: 33–49.
- [30] PENNAZIO S, ROGGERO P. Exogenous polyamines stimulate ethylene synthesis by soybean leaf tissues. *Ann Bot* 1990; **65**: 45–50.
- [31] PRAKASH K, PRATHAPASENAN G. Putrescine reduced NaCl-induced inhibition of germination and early seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.). *Aust J Plant Physiol* 1988; **15**: 761–767.
- [32] RABE E. Stress physiology: The functional significance of the accumulation of nitrogen-containing compounds. *J Hort Sci* 1990; **65**: 231–243.
- [33] RAJAM MV, DAGAR S, WALE B, YADAV JS, KUMAR PA, SHOEB F, KUMRIA R. Genetic engineering of polyamine and carbohydrate metabolism for osmotic stress tolerance in higher plants. *J Biosci* 1998; **23**: 473–482.
- [34] SANTA-CRUZ A, ACOSTA M, PÉREZ-ALFOCEA F, BOLARIN MC. Changes in free polyamines levels induced by salt stress in leaves of cultivated and wild tomato species. *Physiol Plant* 1997; **101**: 341–346.
- [35] SANTA-CRUZ A, ESTAÑ MT, RUS A, BOLARIN MC, ACOSTA M. Effects of NaCl and mannitol iso-osmotic stresses on the free polyamine levels in leaf discs of tomato species differing in salt tolerance. *J Plant Physiol* 1997; **151**: 754–758.
- [36] SANTA-CRUZ A, PÉREZ-ALFOCEA F, CARO M, ACOSTA M. Polyamines as short-term salt tolerance traits in tomato. *Plant Sci* 1998; **138**: 9–16.
- [37] SCHUBER F. Influence of polyamines on membrane functions. *Bioch J* 1989; **260**: 1–10.
- [38] SHEVYAKOVA NI. Metabolism and physiological role of diamines and polyamines in plants. *Sov Plant Physiol* 1981; **28**: 775–782.
- [38] SMITH TA. Putrescine and inorganic ions. *Adv Phytochem* 1984; **18**: 7–54.
- [39] SMITH TA. Polyamines. *Annu Rev Plant Physiol* 1985; **36**: 117–143.
- [40] SUNG HI, LIU LF, KAO CH. Putrescine accumulation is associated with growth inhibition in suspension cultured rice cells under potassium deficiency. *Plant Cell Physiol* 1994; **35**: 313–316.
- [41] TABOR CW, TABOR H. Polyamines. *Annu Rev Biochem* 1984; **53**: 749–790.
- [42] TACHIMOTO M, FUKUTOMI M, MATSUSHIRO H, KOBAYASHI M, TAKAHASHI E. Role of putrescine in *Lemna* plants under potassium deficiency. *Soil Sci Plant Nutr* 1992; **38**: 307–313.
- [43] TADOLINI B. Polyamine inhibition of lipid peroxidation: The influence of polyamines in iron oxidation in the presence of compound mimicking phospholipid polar head. *Bioch J* 1988; **249**: 33–36.
- [44] TORRIGIANI P, RABITI AL, BORTOLOTTI C, BETTI L, MARANI F, CANOVA A, BAGNI N. Polyamine synthesis and accumulation in the hypersensitive response to TMV in *Nicotiana tabacum*. *New Phytol* 1997; **135**: 467–473.

- [45] WANG CY, JIZL. Effect of low oxygen storage on chilling injury and polyamines in zucchini squash. *Sci Horti* 1989; **39**: 1–7.
- [46] WOLSKA-MITASZKO B. Rola poliamin w syntezie białka. *Post Bioch* 1977; **23**: 399–415.
- [47] YAMAKAWA H, KAMADA H, SATOH M, OHASHI Y. Spermine is a salicylate-independent endogenous inducer for both tobacco acidic pathogenesis-related proteins and resistance against tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol* 1998; **118**: 1213–1222.
- [48] YE XS, AVDIUSHKO SA, KUC J. Effects of polyamines on *in vitro* phosphorylation of soluble and plasma membrane proteins in tobacco, cucumber and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 1994; **97**: 109–118.
- [49] YOUNG ND, GALSTON AW. Putrescine and acid stress. *Plant Physiol* 1983; **71**: 767–771.
- [50] YOUNG ND, GALSTON AW. Physiological control of arginine decarboxylase activity in K-deficient oat shoots. *Plant Physiol* 1984; **76**: 331–335.
- [51] ZACCHINI M, MAROTTA A, DE AGAZIO M. Tolerance to salt stress in maize callus lines with different polyamine content. *Plant Cell Rep* 1997; **17**: 119–122.

*Redaktor prowadzący – Maria Olszewska*

*Otrzymano: 22.02. 1999 r.*

*Przyjęto: 24.03. 1999 r.*

*Adres autora: ul. Świerkowa 20 B, 15-950 Białystok*



## BIAŁKOWE INHIBITORY KINAZ CYKLINO-ZALEŻNYCH Z RODZINY p16: BUDOWA, WŁAŚCIWOŚCI BIOCHEMICZNE I ROLA BIOLOGICZNA

THE p16 FAMILY OF THE PROTEIN CYCLIN-DEPENDENT  
KINASE INHIBITORS: STRUCTURE, BIOCHEMICAL  
PROPERTIES AND BIOLOGICAL FUNCTION

Lidia CISZAK<sup>1</sup>, Dariusz WOŁOWIEC<sup>1,2</sup>, Agata KOSMACZEWSKA<sup>1</sup>,  
Dorota BOĆKO<sup>1</sup>, Irena FRYDECKA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, Wrocław

<sup>2</sup>Katedra i Klinika Hematologii i Chorób Rozrostowych AM, Wrocław

*Streszczenie:* Holoenzymy utworzone przez cykliny typu D i kinazy cyklino-zależne: Cdk4 oraz Cdk6, które uczestniczą w procesie fosforylacji białka Rb, umożliwiają przejście komórki przez fazę G<sub>1</sub> cyklu podziałowego. Istotną rolę w regulacji aktywności wspomnianych holoenzymów odgrywają niedawno odkryte białka należące do rodziny p16. Stanowią one grupę podobnych do siebie pod względem struktury i właściwości biochemicznych cząsteczek, które wiążąc się z kinazami: Cdk4 i Cdk6 hamują ich aktywność. W artykule przedstawiono stan obecnej wiedzy dotyczącej budowy, właściwości biochemicznych, mechanizmu działania oraz roli biologicznej białek z rodziny p16. Szczególną uwagę zwrócono na indywidualny udział każdego z inhibitorów należących do tej rodziny w regulacji aktywności kinaz: Cdk4 i Cdk6 w warunkach *in vivo*.

(*Postępy Biologii Komórki* 1999; 26: 539–559)

*Słowa kluczowe:* inhibitory kinaz cyklino-zależnych, rodzina białek p16, białka oddziałujące z Cdk4 i Cdk6, supresja nowotworowa, białko Rb, białko p53.

*Summary:* Holoenzymes formed between D-type cyclins and the cyclin-dependent kinases Cdk4 or Cdk6 are most prominently implicated in the phosphorylation of the retinoblastoma protein and facilitate progression through the G<sub>1</sub> phase. The critical role in the regulation of the above-mentioned holoenzymes activity play the recently discovered proteins belong to p16 family, which are structurally related to one

\*Praca sponsorowana przez grant KBN nr 4 P05B 073 16.

another and have similar biochemical properties. A hallmark of this family of proteins is their specificity for binding to and inhibiting Cdk4 and Cdk6. In this article we summarize the present knowledge of the structure, biochemical properties, mode of action and biological role of the p16 family of inhibitors. Special attention has been given how each inhibitor contributes to Cdk4 and Cdk6 regulation *in vivo*. (*Advances in Cell Biology* 1999; 26: 539–559)

**Key words:** cyclin-dependent kinase inhibitors, the p16 protein family, Cdk4 and Cdk6 interacting proteins, tumor suppression pathways, retinoblastoma protein, protein p53.

## WSTĘP

Kluczową rolę w kontrolowaniu prawidłowego przebiegu cyklu mitotycznego komórek eukariotycznych odgrywa rodzina podobnych do siebie pod względem strukturalnym kinaz serynowo-treoninowych, zwanych kinazami cyklino-zależnymi Cdk (ang. *Cyclin-dependent kinases*). W komórkach ssaków zidentyfikowano do chwili obecnej kilkunastu różnych przedstawicieli tej grupy enzymów, którzy podlegają złożonemu procesowi aktywacji w ściśle określonych fazach cyklu podziałowego. Aktywność kinaz cyklino-zależnych regulowana jest co najmniej na trzech różnych poziomach, tj. przez związanie jednostki regulacyjnej: cykliny, przez aktywującą lub hamującą fosforylację odpowiednich dla każdej kinazy reszt treoniny i tyrozyny oraz przez wiązanie białkowych inhibitorów [prace przeglądowe: 12, 15, 29, 37, 44, 61, 82, 83].

W komórkach ssaków wykazano obecność kilku białkowych inhibitorów kinaz cyklino-zależnych, które na podstawie homologii strukturalnej i podobieństwa funkcjonalnego podzielono na dwie grupy. Pierwszą grupę stanowi rodzina białek p21, której nazwa pochodzi od pierwszego poznanego jej przedstawiciela, tj. białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup>. Wykryto je w normalnych, nietransformowanych fibroblastach ludzkich jako komponentę czteroskładnikowego kompleksu: zawierającego oprócz wspomnianej cząsteczki p21<sup>WAF1/CIP1</sup> kinazę CDK, cyklinę i jądrowy antygen komórki proliferującej PCNA (ang. *Proliferating Cell Nuclear Antigen*) [97]. Obecnie do tej klasy inhibitorów zalicza się również białka: p27<sup>KIP1</sup> i p57<sup>KIP2</sup>, przypominające swą strukturą cząsteczkę p21<sup>WAF1/CIP1</sup> [43, 55, 67, 68, 75, 90]. Wszyscy przedstawiciele omawianej rodziny p21 mogą wiązać się w warunkach *in vitro* do różnych rodzajów kompleksów utworzonych przez cykliny G<sub>1</sub> i kinazy Cdk oraz w mniejszym stopniu do kompleksu: Cdk1 - cyklina B i hamować ich aktywność [44, 55, 68, 90, 97]. Stwierdzono również, że inhibitory z grupy p21 wykazują większe powinowactwo do kinazy Cdk związanej z cyklina niż do formy niezwiązanej [44].

Do drugiej grupy inhibitorów kinaz cyklino-zależnych, zwanej rodziną p16, zalicza się obecnie białka: p15, p16, p18 i p19, którym poświęcono dalszą część pracy. Nazwa tej rodziny pochodzi od pierwszego poznanego jej przedstawiciela: białka p16.

## BIAŁKO p16

### 1.1. Występowanie białka p16

Białko p16, o masie cząsteczkowej (m. cz.) 15,8 kDa, zidentyfikowano po raz pierwszy w prawidłowych fibroblastach ludzkich (linia W138) oraz w liniach transformowanych przez onkoproteiny wirusowe: VA13 i HeLa jako cząsteczkę wiążącą się z kinazą CDK4 [79]. Następnie wykryto je w komórkach ośmiu różnych pierwotnych hodowli tkankowych, reprezentujących trzy główne typy tkanek: nabłonkową, łączną i mięśniową [88]. Stwierdzono ponadto, że stężenie białka p16 w komórkach wspomnianych wyżej hodowli tkankowych jest różne, w przeciwieństwie do inhibitora p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, którego stężenie we wszystkich rodzajach tkanek wydaje się być jednakowe [88]. Najniższe stężenie białka p16 zaobserwowano w komórkach nabłonka oskrzelowego i w nabłonku dróg oddechowych. Sprzeczne są natomiast doniesienia dotyczące obecności inhibitora p16 w ludzkich limfocytach T. Tam i wsp. [88] nie wykryli bowiem w tych komórkach białka p16, podczas gdy Stone i wsp. [86] zaobserwowali jego obecność, aczkolwiek w niewielkim stężeniu.

Dalsze badania immunofluorescencyjne i immunocytochemiczne przeprowadzone na prawidłowych ludzkich fibroblastach (linia W138) wykazały, iż p16 występuje w komórce głównie w jądrze, ale jest również obecne w cytoplazmie [53, 63].

### 1.2. Struktura białka p16

Białko p16 zbudowane jest ze 148 aminokwasów [79]. W strukturze cząsteczki p16 występują cztery tzw. powtórzenia ankyrinowe (ang. *ankyrin-like repeats*) [79], które są motywami zaangażowanymi w oddziaływania typu białko-białko i wykryto je w białkach pełniących różne funkcje biologiczne [57]. Wyniki badań Yanga i wsp. [98] wskazują, iż motywy te odgrywają najprawdopodobniej istotną rolę w wiązaniu inhibitorów z rodziny p16 z kinazą CDK4 i hamowaniu aktywności tego enzymu. Wykazano bowiem, że mutacje punktowe w konserwatywnych regionach powtórzeń ankyrinowych wpływają na aktywność inhibitorową białka p16, a ich usunięcie z cząsteczki p16 powoduje całkowitą utratę jej zdolności do hamowania CDK4 [98].

### 1.3. Właściwości biochemiczne

W przeciwieństwie do inhibitorów z rodziny p21 wiążących się z różnymi rodzajami kompleksów CDK - cyklina, białko p16 łączy się jedynie z kinazami CDK4 i CDK6, których podjednostkę regulatorową stanowi cyklina D (D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> lub D<sub>3</sub>) [16, 79]. Wykazano, że białka p16 i CDK4 tworzą dwuskładnikowy, równomolarny kompleks (1:1), którego m. cz. wyznaczona w warunkach natywnych wynosi ok.

45–55 kDa [73]. Wartość ta jest bardzo zbliżona do wartości wyliczonej teoretycznie równej 50 kDa, będącej sumą mas cząsteczkowych kinazy CDK4 (34 kDa) i inhibitora p16 (16 kDa). Nie stwierdzono ponadto różnic w powinowactwie białka p16 do CDK4 i CDK6 [16, 19, 66]. Kinaza CDK6 wiąże się z inhibitorem p16 tworząc dwuskładnikowy, równomolarny kompleks (1:1), którego masa cząsteczkowa, wyznaczona za pomocą techniki sedymentacji w gradiencie stężenia glicerolu, odpowiada sumie mas cząsteczkowych poszczególnych składników kompleksu [66].

Badania Serrano i wsp. [79], potwierdzone przez innych badaczy [19, 66], wykazały, że białko p16 hamuje aktywność kompleksów cykliny D z CDK4 lub CDK6, mierzoną jako zdolność do fosforylacji białka Rb (białko supresorowe dla siatkówczaka), nie wpływa natomiast na aktywność kompleksu: CDK2 - cykliny D.

Łączenie się inhibitorów z rodziny p21 z kompleksem: kinaza CDK - cykliny jest stymulowane przez cząsteczkę cykliny, co prowadzi w rezultacie do powstania trójskładnikowego kompleksu: CDK - cykliny - białko z rodziny p21. Białko p16 współzawodniczy natomiast z cykliną D o wiązanie z kinazą CDK4 [17]. Ragione i wsp. [73] zaobserwowali, że dodanie inhibitora p16 (wyizolowanego z komórek linii HBL-100 i częściowo oczyszczonego lub ludzkiego zrekombinowanego białka p16) do ekstraktów z komórek linii U-118, w których nie wykazano obecności endogennego białka p16, powoduje przesunięcie CDK4 z kompleksu z cykliną D<sub>1</sub> do kompleksu z cząsteczką p16. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż we frakcjach zawierających białka p16 i CDK4 nie wykrywano obecności cykliny D<sub>1</sub>. Obserwacja ta wyklucza zdaniem Ragione i wsp. [73] możliwość tworzenia trójskładnikowego kompleksu pomiędzy CDK4, cykliną D i inhibitorem p16. Tezę o współzawodniczeniu między białkiem p16 a cykliną D o wiązanie z CDK4, a także CDK6, zdają się potwierdzać wyniki doświadczeń przeprowadzonych przez Parry'ego i wsp. [66], polegających na inkubacji cykliny D<sub>1</sub> i CDK4 lub CDK6 z różnymi ilościami białka p16 znakowanego histydyną, a następnie immunoprecypitacji z przeciwciałami skierowanymi przeciw inhibitorowi p16 bądź cyklinie D<sub>1</sub>. Na ich podstawie autorzy wyliczyli, iż stężenie cząsteczki p16 potrzebne do związania z CDK4 lub CDK6 w 50% wynosi ok. 10 nM. Identyczne stężenie inhibitora p16 jest z kolei konieczne, aby współzawodniczyć z cykliną D<sub>1</sub> o wiązanie z CDK4 lub CDK6 w 50%. Wskazuje to, zdaniem Parry'ego i wsp. [66], że białka: p16 i cykliny D<sub>1</sub> tworzą niezależnie dwuskładnikowe kompleksy z CDK4 i CDK6. Hirai i wsp. [27] uważają zaś, że zrekombinowane ludzkie białko p16 może wiązać się do kompleksu: CDK4 - cykliny D i hamować jego aktywność *in vitro*.

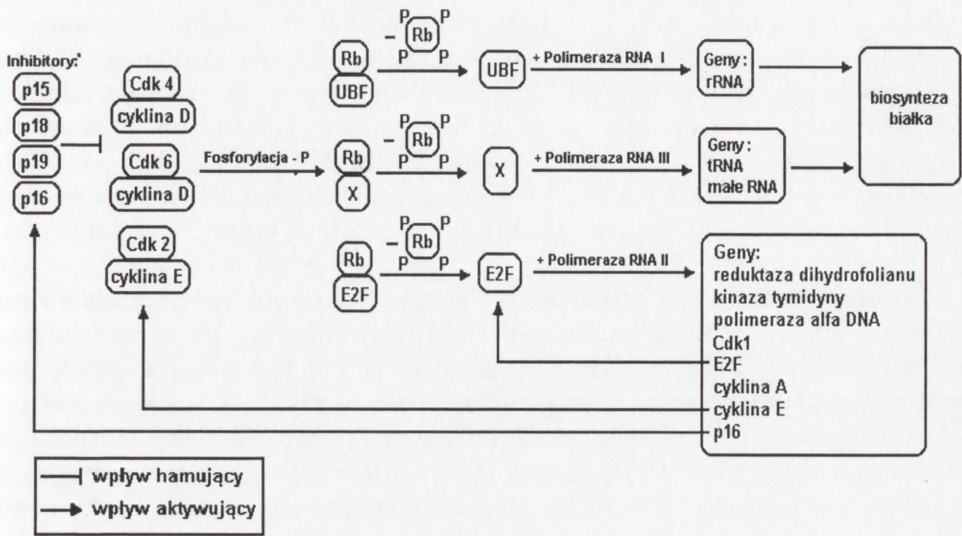
#### 1.4. Rola fizjologiczna białka p16

Inhibitor p16 należy do szlaku metabolicznego, którego głównym komponentem jest białko Rb (rys. 1) [9, 39, 46, 52, 72, 88, 94]. Szlak ten ma zasadnicze znaczenie dla kontroli w tzw. punkcie restrykcyjnym występującym na granicy faz G<sub>1</sub> i S,

w którym zapadają decyzje o dalszym losie komórki, tj. czy cykl będzie kontynuowany i zakończony podziałem, czy też komórka ma wyjść z cyklu i w wyniku procesu różnicowania podjąć wyspecjalizowane funkcje [1, 39, 42]. Białko Rb występuje w komórce w dwóch formach: ufosforylowanej i nieufosforylowanej [1, 94]. Forma nieufosforylowana cząsteczki pRb tworzy kompleksy z różnymi czynnikami transkrypcyjnymi hamując tym samym w sposób pośredni aktywność transkrypcyjną polimeraz RNA: I, II i III [1, 39, 89]. Białko Rb, a także podobne do niego strukturalnie białka: p107 i p130, wiążą się za pośrednictwem obecnego w ich strukturze tzw. regionu „kieszeniowego” (ang. *pocket domain*) z domeną C-kończową czynników transkrypcyjnych należących do rodziny E2F [1, 42]. Fragmenty C-końcowe cząsteczek z grupy E2F odpowiadają także za ich wiązanie z sekwencją nukleotydową TTTCGCGC występującą w promotorach transkrybowanych przez polimerazę RNA II genów: Cdk1, reduktazy dihydrofolianu (DHFR), kinazy tymidyny (TK), polimerazy  $\alpha$  DNA (POL), cykliny: E i A, a także genu E2F [1, 39, 94], których produkty są niezbędne do przejścia przez dzielącą się komórkę punktu restrykcyjnego i do replikacji DNA [1, 39]. Związanie przez nieufosforylowaną formę białka Rb czynników transkrypcyjnych z rodziny E2F zmienia je w represory hamujące ekspresję wymienionych powyżej genów [39]. Cząsteczka pRb blokuje również aktywność polimerazy RNA I tworząc kompleks z czynnikiem transkrypcyjnym UBF (ang. *Upstream-Binding Factor*) [1, 39, 89]. Białko Rb jest także supresorem polimerazy RNA III w przypadku, gdy jego nieufosforylowana forma zwiąże się z niezidentyfikowanym jeszcze czynnikiem [1, 39, 89]. Wymienione powyżej polimerazy RNA odpowiedzialne są za transkrypcję genów kodujących rRNA i tRNA. Aktywność tych enzymów wymagana jest w przypadku wzmożonej biosyntezy białka, która poprzedza ewentualne podwojenie wszystkich składników komórki przed jej podziałem [1, 39]. Tak więc białko Rb, będąc jedynym znanym supresorem wszystkich polimeraz RNA, może wpływać zarówno na replikację DNA, jak i na syntezę białka w czasie cyklu komórkowego [1]. Z tego też powodu kontrola procesu fosforylacji białka Rb, powodującego uwalnianie czynników transkrypcyjnych z kompleksów z pRb i aktywację polimeraz RNA, ma kluczowe znaczenie w regulacji proliferacji. Oprócz kompleksu: Cdk2 - cyklina E, w fosforylację cząsteczki pRb zaangażowane są kinazy Cdk4 i Cdk6 związane z cyklina D [1, 39, 89, 94], których aktywność ujawnia się w połowie fazy  $G_1$  i jest najwyższa w momencie przejścia komórki do fazy S cyklu podziałowego [39]. Aktywność holoenzymów: Cdk4 - cyklina D i Cdk6 - cyklina D jest z kolei regulowana przez inhibitory z rodziny p16 [7, 16, 17, 19, 27, 79]. Z badań przeprowadzonych przez Li i wsp. [46], Tama i wsp. [88] oraz Hara'ego i wsp. [20] wynika, że fosforylacja cząsteczki pRb stymuluje ekspresję genu kodującego białko p16 w drodze nie poznanego jeszcze mechanizmu. Wzrost stężenia inhibitora p16 powoduje stopniowe wypieranie cykliny D z kompleksu z kinazą CDK4 lub CDK6, co prowadzi do inaktywacji tych enzymów, a w rezultacie do zatrzymania procesu fosforylacji pRb

[46, 88, 94]. Zahamowanie procesu fosforylacji białka Rb powoduje z kolei obniżenie poziomu ekspresji białka p16 [46, 88]. Uwolnienie cykliny D z kompleksu z jej katalitycznym partnerem: Cdk4 lub Cdk6 umożliwia natomiast jej degradację [94]. W przedstawionym modelu cząsteczka p16 jest elementem regulującym aktywność kompleksów: CDK4 - cykliny D i CDK6 - cykliny D i fosforylację białka Rb w celu kontrolowania prawidłowego przejścia komórki z fazy G<sub>1</sub> do fazy S cyklu podziałowego [46, 88]. Model ten stanowi także wiarygodne wyjaśnienie zjawiska znacznie podwyższonego poziomu syntezy inhibitora p16 w komórkach nie mających funkcjonalnego białka Rb. Stwierdzono, że w normalnych diploidalnych komórkach zawierających funkcjonalne białko Rb cząsteczka p16 syntetyzowana jest na niskim, ale wykrywalnym poziomie, podczas gdy w komórkach nowotworowych, nie mających prawidłowego pRb, obserwowano znacznie wyższe stężenie p16 [46, 53, 65, 66, 86, 88]. O znaczeniu cząsteczek: p16, pRb i CDK4 w patogenezie rozrostów nowotworowych może świadczyć fakt, że w ok. 70% nowotworów złośliwych pochodzenia glejowego występują zmiany w ekspresji tych cząsteczek spowodowane przez homozygotyczną delecję genu kodującego białko p16, brak transkryptu pRb mRNA i amplifikację genu CDK4 [22]. Interesująca wydaje się obserwacja, iż w komórkach ze stwierdzonymi zmianami w ekspresji białek: p16, pRb i CDK4 w 95% aberracja dotyczyła tylko jednego białka [22]. Wykazano również, iż w komórkach przeważającej ilości pierwotnych guzów płuc zmieniona jest ekspresja tylko jednego z dwóch białek: p16 lub Rb [81]. W komórkach raków niedrobnokomórkowych płuc, w których brak funkcjonalnego białka Rb obserwowany jest bardzo rzadko, często występują homozygotyczne delecje genu kodującego białko p16 (w 66%). W komórkach raków drobnokomórkowych płuc, które w przeważającej ilości przypadków nie zawierają funkcjonalnego białka Rb, poziom ekspresji białka p16 jest wysoki [81]. Opisanie wyżej obserwacje stanowią potwierdzenie dla założenia, że p16, pRb i CDK4 współdziałają ze sobą tworząc szlak metaboliczny mający zasadnicze znaczenie dla kontroli w punkcie restrykcyjnym i brak jednego z dwóch białek: p16 lub Rb bądź też nadmierna transkrypcja genu kodującego kinazę CDK4 spowodowana jego amplifikacją powoduje zaburzenia mechanizmu regulacyjnego w tym szczególnym punkcie kontrolnym, co może prowadzić w konsekwencji do nieograniczonej proliferacji [22].

Badania ostatnich lat wskazują, iż białko p16 może kontrolować cykl komórkowy nie tylko przez hamowanie aktywności kinaz: CDK4 i CDK6, ale również przez bezpośrednią regulację transkrypcji [78]. Serizawa [78] wykazał bowiem, że inhibitor p16 wiąże się z domeną C-końcową (CTD: ang. *C-terminal domain*) polimerazy RNA II. Nie jest więc wykluczone, iż inhibitor p16 stanowi podjednostkę holoenzymu polimerazy RNA II [78]. Z holoenzymem tym może łączyć się również kompleks: kinaza CDK8 - cykliny C [11, 59]. Kinaza CDK8 związana z cykliną C uczestniczy przypuszczalnie w procesie fosforylacji domeny CTD polimerazy RNA II [11], który kontroluje inicjację transkrypcji *in vivo* [40]. W fosforylację domeny CTD



RYSunEK 1. Udział białka Rb, kinaz: Cdk4, Cdk6 i Cdk2, cyklin: D i E oraz inhibitorów z rodziny p16 w regulacji ekspresji genów transkrybowanych przez polimerazy RNA (na podstawie prac: Kocika i Szczylika [39], Li i wsp. [46], Tama i wsp. [88] oraz Bartka i wsp. [1]): białko Rb, poddane fosforylacji przez holoenzymy: Cdk4/Cdk6 - cyklina D oraz Cdk2 - cyklina E, uwalnia czynniki transkrypcyjne: UBF, niezidentyfikowany czynnik X i E2F umożliwiające polimerazom RNA: I, II i III wiązanie się z DNA i rozpoczęcie transkrypcji genów, których produkty są niezbędne do replikacji DNA i wzmożonej biosyntezy białka, poprzedzającej podwojenie wszystkich składników komórki przed jej podziałem. Fosforylacja pRb stymuluje także ekspresję genu kodującego inhibitor p16. Wzrost stężenia białka p16 powoduje stopniową inaktywację kinaz: Cdk4 i Cdk6, co prowadzi w rezultacie do zatrzymania procesu fosforylacji białka Rb

zaangażowany jest natomiast na pewno czynnik transkrypcyjny TFIID stanowiący kompleks wielu białek o różnej aktywności enzymatycznej. Wśród białek budujących TFIID zidentyfikowano m.in. kinazę CDK7 i jej podjednostkę regulatorową: cyklina H [11, 59, 77]. Stwierdzono również, że kompleks: CDK7 - cyklina H może fosforylować domenę CTD polimerazy RNA II [11, 59, 77]. Badania Serizawy [78] wykazały, że białkiem wiążącym się zarówno z CDK7, jak i z czynnikiem transkrypcyjnym TFIID i hamującym fosforylację domeny CTD jest inhibitor p16. Przedstawione powyżej obserwacje sugerują, że cząsteczka p16, biorąc udział w kontroli aktywności kinaz: CDK7 i CDK8, uczestniczy w regulowaniu procesu inicjacji transkrypcji [78].

### 1.5. Gen kodujący białko p16 jako prawdopodobny gen supresorowy

W ciągu ostatnich czterech lat wiele uwagi poświęcono genowi kodującemu białko p16, zwanemu *MTS1* (ang. *Multiple Tumor Suppressor 1* [33]), *CDKN2*,

*CDK4I* (ang. *CDK4 Inhibitor* [60]) lub *INK4a* [79], ze względu na fakt, iż leży on w regionie p21 chromosomu 9Gp, którego nieprawidłowości obserwowano w wielu liniach nowotworowych różnego pochodzenia [33, 60]. Analizując 46 linii nowotworowych Nobori i wsp. [60] stwierdzili homozygotyczną delecję w obrębie *MST1/CDK4I* w 61% czerniaków, 87% glejaków, 36% niedrobnokomórkowych raków płuc i 64% białaczek. Kamb i wsp. [33] zbadali 290 linii komórkowych znajdując homozygotyczną delecję w 133 przypadkach, przy czym częstość występowania tej aberracji wahała się od 0% (rak okrężnicy) do 82% (gwiazdziak). Rodzi się pytanie, czy obserwowane przez badaczy częste zmiany w regionie p21 chromosomu 9 w komórkach ustalonych linii nowotworowych hodowanych *in vitro* występują również w komórkach nowotworów pierwotnych? Jakie są mechanizmy inaktywacji genu *MTS1 in vivo*? Czy gen kodujący białko p16 jest genem supresorowym? Obecnie znane są cztery różne mechanizmy inaktywacji genu *MTS1 in vivo*: mutacje punktowe i małe delecje, duże homozygotyczne delecje, translokacje chromosomalne oraz metylacja cytozyny w pozycji 5' w regionie promotora bogatym w cytozynę i guanidynę (ang. *CpG island*). Występowanie mutacji punktowych stwierdzono w przypadku pierwotnego raka: gruczołowego trzustki [5], przelyku [28, 31, 58], przewodu żółciowego [99] i w rodzinach z dziedziczną podatnością na czerniaka [30]. Duże homozygotyczne delecje genu *MTS1*, które eliminują również w 80% przypadków sąsiadujący gen *MTS2* kodujący białko p15 [85], są częste w takich typach nowotworów pierwotnych, jak rak: niedrobnokomórkowy płuc [4, 56, 93, 96], płaskonabłonkowy głowy i szyi [4, 56, 74], nerki [4], pęcherza [95], jamy nosowo-gardłowej [49], w glejakach [28, 64, 76, 92], śródbłoniakach złośliwych [8], ostrej białaczce limfoblastycznej typu T [3, 6, 23, 28] i gwiazdziakach złośliwych [64, 92]. Interesujący wydaje się fakt, iż w przypadku gwiazdziaków oraz glejaków homozygotyczne delecje genu *MTS1* występują tylko odpowiednio w: III i IV oraz IV stopniu złośliwości tych nowotworów [64, 92], a komórki ze wspomnianą zmianą chromosomalną wykazują wyższą aktywność proliferacyjną w porównaniu do komórek nie mających tej aberracji [64]. Obserwacje te wskazują, że w przypadku niektórych typów nowotworów istnieje związek między występowaniem delecji homozygotycznej locus *MTS1* a stopniem złośliwości tych chorób, co może z kolei sugerować, że wspomniana aberracja chromosomalna nie jest przyczyną karcynogenezy, ale pojawia się na pewnych jej etapach. Translokacje chromosomalne przedstawiające locus *TCRA/D* leżący w regionie chromosomu 14q11 i locus *INK4/MTS1* kodujący gen p16 obserwowano natomiast w przypadku ostrej białaczki limfoblastycznej typu B [10]. Inaktywację genu *MTS1*, spowodowaną przez metylację cytozyny w pozycji 5' w regionie bogatym w cytozynę i guanidynę, obejmującym swym zasięgiem promotor oraz egzon 1 locus *MTS1*, stwierdzono w komórkach guzów pierwotnych pobranych od chorych na: nerwiaka niedojrzałego [87], raka pęcherza [14], piersi [26] i jamy nosowo-gardłowej [48], glejaki [56] i niedrobnokomórkowego raka płuc [56]. Częstość występowania mutacji, homozygotycznych



delecji i metylacji w komórkach nowotworów pierwotnych jest mniejsza w porównaniu z komórkami ustalonych linii nowotworowych hodowanych *in vitro* [4, 8, 26, 84], jest jednak na tyle duża, aby założyć, iż obserwowane w warunkach *in vivo* wszelkie aberracje w regionie p21 chromosomu 9 odgrywają istotną rolę w procesie karcynogenezy. Ponieważ homozygotyczne delecje locus *MTS1* eliminują również w większości przypadków sąsiadujący gen *MTS2* [85], kodujący białko p15, które podobnie jak inhibitor p16 hamuje aktywność kinaz: CDK4 i CDK6 [19], nasuwa się pytanie, czy funkcjonowanie genu *MTS1* jako supresora wzrostu nowotworów jest tak powszechne, jak wskazywały na to pierwsze badania Kamba i wsp. [33] oraz Naboriego i wsp. [60]. Kolejne wątpliwości zrodził fakt odkrycia tylko dwóch mutacji w sekwencji nukleotydowej kodującej białko p16, które mogą być odpowiedzialne za dziedziczną podatność na czerniaka [34]. Przedstawione w 1996 r. wyniki badań Serrano i wsp. [80], przeprowadzonych na myszach mających prawidłowy gen *mts2* oraz zmodyfikowany w skutek usunięcia egzonów: 2 i 3 locus *ink4a*, zdają się jednak rozwiewać przedstawione powyżej wątpliwości. W zwierzętach z opisanym defektem rozwijały się bowiem spontaniczne nowotwory we wczesnym wieku, a ponadto myszy te były bardzo wrażliwe na traktowanie karcynogenami. Serrano i wsp. [80] stwierdzili także, że embrionalne fibroblasty pobrane od myszy mających pozbawiony egzonów: 2 i 3 gen *ink4a* proliferowały znacznie szybciej w porównaniu z fibroblastami myszy bez tego defektu, mimo iż obie populacje komórek nie różniły się między sobą morfologicznie. Autorzy zauważyli również, że wprowadzenie zaktywowanego onkogenu Ha-ras do embrionalnych fibroblastów pochodzących od myszy ze zmodyfikowanym locus *ink4a* indukuje transformację nowotworową w tych komórkach. W embrionalnych fibroblastach mysich transformacja nowotworowa jest obserwowana tylko przy współdziałaniu dwóch onkogenów, np. Ha-ras i białka adenowirusowego E1A [51]. Konsekwencje występowania defektu w genie *ink4a* i wprowadzenia aktywnego białka Ha-ras są więc takie same jak w przypadku współdziałania dwóch onkogenów. Zaprezentowane przez Serrano i wsp. [80] wyniki badań wskazują dobitnie, że locus *ink4a* jest zaangażowany w proces supresji wzrostu nowotworów.

Badania zmierzające do wyjaśnienia, czy gen *INK4a* jest genem supresorowym, skomplikowało niedawne odkrycie, iż poza białkiem p16 koduje on również drugie białko zwane p14<sup>ARF</sup> (ang. *Alternative Reading Frame Protein*) lub p19<sup>arf</sup> (mysi homolog ludzkiego białka p14<sup>ARF</sup>) [54, 71, 86]. Możliwość ta wynika z niezwyklej organizacji genu *INK4a*, tj. obecności w jego strukturze dwóch różnych pierwszych egzonów, tzn. egzonu 1 $\alpha$  i 1 $\beta$  [54, 70, 71, 86]. W wyniku transkrypcji egzonów: 1 $\alpha$ , 2 i 3 syntetyzowany jest inhibitor p16, podczas gdy produktem białkowym transkryptu: egzon 1 $\beta$  – egzon 2 – egzon 3 jest cząsteczka p14<sup>ARF</sup> lub w przypadku genomu myszy cząsteczka p19<sup>arf</sup> [9, 18, 54, 70, 71, 86]. Ze względu na sposób organizacji genu *INK4a* wydaje się więc bardziej stosowne używanie określenia: locus *INK4a/ARF* [9]. Białko p19<sup>arf</sup> (p14<sup>ARF</sup>) zdolne jest do zatrzymania cyklu

podziałowego komórki w fazie  $G_1$ , jak i podczas przejścia z fazy  $G_2$  do M, jednak w przeciwieństwie do białka p16 nie wykazuje aktywności inhibitora kinaz cyklicznych [9, 18, 47, 71]. Nie znaleziono również żadnych dowodów na to, iż cząsteczka p19<sup>arf</sup> (p14<sup>ARF</sup>) należy do szlaku metabolicznego, którego głównym komponentem jest białko Rb. W jaki więc sposób p19<sup>arf</sup> (p14<sup>ARF</sup>) zatrzymuje cykl podziałowy komórki? Z najnowszych badań wynika, że p19<sup>arf</sup> należy do szlaku metabolicznym określanego mianem „drogi supresji nowotworowej”, którego głównym komponentem jest białko p53 [35, 69, 100]. Cząsteczka p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym uczestniczącym w ekspresji genów, których produkty powodują zatrzymanie cyklu podziałowego komórki w fazie  $G_1$  lub apoptozę [38, 45]. Wykazano, że p19<sup>arf</sup> (p14<sup>ARF</sup>) może wpływać na aktywność białka p53 oraz uczestniczyć w regulacji poziomu jego stężenia [35, 69, 100]. Stwierdzono, iż cząsteczka p19<sup>arf</sup> wiąże się za pośrednictwem swej N-końcowej domeny, kodowanej przez egzon 1 $\beta$ , z białkiem p53 i zwiększa jego aktywność transkrypcyjną [35]. Wykazano ponadto, że p19<sup>arf</sup> (p14<sup>ARF</sup>) łączy się także za pomocą wspomnianego N-końcowego fragmentu z domeną C-końcową białka MDM2 [69, 100] i promuje szybką degradację tego białka [100]. Cząsteczka Mdm2 reguluje z kolei poziom stężenia białka p53 w komórce [21, 41]. Udowodniono, że Mdm2 wiąże się za pośrednictwem swej N-końcowej domeny z p53 przyczyniając się do jego szybkiej proteolizy. Promowana przez p14<sup>ARF</sup> degradacja cząsteczki MDM2 prowadzi więc w rezultacie do stabilizacji i akumulacji białka p53 w komórce, a w konsekwencji do aktywacji genów, których produkty są konieczne do zatrzymania proliferacji lub wejścia komórki na drogę apoptozy. Białko p53 indukuje m.in. transkrypcję genu kodującego białko p21<sup>WAF1/CIP1</sup> [45], które jak wspomniano we wstępie pracy, hamuje aktywność różnych kompleksów: kinaza Cdk - cyklina, a wśród nich i holoenzymu: Cdk2 - cyklina E odpowiedzialnego za fosforylację białka Rb [44, 97]. Można więc powiedzieć, że p19<sup>arf</sup> (p14<sup>ARF</sup>) wpływając bezpośrednio na aktywność transkrypcyjną cząsteczki p53 oraz pośrednio na jej stabilność, stanowi ogniwo łączące ze sobą dwa główne szlaki metaboliczne zaangażowane w kontrolę wzrostu komórki, których głównymi komponentami są białka: pRb i p53. Powiązanie ze sobą obu wspomnianych szlaków za pośrednictwem cząsteczki p19<sup>arf</sup> (p14<sup>ARF</sup>) stwarza możliwość skutecznej ochrony komórek przed zmianami nowotworowymi w sytuacji, gdy jedna z tych dróg ulegnie zaburzeniu. Zauważono, iż w przypadku braku funkcjonalnego białka Rb w komórce dochodzi do nieprawidłowej proliferacji spowodowanej wzmożoną aktywnością czynników transkrypcyjnych z rodziny E2F, ale obserwowana jest również aktywacja cząsteczki p53, która prowadzi do zatrzymania cyklu podziałowego lub apoptozy [2]. Bates i wsp. [2] zaproponowali model wyjaśniający molekularne podstawy tego zjawiska. Główne założenie tego modelu opiera się na obserwacji, iż czynnik transkrypcyjny E2F-1 bezpośrednio indukuje syntezę białka p14<sup>ARF</sup>. Analiza sekwencji nukleotydowej ludzkiego genu kodującego p14<sup>ARF</sup> wykazała ponadto, że w regionie leżącym poniżej w stosunku

do egzonu 1 $\beta$  występuje potencjalne miejsce wiązania E2F-1. Zgodnie z założeniami modelu Batesa i wsp. [2] nieprawidłowa proliferacja wynikająca z nieobecności funkcjonalnego białka Rb w komórce lub aktywacji onkogenów, takich jak: Ras, E1A lub Myc, stanowi dla E2F-1 sygnał do indukcji syntezy białka p14<sup>ARF</sup>, które hamuje zależną od MDM2 degradację białka p53 oraz zwiększa jego aktywność transkrypcyjną, co prowadzi w rezultacie do zatrzymania cyklu podziałowego lub apoptozy i w konsekwencji chroni komórki przed zmianami nowotworowymi.

Wyjaśnienie roli biologicznej białka p19<sup>arf</sup> (p14<sup>ARF</sup>) zrodziło pytanie, czy jest ono białkiem supresorowym? Odpowiedź na to pytanie jest utrudniona ze względu na fakt, iż homozygotyczne delecje locus *INK4a/ARF*, występujące często w nowotworach ludzkich różnego pochodzenia, powodują w rzeczywistości zaburzenia w ekspresji dwóch białek: p16 i p14<sup>ARF</sup>, co stwarza komplikacje w określeniu indywidualnego udziału obu tych cząsteczek w supresji nowotworowej [36, 80]. W celu rozwiązania tego problemu Kamijo i wsp. [36] przeprowadzili doświadczenia na myszach, których komórki syntetyzowały funkcjonalne białko p16<sup>ink4a</sup>, ale nie miały p19<sup>arf</sup> ze względu na brak egzonu 1 $\beta$  w locus *ink4a/arf*. Stwierdzono, iż u zwierząt tych we wczesnym okresie życia rozwijały się spontanicznie nowotwory. Zaobserwowano ponadto, że embrionalne fibroblasty myszy z opisanym defektem wykazywały większą zdolność do proliferacji i rosły szybciej w porównaniu z normalnymi fibroblastami, a wprowadzenie do nich zaktywowanego onkogenu *H-ras* indukowało transformację nowotworową w tych komórkach. Z badań Kamijo i wsp. [36] wynika więc, że locus *arf* pełni rolę supresora wzrostu nowotworowego. Do chwili obecnej w komórkach guzów pierwotnych, jak i linii nowotworowych nie stwierdzono natomiast występowania mutacji w egzonie 1 $\beta$  lub metylacji cytozyny w pozycji 5' promotora locus *ARF* [18, 54, 56, 86]. Wydaje się, że mutacje dziedziczne i sporadyczne dotyczą raczej genu *INK4a* niż *ARF* [70].

Tak więc na podstawie naszej obecnej wiedzy można stwierdzić, iż locus *INK4a/ARF* koduje dwa białka o właściwościach supresorowych, które niewątpliwie uczestniczą w kontroli wzrostu komórek.

## BIAŁKO p15

Białko p15, o m. cz. 14,7 kDa, wykryto po raz pierwszy w ludzkich keratynocytach potraktowanych parakrynnym czynnikiem wzrostu TGF- $\beta$  [19]. Dalsze badania wykazały, że białko p15, podobnie jak inhibitor p16, występuje w komórkach wielu rodzajów tkanek w różnym stężeniu, przy czym dane literaturowe dotyczące poziomu tego stężenia są w przypadku niektórych tkanek sprzeczne [32, 85].

Cząsteczka p15 zbudowana jest ze 137 aminokwasów, a jej fragment N-końcowy wykazuje duży stopień homologii z inhibitorem p16: 50 pierwszych i 81 kolejnych

reszt aminokwasowych jest identycznych w obu białkach odpowiednio: w 44% i 97% [19]. W cząsteczce p15, podobnie jak p16, występują cztery powtórzenia ankyrinowe, które najprawdopodobniej stanowią motyw konserwatywny w strukturze białek z rodziny p16 [19].

Właściwościami biochemicznymi białko p15 przypomina inhibitor p16. Wiąże się ono specyficznie z kinazami: CDK4 i CDK6 i nieznacznie z: CDK1, CDK2 i CDK5 [19]. W warunkach *in vitro* cząsteczka p15 hamuje jedynie aktywność kompleksów cykliny D z CDK4 lub CDK6, nie wpływa natomiast na aktywność holoenzymu: CDK2 – cyklina A [19]. Podobnie jak inhibitor p16, białko p15 tworzy dwuskładnikowy kompleks z CDK4 lub CDK6 współzawodnicząc z cykliną D o wiązanie z wymienionymi kinazami [16].

Gen kodujący białko p15, zwany *MTS2* (ang. *Multiple Tumor Suppressor 2* [16, 33]) lub *INK4b* [19], zlokalizowano w chromosomie 9 w regionie leżącym w odległości około 20 kb poniżej egzonu 1 $\beta$  należącego do locus *INK4a/ARF* [85]. Transkrypcja genu *MTS2/INK4b* nie jest kontrolowana przez białko Rb, jak ma to miejsce w przypadku locus *INK4a/ARF* [2, 46, 88], ale jest stymulowana przez wspomniany TGF- $\beta$  [19]. Hannon i Beach [19] wykazali, że TGF- $\beta$  indukuje w ludzkich keratynocytach 30-krotny wzrost syntezy p15mRNA, a w konsekwencji i białka p15, nie wpływa natomiast na poziom p16mRNA.

Ponieważ białko p15 przypomina swą strukturą i właściwościami biochemicznymi inhibitor p16, powstało pytanie, jaka jest rola biologiczna cząsteczki p15. Z badań przeprowadzonych na limfocytach T krwi obwodowej wynika, że p15 razem z białkiem p27<sup>KIP1</sup>, należącym do rodziny inhibitorów p21 i hamującym aktywność holoenzymów: Cdk4 - cyklina D, Cdk2 - cyklina A oraz Cdk2 - cyklina E [68, 90], odgrywają istotną rolę w utrzymaniu komórki w fazie G<sub>0</sub> cyklu podziałowego [50]. Stwierdzono, że w limfocytach T pozostających w fazie spoczynkowej (G<sub>0</sub>) cyklu podziałowego występują oba białka: p15 i p27<sup>KIP1</sup>, których stężenie obniża się do poziomu niewykrywalnego w wyniku aktywacji tych komórek przez interleukinę-2 lub interleukinę-2 i przeciwciała skierowane przeciwko kompleksowi CD3 [50, 62]. Zaobserwowano również, że wraz z obniżeniem stężenia białek: p15 i p27<sup>KIP1</sup> zwiększała się aktywność kinaz CDK2 i CDK4 [50, 62]. Wyniki badań przeprowadzonych na limfocytach T krwi obwodowej sugerują, iż zahamowanie syntezy inhibitorów: p15 i p27<sup>KIP1</sup> podczas aktywacji limfocytów T powoduje w rezultacie zwiększenie aktywności kinaz: CDK2 i CDK4, co ułatwia dalszą proliferację [50]. Wydaje się więc, że oba białka: p15 i p27<sup>KIP1</sup> odgrywają istotną rolę w utrzymaniu komórki w fazie G<sub>0</sub> cyklu podziałowego [50], chociaż indywidualny udział wspomnianych inhibitorów w tym procesie oraz ewentualny mechanizm ich współdziałania nie został do chwili obecnej dokładnie wyjaśniony.

Ponieważ wykazano również, że ektopowa ekspresja białka p15 powoduje zatrzymanie cyklu podziałowego w warunkach *in vivo* [85], zaczęto się zastanawiać, czy gen *MTS2/INK4b* nie jest genem supresorowym. Odpowiedź na to pytanie

nie jest jednoznaczna. Do chwili obecnej w komórkach linii nowotworowych, jak i guzów pierwotnych nie stwierdzono bowiem występowania mutacji w sekwencjach nukleotydowych kodujących p15 [85, 99]. Homozygotyczną delecję genu *MTS2/INK4b* nie obejmującą swym zasięgiem locus *INK4a/ARF* wykryto tylko u dwóch pacjentów chorych na glejaka [32] i w komórkach sześciu linii pochodzących od ludzi chorych na czerniaka [13]. Metylację cytozyny w pozycji 5' w regionie egzonu 1 bogatym w cytozynę i guanidynę, inaktywującą gen *MTS2/INK4b*, stwierdzono w przypadkach: zespołu mielodysplastycznego [91], ostrej białaczki limfoblastycznej i ostrej białaczki szpikowej [24, 25], w których gen kodujący białko p16 nie ulegał inaktywacji. Dane te wskazują, iż metylacja genu kodującego białko p15 jest procesem odgrywającym istotną rolę w patogenezie wymienionych powyżej rodzajów rozrostów nowotworowych [24, 91]. Z drugiej jednak strony aberracja ta występuje bardzo rzadko w komórkach linii nowotworowych i pierwotnego raka: płaskonabłonkowego głowy i szyi, płuc, piersi, prostaty oraz okrężnicy i tylko wtedy gdy towarzyszy jej metylacja genu *INK4a* [25].

## BIAŁKO p18

Białko p18, o m. cz. 18,1 kDa, zidentyfikowano w ludzkich komórkach ostrej białaczki limfoblastycznej (ATCC CCL 119) jako cząsteczkę łączącą się preferencyjnie z kinazą CDK6 [16], a następnie wykryto je w osteoblastach, fibroblastach i chondrocytach [73]. Z badań Guana i wsp. [16] wynika, że poziom p18mRNA jest bardzo różny w poszczególnych tkankach człowieka: najwyższy w mięśniach szkieletowych, pośredni w trzustce oraz sercu i prawie niewykrywalny w łożysku, co może świadczyć o tym, iż regulacja ekspresji genu kodującego białko p18 jest specyficzna tkankowo.

Zbudowana ze 168 aminokwasów cząsteczka p18 przypomina swą budową inhibitory: p16 i p15. W jej strukturze występują powtórzenia ankyrinowe, a sekwencje aminokwasowe białek: p18 i p16 oraz p18 i p15 są identyczne odpowiednio w: 38% i 42%, przy czym region N-końcowy tych cząsteczek wykazuje większą homologię niż fragment C-końcowy [16]. Bardzo interesujący wydaje się fakt, że fragment cząsteczki p18, obejmujący 107 aminokwasów od C-końca, jest w 32% homologiczny z wysoce konserwatywną domeną występującą w białkach należących do rodziny Notch, które uczestniczą w procesie różnicowania [16].

Podobnie jak inhibitory: p16 i p15, cząsteczka p18 wiąże się z CDK4 oraz CDK6, nie łączy się natomiast z innymi kinazami CDK [16]. Ragione i wsp. [73] wykazali, że białka p18 i CDK4 tworzą dwuskładnikowy, równomolarny kompleks (1:1), który migruje w żelu poliakrylamidowym z szybkością odpowiadającą m. cz. 45–55 kDa. Z badań Guana i wsp. [16] wynika jednak, że białko p18 silniej

wiąże i hamuje kinazę CDK6 niż CDK4. Fakt preferencyjnego łączenia się inhibitora p18 z CDK6 wydają się potwierdzać obserwacje przeprowadzone na komórkach linii Saos-2 i U-118 [73]. W komórkach linii Saos-2, w których stężenie białek: p18, p16 i CDK4 jest duże, kinaza CDK4 tworzy kompleks przede wszystkim z p16, cząsteczka p18 występuje natomiast w formie niezwiązanej. W komórkach linii U-118, nie syntetyzujących p16, inhibitor p18 wiąże się wprawdzie z CDK4, ale w bardzo niewielkim stopniu. Stwierdzono natomiast, że znaczna ilość białka p18 występuje w tych komórkach w formie niezwiązanej.

Podobnie jak inhibitory: p16 i p15, cząsteczka p18 współzawodniczy z cykliną D o wiązanie z CDK6 [16, 17]. Wykazano również, że dwuskładnikowe kompleksy utworzone przez białko p18 i CDK6 lub cyklinę D i CDK6 są bardzo stabilne i nie mogą być rozdysocjowane w wyniku dodania odpowiednio: cykliny D lub inhibitora p18 [17]. W jaki więc sposób aktywne holoenzymy: CDK6/CDK4 – cyklina D są hamowane przez p18? Guan i wsp. [17] uważają, iż białka z rodziny p16 kontrolują aktywność CDK6 i CDK4 za pomocą dwóch różnych mechanizmów. Pierwszy z nich stanowiłaby kolejność syntezy inhibitorów z grupy p16 i cykliny D podczas cyklu podziałowego decydująca o tym, który z kompleksów: aktywny, zawierający kinazę CDK6/CDK4 i cyklinę D, lub nieaktywny, utworzony przez białko z rodziny p16 i CDK6/CDK4, powstanie jako pierwszy i następnie ze względu na swoją stabilność będzie w komórce preferencyjnie utrzymywany. Mechanizm ten umożliwiałby kontrolę aktywności CDK6 lub CDK4 przez cząsteczki z grupy p16 bez konieczności formowania trójskładnikowych kompleksów: CDK6/CDK4 - cyklina D - inhibitor z rodziny p16, których obecności nie zaobserwowano dotychczas w warunkach *in vivo*. Aktywność utworzonych już holoenzymów: CDK6/CDK4 - cyklina D regulowana byłaby natomiast za pomocą drugiego mechanizmu polegającego na ich pośrednim lub bezpośrednim hamowaniu przez białka z grupy p16. Zgodnie z koncepcją Guana i wsp. [17], bezpośrednie hamowanie wymienionych wyżej holoenzymów byłoby wynikiem utworzenia trójskładnikowych, katalitycznie nieaktywnych kompleksów: CDK6/CDK4 - cyklina D - inhibitor z rodziny p16. Hamowanie w sposób pośredni polegałoby natomiast na ciągłym spadku zawartości cykliny D we wspomnianych trójskładnikowych kompleksach, ze względu na krótki okres jej pół-życia, i nagromadzeniu się dwuskładnikowych kompleksów: CDK6/CDK4 - białko z grupy p16, co uniemożliwiałoby z kolei wiązanie się kinaz: CDK6 lub CDK4 z nowo zsyntetyzowaną cykliną D i aktywację tych enzymów.

Guan i wsp. [16] zaobserwowali, iż wprowadzenie do komórek linii U-2OS plazmidu zawierającego pełny region kodujący białko p18 wyraźnie zmniejszyło zdolność tych komórek do wzrostu. Stwierdzono również, że inhibitor p18 hamuje wzrost komórek jedynie w obecności funkcjonalnego białka Rb w komórce [16]. Pomimo że gen kodujący białko p18, zwany *INK4c*, leży w regionie p32 chromosomu 1, którego nieprawidłowości obserwowano w przypadku niektórych typów nowo-

tworów [16], dotychczas nie przedstawiono jednak przekonujących dowodów potwierdzających hipotezę Guana i wsp. [16], iż locus *INK4c* jest potencjalnym genem supresji nowotworowej. Jaka jest więc rola biologiczna inhibitora p18? Ponieważ cząsteczka p18 wykazuje znaczną homologię z białkami należącymi do rodziny Notch, a ludzkie tkanki różnią się między sobą drastycznie poziomem p18mRNA [16], uważa się obecnie, że białko p18 zatrzymuje cykl podziałowy i zapoczątkowuje proces różnicowania komórek [17].

## BIAŁKO p19

Szczegółowa analiza sekwencji nukleotydowych cząsteczek DNA wyizolowanych z komórek wielu różnych linii umożliwiła zidentyfikowanie genu *INK4d*, leżącego w regionie p13.2 chromosomu 19, który koduje białko migrujące w żelu poliakrylamidowym z szybkością odpowiadającą m. cz. 19 kDa i przypominające swą budową i właściwościami biochemicznymi inhibitory z rodziny p16 [17]. W strukturze cząsteczki p19 występują powtórzenia ankyrinowe, a jej sekwencja aminokwasowa jest w ok. 40% identyczna z sekwencją aminokwasową białek: p16, p15 i p18 [17]. Cząsteczka p19 wykazuje ponadto, podobnie jak p18, znaczną homologię z białkami należącymi do rodziny Notch [17]. Tak jak wszyscy poznani przedstawiciele rodziny inhibitorów p16, p19 łączy się jedynie z kinazami: CDK4 i CDK6 oraz hamuje ich aktywność w warunkach *in vitro* [17]. Stwierdzono również, że białko p19 współzawodniczy z cykliną D o wiązanie z wymienionymi wyżej enzymami [17]. Funkcjonalny związek między białkiem p19, cykliną D oraz CDK6 i CDK4 wydaje się być w warunkach *in vivo* bardzo złożony. Zgodnie z modelem Guana i wsp. [17], opisanym w rozdziale poświęconym białku p18, kolejność syntezy inhibitorów z rodziny p16 i cykliny D odgrywa kluczową rolę w regulacji aktywności CDK6 i CDK4. W przypadku białka p19 zaobserwowano, iż poziom p19mRNA w komórce podczas kolejnych faz cyklu podziałowego jest ściśle skorelowany w czasie z szybkością syntezy białka p19 [27]. W najniższym stężeniu p19mRNA i białko p19 występują w fazie G<sub>1</sub>, w której ujawnia się aktywność holoenzymów: Cdk4/Cdk6 – cyklina D [27]. Wydaje się więc, że blokowanie ekspresji genu kodującego inhibitor p19 w fazie G<sub>1</sub> umożliwia wspomnianym holoenzymom spełnianie ich fizjologicznych funkcji. Najwyższe stężenie p19mRNA i białka p19 obserwowano w fazie S, w której aktywność kompleksów: Cdk4/Cdk6 – cyklina D nie jest już konieczna do przejścia komórek do kolejnych etapów cyklu, a spadało ono po zakończeniu podziału komórkowego. Tak więc synteza białka p19 we wczesnym okresie fazy G<sub>1</sub>, a nie podczas późniejszych faz cyklu podziałowego, prowadzi do zahamowania proliferacji komórki. Jaka jest rola fizjologiczna inhibitora p19? Ponieważ cząsteczka p19 wykazuje znaczną homologię z białkami należącymi do

rodziny Notch, a poziom p19mRNA w leukocytach krwi obwodowej jest bardzo wysoki w porównaniu z innymi ludzkimi tkankami, zakłada się obecnie, że ekspresja genu kodującego inhibitor p19 w komórkach krwiotwórczych stanowi sygnał do rozpoczęcia procesu różnicowania tych komórek [17]. Wykazano ponadto, iż białko p19 wiąże się z receptorem Nur77, który uczestniczy w procesie apoptozy niedojrzałych limfocytów T [7]. Rola biologiczna oddziaływania pomiędzy białkiem p19 a receptorem Nur77 nie została jeszcze jednak wyjaśniona.

## PODSUMOWANIE

Białka: p16, p15, p18 i p19 stanowią grupę niedawno odkrytych regulatorów cyklu podziałowego. Najlepiej poznany przedstawiciel tej grupy: inhibitor p16 tworzy wraz z cyklinami typu D, kinazami: Cdk4 i Cdk6 oraz białkami: Rb i E2F szlak metaboliczny określany mianem „drogi supresji nowotworowej”. Białko p15 jest najprawdopodobniej odpowiedzialne za utrzymanie komórki w fazie spoczynkowej cyklu podziałowego, a inaktywacja kodującego go genu jest procesem, który może odgrywać istotną rolę w patogenezie niektórych rozrostów nowotworowych. Białka: p18 i p19, wykazujące znaczną homologię z białkami rodziny Notch, uczestniczą natomiast najprawdopodobniej w zapoczątkowywaniu procesów różnicowania komórek. Głównym celem prowadzonych obecnie badań jest dokładne poznanie mechanizmu działania inhibitorów z rodziny p16 oraz ich roli biologicznej.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] BARTEK J, BARTKOVA J, LUKAS J. The retinoblastoma protein pathway and the restriction point. *Curr Opin Cell Biol* 1996; **8**: 805–814.
- [2] BATES S, PHILLIPS AC, CLARK PA, STOTT F, PETERS G, LUDWIG RL, VOUSDEN KH. p14<sup>ARF</sup> links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* 1998; **395**: 124–125.
- [3] BATOVA A, DICCIANNI MB, YU JC, NOBORI T, LINK MP, PULLEN J, YU AL. Frequent and selective methylation of p15 and deletion of both p15 and p16 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 1997; **57**: 832–836.
- [4] CAIRNS P, MAO L, MERLO A, LEE DJ, SCHWAB D, EBY Y, TOKINO K, van der RIET P, BLAUGRUND JE, SIDRANSKY D. Rates of p16 (MTS1) mutations in primary tumors with 9p loss. *Science* 1994; **265**: 415–416.
- [5] CALDAS C, HAHN SA, da COSTA LT, REDSTON MS, SCHUTTE M, SEYMOUR AB, WEINSTEIN CL, HRUBAN RH, YEO CJ, KERN SE. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet* 1994; **8**: 27–32.
- [6] CAYUELA JM, MADANI A, SANHES L, STERN MH, SIGAUX F. Multiple Tumor-Suppressor Gene 1 inactivation is the most frequent genetic alteration in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1996; **87**: 2180–2186.
- [7] CHAN FKM, ZHANG J, CHENG L, SHAPIRO DN, WINOTO A. Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16<sup>ink4</sup>. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 2682–2688.



- [8] CHENG JQ, JHANWAR SC, KLEIN WM, BELL DW, LEE W-C, ALTOMARE DA, NOBORI T, OLOPADE OI, BUCKLER AJ, TESTA JR. P16 alterations and deletion mapping of 9p21-p22 in malignant mesothelioma. *Cancer Res* 1994; **54**: 5547–5551.
- [9] CHIN L, POMERANTZ J, DePINHO RA. The INK4a/ARF tumor suppressor: one gene-two products-two pathways. *TIBS* 1998; **23**: 291–296.
- [10] DUROD, BERNARD O, VALLE VD, LEBLANC T, BERGER R, LARSEN CJ. Inactivation of the p16INK4/MTS1 gene by a chromosome translocation t(9;14)(p21;q11) in acute lymphoblastic leukemia of B-cell type. *Cancer Res* 1996; **56**: 848–854.
- [11] DYNLACHT BD. Regulation of transcription by proteins that control the cell cycle. *Nature* 1997; **389**: 149–152.
- [12] ELLEDGE SJ, HARPER JW. Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Curr Opin Cell Biol* 1994; **6**: 847–852.
- [13] GLENDENING JM, FLORES JF, WALKER GJ, STONE S, ALBINO AP, FOUNTAIN JW. Homozygous loss of the p15<sup>INK4B</sup> gene (and not the p16<sup>INK4A</sup> gene) during tumor progression in a sporadic melanoma patient. *Cancer Res* 1995; **55**: 5531–5535.
- [14] GONZALEZ-ZULUETA M, BENDER CM, YANG AS, NGUYEN T, BEART RW, van TORNOUT JM, JONES P. Methylation of the 5 CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res* 1995; **55**: 4531–4535.
- [15] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Regulacja cyklu komórkowego – udział białkowych inhibitorów kinaz cyklino-zależnych. Regulation of cell cycle – involvement of protein inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Post Biochem* 1995; **41**: 80–93.
- [16] GUAN K-L, JENKINS CW, LI Y, NICHOLS MA, WU X, OKEEFE CL, MATERA AG, XIONG Y. Growth suppression by p18, a p16<sup>INK4/MTS1</sup> and p14<sup>INK4B/MTS2</sup>-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes & Development*\* 1994; 2939–2952.
- [17] GUAN K-L, JENKINS CW, LI Y, OKEEFE CL, NOH S, WU X, ZARIWALA M, MATERA AG, XIONG Y. Isolation and characterization of p19<sup>INK4d</sup>, a p16-related inhibitor specific to CDK6 i CDK4. *Mol Biol Cell* 1996; **7**: 57–70.
- [18] HABER DA. Splicing into senescence: the curious case of p16 and p19<sup>ARF</sup>. *Cell* 1997; **91**: 555–558.
- [19] HANNON GJ, BEACH D. p15<sup>INK4B</sup> is a potential effector of TGF-β- induced cell cycle arrest. *Nature* 1994; **371**: 257–261.
- [20] HARA E, SMITH R, PARRY D, TAHARA H, STONE S, PETERS G. Regulation of p16<sup>CDKN2</sup> expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol* 1996; **16**: 859–867.
- [21] HAUPT Y, MAYA R, KAZAZ A, OREN M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 1997; **387**: 296–299.
- [22] HE J, OLSON JJ, JAMES CD. Lack of p16<sup>INK4</sup> or retinoblastoma protein (pRb), or amplification-associated overexpression of cdk4 is observed in distinct subset of malignant glial tumors and cell lines. *Cancer Res* 1995; **55**: 4833–4836.
- [23] HEBERT J, CAYUELA JM, BERKELEY J, SIGAUX F. Candidate tumor-suppressor genes MTS1 (p16<sup>INK4A</sup>) and MTS2 (p15<sup>INK4B</sup>) display frequent homozygous deletions in primary cells from T- but not from B-cell lineage acute lymphoblastic leukemias. *Blood* 1994; **84**: 4038–4044.
- [24] HERMAN JG, CIVIN CI, ISSA J-PJ, COLLECTOR MI, SHARKIS SJ, BAYLIN SB. Distinct patterns of inactivation of p15<sup>INK4B</sup> and p16<sup>INK4A</sup> characterize the major types of hematological malignancies. *Cancer Res* 1997; **57**: 837–841.
- [25] HERMAN JG, JEN J, MERLO A, BAYLIN SB. Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15<sup>INK4B</sup>. *Cancer Res* 1996; **56**: 722–727.

- [26] HERMAN JG, MERLO A, MAO L, LAPIDUS RG, ISSA J-PJ, DAVIDSON NE, SIDRAN-SKY D, BAYLIN SB. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 1995; **55**: 4525–4530.
- [27] HIRAI H, ROUSSEL MF, KATO J-Y, ASHHMUN RA, SHERR CJ. Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 2672–2681.
- [28] HIRAMA T, KOEFFLER HP. Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood* 1995; **86**: 841–854.
- [29] HUNTER T, PINES J. Cyclins and cancer II: cyclin D and cdk inhibitors come of age. *Cell* 1994; **79**: 573–582.
- [30] HUSSUSSIAN CJ, STRUEWING JP, GOLDSTEIN AM, HIGGINS PAT, ALLY DA, SHEAHAN MD, CLARK Jr WH, TUCKER MA, DRACOPOLI N. Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet* 1994; **8**: 15–21.
- [31] IGAKI H, SASAKI H, TACHIMORI Y, KATO H, WATANABE H, KIMURA T, HARADAY, SUGIMURA T, TERADA M. Mutation frequency of the p16/CDKN2 gene in primary cancers in the upper digestive tract. *Cancer Res* 1995; **55**: 3421–3423.
- [32] JEN J, HARPER JW, BIGNER SH, BIGNER DD, PAPADOPOULOS N, MARKOWITZ S, WILLSON JKV, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Deletion of p16 and p15 genes in brain tumors. *Cancer Res* 1994; **54**: 6353–6358.
- [33] KAMB A, GRUIS NA, WEAVER-FELDHAUS J, LIU Q, HARSHMAN K, TAVTIGIAN SV, STOCKERT E, DAY III RS, JOHNSON BE, SKOLNICK MH. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994; **264**: 436–440.
- [34] KAMB A, SHATTUCK-EIDENS D, EELES R, LIU Q, GRUIS NA, DING W, HUSSEY C, TRAN T, MIKI Y, WEAVER-FELDHAUS J, McCLURE M, AITKEN JF, ANDERSON DE, BERGMAN W, FRANTS R, GOLDFAR DE, GREEN A, MacLENNAN R, MARTIN NG, MEYER LJ, YOUL P, ZONE JJ, SKOLNICK MH, CANNON-ALBRIGHT LA. Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nat. Genet* 1994; **8**: 22–26.
- [35] KAMIJO T, WEBER JD, ZAMBETTI G, ZINDY F, ROUSSEL MF, SHERR CJ. Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci* 1998; **95**: 8292–8297.
- [36] KAMIJO T, ZINDY F, ROUSSEL MF, QUELLE DE, DOWNING JR, ASHMUN RA, GROSVELD G, SHERR CJ. Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19<sup>ARF</sup>. *Cell* 1997; **91**: 649–659.
- [37] KING RW, JACKSON PK, KIRSCHNER MW. Mitosis in transition. *Cell* 1994; **79**: 563–571.
- [38] KO LJ, PRIVES C. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 1996; **10**: 1054–1072.
- [39] KOCIK J, SZCZYLIK C. Regulatory cyklu komórkowego i ich udział w onkogenezie. *Współczesna Onkologia* 1998; **4**: 7–15.
- [40] KOLESKE AJ, YOUNG RA. The RNA polymerase II holoenzyme and its implications for gene regulation. *TIBS* 1995; **20**: 113–116.
- [41] KUBBUTAT MHG, JONES SN, VOUSDEN KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 1997; **387**: 299–303.
- [42] LaTHANGUE NB. DRTF1/E2F: an expanding family of heterodimeric transcription factors implicated in cell cycle control. *TIBS* 1994; **19**: 108–114.
- [43] LEE M-H, REYNISDOTTIR I, MASSAGUE J. Cloning of p57<sup>Kip2</sup>, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev* 1995; **9**: 639–649.
- [44] LEES E. Cyclin dependent kinase regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1995; **7**: 773–780.
- [45] LEVINE AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; **88**: 323–331.
- [46] LI Y, NICHOLS MA, SHAY JW., XIONG Y. Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependent kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product Rb. *Cancer Res* 1994; **54**: 6078–6082.

- [47] LIGGETT jr WH, SEWELL DA, ROCCO J, AHRENDT S.A., KOCH W, SIDRANSKY D. p16 and p16 are potent growth suppressors of head and neck squamous carcinoma cells *in vitro*. *Cancer Res* 1996; **56**: 4119–4123.
- [48] LO K-W, CHEUNG S-T, LEUNG S-F, van HASSELT A, TSANG Y-S, MAK K-F, CHUNG Y-F, WOO JKS, LEE JCK, HUANG DP. Hypermethylation of the p16 gene in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 1996; **56**: 2721–2725.
- [49] LO K-W, HUANG DP, LAU K-M. p16 gene alterations in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 1995; 2039–2043.
- [50] LOIS AF, COOPER LT, GENG Y, NOBORI T, CARSON D. Expression of the p16 and p15 cyclin-dependent kinase inhibitors in lymphocyte activation and neuronal differentiation. *Cancer Res* 1995; **55**: 4010–4013.
- [51] LOWE SW, BODIS S, McCLATCHEY A, REMINGTON L, RULEY HE, FISHER DE, HOUSMAN DE, JACKS T. p53 status and the efficacy of cancer therapy *in vivo*. *Science* 1994; **266**: 807–810.
- [52] LUKAS J, AAGAARD L, STRAUSS M, BARTEK J. Oncogenic aberrations of p16<sup>INK4a/CDKN2</sup> and cyclin D1 cooperate to deregulate G<sub>1</sub> control. *Cancer Res* 1995; **55**: 4818–4823.
- [53] LUKAS J, PARRY D, AAGAARD L, MANN DJ, BARTKOVA J, STRAUSS M, PETERS G, BARTEK J. Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumor suppressor p16. *Nature* 1995; **375**: 503–506.
- [54] MAO L, MERLO A, BEDI G, SHAPIRO GI, EDWARDS CD, ROLLINS BJ, SIDRANSKY D. A novel p16<sup>INK4A</sup> transcript. *Cancer Res* 1995; **55**: 2995–2997.
- [55] MATSUOKA S, EDWARDS MC, BAI C, PARKER S, ZHANG P, BALDINI A, HARPER JW, ELLEDGE SJ. p57<sup>Kip2</sup>, a structurally distinct member of the p21<sup>CIP1/CDK</sup> inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev* 1995; **9**: 650–662.
- [56] MERLO A, HERMAN JG, MAO L, LEE DJ, GABRIELSON E, BURGER PC, BAYLIN SB, SIDRANSKY D. 5CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nature Medicine* 1995; **7**: 686–692.
- [57] MICHAELY P, BENNETT V. The ANK repeat: a ubiquitous motif involved in macromolecular recognition. *Trends Cell Biol* 1992; **2**: 127–129.
- [58] MORI T, MIURA K, AOKI T, NISHIHARA T, MORI S, NAKAMURA Y. Frequent somatic mutation of the MTS1/CDK4I (Multiple Tumor Suppressor/Cyclin-dependent Kinase 4 Inhibitor) gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1994; **54**: 3396–3397.
- [59] NIGG EA. Cyclin-dependent kinase 7: cross-roads of transcription, DNA repair and cell cycle control? *Curr Opin Cell Biol* 1996; **8**: 312–317.
- [60] NOBORI T, MIURA K, WU DJ, LOIS A, TAKABAYASHI K, CARSON DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1994; **368**: 753–756.
- [61] NORBURY C, NURSE P. Animal cell cycles and their control. *Ann Rev Biochem* 1992; **61**: 441–470.
- [62] NOURSE J, FIRPO E, FLANAGAN WM, COATS S, POLYAK K, LEE M-H, MASSAGUE J, CRABTREE GR, ROBERTS JM. Interleukin-2 mediated elimination of the p27<sup>Kip1</sup> cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature* 1994; **372**: 570–573.
- [63] OKAMOTO A, DEMETRICK DJ, SPILLARE EA, HAGIWARA K, HUSSAIN SP, BENNETT WP, FORRESTER K, GERWIN B, SERRANO M, BEACH DH, HARRIS CC. Mutations and altered expression of p16<sup>INK4a</sup> in human cancer. *Proc Natl Acad Sci* 1994; **91**: 11045–11049.
- [64] ONO Y, YAMIYA T, ICHIKAWA T, KUNISHIO K, MATSUMOTO K, FURUTA T, OHMOTO T, UEKI K, LOUIS DN. Malignant astrocytomas with homozygous CDKN2/P16 gene deletions have higher KI-67 proliferation indices. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; **55**: 1026–1031.

- [65] OTTERSON GA, KRATZKE RA, COXON A, KIM YW, KAYE FJ. Absence of p16INK4 protein is restricted to the subset of lung cancer lines that retains wildtype RB. *Oncogene* 1994; **9**: 3375–3378.
- [66] PARRY D, BATES S, MANN DJ, PETERS G. Lack of cyclin D-cdk complexes in Rb-negative cells correlates with high levels of p16<sup>INK4/MTS1</sup> tumor suppressor gene product. *EMBO J* 1995; **14**: 503–511.
- [67] POLYAK K, KATO J-Y, SOLOMON MJ, SHERR CJ, MASSAGUÉ J, ROBERTS JM, KOFF A. p27<sup>Kip1</sup>, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor- $\beta$  and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 1994; **8**: 9–22.
- [68] POLYAK K, LEE M-H, ERDJUMENT-BROMAGE H, KOFF A, ROBERTS J, TEMPST P, MASSAGUE J. Cloning of p27<sup>Kip1</sup>, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 1994; **78**: 59–66.
- [69] POMERANTZ J, SCHREIBER-AGUS N, LIÉGEOIS NJ, SILVERMAN A, ALLAND L, CHIN L, POTES J, CHEN K, ORLOW I, LEE H-W, CORDON-CARDO C, DePINHO RA. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19<sup>Arf</sup>, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 1998; **92**: 713–723.
- [70] QUELLE DE, CHENG M, ASHMUN RA, SHERR CJ. Cancer-associated mutations at the INK4a locus cancel cell cycle arrest by p16<sup>INK4a</sup> but not by the alternative reading frame protein p19<sup>ARF</sup>. *Proc Natl Acad Sci* 1997; **94**: 669–673.
- [71] QUELLE DE, ZINDY F, ASHMUN RA, SHERR CJ. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 1995; **83**: 993–1000.
- [72] QUESNEL B, PREUDHOMME C, FENAUX P. p16<sup>INK4a</sup> gene and hematological malignancies. *Leukemia and Lymphoma* 1996; **22**: 11–24.
- [73] RAGIONE FD, RUSSO GL, OLIVA A, MERCURIO C, MASTROPIETRO S, PIETRA VD, ZAPPIA V. Biochemical characterization of p16<sup>INK4</sup>- and p18-containing complexes in human cell lines. *J Biol Chem* 1996; **5**: 15942–15949.
- [74] REED AL., CALIFANO J, CAIRNS P, WESTRA WH, JONES RM, KOCH W, AHRENDT S, EBY Y, SEWELL D, NAWROZ H, BARTEK J, SIDRANSKY D. High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1996; **56**: 3630–3633.
- [75] RUSSO AA, JEFFREY PD, PATTEN A, MASSAGUE J, PAVLETICH NP. Crystal structure of the p27<sup>Kip1</sup> cyclin-dependent kinase inhibitor bound to the cyclin A-cdk2 complex. *Nature* 1996; **382**: 325–331.
- [76] SCHMIDT EE, ICHIMURA K, REIFENBERGER G, COLLINS VP. CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer Res* 1994; **54**: 6321–6324.
- [77] SCLAFANI RA. Cyclin dependent kinase activating kinases. *Curr Opin Cell Biol* 1996; **8**: 788–794.
- [78] SERIZAWA H. Cyclin-dependent kinase inhibitor p16<sup>INK4A</sup> inhibits phosphorylation of RNA polymerase II by general transcription factor TFIIF. *J Biol Chem* 1998; **273**: 5427–5430.
- [79] SERRANO M, HANNON GJ, BEACH D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993; **366**: 704–707.
- [80] SERRANO M, LEE H-W, CHIN L, CORDON-CARDO C, BEACH D, DePINHO RA. Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* 1996; **85**: 27–37.
- [81] SHAPIRO GI, EDWARDS CD, KOBZIK L, GODLESKI J, RICHARDS W, SUGARBAKER DJ, ROLLINS BJ. Reciprocal Rb inactivation and p16<sup>INK4</sup> expression in primary lung cancers and cell lines. *Cancer Res* 1995; **55**: 505–509.
- [82] SHERR CJ. Mammalian G<sub>1</sub> cyclins. *Cell* 1993; **73**: 1059–1065.
- [83] SHERR CJ. G<sub>1</sub> phase progression: cycling on cue. *Cell* 1994; **79**: 551–555.

- [84] SPRUCK III CH, GONZALEZ-ZULUETA M, SHIBATA A, SIMONEAU AR, LIN M-F, GONZALES F, TSAI YC, JONES P. p16 gene in uncultured tumours. *Nature* 1994; **370**: 183–184.
- [85] STONE S, DAYANANTH P, JIANG P, WEAVER-FELDHAUS JM, TAVTIGIAN SV, CANNON-ALBRIGHT L, KAMB A. Genomic structure, expression and mutational analysis of the P15 (MTS2) gene. *Oncogene* 1995; **11**: 987–991.
- [86] STONE S, JIANG P, DAYANANTH P, TAVTIGIAN SV, KATCHER H, PARRY D, PETERS G, KAMB A. Complex structure and regulation of p16 (MTS1) locus. *Cancer Res* 1995; **55**: 2988–2994.
- [87] TAKITA J, HAYASHI Y, KOHNO T, YAMAGUCHI N, HANADA R, YAMAMOTO K, YOKOTA J. Deletion map of chromosome 9 and p16 (CDKN2A) gene alterations in neuroblastoma. *Cancer Res* 1997; **57**: 907–912.
- [88] TAM SW, SHAY JW, PAGANO M. Differential expression and cell cycle regulation of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor p16<sup>INK4a</sup>. *Cancer Res* 1994; **54**: 5816–5820.
- [89] TAYA Y. RB kinases and RB-binding proteins: new points of view. *TIBS* 1997; **22**: 14–17.
- [90] TOYOSHIMA H, HUNTER T. p27, a novel inhibitor of G<sub>1</sub> cyclin-Cdk proteins kinase activity, is related to p21. *Cell* 1994; **78**: 67–74.
- [91] UCHIDA T, KINOSHITA T, NAGAI H, NAKAHARA Y, SAITO H, HOTTA T, MURATE T. Hypermethylation of the p15<sup>INK4B</sup> gene in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997; **90**: 1403–1409.
- [92] WALKER DG, DUAN W, POPOVIC EA, KAYE AH, TOMLINSON FH, LAVIN M. Homozygous deletions of the Multiple Tumor Suppressor Gene 1 in the progression of human astrocytomas. *Cancer Res* 1995; **55**: 20–23.
- [93] WASHIMI O, NAGATAKE M, OSADA H, UEDA R, KOSHIKAWA T, SEKI T, TAKAHASHI T, TAKAHASHI T. *In vivo* occurrence of p16 (MTS1) and p15 (MTS2) alterations preferentially in non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 1995; **55**: 514–517.
- [94] WEINBERG RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995; **81**: 323–330.
- [95] WILLIAMSON MP, ELDER PA, SHAW M, DEVLIN J, KNOWLES M. p16 (CDKN2) is a major deletion target at 9p21 in bladder cancer. *Human Mol Genetics* 1995; **9**: 1569–1577.
- [96] XIAO S, LI D, CORSON JM, VIJG J, FLETCHER JA. Codeletion of p15 and p16 genes in primary non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 1995; **55**: 2968–2971.
- [97] XIONG Y, HANNON GJ, ZHANG H, CASSO D, KOBAYASHI R, BEACH D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993; **366**: 701–704.
- [98] YANG R, GOMBART AF, SERRANO M., KOEFFLER HP. Mutational effects on the p16<sup>INK4a</sup> tumor suppressor protein. *Cancer Res* 1995; **55**: 2503–2506.
- [99] YOSHIDA S, TODOROKI T, ICHIKAWA Y, HANAI S, SUZUKI H, HORI M, FUKAO K, MIWA M, UCHIDA K. Mutations of p16<sup>Ink4</sup>/CDKN2 and p15<sup>Ink4B</sup>/MTS2 genes in biliary tract cancers. *Cancer Res* 1995; **55**: 2756–2760.
- [100] ZHANG Y, XIONG Y, YARBROUGH WG. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* 1998; **92**: 725–734.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 02.01.1999 r.

Przyjęto: 07.04.1999 r.

Adresy autorów: 53-114 Wrocław, ul. R. Weigla 12, 50-567 Wrocław, ul. Pasteura 4

e-mail: ciszak@immuno.iitd.pan.wroc.pl



## ENDOGENNE BIAŁKA PRZECIWDZIAŁAJĄCE APOPTOZIE

### ENDOGENOUS APOPTOSIS INHIBITING PROTEINS

Danuta ROŻYŃKOWA, Agata FILIP  
Zakład Genetyki Medycznej AM, Lublin

*Felix qui potuit  
rerum cognoscere causas*  
Wergiliusz: Georgiki ks. II: vers 490

**Streszczenie.** Do dysregulacji apoptozy w wyniku niedostatecznej supresji śmierci komórki może dojść m.in. w chorobach neurodegeneracyjnych, nowotworach, zaburzeniach autoimmunologicznych. W wyjaśnieniu ich etiopatogenezy mogą posłużyć informacje o białkach inhibitorowych apoptozy, IAP. Są to produkty nowej wielogenowej rodziny ludzkich genów, częściowo homologicznych do genów bakulowirusów owadzych. Białka IAP powiększyły listę supresorów apoptozy uczestniczących w mechanizmach przeciwdziałania apoptozie na etapie jej inicjacji lub egzekucji. Artykuł zmierza do omówienia roli białek rodziny IAP i białek rodziny BCL-2. Referowane prace opisują delecję/mutację dwóch różnych genów kodujących NIAP i SMN, wykrytych metodą sprzężeń i zmapowanych do chromosomu 5q13, jako przyczynę nadmiernej apoptozy neuronów mięśniowych i w konsekwencji rdzeniowego zaniku mięśni, SMA, z postępującym paraliżem. NIAP należy do rodziny IAP, lecz jego działanie inhibitorowe apoptozy nie zostało w szczegółach wyjaśnione. Białko SMN – białko przeżycia neuronów ruchowych – nie należy do rodziny IAP, jest białkiem krytycznym dla składania pre-mRNA i metabolizmu snRNP, małych jądrowych rybonukleoprotein. Omówiono rodzinę komórkowych białek inhibitorowych apoptozy c-IAP, ich odkrycie, lokalizację genów IAP w chromosomach człowieka, ekspresję w tkankach. Przypuszczalny mechanizm akcji polega na wiązaniu się IAP do białek adaptorowych sygnalizacji przez THFR-2-TRAF oraz kompleksowaniu z kaspazami i blokowaniu aktywności proteolitycznej tych proteaz cysteinowych przez obecną w IAP domenę BIR. Przedstawiono doświadczalny model (*in vivo*) nacelowanej delecji genu *kaspazy-9* u myszek. Dużej letalności towarzyszył niedorozwój mózgu, znacznie powiększonego wobec obniżonej apoptozy i przewagi proliferacji komórek przodomózgowia w czasie rozwoju embrionalnego. Zwrócono uwagę na gotowość tymocytów i splenocytów do apoptozy po UV i anty CD-95 mimo delecji genu *kaspazy-9*. Niedawno wykryte białko SURVIVIN z rodziny IAP przyczyna się do znacznego obniżenia apoptozy w komórkach nowotworo-

wych. Ekspresja genu *SURVIVIN* ma miejsce w komórkach okresu embrionalnego, jest nieobecna w prawidłowych tkankach dorosłych, do reekspresji dochodzi we wzroście nowotworowym. Ekspresję tego genu udało się zahamować w wyniku transfekcji cDNA *EPR-1*, genu kodującego jeden z receptorów proteaz. Jego zastosowanie kliniczne jako antisensownego genu *SURVIVIN* wymaga dalszych badań. Nawiązano do nowszych badań białek rodziny *BCL-2*, skupiającej onkoproteiny o działaniu antyapoptotycznym i proapoptotycznym. Omawiają one głównie interakcje *BCL-xL* i *BAX* w regulowaniu przepuszczalności błony mitochondrialnej oraz tworzeniu kompleksów z *Apaf-1*, cytochromem *c* i kaspazami. Nawiązano do terapeutycznego klinicznego zastosowania *antisens cDNA BCL-2* w chłoniakach złośliwych. Przytoczono też kilka danych o dysregulacji apoptozy doświadczalnej w B-limfocytowej białaczce przewlekłej. We własnych (A. Filip) doświadczeniach zauważono mianowicie, że znacznej endogennej koekspresji *BCL-2* i *C-MYC* towarzyszy: a) oporność limfocytów białaczkowych na apoptozę indukowaną glikokortykosteroidami oraz b) brak indukcji *P53* po napromienieniu UV-B. Niektóre geny i białka *IAP*, a także inne czynniki przeżycia mają już ważne znaczenie diagnostyczne i prognostyczne – *SMN* i *NIAP* w rdzeniowym zaniku mięśni i *SURVIVIN* w nowotworach. Wyjaśnienie do końca ich działania i identyfikacja następných genów i ich produktów poszerzy zrozumienie procesów biologicznych, zachodzących w samozagładzie komórki jak i w chorobach wynikających z dysregulacji apoptozy.

(*Postępy Biologii Komórki* 1999; 26: 561–578).

**Słowa kluczowe:** apoptoza, *BCL-2*, *BIR*, *IAP* (*DIAP*, *NIAP*, *XIAP*), kaspazy, *SMN*, *SURVIVIN*.

**Summary:** Faulty regulations of apoptosis can result in inappropriate suppression of cell death as occurs f.ex. in some neurodegenerative diseases, cancer and autoimmune conditions. In this article recent discoveries regarding a novel multigene family of inhibitory apoptosis proteins (*IAP*'s) is presented which show homology to baculoviral *Iap*'s. Reported papers will significantly increase our understanding of disease etiology or pathogenesis. Mechanisms inhibiting cellular suicide are highly dependent on *BCL-2* family proteins and *IAP* proteins which significantly increase the number of known apoptosis suppressors. Both are probably involved in the initiation and/or execution of apoptosis and function under different but overlapping circumstances. It was shown by linkage analysis that deletion/mutation of 2 different genes named *NAIP* and *SMN*, mapped to chromosome 5q13, is responsive for spinal muscular atrophy (*SMA*), characterized by degeneration of motor neurons leading to muscular atrophy with progressive paralysis. *NIAP* deletion is responsive for not regulated apoptosis by unknown mechanism whereas loss of *SMN* dysregulates mRNA biogenesis and is responsive for snRNP metabolism in nerve cells. Cellular members (*c-IAP*) of human apoptosis inhibitory protein family, originally identified in baculoviruses, have been presented in relation to gene localizations and tissue expression. The mechanisms of their interaction are connected on associations with *TRAF* signalling complex in the apoptosis signalling phase and on complexing/blocking specific cysteine containing proteases (caspases) in the executive phase, the structural motif *BIR* being indispensable for their interaction. Mutation of caspase-9 through gene targeting in mice results in perinatal lethality with markedly enlarged and malformed cerebrum caused by reduced apoptosis and enhanced proliferation during brain development. *Casp-9* deficient thymocytes and splenocytes, resistant to several apoptotic stimuli, were surprisingly sensitive to apoptosis induced by UV-irradiation or anti-*CD95*. Authors compare the requirement for *Casp-9* and *Casp-3* in different apoptotic settings. *SURVIVIN* is a new *IAP* apoptosis inhibitor expressed during development and reexpressed in human cancer. Present investigations are referred in relation to induction of apoptosis by *SURVIVIN* gene targeting as the coding strand of *SURVIVIN* gene is extensively complementary to that of *EPR-1*. This new target for disrupting cell viability pathways in cancer is being investigated. Recent data of *BCL-2* pro- and antiapoptotic family members are shortly reviewed. The structural and functional interactions of *BCL-2* proteins with apoptosis protease activating factor (*Apaf-1*), cytochrome *c* and caspase regulatory cascade are referred. Successful *antisens cDNA BCL-2* therapies in progressive lymphoma were shortly presented. Finally author's (A. Filip) last experiments on dysregulated (suppressed) apoptosis in B-CLL lymphocytes accompanied with stable high co-expression of *BCL-2* and *MYC* proteins are presented. Some of reported findings are important in diagnosis



(SMN, NIAP in spinal muscular atrophy) and prognosis (SURVIVIN in neoplasia). Further characterization of genes and other regulatory proteins will provide important clues to the understanding of molecular processes controlling cellular suicide and of diseases resulting from dysregulated apoptosis. (*Advances in Cell Biology* 1999; 26: 561–578)

**Key words:** apoptosis, BCL-2, BIR, IAP (DIAP, NIAP, XIAP), caspases, SMN, SURVIVIN.

*Stosowane skróty:* **Aif** (*apoptosis inducing factor*) – czynnik indukujący apoptozę, proteaza mitochondrialna, **Apaf** (*apoptosis protease activating factor*) – czynnik aktywujący proteazę, ssaczy homolog CED-4 nicienia, **BAX** (*BCL-2 antagonist X*) – antagonist BCL-2, **BCL<sub>xL</sub>**, **BCL-2** (*B-cell leukemia/lymphoma*) – produkt genu wykrytego w chłoniaku B-komórkowym, **BCL<sub>xL</sub>** (*BCL-2 large*) – duże białko, część homolog. BCL-2, proapoptotyczne, **BH3** (*BCL-2 family homologous domain*) – domena białkowa typowa dla antyapoptotycznych członków rodziny BCL-2, **białka 14-3-3** (symbol pozycji po rozdziale dwukierunkowym) – grupa kwaśnych białek o roli adaptacyjnej, m.in. asocjują z BAX, który wiąże i sekwestrują, **BIR** (*baculovirus IAP repeats*) – powtarzające się domeny IAP homologiczne do układu aminokwasów po zakażeniu bakulowirusem, **CARD** (*caspase recruitment domain*) – domena katalizująca interakcję kaspazy z Apaf i cytochromem c, **CASP** (*caspase*) – kaspaza, **CED** (*cell death genes*) – geny śmierci programowanej u nicienia *C. elegans*, **C-MYC** (*cell-myelomatosis, chicken*) – komórkowy ekwiwalent wirusowej onkoproteiny v-Myc, **CrmA** (*cytokine response modifier A*) – inhibitor apoptozy sygnalizowanej cytokiną TNF, produkt wirusa ospy krowiej, **DIAP** (*Drosophila inhibitory apoptosis protein*) – homologiczne białko IAP u *Drosophila melanogaster*, **ECPR** (*effector cell protease receptor*) – receptor proteazy komórki efektorowej uczestniczącej m.in. w kaskadzie czyn. krzepnięcia, **HIAP** (*human inhibitory apoptosis protein*) – inhibitorowe białko apoptozy w komórkach człowieka, c-IAP, **XIAP** (*X-linked IAP*) – IAP kodowane przez locus chromosomu X, **NIAP** (*neuronal apoptosis inhibitory protein*) – białko hamujące apoptozę neuronów, **P53** (*protein 53*) – produkt genu supresorowego P53, **PI** (*propidium iodide*) – jodek propidyny, **RING** – motyw palca cynkowego, **SMA** (*spinal muscular atrophy*) – rdzeniowy zanik mięśni, **SMN** (*surviving of motor neurons*) – czynnik przeżycia neuronów ruchowych, **TRAF** (*TNFR-associated factor*) – czynniki wiążące się z receptorem TNF (*tumor necrosis factor*), czynnikiem martwicy nowotworu.

## WSTĘP

W badaniach apoptozy zidentyfikowano w ostatnich latach rodzinę cząsteczek, zdolnych do zakłócenia układów sygnalizacji śmierci, a nawet do zahamowania jej wykonania. Tak więc, coraz bogatszemu repertuarowi białek, opisywanych w inicjacji i egzekucji apoptozy, partneruje rozwój badań nad inhibitorami apoptozy. Wprawdzie najwcześniej opisanym antyapoptycznym białkiem był produkt genu *BCL-2* [25, 43, 53], to jednak chcielibyśmy w tym przeglądzie zwrócić uwagę przede wszystkim na inhibitorowe białka apoptozy-IAP (z ang. *inhibitory apoptosis proteins*). Modułują one:

- a) etap sygnalizacji drogą cytokin przez wiązanie się do TRAF (*TNF – receptor associated factor*) na powierzchni błony komórkowej [45] oraz
- b) fazę wykonawczą przez fizyczne blokowanie kaspaz [46], proteaz cysteinowych (*caspases*) o zdolności cięcia wiązania peptydowego przy reszcie asparaginianowej [1, 2, 15].

Druga część przeglądu nawiąże do relacji BCL-2 z kaskadą kaspaz. Jak wynika z badań częściowo homologicznych genów u nicieni, owadów i ssaków, białka

hamujące apoptozę występują powszechnie i wykształciły się w ewolucji tak dawno, jak molekularne mechanizmy wykonawcze apoptozy w odpowiedzi na bodźce prowokujące proces samozagłady komórki lub jej śmierci zaprogramowanej w rozwoju [por. 57]. Na załączonym schemacie (rys. 1) przedstawiono usytuowanie endogennych IAP wśród wybranych czynników pro- i antyapoptotycznych. Aktywacja pierwszych lub usunięcie drugich może indukować proces apoptozy. W tabeli 1 objaśniono miejsce działania IAP, białek hamujących apoptozę.

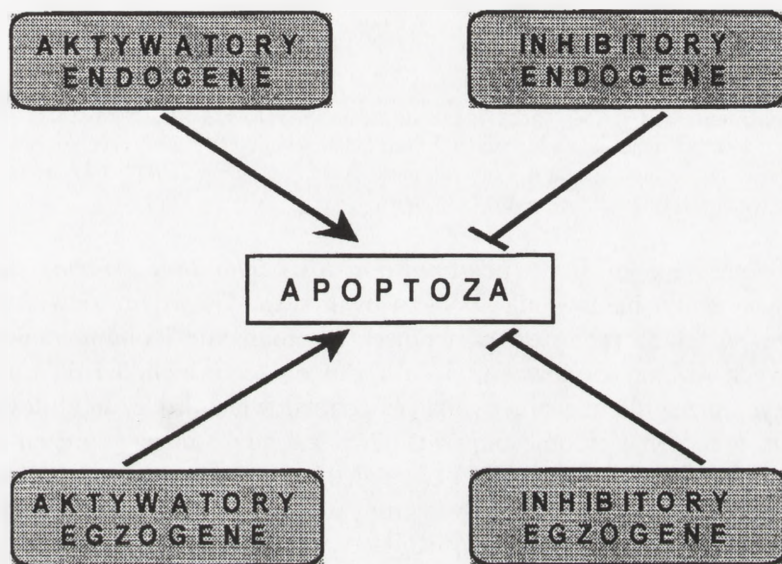
Pierwsze białka rodziny IAP – białkowych inhibitorów apoptozy opisali Crook i wsp. [16] oraz Clem i Miller [14] jako produkty bakulowirusów owadzych Cp-IAP (*Cydia pomonella granulosis virus*) i Op-IAP (*Orygia pseudotsugata nuclear polyhydrosis virus*). Białka te kompensowały czynność *p35*, zmutowanego w tych wirusach niefunkcjonalnego genu, który w normalnych warunkach koduje białkowy inhibitor zakażonej komórki. Następnie opisywanym wirusowym inhibitorem apoptozy okazał się produkt ospy krowiej Crma (*cytokine response modifier*), białko z nadrodziny serpin [63]. Można się domyśleć, że wirusowe infekcje wywołują pro-apoptyczne reakcje komórek gospodarza, które są blokowane pośrednio lub bezpośrednio przez produkty genów wirusów; w ten sposób wirusy niejako zdobywają przewagę nad organizmem wielokomórkowym, bardzo odległym w filogenezie.

Częściowymi homologami tych wirusogennych białek IAP są ich odpowiedniki w komórkach ssaków, mianowicie endogenne komórkowe inhibitory apoptozy, określane w literaturze jako c-IAP [37, 46]. Cechuje je obecność struktury typu palca cynkowego (*Ring finger*) w C-końcu oraz występowanie w N-końcu tandemowych powtórzeń specyficznych domen zwanych BIR (od *baculovirus IAP repeats*), przedzielonych łącznikiem. Dla domen białkowych BIR typowy jest układ około 70 aminokwasów o sekwencji Cys-X<sub>2</sub>-Cys oraz Cys-X-His. To właśnie te domeny mają hamować samozagładę komórki przez blokowanie enzymatycznej aktywności kaspaz wobec ich substratów w jądrze i cytoplazmie [17, 44, 46]. Motyw palca cynkowego RING, obecny także w wielu innych jądrowych i cytozolowych białkach, zawiera domenę z dwoma niezależnymi miejscami wiążącymi cynk [1]. W niektórych szczególnie aktywnych białkach inhibitorowych apoptozy jak NAIP i SURVIVIN (tab.1) nie wykryto struktury palca RING. To sugeruje model, w którym palec RING działałby jako negatywny regulator aktywności hamowania apoptozy przez BIR [23].

## NIEHAMOWANA APOPTOZA NEURONÓW: DELECJA NIAP i SMN

Obecność białka typu IAP w ludzkich komórkach somatycznych zaproponowała Natalie Roy i wsp. [47] na podstawie genetycznych badań u chorych z rdzeniowym zanikiem mięśni, SMA (z ang. *spinal muscular atrophy*). Wykrytą delecję genu

- BRAK CZYNNIKÓW WZROSTU
- TNF
- TGF  $\beta$
- IFN  $\gamma$
- Fast
- REAKTYWNE FORMY TLENU
- $\text{Ca}^{2+}$
- GLUKOKORTYKOIDY
- CZYNNIKI WZROSTU
- ANTYOKSYDANTY
- $\text{Zn}^{2+}$
- ANDROGENY
- ESTROGENY
- IAP: BIAŁKA INHIBITOROWE APOPTOZY



- PROMIENIOWANIE X, UV,  $\gamma$
- SZOK TERMICZNY
- INHIBITORY PKC
- PRZECIWCIAŁA PRZECIWKO ANTYGENOM POWIERZCHNI LIMFOCYTÓW (ANTY CD3, ANTY CD95)
- SUPERANTYGENY BAKTERYJNE (SEB)
- CYTOSTATYKI
- BIAŁKA WIRUSOWE: E1A ADENOWIRUSA, Tat i gp 120 WIRUSA HIV-1
- AKTYWATORY PKC
- BIAŁKA WIRUSOWE: LMP1 WIRUSA E1B 19 i E1B 95 ADENOWIRUSA p35 BAKULOWIRUSA

RYSUNEK 1. Zestawienie wybranych czynników indukujących i hamujących proces apoptozy

TABELA I. Rodzina białek inhibitorowych apoptozy IAP

Białko	Pochodzenie	Wspólny motyw struktury		Docelowa kaspaza	Inne asocjacje
		w N-końcu	w C-końcu		
Iap (p35)	Bakulowirus	BIR*	palec RING	prokaspazy (gospodarza) 1,2,3,4,7	
Diap1	<i>Drosophila</i>	2 BIR	palec RING	drICE	
Diap2	<i>Drosophila</i>	3 BIR	palec RING	drICE	
c-IAP1	Człowiek	3 BIR	palec RING	prokaspazy 3,7	TRAF1, TRAF2
c-IAP2	Człowiek	3 BIR	palec RING	prokaspazy 3,7	TRAF1, TRAF2
XIAP	Człowiek	3 BIR	palec RING	prokaspazy 3,7	
NAIP/NAIP	Człowiek	3 BIR	–	n.o.	
SURVIVIN	Człowiek	1 BIR	–	n.o.	EPR1* jako antysens

\*Objaśnienie: BIR: 2-3 specyficzne domeny *baculovirus IAP repeats*, dla których typowe są powtórzenia cysteina-histydyne; EPR1: łańcuch kodujący *EPR1* (receptor proteazy komórki efektorowej) jest komplementarny i odwrotnie skierowany do genu *SURVIVIN*, stąd rozważany jako antysens tego genu (p. tekst); n.o. – nie określono.

i białka nazwanego NAIP (*neuronal apoptosis inhibitory protein*) skojarzono z przyczyną braku hamowania apoptozy neuronów. Głównym zjawiskiem patologicznym w tej chorobie jest postępujące zwyrodnienie i obumieranie neuronów ruchowych rdzenia kręgowego, w następstwie czego dochodzi do zaniku zaopatrywanych przez nie mięśni i wynikającego niedowładu kończyn i tułowia. Delecję wykryto w regionie chromosomu 5q11.2-q13.3, gdzie analiza sprzężeń został zmąpowany poprzednio locus SMA przez międzynarodową grupę neurologów i psychiatrów [12]. Przed trzema laty dwie grupy badaczy zidentyfikowały w tym regionie dwa nowe geny blisko z sobą sąsiadujące w postaci przeciwnych podwójnych kopii skierowanych ku sobie od centromeru i od telomeru. Jeden nazwano NAIP (jw.), czyli gen kodujący białko hamujące apoptozę neuronów, a drugi – SMN (od *survival of motor neurons*), czyli gen przeżycia neuronów ruchowych [34], [35]. Pierwszy gen *NAIP* koduje duże białko o 1232 aminokwasach i z domeną BIR homologiczną z bakulowirusowym inhibitorem apoptozy, nie mającym natomiast struktury palca cynkowego RING w końcu C-terminalnym. Efekt antypoptotyczny NAIP udowodniono *in vitro* w doświadczeniu na komórkach HeLa z transgenem *NAIP*, wystawionych na działanie cytokiny TNF alfa oraz cykloheksimidu [37]. Gen *SMN* nie koduje białka typu IAP.

Niedawno okazało się, że dysfunkcja drugiego genu – *SMN* prowadzi do zakłócenia biogenezy i funkcji snRNP – małych jądrowych rybonukleoprotein, uczestniczących w dojrzewaniu pre-mRNA na terenie jądra i w cytoplazmie. Białko SMN – białko przeżycia neuronów ruchowych – jest białkiem krytycznym dla odtwarzania maszynerii składania (*splicing*) pre-mRNA [42]. Jego ekspresja jest

szczególnie wysoka w układzie nerwowym, gdzie, jak referuje Zimowski [64], białko SMN znajduje się w cytoplazmie neuronów, podczas gdy w komórkach intensywnie dzielących się gromadzi się w strukturach jądra komórkowego, nazywanych *gems* (od ang. *gemini of coiled bodies*), odpowiedzialnych za metabolizm snRNP – małych jądrowych rybonukloprotein. Uszkodzenia (delecje) genu *SMN* stanowią główne molekularne podłoże rdzeniowego zaniku mięśni, w którym to procesie białko NAIP ma odgrywać rolę modulującą.

Więcej ciekawych szczegółów odnośnie genów, białek i korelacji z obrazem klinicznym SMA znajdzie czytelnik w najnowszym artykule J.G. Zimowskiego w *Postęпах Biologii Komórki* [64]. Możliwość analiz delecji niektórych egzonów, mikrodelecji i mutacji opisanych genów u pacjentów z rdzeniowym zanikiem mięśni rewolucjonizuje kliniczną diagnozę oraz poradnictwo genetyczne tego dramatycznego schorzenia.

## MECHANIZM BŁOKOWANIA ŚMIERCI KOMÓREK PRZEZ IAP

Przy wyszukiwaniu w ludzkich tkankach sekwencji homologicznych do genu *NIAP* o dużej zgodności z domenami BIR znaleziono w banku genów mózgu ludzkiego dodatkowe geny: *XIAP* (*X-linked IAP*) zlokalizowany w Xq24-25 oraz *HIAP-1* i *HIAP-2*, zmapowane do chromosomu 11 [37]. Pisownię *HIAP* zmieniono później na *c-IAP* (tab. 1). Ekspresję tych genów na poziomie mRNA badano metodą *northern* w różnych tkankach człowieka. Okazało się, że geny *HIAP* mają określoną ekspresję w tkankach płodów i dorosłych, np. *HIAP-1* w tkance limfoidalnej, *HIAP2* w mózgu i krwinkach białych, *XIAP* w mięśniach szkieletowych i trzustce. W doświadczeniach *in vitro* wszystkie białka IAP w wyniku transferu odnośnych genów do komórek hamowały egzekucję apoptozy, wywołanej pozbawieniem surowicy [37]. Warto dodać, że komórki w kontrolnym porównawczym doświadczeniu z transferem genu *BCL-2* były jeszcze lepiej chronione przed apoptozą.

W tym samym czasie opisano białka inhibitorowe apoptozy u muszki owocowej [22], ale w połowie lat dziewięćdziesiątych nie było jeszcze wiadome, jaki jest mechanizm działania białek IAP w apoptotycznej kaskadzie procesów w komórce somatycznej. Pierwsza odpowiedź nadeszła z grupy eksperymentalnej apoptozy Reeda [17]. Mechanizm ten sprowadza się mianowicie do wiązania się IAP z określoną proteazą (tab. 2) na wzór pseudosubstratu i blokowania jej aktywności. Autorzy ci wykonywali doświadczenia z *XIAP*, *c-IAP1* i *c-IAP2*, które okazały się skutecznymi inhibitorami torów apoptozy przy udziale kaspazy 3 i/lub kaspazy 7 [17].

Hamowanie aktywności proteolitycznej rekombinowanych kaspaz badano *in vitro* w układzie bezkomórkowym i komórkowym:

- a. Układ bezkomórkowy zawierał cytosol, cytochrom c, dATP, rekombinowane białko rXIAP i egzogenne, izolowane jądra komórkowe lub syntetyczny substrat peptydowy DEVD swoisty dla kaspazy 3 lub 7. Dowodem aktywności kaspaz była destrukcja jąder komórkowych lub rozkład syntetycznego peptydu, czemu zapobiegała obecność rXIAP. W wyniku działania cytochromu c w cytosolowym wyciągu dochodziło do proteolitycznego przekształcenia kaspazy 3 z prokaspazy, co potwierdzono analizą produktów ze swoistym przeciwciałem (*immunoblotting*) [17].
- b. Podobne wyniki uzyskano przy pomocy ludzkich komórek nabłonkowych T293 i linii Jurkat poddanych bodźcom apoptotycznym. Aktywne białko XIAP, hamujące skutecznie apoptozę, było tym razem produktem transfekcji komórek pcDNA3-XIAP. Jednakże w wyniku jednoczesnej transfekcji plazmidów kodujących BAX (gen proapoptyczny) i XIAP nie udało się przeciwdziałać apoptozie komórek linii 293T. Zdaniem autorów dowodzi to, że XIAP, c-IAP1 i cIAP2 hamują kaspazy bezpośrednio wykonawcze, podczas gdy białka rodziny BCL-2 włączają się w regulację kaskady kaspaz wcześniej, na poziomie aparatu mitochondrialnego (rys. 2). Postęp apoptozy w tych doświadczeniach kontrolowano pobieraniem PI (wskaźnik dyfuzji) dla oceny liczby komórek martwych oraz liczbą komórek apoptotycznych, mających hipodiploidalną zawartość DNA w ocenie cytometru przepływowego [17].

Hamowanie aktywności proteolitycznej kaspaz przez XIAP było przy stałych inhibicji ca 0,7 i 0,2 nM dla kaspazy 3 i 7, odpowiednio. Te wartości były porównywalne z wirusową inhibicją kaspaz w komórce zakażonej wirusem ospy krowiej czy wirusem owadzi [17].

Podsumowując: modulowanie etapu wykonawczego apoptozy przez komórkowe białka IAP polega na bezpośredniej interakcji IAP-prokaspaza w wyniku utworzenia kompleksu z obecnymi w cytoplazmie proenzymami (prokaspazami) o słabej aktywności proteolitycznej. Aktywacja niezwiązanej prokaspazy odbywa się w wyniku jej proteolizy z odsłonięciem katalitycznej domeny CARD w powstałym heterodimerze. Domena CARD (*caspase recruitment domain*) jest miejscem interakcji kaspazy z Apaf-1 (*apoptosis activating factor*) i z cytochromem c.

Tu trzeba zastrzec, że w przeciwieństwie do białek XIAP i c-IAP, białko NAIP nie wiązało i nie blokowało żadnej z badanych prokaspaz. Supresja apoptozy, brak której uwidacznia się w patomorfologii neuronów ruchowych u chorych z defektem genu NAIP, odbywa się najprawdopodobniej inną drogą [37]. Droga przekazywania sygnału apoptotycznego zależy od specyfiki danej tkanki. Przykładem jest modulacja etapu sygnalizacji apoptozy przez błonowy receptor limfocyту TNFR (*tumor necrosis factor receptor*). Komórkowe białka c-IAP1 i c-IAP2 nie kontaktują się bezpośrednio z TNFR, lecz wchodzi w skład kompleksu białkowego TRAF (*TNFR associated factor*) i dokonują zmiany transmisji sygnału proapoptotycznego w samym receptorze

TABELA 2. Rodzina kaspaz (wg [1 i 15])

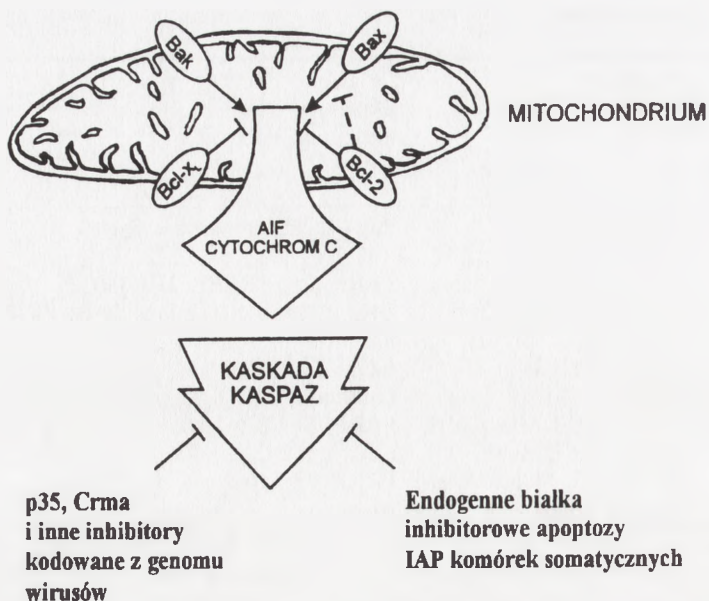
Białko z rodziny kaspaz u człowieka i myszy	Synonimy	Działanie: substrat proteolizy w jądrze lub cytoplazmie	Faza apoptozy Inicjacji Egzekucji
Kaspaza 1	ICE	ProIL1beta, prokaspaza 3,4	I,E
Kaspaza 2	ICH-1, NEDD2	PARP	I,E
Kaspaza 3	Apopaina, CPP32, Yama	PARP, Rb, SREBP, U1-70kDa, DNA-PKcs, RNP, Inhib. dysocj.GDP	E
Kaspaza 4	TX, ICH-2, ICERel-II	n.o.	I,E
Kaspaza 5	TY, ICERelIII	n.o.	E
Kaspaza 6	Mch2	Lamina A	E
Kaspaza 7	Mch3, ICE-LAP3, CMH-1	PARP, SREBP, RNP	E
Kaspaza 8	Mach, FLICE, Mch5	n.o.	I
Kaspaza 9	ICE-LAP6, Mch6, Apaf-3	PARP, prokaspaza-3	I
Kaspaza 10	Flice 2, Mch4	n.o.	I

Objaśnienia: kaspazy (ang. *caspases*), gdzie c określa proteazę cysteinową, asp – miejsce cięcia, ase – enzym; DNA-PKcs: DNA-zależna podjednostka kinaz białkowych; SRBP (ang. *sterol regulatory element binding protein*) – białko adaptorowe; PARP- poli (ADP-rybozo) polimeraza; GDP – guanozynodwufosforan; proIL1 beta – forma prekursorowa interleukiny 1 beta; RNP – rybonukleoproteiny; n.o. – nie określono

blonowym [45]. Te zależności przedstawiła wyczerpująco B. Grzelakowska-Sztabert [20].

## ROLA KASPAZY-9 W OKRESIE EMBRIONALNYM

Współgranie składników wielobiałkowego kompleksu cytochrom c - Apaf-1 - kaspaza - IAP jest istotne w regulacji śmierci programowanej (PCD) zwłaszcza w embrionalnym rozwoju układu nerwowego i immunologicznego, gdzie śmierć komórek jest naturalnym zdarzeniem w określonych stadiach. W okresie embrionalnym odnotowano u ssaków wysokie wartości neuronowych białek inhibitorowych IAP. Homeostaza kompleksów proapoptotycznych prokaspaza-IAP może ulec dramatycznym załamaniem w razie mutacji lub delecji genów kaspaz. Według prac Kuida i wsp. [33] oraz Hakem i wsp. [21] kaspaza 9 jest kluczową dla embrionalnego rozwoju CUN, pełniąc rolę odgórnego sygnalizatora kaskady kaspaz. Autorzy ci pracowali przy pomocy doświadczalnych mieszańców heterozygotycznych myszy *casp9<sup>+/-</sup>*, które uzyskano po nacelowanej modyfikacji genu *casp9<sup>+</sup>*. Uzyskano homozygotyczne embriony mysie *casp9<sup>-/-</sup>*, w których rozwoju zaznaczyła się duża śmiertelność. Patomorfologiczne zmiany polegały na przetrwaniu nadmiernej liczby progenitorowych komórek neuroepithelium, ekspansji strefy komór i struktur war-



RYSUNEK 2. Udział niektórych białek rodziny Bcl-2 w regulacji fazy wykonawczej apoptozy

stwy korowej przodomózgowia. Wraz z przerwaniem organizacji kory mózgowej dochodziło do krwiotoków w śródmózgowiu, wodogłównia i śmierci po urodzeniu.

Jednocześnie podchwyciono „tkankową oryginalność” torów inicjacji apoptozy. Polegała ona na tym, że tymocyty i splenocyty myszek *Casp9<sup>-</sup>* nie zawsze uczestniczyły w zaburzeniach realizacji kaskady kaspaz, jakie przejawiały embrionalne komórki macierzyste (ES) i embrionalne fibroblasty. Mianowicie „zgodną” oporność wobec apoptozy zaobserwowano w ekstraktach cytozolowych wymienionych komórek po zastosowaniu deksametazonu i promieniowania gamma w obecności cytochromu c [33]. Jednakże tylko tymocyty i splenocyty myszek *Casp9<sup>-</sup>* okazały niespodziewaną wrażliwość na apoptogenne działanie przeciwciał anty APO/FAS i promieniowania pozafiołkowego. Cytochrom c przemieszczał się do cytosolu i funkcjonowanie kaspazy 3 było zachowane. Autorzy komentują tę sytuację samym tytułem publikacji: „zróżnicowane zapotrzebowanie kaspazy 9 w różnych torach apoptozy” [21].

## BIAŁKA IAP W NOWOTWORACH: SURVIVIN

Przechodząc do apoptozy w komórkach nowotworowych nie można pominąć bardzo interesującego białka z rodziny inhibitorów apoptozy IAP, a mianowicie



SURVIVIN, wykrytego w roku 1997 przez Grację Ambrozini i wsp. [6]. Białko to występuje u człowieka w komórkach embrionalnych i nowotworowych, nie ma go w prawidłowych tkankach u dorosłych, a jego nazwa oddaje przedłużanie żywotności komórek nowotworowych. W przeciwieństwie do omówionych poprzednio białek IAP, SURVIVIN zawiera tylko jedną domenę BIR z powtórzeniami Cys-His w N-końcu i, tak jak NAIP, nie ma motywu palca cynkowego RING w końcu karboksylowym. Gen tego białka został przypadkowo odkryty przy przeszukiwaniu ludzkiej biblioteki genowej *Pl Genome System* przy pomocy hybrydyzacji do sondy cDNA 1,6 kb genu *ERP-1* (*effector cell protease receptor*). Produkt tego genu, receptor proteazy komórki efektorowej-1, wiąże proteazę, znaną jako czynnik Xa. Czynniki Xa należą do składników kaskady krzepnięcia i fibrynolizy, gromadzonych na powierzchni komórek. Receptory proteaz, niezależnie od udziału w procesie krzepnięcia, uczestniczą też w sygnalizacji międzykomórkowej [5]. Wysoka ekspresja *EPR-1* jest typowa dla komórek Reeda-Sternberga w chorobie Hodgkina, a sam czynnik Xa stymuluje m.in. proliferację komórek mięśniowych aorty i proliferację limfocytów pobudzonych przez antygen różnicowania CD3 [3].

Nowo odkryty gen *SURVIVIN* różnił się jednakże od genu *EPR-1* w analizie sekwencji zasad zmianą pięciu nukleotydów, insercją sześciu nukleotydów i, co najistotniejsze, odwrotnie skierowanym łańcuchem kodującym genu. Dojrzały transkrypt *SURVIVIN*, komplementarny do *EPR-1*, po translacji ramki odczytu pozwolił przewidzieć nowe białko o 142 aminokwasach, odmienne od *EPR-1*, z brakiem N-końcowego peptydu sygnałowego i pasma karboksyterminalnego dla insercji w błonie komórkowej. Zamiast tego zauważono duży stopień homologii między resztami 18 i 88 produktu tego genu a motywem BIR, czyli powtórzeń cysteina-histydyna jak w rodzinie IAP [6]. Nowe białko, nazwane SURVIVIN, nie ma palca cynkowego RING jak inne białka tej rodziny IAP u muszki owocowej i człowieka. W związku z tym zaproponowano model negatywnej regulacji RING-BIR. Na jego korzyść świadczą doświadczenia nad postępowaniem apoptozy w przebiegu embrionalnego rozwoju oka u muszek owocowych, które pochodziły z linii transgenicznej DIAP1-BIR po usunięciu z transgeny fragmentu kodującego palec cynkowy RING. Produkt takiego transkryptu – „okrojone” białko DIAP1 okazało się szczególnie aktywnym inhibitorem drICE, czyli kaspazy rodziny CED-3/ICE u *Drosophila* [23].

Białko SURVIVIN w tkankach, badane przy pomocy przeciwciała dla swoistej sekwencji, a także *mRNA SURVIVIN* badane analizą typu *northern*, zaskakuje tym, że jest obficie obecne w cytoplazmie komórek nowotworowych gruczolakoraków płuc, trzustki, jelita grubego, sutka, gruczołu krokowego i złośliwych chłoniaków, a nie ma go w komórkach dojrzałych narządów z wyjątkiem grasicy i łożyska. Przypomina to zachowanie innego białka antyapoptotycznego, BCL-2.

SURVIVIN było też wykrywalne w komórkach wszystkich analizowanych linii transformowanych mieloidalnych i limfoidalnych oraz tkankach płodowych nerek,

wątroby, płuc i przewodu pokarmowego. Takie zachowanie SURVIVIN wskazuje na reekspresję genu w tkankach nowotworowych w stosunku do okresu embrionalnego [6]. W niecały rok po tym odkryciu przystąpiono do badań klinicznych porównujących ekspresję SURVIVIN i nasilenie apoptozy u chorych w złośliwych chłoniakach [6], w *neuroblastoma* [4] i w raku żołądka [38]. Zastosowane testy immunohistochemiczne na szkiełkach odparafinowanych opierają się na znanej technice ABC (awidyna, biotyna, kompleks peroksydazowy) z zastosowaniem przeciwciał przeciw rekombinowanemu w *E. coli* białku SURVIVIN [38].

Odkrywców SURVIVIN interesowało pytanie: który z ewolucyjnie zabezpieczonych etapów apoptozy jest blokowany przez produkt genu *SURVIVIN* i czy ten gen mógłby stanowić docelowego adresata dla przerwania żywotności komórek nowotworowych [7]. Ze stosunku lokalizacji i czynności dwóch transkryptów *EPR-1* i *SURVIVIN* wynikało, że ekspresję endogennego genu *SURVIVIN* można zahamować w wyniku transfekcji *cDNA EPR-1*, potencjalnie działającego jako antysens genu *SURVIVIN*. Geny kodujące te dwa białka są zlokalizowane w odstępnie 75–130 par zasad w regionie chromosomowym 17q25, a łańcuch kodujący genu *EPR-1* jest odwrotnie skierowany do genu *SURVIVIN*. Po uzyskaniu stabilnej kotransfekcji obydwu genów uzyskano wzmożenie apoptozy i zahamowanie proliferacji komórek linii HeLa w punkcie restrykcyjnym G2/M [7]. Nie było to wynikiem interakcji białek. Trwają nadal badania mechanizmu hamowania kaspaz przez SURVIVIN i regulacji ekspresji obydwu genów, które by upoważniły do klinicznego zastosowania *cDNA EPR-1* jako antysensownego genu *SURVIVIN*.

## INTERAKCJE MIĘDZY BIAŁKAMI RODZINY BCL-2 A KASPAZAMI

Przed dwoma laty rozpoczęto leczenie chorych z niezmiernymi chłoniakami złośliwymi przy pomocy antysensownych nukleotydów genu *BCL-2* w ośrodku hemato-onkologicznym w Sutton, Anglia [55]. Wynik oceniono jako pomyślny. Wybór terapii w tym rodzaju nowotworów jest związany z odkryciem genu *BCL-2* w chłoniakach. Jego nazwa pochodzi od *B-cell leukemia/lymphoma* [53, 43], a rolę tego genu najwcześniej opisano w patofizjologii limfocytów B [31, por. 48].

W związku z tym warto rozważyć choć skrótowo ewentualne oddziaływania między białkami rodziny BCL-2 a kaspazami i białkami inhibitorowymi apoptozy IAP. Referowane prace doświadczalne i przemyślenia stwarzają skomplikowany obraz hierarchii zależności i wzajemnych interakcji [1, 20].

Kluczem do funkcji białek rodziny BCL-2 jest odkrycie, że 3-rzędowa struktura BCL-xL składa się z centralnych hydrofobowych łańcuchów alfa, które są podobne do domen niektórych toksyn bakteryjnych, takich jak: toksyna błonicza i kolicyny, tworzących pory w błonach komórkowych. Białka rodziny BCL-2 mogłyby zatem

działać jako kanały jonowe/pory w transporcie przez błonowy [39, 40]. Temu podejściu dały wyraz prace doświadczalne o antagonizmie BCL-xL i BAX w regulacji potencjału błonowego i homeostazy aparatu mitochondrialnego, określające BCL-2 strażnikiem integralności mikrotubuli [8, 54, 59].

Jeszcze wcześniej badania Hengartnera i Horvitz zidentyfikowały gen *ced-9*, odpowiedzialny za przeżycie komórek nicienia *Caenorhabditis elegans* jako homolog ssaczego genu *BCL-2*. Gen *ced-9* jest oponentem dwóch genów efektorowych śmierci programowanej komórek nicienia: *ced-3* i *ced-4*. Pierwszy koduje proteazę cysteinową homologiczną z ICE (*interleukin-1 beta converting enzyme*), należąca do rodziny kaspaz [7, 30]. Drugi, czyli produkt genu *ced-4* nicienia ma u ssaków swój homolog w białku Apaf-1 (*apoptosis protease activating factor*), jednym z mitochondrialnych czynników indukujących apoptozę [36, 64]. Z badań lokalizacji komórkowej i interakcji molekularnej między *ced-3*, *ced-4* i *ced-9* jawi się wielocząłony kompleks białkowy [58a, 58b]. Tu urywa się podobieństwo białek regulujących programowaną śmierć komórek nicienia do pro- i atypapoptotycznych białek u człowieka, u którego wykształciło się przeszło 10 białek rodziny kaspaz i przeszło 9 białek rodziny BCL-2 (por. [1 i 57]).

Białka BCL-2 i BCL-xL blokują uwalnianie z mitochondrium Apaf-1 i cytochromu c, nazwanego Apaf-2 [64], są też zdolne wiązać Apaf-1 [27, 59]. BAX i BAD, białka proapoptotyczne rodziny BCL-2 z ostatnio opisaną domeną BH3 [62] doprowadzają do obniżenia potencjału błonowego i formowania kanałów błonowych, zwiększając tym samym przepuszczalność błony mitochondrialnej i uwolnienia cytochromu c, a zatem przeciwnie do akcji BCL-2 [28, 41]. Bad i BCL-2 mogą tworzyć homo- i heterodimery [61], jednak nie zawsze. Aktywność obydwu jest regulowana posttranslacyjnie przez fosforylację i fosforylowany BAD nie jest wiązany przez oponenta BCL-xL, ponieważ podlega internalizowaniu do cytoplazmy i wiąże się z cytozolowymi białkami 14-3-3 [1, 56, 62], które umożliwiają współdziałanie z różnymi enzymami sygnalizacji (por. 56) i komentarz Redaktora.

Z opisu tych współzależności wynika, że molekularna interakcja białek rodziny BCL-2 z białkami Apaf-1 i Apaf-2 zachodzi najprawdopodobniej na etapie regulacji apoptozy wcześniejszym niż aktywacja kaspaz [13, 30]. Tu trzeba jeszcze dodać, że w interakcji Apaf-1 z kaspazą istotne jest odsłonięcie u obydwu molekularnej domeny CARD (*caspase responsiveness domain*) [26].

Różni autorzy skłaniają się do przyjęcia inhibicji apoptozy przez BCL-2 nawet już na szczeblu uruchamiania kaspaz [9, 29]. Dotyczy to przynajmniej kaspazy 3 (Apopain, Yama) po sygnalizacji przez receptor APO/FAS lub przez krzyżowe usieciowanie immunoglobulin powierzchni limfocytów B. Także B. Grzelakowska-Sztabert rozważa możliwość interakcji białek anty-apoptotycznych BCL-2 z tymi kaspazami cytoplazmatycznymi, które znajdują się w pobliżu zewnętrznej błony mitochondrialnej, błony jądrowej i endoplazmatycznego retikulum [20], a więc w pobliżu lokalizacji i aktywności białek BCL-2 [32]. Takie przypuszczenia znalazły

wyraz w pracy Hu i wsp. [27] oraz Pana i wsp. [41], którzy wykazali, że kluczowa prokaspaza 9, BCL-xL i Apaf-1 tworzą trzeciorzędowy kompleks z możliwością inaktywacji tej kaspazy. Jak przedstawiono wcześniej, kaspaza 9 uważana jest za proteazę o roli inicjującej w rodzinie kaspaz, stojącą wyżej od tzw. kaspaz wykonawczych.

## ROLA ONKOPROTEIN BCL-2, C-MYC I P53 W APOPTOZIE BIAŁACZKOWYCH LIMFOCYTÓW B

Odzwierciedleniem złożonej regulacji w doświadczalnej apoptozie *in vitro* [por. 49] są oddziaływania onkoprotein CMYC, P53 i BCL-2. Pierwsze uczestniczą w regulacji proliferacji i apoptozy mając wpływ na przejścia G1/S i G2/M cyklu komórkowego. Doświadczenia wykonane przez A. Filip [19] wykazały, że stały (konstytutywny) wysoki poziom onkoproteiny BCL-2 i C-MYC przeciwdziałał apoptozie, indukowanej *in vitro* preparatami glukokortykoidowymi i promieniowaniem UV-B w limfocytach B z przewlekłej białaczki B-limfocytowej. Ponadto, stosując metodę immunocytochemiczną, stwierdzono brak białka P53 w 9/10 świeżo izolowanych i indukowanych do apoptozy przypadków komórek B-CLL. Apoptoza była indukowana promieniowaniem UV-B w dawce wyższej od ustalonej dla zdrowych limfocytów krwi obwodowej, przy której w prawidłowych komórkach przy pomocy tej samej metody immunocytochemicznej odnotowano białkowy produkt genu *P53*, a aktywowane limfocyty wchodziły w apoptozę w pierwszej dobie po napromienieniu. Tylko u jednego na dziesięciu chorych stwierdzono w napromieniowanych UV-B limfocytach produkt *P53* i istotny indeks apoptotyczny w trzeciej dobie doświadczenia. Jakkolwiek za wcześniej jeszcze na interpretację tego zjawiska, nie można wykluczyć, że stała koekspresja BCL-2 i C-Myc może chronić przed apoptozą. Na ewentualny mechanizm tego zjawiska wskazuje praca Ryana i wsp., którzy obserwowali w mysich komórkach linii T3 wzmożoną ekspresję *bcl-2* blisko struktur porowatych błony jądrowej i zakłócenia indukcji *p53*. W związku z rolą BCL-2 w regulacji transportu przez błonowy autorzy zaproponowali hipotezę o uniemożliwieniu przemieszczania produktu genu *p53* z cytoplazmy do jądra komórkowego w fazie G1 cyklu. Nie jest to wniosek, a tylko jedno z przypuszczeń do przyjęcia lub odrzucenia [51].

Ten mechanizm przywodzi na myśl aktywność jeszcze innego białka, mianowicie białka CAS (*cell apoptosis susceptibility*), ludzkim homologu produktu genu segregacji chromosomów drożdży *cse-1* [10]. Jest to białko nieodzwonne w kontroli mitotycznego punktu restrykcyjnego i poprawnej segregacji chromosomów. Białko CAS jest też obecne w mikrotubuli i pośredniczy m.in. w transporcie jądrowym – drogą importyny alfa-onkoprotein supresorowych i czynników transkrypcyjnych, takich jak: P53, RB, BRCA, NF i nukleaz, istotnych w regulacji apoptozy. Gen

CAS został zmapowany do regionu chromosomowego 20q13, miejscu stosunkowo niestabilnym w komórkach guzów nowotworowych jelita grubego i sutka. Wrażliwość tych komórek na bodźce apoptotyczne można obniżyć, jeśli się je pozbawi produktu genu CAS przez ekspresję cDNA nukleotydów antysensownych genu kodującego CAS [11].

Bieżące piśmiennictwo wzbogaca nadal listę sygnałów przeżycia ingerujących w mechanizmy apoptozy jak BI-1, ostatnio sygnalizowany inhibitor BAX'a [52], czy ICAD, inhibitor DNAzy aktywowanej kaspazą [18]. Dalsza identyfikacja tych czynników przyczyni się do głębszego zrozumienia procesów biologicznych rozgrywających się w planie samozagłady komórek jak i w programie chorób wynikających z dysregulacji apoptozy.

## LITERATURA

- [1] ALLEN RT, CLUCK MW, AGRAVAL DK. Mechanisms controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. *Cell Mol Life Sci* 1998; **54**: 427–445.
- [2] ALNEMRI ES, LIVINGSTON DJ, NICHOLSON, SALVESEN G, THORNBERRY NA, WONG WW, YUAN J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996; **87**: 171.
- [3] ADIDA C, AMBROSINI G, PLESCIA J, CROTTY PL, COSTA J, ALTIERI DC. Protease receptors in Hodgkin disease: Expression of the factor Xa receptor, effector cell protease receptor-1 in Reed-Sternberg cells. *Blood* 1996; **88**: 1457–1464.
- [4] ADIDA C, BERREBID, PEUCHMAUR M., REYES-MUGICA M., ALTIERI DC. Anit-apoptosis gene, survivin and prognosis of neuroblastoma. *Lancet* 1998; **351**: 882–883.
- [5] ALTIERI DC. Molecular cloning of effector cell protease receptor-1, a novel cell surface receptor for the protease factor Xa. *J Biol Chem* 1994; **269**: 3139–3144.
- [6] AMRBROSINI G, ADIDA C, ALTIERI DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature Med* 1997; **3**: 917–921.
- [7] AMBROSINI G, ADIDA C, SIRUGO G, ALTIERI DC. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *J Biol Chem* 1998; **273**: 11177–11182.
- [8] ANTOSSON B, CONTI F, CIAVATTA AM, MONTESSUIT S, LEWIS S, MARTINOU I, BERNASCONI L, BERNARD A, MERMOD JJ, MAZZEI G, MAUNDRELL K, GAMBALE F, SADOUL R, MARTINOU JC. Inhibition of BAX channel forming activity by BCL-2. *Science* 1997; **277**: 370–372.
- [9] ARMSTRONG RC, AJA T, XIANG J, GAUR S, KREBS JF, HOANG K, BAI X, KORSMEYER SJ, KARANEWSKY DS., FRITZ LC, TOMASELLI KJ. Fas-induced activation of the cell death-related protease CPP32 is inhibited by BCL-2 and by ICE family protease inhibitors. *J Biol Chem* 1996; **271**: 16850–16855.
- [10] BRINKMANN U, BRINKMANN E, GALLO M., SCHERF U, PASTAN I. Role of CAS, a human homologue to the yeast chromosome segregation gene csel, in toxin- and TNF-induced apoptosis. *Biochem* 1996; **35**: 2891–2899.
- [11] BRINKMANN U. CAS, the human homologue of the yeast chromosome segregation gene csel, in proliferation, apoptosis and cancer. *Am J Hum Gen* 1998; **62**: 509–513.
- [12] BRZUSTOWICZ LM, LEHNER T, CASTILLA LH, PENCHASZADEH GK, WILHELMSEN KC, DANIELS R, DAVIES KE, LEPPERT M., ZITER F, WOOD D, DUBOVITZ V, ZERRES K, HAUSMANOWA-PETRUSEWICZ I, OTT J, MUSNAT TL, GILLIAM TC. Genetic mapping of chronic childhood onset spinal muscular atrophy to chromosome 5qll.2-13.3. *Nature* 1990; **344**: 540–541.

- [13] CHINNAIYAN AM, ORTH K, OROURKE K, DUAN H, POIRIER GG, DIXIT VM. Molecular ordering of the cell death pathway. BCL-2 and BCL<sub>xL</sub> function upstream of the ced-3-like apoptotic proteases. *J Biol Chem* 1996; **271**: 4573–4577.
- [14] CLEM RJ, MILLER LK. Control of programmed cell death by the baculovirus genes p35 and iap. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 5212–5222.
- [15] COHEN GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Bioch J* 1997; **326**: 1–16.
- [16] CROOK NE, CLEM RJ, MILLER LK. An apoptosis inhibiting baculovirus gene with the zink-finger-like motif. *J Virol* 1993; **67**: 2168–2174.
- [17] DEVERAUX QL, TAKAHASHI R, SALVESEN GS, REED JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell death proteases. *Nature* 1997; **388**: 300–304.
- [18] ENARI M., SAKAHIRA H, YOKOYOMA H, OKAWA K, IWAMATSU A, NAGATA S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998; **391**: 43–50.
- [19] FILIP A. Onkoproteiny BCL-2, C-MYC i P53 w ludzkich komórkach hemopoetycznych indukowanych do apoptozy. Rozprawa Doktorska, 1998; AM w Lublinie.
- [20] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Molekularne mechanizmy apoptozy indukowanej przez aktywację błonowych receptorów z nadrodziny TNF-R. *Post Biochem* 1998; **44**: 1–21.
- [21] HAKEM R, HAKEM A, DUNCAN GS, HENDERSON JT, WOO M., SOENGAS MS, ELIA A, DE LA POMPA JL, KAGID, KHOO W, POTTER J, YOSHIDA R, KAUFMAN SA, LOWE SW, PENNINGER JM, MAK TW. Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways *in vivo*. *Cell* 1998; **94**: 339–352.
- [22] HAN JP, SABATTINI P, PEREZ D, RAO L, MODHA D, WHITE E. The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53- inducible and death promoting BAX protein. *Genes Dev* 1996; **10**: 461–477.
- [23] HAY BA, WASSERMAN DA, RUBIN GM. *Drosophila* homologs of baculovirus inhibitor of apoptosis proteins function to block cell death. *Cell* 1995; **83**: 1253–1262.
- [24] HENGARTNER MO, HORVITZ HR. *C.elegans* cell surviving gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene BCL-2. *Cell* 1994; **76**: 665–676.
- [25] HOCKENBERRY DM, NUNEZ G, MILLIMAN C, SCHREIBER RD, KORSMEYER SJ. BCL-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; **348**: 334–336.
- [26] HOFFMAN K, BUCHER P, TSCHOPP J. The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Bioch Sci* 1997; **22**: 155–156.
- [27] HU Y, BENEDICT MA, WU D, INOHARA N, NUNEZ G. Bcl-2 interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase 9 activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 4386–4391.
- [28] HUNTER T. Oncoprotein networks. *Cell* 1997; **88**: 333–346.
- [29] IBRADO AM, HUANG Y, FANG G, LIU L, BHALLA K. Overexpression of BCL-2 and BCL<sub>xL</sub> inhibits Ara-C – induced CPP32/Yama protease activity and apoptosis of human acute myelogenous leukemia cells HL-60. *Canc Res* 1996; **56**: 4743–4748.
- [30] KLUCK RM, BOSSY-WETZEL E, GREEN DR, NEWMEYER DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for BCL-2 –regulations of apoptosis. *Science* 1997; **275**: 1132–1136.
- [31] KOCKIJ, ROŻYŃKOWA D. Gen BCL-2 w patofizjologii limfocytów B. *Post Biol Kom* 1991; **18**: 169–182.
- [32] KRAJEWSKI S, GASCOYNE RD, ZAPATA JM, KRAJEWSKA M, KITADA S, CHHANABHAI M, HORSMAN D, BEREAN K, PIRO LD, FUGIER-VIVIER I, LIU Y-J, WANG GH, REED JC. Immunolocalization of the ICE/Ced-3 family protease, CPP32 /Caspase-3/, in non-Hodgkin lymphomas, chronic lymphocytic leukemias, and reactive lymph nodes. *Blood* 1997; **89**: 3817–3825.

- [33] KUIDA K, HAYDAR TF, KUAN C-Y, GU Y, TAYA C, KARASUYAMA H, SU MS-S, RAKIC P, FLAVELL RA. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* 1998; **94**: 325–337.
- [34] LEVEBRVE S, BURGIEEN L, REBOULLET S, CLERMONT O, BURLET P, VIOUET L, BENICHOU B, CRUAUD C, MILLASEAU P, ZEVIANI M., de la PASSLIER D, FREZAL J, COHEN D, WEISSENBACH J, MUNNICH A, MELKI J. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy determining gene. *Cell* 1995; **80**: 156–165.
- [35] LEWIN B. Genes for SMA: multum in parvo. *Cell* 1995; **80**: 1–5.
- [36] LI P, NIJHAVAN D, BUDI HARDJO I, SRINIVASULA SM, AHMAD M., ALNEMRI ES. Cytochrome c and dATP dependent formation of Apaf-1/ caspase 9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; **91**: 479–489.
- [37] LISTON P, ROY N, TAMAI K, LEVEBRE C, BAIRD S, CHERTON-HOVART G, FARAHANI R, McLEAN M., IKEDA J-E, MACKENZIE A, KORNELUK RG. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and related family of IAP genes. *Nature* 1996; **379**: 349–353.
- [38] LU CD, ALTIERI DC, TONIGAWA N. Expression of a novel antiapoptosis gene, SURVIVIN, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinoma. *Canc Res* 1998; **58**: 1808–1812.
- [39] MINN AJ, VELEZ P, SCHENDELS SL, LIANG H, MUCHMORE SW, FESIK SW, FILL M, THOMPSON CB. BclxL forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 1997; **385**: 353–357.
- [40] MUCHMORE SW, SATTLER M, LIANG H, MEADOWS RP, HARLAN IE, YOON HS, NETTESHEIM D, CHANG BS, THOMPSON CP, WONG SL, NG SC, FESIK SW. X-ray and MNR structure of human BCL-XL – an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 1996; **381**: 335–341.
- [41] PAN G, OROURKE K, DIXIT VM. Caspase-9 BCLxL and Apaf-1 form a tertiary complex. *J Biol Chem* 1998; **273**: 5841–5845.
- [42] PELLIZONI L, KATOKA N, CHARROUX B, DREYFUSS G. A novel function for SMN, the Spinal Muscular Atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing. *Cell* 1998; **95**: 615–624.
- [43] REED JC. BCL-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994; **124**: 1–6.
- [44] RODRIGUEZ A, CHEN P, ABRAMS JN. Insights from model systems. Molecular prophets of death in the fly. *Am J Hum Genet* 1998; **62**: 514–519.
- [45] ROTHE M, PAN MG, HENZEL WJ, AYRES TM, GOEDDEL DV. The TNFR2- TRAF signalling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 1995; **83**: 1243–1252.
- [46] ROY N, DEVERAUX QL, TAKAHASHI R, SALVESEN GS, REED JC. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 1997; **16**: 6914–6925.
- [47] ROY N, MAHADEVAN MS, McLEAN M., SHUTLER G, YARAGHI Z, FARAHANI R, BAIRD S, BESNER-JOHNSTON A, LEVEBRE C, KANG X, SALIH M, AUBRY H, TAMAI K, GUAN X, IOANNOU P, CRAWFORD TO, deJONG PJ, SURHL, IKEDA JE, KORNELUK RG, MCKENZIE. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* 1995; **80**: 167–178.
- [48] ROŻYŃKOWA D. Genetyczne regulacje apoptozy, programowanej śmierci komórek. *Post Biol Kom* 1994; **21**: 303–318.
- [49] ROŻYŃKOWA D. Apoptoza doświadczalna: modele indukcji *in vitro* i zastosowania. *Post Biol Kom* 1996; **23**: 421–444.
- [50] RUPNIEWSKA ZM, ROŻYŃKOWA D, KUROWSKA M. Rodzina genów Bcl-2. *Post Biol Kom* 1997; **24**: 33–47.

- [51] RYAN JJ, PROCHOWNIK E, GOTTLIEB CA, APEL IJ, MERINO R, NUNEZ G, CLARKE MF. C-myc and Bcl-2 modulate p53 function by altering p53 subcellular trafficking during cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 5878–5882.
- [52] SHAHAM S, SHUMAN MA, HERSKOVITZ I. Death-defying yeast identify novel apoptosis genes. *Cell* 1998; **92**: 425–427.
- [53] TSUJIMOTO Y, CROCE CM. Analysis of structure, transcripts and protein product of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986: 5214–5218.
- [54] VANDER-HEIDEN MG, CHANDEL MS, WILLIAMSON EK, SCHUMACKER PT, THOMPSON CB. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 1997; **91**: 627–637.
- [55] WEBB A, CUNNINGHAM D, COTTER E, CLARKE PH, DiSTEFANO F, ROSS P, CORBO M, DZIEWANOWSKA Z. Bcl-2 antisense therapy for non-Hodkin lymphoma. *Lancet* 1997; **349**: 1137–1141.
- [56] WILCZYŃSKI G, MARKIEWICZ E, KULMA A, SZOPA J. Białka rodziny 14-3-3, występowanie i właściwości. *Post Biol Kom* 1998; **25**: 9–32. Także komentarz Redaktora str. 1.
- [57] WŁOGA DOROTA. Programowana śmierć komórek (PCD) w organizmach jednokomórkowych i u bezkręgowców. *Post Biol Kom* 1998; **25**: 469–473.
- [58a] WU D, WALLEN HD, NUNEZ G. Interaction and regulation of subcellular localization of CED-4 by CED-9. *Science* 1997; **275**: 1126–1136.
- [58b] WU D, WALLEN HD, INOHARA N, NUNEZ G. Interaction and regulation of the *Caenorhabditis elegans* death protease CED-3 by CED-4 and CED-9. *J Biol Chem* 1997; **272**: 21449–21454.
- [59] YANG J, LIU X, BHALLA K, KIM CN, IBRADO AM, CAI J, PENG IL, JONES DP, WANG X. Prevention of apoptosis by Bcl-2-release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997; **275**: 1129–1132.
- [60] YUAN J, SHAHAM S, LEDOUX S, ELLIS HM, HORVITZ HR. The *C. elegans* cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme: *Cell* 1993; **75**: 641–652.
- [61] ZHA H, AIME-SEMPE C, SATO T, REED JC. Proapoptotic protein BAX heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with BAX via a novel domain /BH3/ distinct from BH1 and BH2. *J Biol Chem* 1996; **271**: 7440–7444.
- [62] ZHA J, HARADA H, YANG E, JOCKEL J, KORSMEYER SJ. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3, not BCL-xL. *Cell* 1996; **87**: 619–628.
- [63] ZHOU Q, SNIPAS S, ORTH, MUZIO M, DIXIT VM, SALVESEN GS. Target protease specificity of the viral serpin CrmA, analysis of five caspases. *J Biol Chem* 1997; **272**: 7797–7800.
- [64] ZIMOWSKI JG. Rdzeniowy zanik mięśni – podłoże molekularne choroby. *Post Biol Kom* 1999; **26**: 311–323.
- [65] ZOU H, HENZEL WJ, LIU X, LUTSCHG, WANG X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c dependent activation of caspase 3. *Cell* 1997; **90**: 405–413.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 20.04. 1999 r.

Przyjęto: 28.04. 1999 r.

Adres autora: Lublin 20-610, Piastowska 37



## KWAS RETINOWY: JEGO METABOLIZM I MECHANIZM DZIAŁANIA

### RETINOIC ACID: ITS METABOLISM AND MECHANISM OF ACTION

Danuta KWIATKOWSKA, Janina KWIATKOWSKA-KORCZAK

Katedra i Zakład Biochemii Akademii Medycznej we Wrocławiu

*Streszczenie:* Kwas retinowy jest silnym morfogenem i regulatorem wzrostu i różnicowania komórek u płodu i w dorosłych organizmach. Moduluje też działanie wielu hormonów i enzymów. W wątrobie powstaje z karotenu, w innych tkankach z retinolu. Kwas retinowy występuje w postaci izomerów *all-trans*, *9-cis* i *13-cis*. W cytoplazmie wiąże go białka CRABP I i II. Jądrowe receptory kwasu retinowego, RAR i RXR należą do nadrodziny czynników transkrypcyjnych, indukowanych przez ligandy, podobnie jak receptory hormonów sterydowych, tyroksyny i witamin D. Receptory klasy RAR wiążą wszystkie izomery kwasu retinowego, klasy RXR – jedynie formę *9-cis*. W obrębie obu klas receptorów występują izoformy  $\alpha$ ,  $\beta$ , i  $\chi$ . Jedynie heterodimer RAR/RXR wykazuje aktywność biologiczną. Wiąże się on z elementem odpowiedzi w DNA. Stanowi go proste powtórzenie sekwencji AGGTCA, oddzielonych od siebie o dwa lub pięć nukleotydów. Interakcja z DNA stymuluje aktywność transaktywacyjną receptora, a w następstwie indukcję lub represję docelowych genów. W tkankach nowotworowych zmienia się występowanie i lokalizacja izoform receptorów kwasu retinowego, między innymi zanika RAR $\beta$ . Pod wpływem kwasu retinowego następuje zahamowanie wzrostu i indukcja różnicowania komórek białaczkowych, raka piersi i płuc, teratokarcinoma oraz innych nowotworów. (*Postępy Biologii Komórki* 1999; 26: 579–592)

*Słowa kluczowe:* kwas retinowy, receptory jądrowe, nowotwory.

*Summary:* Retinoic acid, a potent morphogen, regulates cell growth and differentiation in embryo and adults. Also, it modulates function of many hormones and enzymes. In liver it is derived from carotene, in other tissues – from retinol. Retinoic acid is present as *all-trans*, *9-cis* and *13-cis* isoforms. In cytoplasm they are bound by proteins CRABP I and II. Nuclear receptors of retinoic acid, RAR and RXR, belong to the superfamily of ligand inducible transcription factors, that include receptors of steroid hormones, thyroxine and vitamin D. Receptors of the RAR class interact with all retinoic acid isomers, RXR – with *9-cis*-form only. Three isoforms –  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\chi$  – of both classes are present in cells. Only heterodimer RAR/RXR is biologically active. It is bound to the response elements in DNA, consisting of two AGGTCA direct repeats, separated by two or five nucleotides. This interaction stimulates transactivity

function of the receptor, resulting in induction or repression of target genes. Modifications of the receptor isoform presence and localisation, for instance lack of RAR $\beta$ , was found in many tumors. Growth inhibition and differentiation induction was observed after retinoid treatment in leukemic, breast and lung cancer, teratocarcinoma and other malignant tissues.

(*Advances in Cell Biology* 1999; 26: 579–592)

*Key words:* retinoic acid, nuclear receptors, tumors.

Kwas retinowy (RA), endogenny produkt przemiany witaminy A u ssaków pełni funkcję morfogenu oraz regulatora proliferacji i różnicowania komórek w życiu pre- i postnatalnym. Niedobór i nadmiar RA, a także jego nieprawidłowa funkcja prowadzą do poważnych zaburzeń rozwoju płodu oraz funkcjonowania wielu tkanek i narządów w dorosłych organizmach [24, 42, 52]. Dobroczynny wpływ, jaki RA wywiera na procesy biologiczne, sprawia, że znalazł on zastosowanie jako lek, m.in. w białaczkach [4].

Fizjologiczna rola kwasu retinowego (RA) ujawnia się już w najwcześniejszych etapach rozwoju płodu [23]. Regulując ekspresję homeotycznych genów *hox* w odpowiedniej kolejności, uczestniczy w tworzeniu architektury ciała i przypisaniu komórkom właściwego miejsca wzdłuż przednio-tylnej osi ciała [39, 18]. Kwas retinowy jest niezbędny w rozwoju tkanek pochodzenia mezenchymalnego. Reguluje rozwój twarzoczaszki, kończyn i palców, a u ptaków – mineralizację chrząstek [61, 89]. Indukuje miogenezę i stymuluje różnicowanie kardiomiocytów [44, 88]. Kwas retinowy odgrywa istotną rolę w proliferacji i różnicowaniu komórek nerwowych [14]. Uważa się, że RA jest krytycznym czynnikiem rozwoju oka i fotoreceptorów, niezbędnym w kształtowaniu siatkówki, soczewki i rogówki [32]. RA wpływa na formowanie ucha środkowego [50]. Wpływa też na rozwój jelit, stymuluje prawidłową interakcję komórek nabłonka i mezenchymy, tworzenie mięśniówki i wzrost kosmków [65, 84]. Tak w życiu płodowym, jak i w dorosłych organizmach kwas retinowy moduluje morfogenezę skóry i naskórka, różnicowanie keratynocytów, wzrost włosów i piór oraz funkcję gruczołów potowych [36, 55, 29, 68]. RA chroni skórę przed starzeniem się i przed promieniami UV [19].

Prawidłowy wzrost i różnicowanie komórek nabłonka oskrzeli jest uzależnione od obecności RA [45]. Kwas retinowy hamuje proliferację i stymuluje monocytarne różnicowanie promielocytów [62], moduluje generowanie granulocytów, aktywuje neutrofile [41] oraz limfocyty T i B [6]. U samców RA reguluje morfogenezę jąder, najądrza i prostaty [73, 15, 1]. Ostatnio wykazano, że RA bierze udział w procesach apoptozy komórek [78].

Przy braku RA lub inaktywacji wszystkich jego receptorów następuje śmierć płodu. W przypadku niedoborów obserwuje się występowanie wad rozwojowych: agenezę lub zniekształcenie twarzoczaszki, homeotyczne transformacje kręgów i kończyn, zmiany soczewki, siatkówki i rogówki oka, dysplazję ślinianek, tarczycy i grasicy, bezpłodność samców. Należy nadmienić, że nadmiar kwasu retinowego w określonych etapach rozwoju płodu ma działanie teratogenne [2, 3, 18, 29, 39].

Kwas retinowy moduluje działanie wielu hormonów, m.in. przez wpływ na ich syntezę, jak w przypadku hormonu wzrostu [26], lub sekrecję, jak insuliny [11,12]. RA stymuluje ekspresję genu i syntezę receptorów adrenaliny, insulino-podobnego czynnika wzrostu (IGF), D<sub>2</sub> dopaminy [5, 22, 30, 71], obniża zaś syntezę receptora neuropeptydu Y [53]. RA wiąże się ze specyficznym typem receptora IGF (M6P/IGF) i moduluje jego działanie [37]. Hamuje działanie bradykininy, blokując przenoszenie jej sygnału na fosfolipazę C i produkcję inozytolo-1,4,5-P<sub>3</sub> [28]. Kwas retinowy wywiera bezpośredni wpływ na działanie tyroksyny, witaminy D<sub>3</sub>, aktywatora proliferacji peroksyosomów (PPAR) i prostanoidów, gdyż ich jądrowe receptory tworzą aktywne heterodimery z receptorem RA typu RXR [51]. Produkcja interleukin jest też pod kontrolą RA. Stymuluje on syntezę IL-2 i jej receptora w limfocytach T oraz produkcję IL-4 w tymocytach, obniża zaś ekspresję i hamuje działanie IL-6 i IL-7 [6, 17, 60].

Synteza i aktywność wielu enzymów jest uzależniona od RA. Wpływa on stymulująco na ceruloplazminę [76], karboksykinazę PEP [63], acylotransferazę lizofosfatyd-retinol [75], S-transferazę glutationową [47], glukokinazę [16], syntazę kwasów tłuszczowych [69], kinazę białkową C<sub>zeta</sub> [7] i wiele innych.

## METABOLIZM KWASU RETINOWEGO

Niewielkie ilości kwasu retinowego mogą powstać w jelitach i wątrobie bezpośrednio z karotenu. W osoczu RA jest transportowany przez albuminy. Jego stężenie nie przekracza 4–14 nmoli/l. Egzogeny RA jest wydajnie wchłaniany do komórek, ale jego dalszy metabolizm jest stosunkowo powolny [67]. Wydaje się, że w komórkach głównym źródłem RA jest retinol. Transport retinolu z osocza, gdzie występuje on w połączeniu z białkiem RBP, odbywa się z udziałem błonowego receptora RBP. W komórce retinol wiąże się z cytozolowym białkiem nośnikowym, CRBP. W tej związanej postaci jest utleniany do retinalu, a następnie kwasu retinowego. Enzym, który katalizuje te reakcje, jest identyczny z izoenzymem IV dehydrogenazy alkoholowej [31].

RA występuje w komórce w co najmniej trzech postaciach izomerycznych: *all-trans*- (ATRA), *9-cis*- i *13-cis*-. Formy te mogą przechodzić wzajemnie w siebie. We wszystkich tkankach i szczególnie energicznie zachodzi enzymatyczna izomeryzacja form *cis*-RA do ATRA [9]. Nie wszystkie jednak tkanki, jak np. śródbłonek naczyń, mają zdolność przekształcania ATRA do *9-cis*-RA [43]. Ta ostatnia forma może jednak powstawać drogą utlenienia *9-cis*-retinolu. Opisano i wydzielono enzym, katalizujący tę reakcję. Występuje on we wszystkich tkankach wrażliwych na kwas retinowy [58, 70]. Ostatnio odkryty stereoizomer *9,13-di-cis*-RA okazał się równie aktywny [34].

W cytoplazmie RA wiąże się z dużym powinowactwem ze swoistymi nośnikami białkowymi, CRABP I i CRABP II. Gen białka Crabp I zlokalizowano na szczurzym

chromosomie 8 [66]. U człowieka gen ten mieści się na chromosomie 15q24. Gen dla CRABP II jest zlokalizowany na ludzkim chromosomie 1q21 [20]. Ekspresja genu kodującego CRABP I jest hamowana przez RA, indukowana zaś przy jego niedoborach, np. w awitaminozie A. Gen ten jest też regulowany przez tyroksynę [85].

Wszystkie izoformy kwasu retinowego podlegają dalszej przemianie. Katalizuje ją wybiórczo jeden z enzymów z grupy cytochromów P450 [21]. Nadmierna aktywność cytochromu P450 swoistego dla RA może powodować jego niedobór w komórce [54].

## JĄDROWE RECEPTORY RA I MECHANIZM ICH DZIAŁANIA

Receptory kwasu retinowego zaliczamy do dużej nadrodziny białkowych czynników transkrypcyjnych, indukowanych przez drobnocząsteczkowe ligandy, np. hormony płciowe, kortykosteroidy czy tyroksynę. Wszystkie receptory tego typu cechuje podobieństwo budowy pierwszorzędowej i konformacji oraz jednakowe ułożenie przestrzenne domen funkcjonalnych. Mechanizm działania wszystkich przedstawicieli nadrodziny jest też jednakowy. Przyłączenie liganda indukuje zmianę konformacji cząsteczki receptora, co umożliwia jego połączenie z odpowiednim regionem DNA, zwanym elementem odpowiedzi (RE, *response element*), często też elementem odpowiedzi hormonalnej (HRE). Elementy te znajdują się w obszarach DNA zwanych wzmacniaczami (*enhancers*) lub wygaszaczami (*repressors*).

Przyłączenie kompleksu receptor-ligand do RE indukuje interakcje kompleksu z aktywatorami i innymi białkami aparatu transkrypcyjnego, co nosi nazwę aktywności transaktywacyjnej. Następstwem tego procesu jest stymulacja lub niekiedy hamowanie ekspresji określonych genów. Receptory należące do tej nadrodziny wykazują aktywność jedynie w postaci dimerów.

Receptory kwasu retinowego wchodzi w skład wydzielonej podgrupy (podrodziny) opisanej nadrodziny. Podgrupa ta odznacza się szczególnie wysoką wzajemną homologią strukturalną. Oprócz receptorów RA zaliczamy do niej także receptory tyroksyny, witamin D, prostanoidów, receptor aktywowany przez czynnik proliferacji peroksosomów (PPAR) oraz szereg tzw. „receptorów sierocych”, o nieznanym dotąd ligandach. Istnieją dwie klasy receptorów kwasu retinowego: RAR i RXR. RAR wiąże wszystkie izomery RA, - ATRA, 9-*cis*-RA i 13-*cis*-RA, zaś RXR – wyłącznie 9-*cis*-RA [64].

W obu klasach receptorów RA wyróżnia się 5 domen strukturalnych o ściśle określonych funkcjach, charakterystycznych dla tej nadrodziny. Są to – idąc od N-końca cząsteczki – domeny A, B, C, D i E. W klasie RXR wyróżnia się też dodatkową, C-końcową domenę F. Obydwie klasy receptorów RA występują w

postaci podtypów: RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  i RAR $\chi$  oraz RXR $\alpha$ , RXR $\beta$  i RXR $\chi$ , kodowanych przez oddzielne geny. Formy te wykazują aż 90% wzajemnej homologii w obrębie domeny C, 80% – w domenie E, natomiast w domenach transaktywacji, A, B i AF-2 dają się zauważyć znaczne różnice sekwencji aminokwasów. Dodatkowo, w każdym podtypie RAR i RXR występują izoformy jako skutek alternatywnego składowania mRNA [39]. Podtypy i ich izoformy różnią się często swymi właściwościami i funkcją. Ich profil często zmienia się w zależności od okresu rozwoju płodowego, a także jest swoisty dla określonych tkanek. Miejsce wiązania kwasu retinowego znajduje się w domenie E. Receptory klasy RAR mają w tej domenie osobne miejsca wiążące odpowiednie izoformy liganda, ATRA i 9-*cis*-RA [40]. Funkcja domeny E nie ogranicza się do przyłączania RA. Uczestniczy ona także w dimeryzacji receptorów, mieszczą się w niej bowiem obszary interakcji obu podjednostek. W domenie E znajduje się też region AF-2, wykazujący zdolność wiązania się z białkami aparatu transkrypcyjnego i pobudzania ekspresji genów. Aktywność transaktywacyjną niezależną od regionu AF-2 mają N-końcowe domeny A i B. Domena C, odznaczająca się wysoką homologią w obrębie całej nadrodziny jest miejscem wiązania receptora z DNA. W domenie C znajdują się motywy charakterystyczne dla białek wiążących DNA, tzn. „palce cynkowe”. Tworzą je dwie pętle łańcucha polipeptydowego, stabilizowane przez dwa atomy cynku. Wystając ponad powierzchnią cząsteczki receptora mają ułatwiony dostęp do obszarów DNA, z którymi reagują. Musi przy tym nastąpić jednoczesna interakcja dwu elementów odpowiedzi w DNA z dwoma domenami C, stąd też konieczność udziału dwu podjednostek receptora, czyli jego dimeru. W odróżnieniu od receptorów hormonów steroidowych, tworzących homodimery, funkcjonalną jednostką receptorów kwasu retinowego jest heterodimer RAR/RXR. Wprawdzie RXR może tworzyć homodimery, ale bardzo rzadko występuje w tej postaci. RAR jest pozbawiony zdolności łączenia dwu identycznych podjednostek.

RXR tworzy też aktywne dimery z receptorami tyroksyny (TR), witamin D (VDR), PPAR [13, 51]. Ma to ogromne znaczenie fizjologiczne i świadczy o konieczności udziału witamin A i powstającego z nich RA w znacznie większym zakresie funkcji biologicznych, niż to dotychczas wiedziano.

Element odpowiedzi na RA (RARE) w DNA składa się z dwu „półmiejsc” o sekwencji AGGTCA. Sekwencje te są ułożone jako tzw. powtórzenia proste (czyli nie odwrócone), oddzielone od siebie o pięć nukleotydów. Element taki nosi nazwę DR<sub>5</sub> (*direct repeat 5*). W przypadku dimeru receptorów RXR/PPAR między półmiejscami znajduje się tylko jeden nukleotyd (DR<sub>1</sub>), RXR/VDR – trzy nukleotydy (DR<sub>3</sub>), RXR/TR – cztery nukleotydy (DR<sub>4</sub>). Ostatnio okazało się, że DR<sub>2</sub> jest drugim elementem odpowiedzi na kwas retinowy [51]. We wszystkich heterodimerach RXR zajmuje zawsze miejsce *trans*, ku 5'-końcowi cząsteczki DNA, zaś jego partner 3'-końcowe miejsce *cis* [64]. Elementy odpowiedzi nie łączą się z receptorami wolnymi od liganda. Po związaniu ligandów, przypuszczalnie najpierw

wiąże się RXR w miejscu *trans*. Inicjuje to interakcję miejsca *cis* z drugim monomerem [33]. W wielu przypadkach przyłączenie receptorów do elementów odpowiedzi wymaga obecności dodatkowych białek, F-1 i F-2 oraz ich fosforylacji [79]. Kwestią dyskusyjną pozostaje, czy RXR pełni w dimerze jedynie bierną rolę stymulacji przyłączenia swego partnera, czy też można mu przypisać samodzielną rolę czynnika transkrypcyjnego dla określonych genów. Obydwa poglądy mają swoich zwolenników.

Połączenie elementów odpowiedzi w DNA z domenami C w dimerze receptora wywołuje w tym ostatnim zmiany konformacyjne, niezbędne dla ujawnienia zdolności transaktywacji i asocjacji z aktywatorami lub składnikami głównego kompleksu transkrypcyjnego. Wykazano, że w wielu przypadkach region AF-2 domeny E RAR łączy się bezpośrednio z czynnikiem transkrypcyjnym TF-II B. Także RXR może wiązać się z tym czynnikiem, ale interakcja jest wtedy słabsza niż w przypadku RAR i zachodzi poza C-kończową domeną receptora. Po usunięciu TF-II B z komórek hodowli tkankowej, kwas retinowy utracił zdolność regulacji ekspresji wielu genów [10].

## RETINOIDY A NOWOTWORY

Retinoidy, a szczególnie RA są od wielu lat przedmiotem szczególnego zainteresowania przede wszystkim w terapii antynowotworowej, ze względu na swoje działanie prowadzące do zahamowania wzrostu i podziałów komórkowych, stymulację procesu różnicowania, jak również przypisywaną im ostatnio zdolność uruchomienia sygnału prowadzącego do apoptozy, czyli programowanej śmierci komórki. Od szeregu lat RA stosowano w leczeniu białaczek promieloblastycznych, obserwując długoletnie remisje i wyleczenia [4]. Wiele informacji na temat mechanizmów działania RA dostarczają eksperymenty przeprowadzane na hodowlach tkankowych, nowe techniki badawcze pozwalające na identyfikację rodzajów receptorów w tkankach prawidłowych i patologicznych, jak również możliwość stosowania syntetycznych retinoidów specyficznie łączących się z określonym typem receptora.

W ostatnich latach wiele tego typu badań przeprowadzono w przypadkach nowotworów sutka. Badając występowanie podtypów receptorów RAR $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\chi$  stwierdzono różnice w rozmieszczeniu tych receptorów w tkankach prawidłowych w porównaniu z tkanką nowotworową. W tkankach prawidłowych wykazano obecność wszystkich trzech izoform, podczas gdy w tkance nowotworowej oraz w tkance otaczającej guz zaobserwowano znacznie zmniejszoną ekspresję lub całkowity brak izoformy receptora RAR $\beta$ . Nie wykazano mutacji DNA w obszarze RARE, tak więc jedną z możliwości wytłumaczenia supresji genu receptora RAR $\beta$  jest mutacja w regionie promotera [87]. Brak lub obniżenie ekspresji genu tego receptora w nowotworach sutka potwierdzili inni autorzy [72].

Podobne rezultaty uzyskano badając występowanie receptorów RAR i RXR w drobnokomórkowym raku płuc. Podczas gdy w tkance prawidłowej stwierdzono obecność wszystkich rodzajów receptorów, receptor RAR $\beta$  udało się wykazać jedynie w około 40% badanych tkanek nowotworowych [90]. Obniżenie lub zahamowanie ekspresji genu RAR $\beta$  stwierdzono również w nowotworach trzustki [35], jamy ustnej [56], wątroby [46]. Można więc przypuszczać, że utrata receptora RAR $\beta$  może być jednym z czynników bezpośrednio związanych z procesem karcinogenezy, co zdaniem niektórych autorów sugeruje rolę genu receptora RAR $\beta$  jako genu supresorowego [46].

Ostatnio ukazało się wiele prac dotyczących efektów działania RA na linie komórkowe prawidłowe i nowotworowe, jak również prac mających na celu wyjaśnienie funkcji poszczególnych receptorów w transmisji sygnałów prowadzących do ujawnienia antynowotworowej aktywności przypisywanej RA i jego izomerom.

Wiadomo, że ekspresja genu kodującego receptor RAR $\beta$  jest pod kontrolą RA. Stwierdzono, że RA w kompleksie z odpowiednim receptorem indukuje syntezę RAR $\beta$  między innymi w komórkach teratokarcinoma F [74], hodowlach hepatocytów [38], komórkach melanoma [77].

W badaniach *in vitro* przeprowadzonych na komórkach pochodzących z linii MCF 7 nowotworu sutka wykazano, że w obecności RA dochodzi do zahamowania wzrostu, co spowodowane jest zatrzymaniem komórek w fazie G1. Obserwuje się również zmniejszenie stosunku ilości komórek znajdujących się w fazach S i G2 + M. Uzyskane wyniki sugerują, że może to być efektem bezpośredniego wpływu RA na ekspresję niektórych cyklin i kinaz cyklinozależnych, zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego. Problem, których cyklin i kinaz to dotyczy, nie został jeszcze jednoznacznie wyjaśniony i zdania różnych autorów na ten temat nie są zgodne [80, 91].

Zatrzymanie komórek w fazie G1 jest prawdopodobnie etapem poprzedzającym proces apoptozy [52]. Stwierdzono, że zahamowanie proliferacji komórek MCF 7 zachodzi nie tylko w obecności ATRA, silną aktywność antyproliferacyjną wykazują również izomery RA: 9-*cis*- i 13-*cis*-RA oraz jego niektóre fizjologiczne metabolity 4-okso-ATRA i 5,6-epoksy-ATRA [81].

W badaniach na komórkach linii neuroblastoma SH SY 5Y oraz komórek pochodzących z drobnokomórkowego raka płuc NCI-H82 i NCI-H209 wykazano, że wpływ 9-*cis*-RA na procesy hamowania wzrostu i indukcji apoptozy jest silniejszy w porównaniu z ATRA [49, 27, 48].

Badano różne syntetyczne pochodne RA selektywnie działające na receptor RAR $\chi$  w liniach komórkowych pochodzących z nowotworu sutka. Wykazano, że są one silnymi inhibitorami wzrostu zarówno same, jak i w kombinacji z IFN $\beta$ . Można więc przypuszczać, że antyproliferacyjna aktywność retinoidów związana jest z sygnałami przekazywanymi przez receptor RAR $\chi$ . Ze względu na małą to-

ksyczość testowanych retinoidów i działanie porównywalne z ATRA wydaje się, że tego typu związki mogą mieć duże znaczenie kliniczne w przyszłości [86].

Stwierdzono, że RA hamuje wzrost komórek pochodzących z ludzkiego nerwiaka (SK-N-BE 2), indukuje procesy różnicowania lub uruchamia sygnały prowadzące do apoptozy. W komórkach apoptotycznych zaobserwowano wzmożoną ekspresję genu transglutaminazy, enzymu katalizującego powstawanie wiązań krzyżowych między łańcuchami polipeptydowymi. Wyniki uzyskane dzięki zastosowaniu selektywnie działających analogów RA pozwalają przypuszczać, że do indukcji transglutaminazy wystarczają sygnały przekazywane przez retinoidy wiążące się z  $RAR\alpha$  lub  $RAR\chi$ , natomiast zdaniem tych autorów zapoczątkowanie procesu apoptozy wymaga jednocześnie stymulacji obydwu typów receptorów [57].

Zaangażowanie receptora  $RAR\chi$  w przekazywaniu sygnałów prowadzących do apoptozy oraz indukcji transglutaminazy potwierdzają badania na mysich tymocytach i komórkach CD4+CD8. I w tym przypadku stwierdzono znacznie wyższą efektywność 9-*cis*-RA w porównaniu z ATRA. Zaobserwowano, że oprócz transglutaminazy zwiększa się aktywność endonukleaz. Proces apoptozy można zahamować przez dodanie związków chelatowych wiążących wapń lub inhibitorów proteaz. Inaczej widzą autorzy funkcję receptora  $RAR\alpha$ . Uważają, że stymulacja receptora  $RAR\alpha$  przez specyficznie działające na ten receptor analogi RA może hamować mediowany przez receptor  $RAR\chi$  proces apoptozy. Takiego efektu nie obserwuje się jednak w komórkach przy fizjologicznym stężeniu RA. Przy wyższych stężeniach RA, powstający z niego 9-*cis*-RA przez swoje oddziaływanie z receptorami RXR może neutralizować ten inhibitorowy efekt. Autorzy sugerują, że powstawanie 9-*cis*-RA może być takim krytycznym momentem decydującym o wejściu komórki na drogę pozytywnej selekcji lub jej zaniechaniu [78].

Zaobserwowano, że RA ma zdolność hamowania wzrostu nie tylko komórek nowotworowych, lecz także ludzkich prawidłowych komórek nabłonkowych sutka. Zatrzymaniu ich w fazie G1 towarzyszyło między innymi obniżenie ekspresji cyklin D1, E i cyklinozależnej kinazy 4, lecz nie stwierdzono indukcji apoptozy. Może to sugerować, że właśnie proces hamowania wzrostu, a nie apoptoza jest mechanizmem, przez który retinoidy spełniają swoją funkcję ochronną przed transformacją nowotworową [72].

Jedną z funkcji przypisywanej RA i jego izomerom jest również wpływ na różnicowanie komórek. W słabo zróżnicowanych komórkach nabłonka endometrium (KLE), które utraciły uporządkowane filamenty aktynowe i cytoplazmatyczne mucyny, w obecności 13-*cis*-RA lub ATRA zaobserwowano reorganizację filamentów aktynowych. Komórki umiarkowanie zróżnicowane (RL95-2) w obecności RA wykazywały znaczną reorganizację filamentów i zwiększenie ilości mucyn cytoplazmatycznych [8].

W komórkach ludzkiego gruczolakoraka linii Colo 201 i Colo 205, które utraciły zdolność oddziaływania z substancją międzykomórkową, po inkubacji z RA stwier-



dzono zahamowanie wzrostu i zwiększoną produkcję antygenu karcynoembrionalnego. Zaobserwowano zwiększoną zdolność do adhezji, obecność E-kahedryny w miejscu kontaktu komórka-komórka, jak również zwiększoną indukcję kinazy FAK (kinazy adhezji płytkowej, *focal adhesion kinase*) [59]. W komórkach hepatoma Mc-RH8994 wzmoczona ekspresja genu RAR $\beta$  prowadziła zarówno do zwiększonej wrażliwości na antyproliferacyjny efekt RA, jak również do spontanicznego procesu różnicowania [46]. Zaobserwowano, że procesowi różnicowania w komórkach teratocarcinoma F-9 towarzyszyła zwiększona ekspresja genów RAR $\beta$ , RXR $\alpha$  oraz genu odpowiedzialnego za syntezę  $\alpha$ -fetoproteiny (AFP). Autorzy sugerują, że regulacja ekspresji genu AFP zachodzi przez tworzenie homodimerów RXR $\alpha$  [83].

Wydaje się, że retinoidy mogą wywierać hamujący wpływ na progresję nowotworów. Używając selektywnie działających agonistów receptorów retinoidów wykazano, że prawdopodobnie heterodimer RAR/RXR kontroluje represję metaloproteinaz stromielizyny i kolagenazy śródmiąższowej, których ekspresja jest związana z powstawaniem przerzutów [25].

Badania kliniczne wykazały korzystne działanie retinoidów w przypadkach nowotworów głowy i szyi. Stosowane u pacjentów redukowały nawroty choroby oraz wzmacniały procesy regresji stanów przednowotworowych [82, 56].

Rezultaty przeprowadzonych badań wskazują na pozytywną funkcję retinoidów w hamowaniu wzrostu i progresji nowotworów. Mimo wielu doniesień, molekularny mechanizm tego działania nie został jednak jeszcze w pełni wyjaśniony, a otrzymane wyniki nie zawsze są całkowicie zgodne, co świadczy z pewnością o stopniu trudności problemu.

## PIŚMIENICTWO

- [1] ABOSEIF SR, DAHIYA R, NARAYAN P, CUNHA GR. Effect of retinoic acid on prostatic development. *Prostate* 1997; **2**: 166–167.
- [2] ABU HILJEH G, PADMANABHAN R. Retinoic-acid induced abnormal development of hindlimb joints in the mouse. *Eur J Morphol* 1997; **35**: 327–336.
- [3] AKMAL KM, DUFOUR JM, VO M, HIGGINSON S, KIM KH. Ligand-dependent regulation of retinoic acid receptor  $\alpha$  in rat testis: *in vivo* response to depletion and repletion of vitamin A. *Endocrinology* 1998; **139**: 1239–1248.
- [4] ASOU N, ADACHI K, TAMURA J, KANAMARU A, KAGEYAMA S, HIRAOKA A, OMOTO E, SAKAMAKI H, TSUBAKI K, SAITO K, OHNO R. *All-trans* retinoic acid therapy for newly diagnosed promyelocytic leukemia: comparison with intensive therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997; **40** Suppl: 30–35.
- [5] BAHOUTH SW, BEAUCHAMP MJ, PARK EA. Identification of a retinoic acid response domain involved in the activation of the  $\beta$  1-adrenergic receptor gene by retinoic acid in F9 teratocarcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 1998; **55**: 215–225.
- [6] BALLOW M, XIANG S, GREENBERG SJ, BRODSKY L, ALLEN C, RICH G. Retinoic acid-induced modulation of IL-2 mRNA production and IL-2 receptor expression in T cells. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; **113**: 167–169.

- [7] BARTOLASO L, GIBELLINI D, SECCHIERO P, PREVIATI M, FALGIONE D, VISANI G, RIZZOLI R, CAPITANI S, ZAULI G. Accumulation of catalytically active PKC-zeta in the nucleus of HL-60 cell line plays a key role in the induction of granulocytic differentiation mediated by *all-trans* retinoic acid. *Br J Haematol* 1998; **100**: 541–549.
- [8] CARTER CA, PARHAM GP. State of differentiation affects the response of endometrial adenocarcinoma cells to retinoic acid. *Anticancer Res* 1997; **17**: 1973–1983.
- [9] CHEN H, JUCHAU MR. Biotransformation of 13-*cis* and 9-*cis*-retinoic acid to *all-trans*-retinoic acid in rat conceptual homogenates. Evidence for catalysis by a conceptual isomerase. *Drug Metabol Dispos* 1998; **26**: 222–228.
- [10] CHEN HW, PRIVALSKY ML. Retinoid X and retinoic acid receptors interact with transcription factor II-B by distinct mechanisms. *Mol Cell Endocrinol* 1997; **129**: 55–61.
- [11] CHERTOW BS, DRISCOLL HK, GOKUNG NQ, PRIMERANO D, CORDLE MB, MATTHEWS KA. Retinoid X receptors and the effects of 9-*cis*-retinoic acid on insulin secretion from RINm5F cells. *Metabolism* 1997; **46**: 656–660.
- [12] CHERTOW BS, GOKING NQ, DRISCOLL HK, PRIMERANO DA, MATTHEWS KA. Effects of *all-trans*-retinoic acid (ATRA) and retinoic acid receptor (RAR) expression on secretion, growth and apoptosis of insulin-secreting RINm5F cells. *Pancreas* 1997; **15**: 122–131.
- [13] CHIBA H, CLIFFORD J, METZGER D, CHAMBON P. Distinct retinoid X receptor-retinoic acid receptor heterodimers are differentially involved in the control of expression of retinoid targeted genes in F9 embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 1997; **17**: 3013–3020.
- [14] COSGAYA JM, RECIO JA, ARANDA A. Influence of Ras and retinoic acid on nerve growth factor induction of transin gene expression in PC12 cells. *Oncogene* 1997; **15**: 1687–1696.
- [15] COSTA SL, BOEKELHEIDE K, VANDERHYDEN BC, SETH R, McBURNEY MW. Male infertility caused by epididymal dysfunction in transgenic mice expressing a dominant negative mutation of retinoic acid receptor  $\alpha 1$ . *Biol Reprod* 1997; **56**: 985–990.
- [16] DECAUX JF, JUANES M, BOSSARD P, GIRARD J. Effects of triiodothyronine and retinoic acid on glucokinase gene expression in neonatal rat hepatocytes. *Mol Cell Endocrinol* 1997; **130**: 61–67.
- [17] DiSEPIO D, MALHOTRA M, CHANDRARATNA RA, NAGPAL S. Retinoic acid receptor-nuclear factor - interleukin 6 antagonism. *J Biol Chem* 1997; **272**: 25555–25559.
- [18] DUPE V, DAVENNE M, BROCRD J, DOLLE P, MARK M, DIERICH A, CHAMBON P, RAJLI PM. *In vivo* functional analysis of the Hoxa-1 3' retinoic acid response element (3'RARE). *Development* 1997; **124**: 399–410.
- [19] FISHER GJ, TALWAR HS, LIN J, McPHILLIPS F, WANG Z, Li X, WAN Y, KANG S, VOORHEES JJ. Retinoic acid inhibits induction of c Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin *in vivo*. *J Clin Invest* 1988; **101**: 1432–1440.
- [20] FLAGIELLO D, APIOU F, GIBAUD A, POUAPON MF, DUTRILLAUX B, MALFOY B. Assignment of the genes for cellular retinoic acid binding protein 1 (CRABP 1) and 2 (CRABP2) to human chromosome band 15q24 and 1q21.3, respectively, by *in situ* hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1997; **76**: 17–18.
- [21] FUJII H, SATO T, KANEKO S, GOTOH O, FUJII-KURIYAMA Y, OSAWA K, KATO S, HAMADA H. Metabolic inactivation of retinoic acid by a novel P450 differentially expressed in developing mouse embryo. *EMBO J* 1977; **16**: 4163–4173.
- [22] GABBITAS B, CANALIS E. Retinoic acid regulates the expression of insulin-like growth factors I and II in osteoblasts. *J Cell Physiol* 1997; **172**: 253–364.
- [23] GAJOVIC S, St ONGE L, YAKOTA Y, GRUSS P. Retinoic acid mediates pax6 expression during *in vitro* differentiation of embryonic stem cells. *Differentiation* 1997; **62**: 187–192.
- [24] GUDAS LJ. Retinoids and vertebrate development. *J Biol Chem* 1994; **269**: 15399–15402.

- [25] GUERIN E, LUDWIG MG, BASSET P, ANGLARD P. Stromelysin-3 induction and interstitial collagenase repression by retinoic acid. Therapeutical implication of receptor-selective retinoids dissociating transactivation and AP-1 mediated transrepression. *J Biol Chem* 1997; **272**: 1188–11095.
- [26] GUIBOURDENCHE J, DJAKOURE C, PORQUET D, PAGESY P, ROCHETTE- EGLY C, PEILLON F, LI JY, EVAIN-BRION D. Retinoic acid stimulates growth hormone synthesis in human somatotrophic adenoma cells: characterization of its nuclear receptors. *J Cell Biochem* 1997; **65**: 25–31.
- [27] GUZEY M, DEMIRPENCE E, CRISS W, DeLUCA HF. Effects of retinoic acid (*all-trans* and *9-cis*) on tumor progression in small-cell lung carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **242**: 369–375.
- [28] HAASE I, LIESEGANG C, HENZ BM, ROSENBACH T. Retinoic acid attenuates phospholipase C-mediated signaling in HaCaT keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 1977; **289**: 533–539.
- [29] HAKKINEN L, WESTERMARCK J, JOHANSSON N, AHO H, PELTONEN J, HEINO J, KAHARI VM. Suprabasal expression of epidermal  $\alpha 2\beta 1$  and  $\alpha 3\beta 1$  integrins in skin treated with topical retinoid acid. *Br J Dermatol* 1998; **138**: 29–36.
- [30] HAN GR, DOHI DF, LEE HY, RAJAH R, WALSH GL, HONG WK, COHEN P, RURIE JM. *All-trans*- retinoic acid increases transforming growth factor- $\beta 2$  and insulin-like growth factor binding protein-3 expression through a retinoic acid receptor- $\alpha$ -dependent signaling pathway. *J Biol Chem* 1997; **272**: 13711–13716.
- [31] HASELBECK RJ, ANG HL, DUETER G. Class IV alcohol dehydrogenase localization in epidermal basal layer; potential site of retinoic acid synthesis during skin development. *Dev Dyn* 1997; **208**: 447–453.
- [32] HYATT GA, DOWLING JE. Retinoic acid. A key molecule for eye photoreceptor development. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; **38**: 1471–1475.
- [33] IKEDA M, SPANJAARD RA, NOORDHOEK EW, KAWAGUCHI A, ONAYA T, CHIN WW. Ligand-inducible retinoid X receptor-mediated protein: DNA interactions in the retinoic acid receptor  $\beta 2$  gene promoter *in vivo*. *Mol Cell Endocrinol* 1998; **136**: 109–118.
- [34] IMAI S, OKUNO M, MORIVAKI H, MUTO Y, MURAKAMI K, SHUDO K, SUZUKI Y, KOJIMA S. 9,13-*di-cis*-Retinoic acid induces the production of tPA and activation of latent TGF- $\beta$  via RAR $\alpha$  in a human liver stellate cell line. *FEBS Lett* 1997; **411**: 102–106.
- [35] KAISER A, HERBST H, FISHER G, KOENIGSMANN M, BERDEL WE, RIECKEN EO, ROSEWICZ S. Retinoic acid receptor  $\beta$  regulates growth and differentiation in human pancreatic carcinoma cells. *Gastroenterology* 1997; **113**: 920–929.
- [36] KAKIZUKA A. Unravelling of physiological functions of retinoic acid using a dominant-negative retinoic acid receptor. *Leukemia* 1997; **3**: 378–379.
- [37] KANG JX, LI Y, LEAF A. Mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor is a receptor for retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 13671–13676.
- [38] KAPTEIN A, NEELE DM, TWISK J, HENDRIKS HF, KOOISTRA T, PRINCEN HM. Mechanism of the slow induction of apolipoprotein A-I synthesis by retinoids in cynomolgus hepatocytes: involvement of retinoic acid and retinoic X receptors. *J Lipid Res* 1997; **38**: 2273–2280.
- [39] KASTNER P, MARK M, CHAMBON P. Nonsteroid nuclear receptors. *Cell* 1995; **83**: 865–869.
- [40] KEIDEL S, LAMOUR FP, APFEL CM. Mutational analysis reveals that *all-trans* retinoic acid, *9-cis* retinoic acid, and antagonist interact with distinct binding determinants of RAR $\alpha$ . *J Biol Chem* 1977; **272**: 18267–18272.
- [41] KOGA H, FUJITA I, MIYAZAKI S. Effect of *all-trans* retinoic acid on superoxide generation in intact neutrophils and cell-free system. *Br J Haematol* 1997; **97**: 300–305.
- [42] KWIATKOWSKA J. Kwas retinowy reguluje procesy wzrostu i różnicowania. *Post Biochem* 1992; **38**: 32–36.

- [43] LANSINK M, BENNEKUM AM, BLANER WS, KOOISTRA T. Differences in metabolism and isomerization of *all-trans*-retinoic acid and 9-*cis*-retinoic acid between human endothelial cells and hepatocytes. *Eur J Biochem* 1997; **247**: 596–604.
- [44] LARRAIN J, CIZMECI -SMITH G, TRONCOSO V, STAHL RC, CAREY DJ, BRANDAN E. Syndecan-1 expression is down-regulated during myoblast terminal differentiation. Modulation by growth factors and retinoic acid. *J Biol Chem* 1997; **272**: 18418–18424.
- [45] LEE HY, DOHI DF, KIM YH, WALSH GL, CONSOLI U, ANDREEFF M, DAWSON MI, HONG WK, KURIE JM. *All-trans* retinoic acid converts E2F into a transcriptional suppressor and inhibits the growth of normal human bronchial epithelial cells through a retinoic receptor-dependent signaling pathway. *J Clin Invest* 1998; **101**: 1012–1019.
- [46] LI C, WAN YJ. Differentiation and antiproliferation effects of retinoic acid receptor  $\beta$  in hepatoma cells. *Cancer Lett* 1998; **124**: 205–211.
- [47] LO HW, ALI-OSMAN F. Genomic cloning of hGSTP1\*C, an allelic human Pi class glutathione-S-transferase gene variant and functional characterization of its retinoic acid response elements. *J Biol Chem* 1997; **272**: 32743–32749.
- [48] LOVAT PE, IRVING H, ANNICCHIARICO-PETRUCELLI M, BARNASSOLA F, MALCOLM AJ, PEARSON AD, MELINO G, REDFERN CP. Retinoids in neuroblastoma therapy: distinct biological properties of 9-*cis*- and *all-trans*-retinoic acid. *Eur J Cancer* 1997; **33**: 2075–2080.
- [49] LOVAT PE, IRVING H, MALCOLM AJ, PEARSON AD, REDFERN CP. 9-*cis*-Retinoic acid – a better retinoid for the modulation of differentiation, proliferation and gene expression in human neuroblastoma. *J Neurooncol* 1997; **31**: 85–91.
- [50] MALLO M. Retinoic acid disturbs mouse middle ear development in a stage-dependent fashion. *Dev Biol* 1997; **184**: 175–186.
- [51] MANDELSDORF DJ, EVANS RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 1995; **83**: 841–850.
- [52] MANGIAROTTI R, DANOVA M, ALBERICI R, PELLICCIARI C. *All-trans* retinoic acid (ATRA)-induced apoptosis is preceded by G1 arrest in human MCF-7 breast cancer cells. *Br J Cancer* 1998; **77**: 186–191.
- [53] MANNON PJ, KEISER LM. Retinoic acid is a negative regulator of the neuropeptide Y peptide YY Y1 receptor gene in SK-N-MC cells. *J Neurochem* 1997; **68**: 20–25.
- [54] MARCHETTI MN, SAMPOL E, BUN H, SCOMA H, LACARELLE B, DURAND A. *In vitro* metabolism of three major isomers of retinoic acid in rats. Intersex and interstrain comparison. *Drug Metab Dispos* 1997; **25**: 637–646.
- [55] MAGRAU-PEYA E, SALOMOND, SAURAT JH, MEDA P. *In vivo* modulation of connexins 43 and 26 of human epidermis by topical retinoic acid treatment. *J Histochem Cytochem* 1997; **45**: 1207–1215.
- [56] MCGREGOR F, WAGNER E, FELIX D., SOUTAR D, PARKINSON K, HARRISON PR. Inappropriate retinoic acid receptor- $\beta$  expression in oral dysplasias: correlation with acquisition of the immortal phenotype. *Cancer Res* 1997; **57**: 3886–3889.
- [57] MELINO G, DRAOUI M, BELLINCAMPI L, BERNASSOLA F, BERNARDINI S, PLACENTINI M, REICHERT U, COHEN P. Retinoic acid receptors  $\alpha$  and  $\chi$  mediate the induction of „tissue” transglutaminase activity and apoptosis in human neuroblastoma cells. *Exp Cell Res* 1997; **235**: 55–61.
- [58] MERTZ JR, SHANG E, PLANTEDOSI R, WEI S, WOLGEMUTH DJ, BLANER WS. Identification and characterization of a stereospecific human enzyme that catalyses 9-*cis*-retinol oxidation. A possible role in 9-*cis*-retinoic acid formation. *J Biol Chem* 1997; **272**: 11744–11749.
- [59] NOKAGAWA K, SOGO S, HIOKI K, TOKUNAGA R, TAKETANI S. Acquisition of cell adhesion and induction of focal adhesion kinase of human colon cancer Colo 201 cells by retinoic acid induced differentiation. *Differentiation* 1998; **62**: 249–257.

- [60] NAPOLITANO M, BELLAVIA D, MARODER M, FARINA M, VACCA A, FRATI L, GULINO A, SCREPNTII I. Modulation of cytokine gene expression by thymic lympho-stromal cell to cell interaction: effect of retinoic acid. *Thymus* 1997; **24**: 247–261.
- [61] NIE D, ISHIKAWA Y, YOSHIMORI T, WUTHIER RE, WU LN. Retinoic acid treatment elevates matrix metalloproteinase-2 protein and mRNA levels in avian growth plate chondrocyte cultures. *J Cell Biochem* 1998; **68**: 90–99.
- [62] OETH P, YAO J, FAN ST, MACKMAN N. Retinoic acid selectively inhibits lipopolysaccharide induction of tissue factor gene expression in human monocytes. *Blood* 1998; **91**: 2857–2865.
- [63] PARK EA, SONG S, OLIVE M, ROESLER WJ. CCAAT-enhancer-binding protein  $\alpha$  (C/EBP  $\alpha$ ) is required for the thyroid hormone but not the retinoic acid induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) gene transcription. *Biochem J* 1997; **322**: 343–349.
- [64] PEMRICK SM, LUCAS DA, GRIFFO JF. The retinoid receptors. *Leukemia* 1994; **8**: 1797–1806.
- [65] PLATEROTI M, FREUND JN, LEBERQUIER C, KEDINGER M. Mesenchyme-mediated effects of retinoic acid during rat intestinal development. *J Cell Sci* 1997; **110**: 1227–1238.
- [66] PRAVENEK M, KREN V, WANG J, KURTZ TW. Linkage mapping of the cellular retinoic acid-binding protein 1 (Crabp1) gene to rat chromosome 8. *Mamm Genome* 1997; **8**: 455–456.
- [67] RANDOLPH RK, SIMON M. Metabolism of *all-trans*-retinoic acid by cultured human epidermal keratinocytes. *J Lipid Res* 1997; **38**: 1374–1383.
- [68] REICHRATH J, MITTMAN M, KAMRADT J, MULLER SM. Expression of retinoid X receptors ( $-\alpha$ ,  $-\beta$ ,  $-\gamma$ ) and retinoic acid receptors ( $-\alpha$ ,  $-\beta$ ,  $-\gamma$ ) in normal human skin: an immunohistological evaluation. *Histochem J* 1997; **29**: 127–133.
- [69] RODER KH, WOLF SS, SCHWEIZER M. Regulation of fatty acid synthase gene by retinoic acid in HepG2 cells is mediated by an E-box-containing multihormonal response element and two neighbouring upstream sequences. *Biochem Soc Trans* 1997; **25**: 157S.
- [70] ROMERT A, TUVENDAL P, SIMON A, DENKER L, ERIKSSON U. The identification of 9-*cis*-retinol dehydrogenase in the mouse embryo reveals a pathway for synthesis of 9-*cis*-retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 4404–4409.
- [71] SAMAD TA, KREZEL W, CHAMBON P, BORELLI E. Regulation of dopaminergic pathways by retinoid: activation of the D2 receptor promoter by members of the retinoid acid receptor-retinoid X receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 14349–14354.
- [72] SEEWALDT VL, KIM JH, CALDWEL LE, JOHNSON BS, SWISSHELM K, COLLINS SJ. *All-trans*-retinoic acid mediates G1 arrest but not apoptosis of normal human mammary epithelial cells. *Cell Growth Differ* 1997; **8**: 631–641.
- [73] SEO R, McGUIRE M, CHUNG M, BUSHMAN W. Inhibition of prostate ductal morphogenesis by retinoic acid. *J Urol* 1997; **158**: 931–935.
- [74] SHEN J, LI C, GUDAS LJ. Regulation of the laminin 1 (LAMB1), retinoic acid receptor  $\beta$ , and bone morphogenetic protein 2 genes in mutant F9 teratocarcinoma cell lines partially deficient in cyclic AMP-dependent protein kinase activity. *Cell Growth Differ* 1997; **8**: 1297–1304.
- [75] SHIMADA T, ROSS AC, MUCCIO DD, BROUILLETTE WJ, SHEALY YF. Regulation of hepatic lecithin:retinol acyltransferase activity by retinoic acid receptor-selective retinoids. *Arch Biochem Biophys* 1997; **344**: 220–227.
- [76] SONG Y, LEVENSON CW. Regulation of ceruloplasmin by retinoic acid in the developing rat. *Int J Vitam Nutr Res* 1997; **67**: 141–144.
- [77] SPANJAARD RA, IKEDA M, CHARPENTIER B, CHIN WW, EBERLEIN TJ. Specific activation of retinoic acid receptors (RARs) and retinoid X receptors reveals a unique role for RAR $\chi$  in induction of differentiation and apoptosis of S91 melanoma cells. *J Biol Chem* 1997; **272**: 18990–18999.

- [78] SHONDY Z, REICHERT U, ERNARDON JM, MICHEL S, OTH R, ANCIAN P, AJZNER E, FESUS L. Induction of apoptosis by retinoids and retinoic acid receptor  $\chi$ -selective compounds in mouse thymocytes through a novel apoptosis pathway. *Mol Pharmacol* 1997; **51**: 972–982.
- [79] TANEJA R, RICHETTE-EGLY C, PLASSAT JL, PENNA L, GAUB MP, CHAMBON P. Phosphorylation of activation function AF-1 and AF-2 of RAR $\alpha$  and  $\chi$  is indispensable for differentiation of F9 cells upon retinoic acid cAMP treatment. *EMBO-J* 1997; **16**: 6452–6465.
- [80] TEIXEIRA C, PRATT MA. CDK2 is a target for retinoic acid-mediated growth inhibition in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 1997; **11**: 1191–1202.
- [81] VAN-HEUSDEN J, WOUTERS W, RAMAEKERS FC, DILLEN L, BORGERS M, SMETS G. All-*trans*-retinoic acid metabolites significantly inhibit the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells *in vitro*. *Br J Cancer* 1998; **77**: 26–32.
- [82] VO-HP, CROWE DL. Transcriptional regulation of retinoic acid responsive genes by cellular retinoic acid binding protein-II modulates RA mediated tumor cell proliferation and invasion. *Anticancer Res* 1998; **18**: 217–224.
- [83] WAN-YJ, CAI Y, MAGEE TR. Retinoic acid differentially regulates retinoic acid receptor-mediated pathways in the Hep3B cell line. *Exp Cell Res* 1998; **238**: 241–247.
- [84] WANG JL, SWARTZ-BASILE DA, RUBIN DC, LEVIN MS. Retinoic acid stimulates early cellular proliferation in the adapting remnant rat small intestine after partial resection. *J Nutr* 1997; **127**: 1297–1303.
- [85] WEI LN, LEE CH, FILIPCIK P, CHANG L. Regulation of the mouse cellular retinoic acid-binding protein-I gene by thyroid hormone and retinoids in transgenic mouse. *J Endocrinol* 1997; **155**: 35–46.
- [86] WIDSCHWENDTER M, DAXENBICHLER G, CULIG Z, MICHEL S, ZEIMET AG, MORTL MG, WIDSCHWENDTER A, MARTH C. Activity of retinoic acid receptor- $\beta$  selectively binding retinoids alone and in combination with interferon- $\chi$  in breast cancer cell lines. *Int J Canc* 1997; **71**: 497–504.
- [87] WIDSCHWENDTER M, BERGER J, DAXENBICHLER G, MULLER-HOLZNER E, WIDSCHWENDTER A, MAYR A, MARTH C, ZEIMET AG. Loss of retinoic acid receptor beta expression in breast cancer and morphologically normal adjacent tissue but not in the normal breast tissue distant from the cancer. *Canc Res* 1997; **57**: 3158–3161.
- [88] WOBUS AM, KAOMEI D, SHAN J, WELLNER MC, ROHWEDDEL J, JI-GUANJU, FLEISCHMANN B, KATUS HA, HESCHELER J, FRANZ WM. Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhance development of ventricular cardiomyocytes. *J Moll Cell Cardiol* 1997; **29**: 1525–1539.
- [89] WU-LN, ISHIKAWA Y, NIED, GENGE BR, WUTHIER RE. Retinoic acid stimulates matrix calcification and initiates type I collagen synthesis in primary cultures of avian weight-bearing growth plate chondrocytes. *J Cell Biochem* 1997; **65**: 209–230.
- [90] XU XC, SOZZI G, LEE JS, PASTORINO U, PILOTTI S, KURIE JM, HONG WK, LOTAN R. Suppression of retinoic acid receptor  $\beta$  in non-small-cell lung cancer *in vivo*: implications for lung cancer development. *J Natl Cancer Ins* 1997; **89**: 602–604.
- [91] ZHU WY, JONES CS, KISS A, MATSUKMA K, AMIN S, DE-LUCA LM. Retinoic acid inhibition of cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Exp Cell Res* 1997; **234**: 293–239.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 18.02. 1999 r.

Przyjęto: 22.04. 1999 r.

Adres autora: 50-368 Wrocław, Chatubińskiego 10

## BARIERA KREW-MÓZG

### THE BLOOD-BRAIN BARRIER

Joanna Elżbieta MROCZKOWSKA

Zakład Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej,  
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

*Streszczenie:* Bariera krew-mózg odpowiada za utrzymanie stałego środowiska, niezbędnego do sprawnego funkcjonowania komórek nerwowych. Dzięki występowaniu specyficznych transporterów i wytworzeniu połączeń zamkniętych kapilary mózgowe zapewniają selektywny transport cząsteczek hydrofilowych i jonów z krwi do płynu okołokomórkowego. Bariera krew-mózg pojawia się u ssaków i wyższych kręgowców jeszcze w okresie życia płodowego pod wpływem czynników wydzielanych przez astrocyty. Dojrzwienie bariery krew-mózg polega na wytworzeniu specyficznych białek warunkujących jej selektywność wobec związków znajdujących się w krwiobiegu, jak również na zamykaniu się połączeń zamkniętych, które uniemożliwiają swobodną dyfuzję związków z krwi do mózgu. Dzięki połączeniom zamkniętym możliwa jest funkcjonalna polaryzacja komórek endotelialnych, a asymetryczne rozmieszczenie systemów transportowych ułatwia kontrolę nad selektywnym przechodzeniem związków z krwi do mózgu. Transport związków niskocząsteczkowych odbywa się przy udziale białek transportowych charakteryzujących się małą specyficznością substratów. Rozpoznają one biologicznie aktywne formy substancji o podobnej strukturze. Substancje polarne o większych rozmiarach mogą pokonywać barierę krew-mózg przy udziale transportu pęcherzykowego. Komórki śródbłonna mózgowego dodatkowo chronią mózg dzięki enzymom usuwającym nadmiar związków będących percursorami neuroprzekazników. Terapia chorób mózgu wymaga poznania mechanizmów transportu przez barierę krew-mózg.

(*Postępy Biologii Komórki* 1999; 26: 593–610)

*Słowa kluczowe:* kapilary, śródbłonek mózgowy, angiogeneza, połączenia zamknięte, transport, pinocytoza.

*Summary:* Blood brain barrier is responsible for maintaining the stable environment essential for normal neuronal function. Due to specific transporters and tight junctions brain capillaries enable selective transport of hydrophilic molecules and ions from blood to interstitial fluid. The blood brain barrier appearance in mammals and higher vertebrates takes place during fetal period and is induced by factors

\*Artykuł napisano w ramach grantu nr 6PO4A 061 14 przyznanego przez Komitet Badań Naukowych.

released by astrocytes. During blood brain barrier maturation there are expressed specific carrier proteins responsible for selective transport of compounds circulating in blood, and tight junctions are closed. Due to tight junctions cells have functional polarity and asymmetrical position of transport proteins facilitates selective passage of different compounds from blood to brain. Transport of small molecules is lead by transporters that have little substrate specificity. They recognize biological active substances that have similar structure. Macromolecules can pass blood brain barrier due to vesicular transport. Brain endothelial cells protect the brain thanks to enzymes removing excess of neurotransmitter precursors. Brain disease therapy requires the knowledge of transport mechanisms across blood brain barrier. (*Advances in Cell Biology 1999; 26: 593–610*)

*Key words:* capillaries, brain endothelium, angiogenesis, tight junctions, transport, pinocytosis

## I. WSTĘP

Prawidłowe funkcjonowanie organizmów żywych zależy od utrzymania homeostazy, zapewniającej optymalne środowisko dla przebiegu procesów życiowych. W przypadku żadnego innego organu nie odgrywa ona tak ważnej roli, jak ma to miejsce w przypadku mózgu. W innych częściach ciała zewnątrzkomórkowe stężenie hormonów, aminokwasów czy jonów ulega fluktuacjom zwłaszcza po posiłku lub wysiłku fizycznym. Jeśli mózg byłby wystawiony na tego typu zmiany, to mogłoby dochodzić do zaburzenia przewodnictwa nerwowego, w którym to procesie niektóre z wyżej wymienionych związków działają jako neuroprzekaźniki. Mózg do sprawnego działania wymaga doskonałego zabezpieczenia nawet przed minimalnymi zmianami składu płynu okołokomórkowego mózgu, co wymaga istnienia fizycznej i biochemicznej przeszkody dla swobodnego przemieszczania się związków między środowiskiem, w którym znajdują się komórki nerwowe i glejowe, a krwią. Bariere taką, definiowaną jako bariera krew-mózg, tworzą kapilary o szczególnych właściwościach.

## II. METODYKA BADANIA BARIERY KREW-MÓZG

Historia badań nad barierą krew-mózg sięga końca XIX wieku, kiedy to niemieccy uczeni Paul Ehrlich i Edwin Goldman zaobserwowali, że barwniki wysokocząsteczkowe podawane zwierzęciu dożylnie gromadzą się we wszystkich narządach z wyjątkiem mózgu. Od tego czasu zaczęto badać mechanizmy zaangażowane w transport substancji z krwi do mózgu. Początkowo badania prowadzone były na całych zwierzętach, którym wstrzykiwano do tętnicy szyjnej badany związek wyznakowany radioaktywnym izotopem, a następnie zabijano zwierzę po jednorazowym przejściu krwi przez naczynia mózgowe i mierzono ilość radioaktywności zakumulowanej w mózgu [6]. Ze względu na liczne ograniczenia tego układu doświadczalnego zaczęto szukać innych modeli do badania procesów zachodzących w obrębie bariery krew-mózg. Oczyszczone kapilary mózgowe były układem bardziej jednorodnym pod względem różnorodności komórek, dzięki czemu można było badać

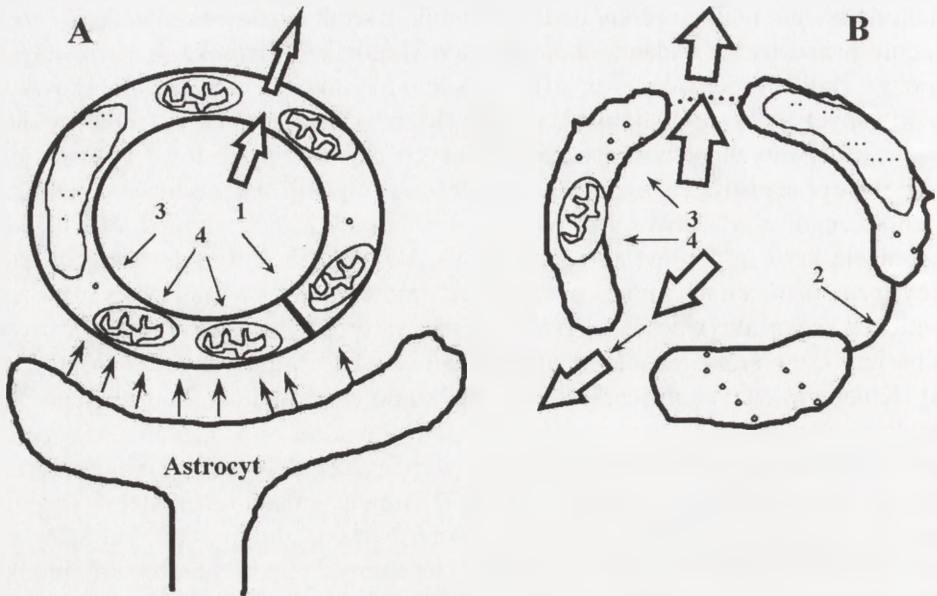


w nich m.in. kinetykę transportu podawanych związków [7, 33]. Jednakże preparowanie kapilar jest procedurą żmudną i mało wydajną. By zwiększyć ilość materiału do badań, podjęto próby hodowli komórek śródbłonka mózgowego *in vitro*. Obecnie prowadzi się badania na hodowlach komórek śródbłonka preparowanych z mózgu (kultury pierwotne) oraz na unieśmiertelnionych liniach komórkowych uzyskiwanych w wyniku transfekcji [46]. Komórki śródbłonka mózgowego hodowane w bogatych pożywkach zawierających czynniki wzrostowe i substancje wydzielane przez astrocyty zachowują zdolność do ekspresji białek odpowiedzialnych za ich szczególne właściwości *in vivo*. Do białek tych należy czynnik VIII układu krzepnięcia krwi (globulina antyhemofilowa, *Von Willebrand factor*), najbardziej specyficzny marker dla komórek pochodzenia śródbłonkowego. Obserwować można również wysoką aktywność i wysoki poziom ekspresji enzymów specyficznych dla bariery krew-mózg, takich jak alkaliczna fosfataza i  $\gamma$ -glutamylotranspeptydaza [86]. Kolejnym enzymem markerowym dla komórek śródbłonka mózgowego jest anhidraza węglanowa IV, występująca tylko na luminalnej powierzchni mózgowych kapilar, podczas gdy w innych komórkach w mózgu ekspresji ulega inna izoforma tego enzymu: anhidraza węglanowa typu II [32]. Innym białkiem charakterystycznym dla śródbłonka mózgowego jest specyficzny transporter L-glukozy GLUT-1 należący do rodziny transporterów glukozy GLUT. Do ważnych cech komórek śródbłonka mózgowego należy zdolność do wytwarzania połączeń zamkniętych. Połączenia te mogą być wytworzone *in vitro* jednakże we wspólnej hodowli z astrocytami [21, 54].

### III. STRUKTURA I ROLA BARIERY KREW-MÓZG

Naczynia włosowate, tworzące barierę krew-mózg, różnią się od tego typu naczyń znajdujących się w innych narządach występowaniem połączeń zamkniętych (rys. 1). Struktury te łączą sąsiadujące ze sobą komórki śródbłonka, co ułatwia stworzenie ciągłej, nieprzepuszczalnej ściany uniemożliwiającej swobodne przechodzenie wielu związków niskocząsteczkowych drogą dyfuzji między komórkami. Błony komórkowe budujące ściany kapilar zawierają swoiste receptory i układy transportowe dla różnych typów związków. Układy te precyzyjnie rozpoznają poszczególne cząsteczki i przenoszą je do mózgu. Do tej pory poznano wiele transporterów, które działają bardzo specyficznie, umożliwiając nie tylko dostarczanie potrzebnych związków z krwi do mózgu, ale również pompowanie na zewnątrz tych substancji, które są w nadmiarze, co ułatwia utrzymanie stałego środowiska dla działania komórek nerwowych. Kolejną cechą charakterystyczną dla komórek śródbłonka naczyń włosowatych mózgu jest brak zjawiska pinocytozy, jak również znikomy udział transportu pęcherzykowego [19]. Dzięki tym wszystkim cechom komórki śródbłonka stanowią barierę utrzymującą szkodliwe substancje na zewnątrz mózgu przy jednoczesnym regulowaniu wpływu i wypływu związków koniecznych dla jego dzia-

## Przekrój przez naczynia włosowate



RYSUNEK 1. Porównanie budowy kapilar: A – w mózgu, B – poza mózgiem; 1 – połączenie zamknięte, 2 – okienkowanie, 3 – pęcherzyki pinocytarne, 4 – mitochondrium; strzałki średnie ilustrują oddziaływania między zakończeniem astrocytu a komórką endotelialną; duże strzałki pokazują schematycznie możliwość swobodnej dyfuzji związków

łania, przez co zapewniają układowi nerwowemu funkcjonowanie w stałym, kontrolowanym środowisku. Bariera krew-mózg chroni mózg przed różnego rodzaju egzogennymi trucznymi oraz zapobiega niekontrolowanemu wnikaniu prekursorów i wypływowi produktów metabolizmu neurotransmiterów, zapewniając utrzymanie równowagi czynnościowej między neuroprzekaznikami pobudzającymi a hamującymi [24].

## IV. ROZWÓJ BARIERY KREW-MÓZG

W okresie życia płodowego naczynia krwionośne wrastają w rozwijający się układ nerwowy z zewnętrznego spłotu naczyniowego. We wczesnych etapach rozwoju kapilary w mózgu płodów ssaczych charakteryzują się przepuszczalnością typową dla kapilar z innych organów ciała, tzn. umożliwiają swobodne przechodzenie związków wysokocząsteczkowym (np. albuminie). Wraz z dojrzewaniem organizmu bariera ulega uszczelnieniu, w zależności od gatunku ma to miejsce na różnym etapie rozwoju. Wydaje się, że dojrzewanie bariery krew-mózg u ssaków zachodzi

dość wcześnie, w tzw. „fazie krytycznej” dla rozwoju mózgu. Jest to okres, kiedy wzrasta aktywność enzymów niezbędnych dla sprawnego funkcjonowania mózgu, dochodzi do gwałtownego rozgałęziania dendrytów oraz pojawia się aktywność elektryczna. Fizjologiczne dojrzewanie bariery polegające na uszczelnianiu połączeń zamkniętych i zaniku pinocytozy zachodzi pod wpływem sygnałów indukujących pochodzących z zakończeń astrocytów [43, 82]. Z obserwacji laboratoryjnych wynika, że u szczurów fizjologiczne dojrzewanie bariery zbiega się w czasie z ultrastrukturalnym dojrzewaniem gleju [3, 22, 40, 41, 66, 76]. Ciągłość naczyń obserwowano w obecności astrocytów, natomiast uszkodzenie powłoki glejowej w wyniku zmian chorobowych, np. przez glejaka, powodowało zanik błony podstawnej, w wyniku czego kapilary mózgowie stawały się bardziej przepuszczalne [14].

Angiogeneza (powstawanie nowych kapilar) wymaga przemieszczania się i namnażania komórek śródbłonka kapilar. Jest to wywołane przez takie substancje, jak zasadowy czynnik wzrostowy fibroblastów (*basic Fibroblast Growth Factor* – bFGF), który jest uwalniany z tkanek sąsiadujących z proliferującymi komórkami [68]. Są też dane na to, że również same komórki tworzące kapilary mózgowie mogą uwalniać czynniki wzrostowe, stymulujące ich rozwój [68, 74]. Do takich czynników zalicza się czynnik wzrostu komórek śródbłonka naczyniowego (*Vascular Endothelial Growth Factor* – VEGF) będący mitogenem wydzielanym przez śródbłonek, co potwierdza tezę, że tworzenie się nowych kapilar jest indukowane przez nie same. Pod względem histochemicznym ukształtowane i dojrzałe kapilary mózgowie zawierają niektóre enzymy w formach izomerycznych nie występujących w kapilarach innego typu. Ponadto komórki endotelialne mózgu charakteryzują się, w porównaniu z innymi kapilarami, względnie dużą ilością mitochondriów [59, 81], co zabezpiecza dostarczanie energii potrzebnej do prowadzenia aktywnego transportu jak też dla utrzymania gradientu metabolicznego i jonowego po obu stronach bariery.

## V. POŁĄCZENIA ZAMKNIĘTE

Połączenia zamknięte (*zonula occludens*) stanowią barierę uniemożliwiającą dyfuzję jonów i cząsteczek do przestrzeni międzykomórkowej. Połączenia zamknięte umożliwiają bardzo bliski kontakt sąsiadującym ze sobą komórkom, nie izolują ich, lecz dzięki przerwom i porom podlegającym precyzyjnej regulacji umożliwiają selektywne przechodzenie wielu związków. Są to struktury typowe dla tkanki nabłonkowej, a w śródbłonku są wytwarzane jedynie w naczyniach włosowatych tworzących barierę między krwiobiegiem a narządem, tak jak ma to miejsce np. w przypadku bariery krew-mózg. Komórki śródbłonka są zdolne do natychmiastowej zmiany w połączeniu zamkniętym, aby umożliwić substancjom krążącym w krwiobiegu przejście przez barierę. Zmiany te są odwracalne i połączenia te mogą być

szybko odtworzone, dzięki czemu możliwa jest precyzyjna regulacja przepuszczalności kapilar [8, 16, 63].

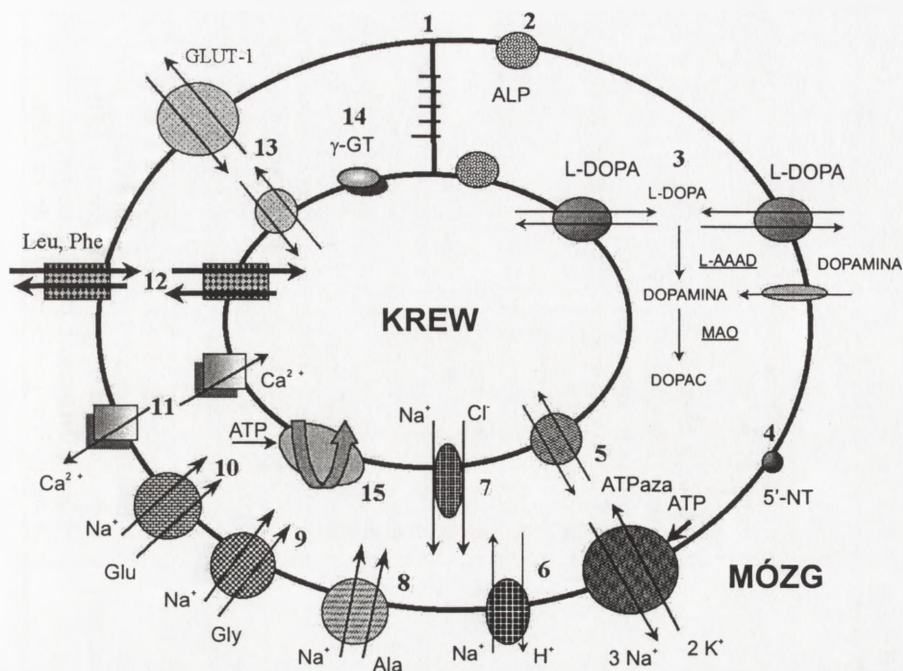
W utworzenie połączeń zamkniętych zaangażowanych jest wiele białek transbłonowych połączonych z białkami znajdującymi się w sąsiadujących rejonach błony komórkowej [12, 28, 70]. Połączenia zamknięte tworzone są przez białko błonowe – okludynę [30]. Sekwencja aminokwasowa tego białka nie wykazuje żadnych znaczących homologii wobec innych znanych białek, wskazuje natomiast na występowanie 4 hydrofobowych odcinków transbłonowych. Połączenia zamknięte w obrębie śródbłonka zawierają białka identyczne z tymi, jakie znaleziono w nabłonku: ZO-1 (*zonula occludens 1*) [50], ZO-2 (*zonula occludens 2*) [2], cyngulinę [2] oraz małe białko wiążące GTP-rab13 [87]. Białko ZO-1 pojawia się podczas tworzenia kontaktu między komórkami i jest typowe dla wczesnego stadium tworzenia połączeń. Cyngulina i ZO-2 są bardziej specyficzne dla połączeń i mimo iż rola tych cytoplazmatycznych białek jest wciąż nieznaną, to sądzi się, że mogą one brać udział w przyczepianiu się połączeń zamkniętych do mikrofilamentów aktynowych i/lub w przekazywaniu sygnałów między komórkami. Ilość połączeń zamkniętych między komórkami endotelialnymi zależy od ich lokalizacji w obrębie systemu naczyń krwionośnych oraz od zapotrzebowania na kontrolę przepuszczalności kapilar. Endotelium w obrębie kapilar mózgowych ma ich bardzo dużo, podczas gdy odcinki żyłne mają ich niewiele, a około 30% połączeń jest otwartych.

W obrębie tkanki nerwowej pobieranie substancji odżywczych z krwiobiegu zachodzi w odmienny sposób niż w regionach ciała, gdzie komórki kapilar nie są ze sobą ściśle połączone, co umożliwia swobodne przemieszczanie się jonów oraz substancji polarnych o stosunkowo dużych rozmiarach. Związki, takie jak mannitol, sacharoza czy  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA, stosowane w badaniach jako znaczniki przestąpienia pozakomórkowej prawie wcale nie przechodzą przez barierę krew-mózg, natomiast takie związki, jak: mocznik, woda, glicerol, przechodzą przez kapilary mózgowie, znacznie wolniej niż przez kapilary z innych organów.

## VI. POLARYZACJA KOMÓREK ENDOTELIALNYCH

Dodatkową konsekwencją istnienia połączeń zamkniętych w obrębie kapilar, oprócz precyzyjnej regulacji i kontroli ich przepuszczalności, jest fizyczne oddzielenie błony luminalnej, wyściełającej światło naczyń krwionośnych, od błony abluminalnej znajdującej się po stronie mózgu, co prowadzi do polaryzacji komórek endotelialnych. Błony luminalna i abluminalna są funkcjonalnie zróżnicowane (rys. 2). Asymetria i spolaryzowane rozmieszczenie transporterów pozwala na aktywną regulację składu płynu okołokomórkowego mózgu.

Jednym z transporterów charakteryzującym się asymetrycznym rozmieszczeniem jest GLUT-1, białko transportujące glukozę, będącą głównym substratem energetycznym w mózgu. Badania cytochemiczne wykazały, iż błona abluminalna w po-



RYSUNEK 2. Schemat rozmieszczenia układów transportujących oraz specyficznych enzymów w obrębie komórki endotelialnej mózgu: 1 – połączenie zamknięte, 2 – fosfataza alkaliczna, 3 – układ enzymatyczny regulujący dostępność neurotransmitera dopaminy, 4 – nukleotransferaza końca 5' (5'-NT), 5 – ATPaza sodowo-potasowa, 6 – wymiennicz sodowo-protonowy, 7 – symporter sodowo-chlorkowy, 8 – układ A (transporter małych aminokwasów alifatycznych), 9, 10 – transportery aminokwasów (glicyny i glutaminianu) zależne od sodu, 11 – transporter wapniowy, 12 – układ L (transport dużych aminokwasów obojętnych), 13 – GLUT-1 (transporter glukozy), 14 –  $\gamma$ -glutamylotranspeptydaza, 15 – glikoproteina-P

równaniu z błoną luminalną zawiera czterokrotnie większą ilość tego białka [27]. Prowadzi to do wzrostu tempa transportu glukozy przez błonę abluminalną i ogranicza metabolizm glukozy w komórkach endotelialnych. Te obserwacje mogą oznaczać, że cytoplazmatyczne stężenie glukozy w komórkach endotelialnych jest niższe od stężenia we krwi, co w dużym stopniu ułatwia dyfuzję glukozy z krwi do komórek śródbłonna. Znaczna ilość (ok. 40%) transportera glukozy znajduje się poza błoną komórkową, w strukturach błonowych w cytoplazmie, co może mieć znaczenie dla regulacji tempa transportu glukozy przez barierę. Skierowanie transportera z obszaru cytoplazmy w kierunku błony komórkowej może być mechanizmem, dzięki któremu możliwe jest natychmiastowe zwiększenie przepływu glukozy z krwi do mózgu [27].

O wiele bardziej skomplikowany wydaje się transport aminokwasów, w przypadku którego występuje także asymetryczna lokalizacja układów transportowych (tab. 1). Związki transportowane z krwi do mózgu przemieszczają się zgodnie z gradientem

TABELA 1. Systemy transportu funkcjonujące w obrębie bariery krew-mózg

System transportu	Preferowany substrat	Specyficzny inhibitor	Lokalizacja	Uwagi	Ref.
A	alanina	MeAIB (metyloamino izomaślan)	błona abluminalna	<ul style="list-style-type: none"> <li>transportuje pochodne metylowe alaniny i GABA,</li> <li>wrażliwy na pH,</li> <li>indukowalny,</li> <li>nie ulega ekspresji <i>in vitro</i>,</li> <li>transport zależny od gradientu <math>[Na^+]</math></li> </ul>	[15]
ASC	alanina, seryna, cysteina	D-alanina aminokwasy obojętne	?	<ul style="list-style-type: none"> <li>nie toleruje grup metylowych,</li> <li>niewrażliwy na zmiany zewnątrzkomórkowego pH,</li> <li>ulega transstymulacji,</li> <li>wysocce stereo specyficzny,</li> <li>transport zależny od gradientu <math>[Na^+]</math></li> </ul>	[61, 72]
L	aminokwasy z dużymi alifatycznymi lub aromatycznymi łańcuchami bocznymi (leucyna, fenyloalanina)	BCH (kwas 2-aminobicyclo (2,2,1)-heptano-2-karboksylowy)	symetrycznie rozmieszczony w obu błonach	<ul style="list-style-type: none"> <li>ulega transstymulacji,</li> <li>niezależny od gradientu sodu <math>[Na^+]</math>,</li> <li>niewrażliwy na zmiany zewnątrzkomórkowego pH,</li> <li>ma zdolność do pobierania D-izomerów,</li> <li>może katalizować wypływ aminokwasów do krwi</li> </ul>	[73, 27, 60,77]
$\gamma^+$	aminokwasy zasadowe	?	?	<ul style="list-style-type: none"> <li>niezależny od gradientu <math>[Na^+]</math>,</li> <li>elektrogeniczny (akumulacja aminokwasów zachodzi dzięki potencjałowi w błonie komórkowej)</li> </ul>	[65]
GLUT-1	glukoza	floretyna, florezyna	błona luminalna, błona abluminalna (4 x więcej)	<ul style="list-style-type: none"> <li>białko o <math>M_{cz} = 52</math> kDa, 482 aminokwasów,</li> <li>transport niezależny od insuliny i gradientu <math>[Na^+]</math></li> </ul>	[27]
ATPaza sodowo-potasowa	$K^+$ , $Na^+$	ouabaina	asymetrycznie rozmieszczona w obrębie obu błon	<ul style="list-style-type: none"> <li>heterodimer złożony z podjednostek <math>\alpha</math> i <math>\beta</math>,</li> <li>katalizuje wymianę 2 jonów potasu na 3 jony sodu czerpiąc energię z 1 cząsteczki ATP,</li> <li>w błonie luminalnej znajduje się forma o mniejszym powinowactwie do ouabainy</li> </ul>	[37, 71]

System transportu	Preferowany substrat	Specyficzny inhibitor	Lokalizacja	Uwagi	Ref.
Wymie niacz sodowo-protonowy	$\text{Na}^+$ , $\text{H}^+$	dimetyloamilorid, amilorid	błona luminalna, błona abluminalna	<ul style="list-style-type: none"> <li>znane są 4 typy wymiennicy sodowo-protonowych (NHE1-4),</li> <li>NHE-3 umieszczony jest w błonie luminalnej,</li> <li>NHE-1 znajduje się w błonie abluminalnej (regulacja pH i objętości komórki)</li> </ul>	[23]
Kanał sodowy	$\text{Na}^+$	fenamil, amilorid	błona luminalna		[23]
Kotransporter sodowo-chlorkowy	$\text{K}^+$ , $\text{Na}^+$ , $\text{Cl}^-$	furozemid	błona luminalna		[6]
Transporter ciał ketonowych MCT1	krótkie kwasy monokarboksylowe (mleczan, pirogromian, $\alpha$ -keoizokapromian, $\beta$ -hydroksymasłan)	floretyna	?	<ul style="list-style-type: none"> <li>stereospecyficzny, wysycający się nośnik,</li> <li>w warunkach fizjologicznych nośnik jest wysycony w niewielkim stopniu,</li> <li>w okresach głodu indukowany jest dyfuzyjny transport <math>\alpha</math>-ketokwasów,</li> <li>zależny od zewnątrzkomórkowego pH</li> </ul>	[38, 58,31, 80]
Transporter prekursorów kwasów nukleinowych	adenina, adenozyzna, gvanozyzna, inozyzna, urydyna	hipoksantyna, wszystkie substraty konkurują ze sobą o wejście	?	<ul style="list-style-type: none"> <li>istnieją dwa niezależnie działające systemy transportu dla prekursorów kwasów nukleinowych</li> </ul>	[18]
Transporter cholinowy	cholina	karnityna, hemicholinium-3, butyrobetaina	?	<ul style="list-style-type: none"> <li>w niskich stężeniach choliny działa system o wysokim powinowactwie, który dostarcza cholinę do syntezy fosfolipidów</li> <li>przy wysokich stężeniach choliny działa system o małym powinowactwie dostarczającym cholinę do syntezy acetylochliny</li> </ul>	[17, 26,55]
Transporter witamin	tiamina	?	?	<ul style="list-style-type: none"> <li>nośnik ulega wysyceniu przy wysokich stężeniach tiaminy</li> </ul>	[34]

stężeń (ułatwiona dyfuzja) nie wymagając dostarczania energii. Tego typu transportery rozmieszczone są symetrycznie. Natomiast w przypadku glicyny, która jest transportowana wbrew gradientowi stężeń, energia potrzebna do przebiegu tego procesu musi być dostarczona z zewnątrz [7, 13, 42, 69]. Ograniczenie do błony abluminalnej zależnego od sodu układu transportu aminokwasów umożliwia ich transport z mózgu do krwi wbrew gradientowi stężeń. Transport glicyny do komórek endotelialnych jest powiązany z ruchem sodu, który przemieszcza się zgodnie z gradientem stężeń i ułatwia glicynie przejście przez błonę komórkową. Nadmiar glicyny z komórek endotelialnych jest usuwany przy udziale transportera dla dużych aminokwasów obojętnych, małe aminokwasy mają wobec niego mniejsze powinowactwo niż aminokwasy duże, jest ono jednak wystarczające, by umożliwić transport aminokwasów z komórek do krwi. Błona abluminalna odpowiadająca w dużym stopniu za transport z mózgu do krwi zawiera znacznie więcej transporterów, które katalizują symport aminokwasów z jonami sodu, gdzie elektrochemiczny gradient potencjału sodowego umożliwia przejście aminokwasu przez błonę komórkową.

Dzięki występowaniu połączeń ścisłych między sąsiadującymi ze sobą komórkami bariera krew-mózg uniemożliwia dyfuzję białek z krwi do mózgu. Nie wiadomo, czy to ograniczenie działa również w przeciwnym kierunku i czy śródbłonek stanowi barierę dla procesów transportu zachodzących w kierunku mózg-krew. Wiadomo, że endotelium mózgowe jest w stanie pobrać białka z przestrzeni około mózgowej oraz przetransportować je na stronę luminalną, gdzie białko zostaje włączone do krwiobiegu [11, 85]. Istnieją także doniesienia o tym, iż na poziomie mikrokapilar może istnieć bariera mózg-krew. Bardzo małe białka zewnątrzkomórkowe oraz białka związane z abluminalną powierzchnią błony komórkowej ulegają internalizacji do komórek śródbłoneka mózgowego. Białka i błony pobrane przez komórkę są kierowane do lizosomów i nie są dalej transportowane w kierunku błony luminalnej [10].

W przypadku komórek tworzących barierę krew-mózg mamy też do czynienia z polarnością funkcjonalną, co oznacza, iż tylko błona abluminalna jest zdolna do wytwarzania pęcherzyków endocytalnych transportujących białka [52].

## VII. TRANSPORT ZWIĄZKÓW NISKOCZĄSTECZKOWYCH

Białka transportujące związki niskocząsteczkowe mają w porównaniu z enzymami stosunkowo małą specyficzność substratową, dzięki czemu rozpoznają dużą grupę substancji o podobnej strukturze i umożliwiają im wejście do mózgu, natomiast charakteryzują się wysoką stereospecyficznością, co oznacza, że ułatwiają przedostanie się do mózgu obecnych w krwiobiegu substancji aktywnych biologicznie, podczas gdy ich stereoizomery zazwyczaj w ogóle nie są rozpoznawane. Bardzo często różne transportery o podobnych właściwościach mogą występować w błonie komórkowej tej samej komórki. Mimo długotrwałych badań nad układami trans-



portującymi występującymi w błonie kapilar mózgowych nadal wiadomo o nich niewiele. Jedynie w przypadku nielicznych białek udało się sklonować ich geny i poznać sekwencję aminokwasową oraz uzyskać bliższe dane na temat ich lokalizacji w obrębie komórki. Dotychczasowy stan wiedzy dotyczący systemów transportu aktywnych w obrębie bariery krew-mózg prezentuje tabela 1.

## VIII. TRANSPORT PĘCHERZYKOWY

W normalnych warunkach transport pęcherzykowy stanowi znikomą część transportu przez barierę krew-mózg i jest on zaangażowany w przenoszenie substancji, które są zbyt duże lub zbyt polarne, by mogły pokonać barierę w inny sposób [51]. Zjawisko to może przebiegać na dwa sposoby: albo jest to endocytoza adsorptywna, albo endocytoza przebiegająca z udziałem receptora.

Endocytoza adsorptywna jest procesem niespecyficznym, wymagającym dostarczenia dużej ilości energii, w znacznym stopniu uzależnionym od oddziaływań elektrostatycznych między transportowanym związkami a powierzchnią komórki endotelialnej. Przykładem tak transportowanych substancji mogą być histony [62].

Endocytoza przebiegająca za pośrednictwem receptora zależy od temperatury i wymaga specyficznego wiązania receptora i substancji transportowanej. W ten sposób może być transportowana np. insulina, insulinowy czynnik wzrostowy, transferyna [9, 20, 67]. Występowanie receptora transferyny transportującej żelazo jest silnie spolaryzowane w obrębie komórki endotelialnej i ogranicza się tylko do strony luminalnej [44]. Nie wiadomo, czy żelazo pokonuje barierę w formie kompleksu białkowego, czy też oddysocjowuje od swojego transportera w endosomach komórek endotelialnych i jest następnie transportowane do mózgu przy udziale innego mechanizmu.

## IX. BARIERA METABOLICZNA

Mózg ma dodatkową ochronę w postaci bariery metabolicznej tworzonej przez enzymy występujące w komórkach endotelialnych. System ten chroni mózg przed zmianami, które mogą być wywołane przez znaczny wzrost cytoplazmatycznego stężenia któregokolwiek z dużych aminokwasów obojętnych, będących między innymi prekursorami neuroprzebieżników. Ten system buforowy może ulec nasyceniu w przypadku długotrwałego, znacznego wzrostu cytoplazmatycznego stężenia prekursora neurotransmitera. Dodatkowym zabezpieczeniem przed taką sytuacją jest alternatywny metabolizm prekursora, który może ulec przemianie metabolicznej do formy chemicznej, która nie będzie zdolna do pokonania błony abluminalnej i przedostania się do mózgu, jak ma to miejsce w przypadku tryptofanu, który ulega przekształceniu w kinureninę [83].

Komórki śródbłonna mózgowego zawierają systemy enzymatyczne potrzebne do syntezy i metabolizmu serotoniny i acetylocholinyl oraz do katabolizmu noradrenaliny i dopaminy. Serotonina może być syntetyzowana i ulegać degradacji w jednorodnej kulturze komórek endotelialnych wyizolowanych z mózgu [53].

Komórki endotelialne mają układ transporterów i enzymów odpowiedzialnych za wychwytywanie pobieranych przez nie niektórych prekursorów monoamin (L-3,4 dihydroksyfenyloalanina-L-DOPA i 5-hydroksytryptofan). Na terenie komórki, pod wpływem dekarboksylazy L-aminokwasów aromatycznych (L-AAAD), ulegają one dekarboksylacji do odpowiadających im amin (dopaminy i 5-hydroksytryptaminy), a następnie są przekształcane przez oksydazę monoamin (MAO) [5, 60]. L-AAAD katalizuje przemianę L-DOPA w dopaminę, a 5-hydroksytryptofanu w serotoninę, zaś MAO katalizuje metaboliczną inaktywację serotoniny, noradrenaliny i dopaminy.

L-DOPA jest selektywnie pobierana przez komórki endotelialne [39], gdzie pod wpływem L-AAAD może ulec konwersji do dopaminy, która następnie może być inaktywowana przez MAO. Tak więc komórki endotelialne mogą pobierać z krwiobiegu znaczne ilości L-DOPA, która nigdy nie dotrze do mózgu. Komórki endotelialne z mózgu charakteryzują się aktywnością enzymatyczną umożliwiającą im zarówno syntezę, jak też i degradację neurotransmiterów.

System L jest bardzo aktywnym układem transportującym, zdolnym do przenoszenia aminokwasów w obu kierunkach, zatem niektóre z nich w zależności od stanu fizjologicznego mogą być kierowane z powrotem do krwi zamiast do neuronów. Na terenie komórek endotelialnych duże aminokwasy obojętne w zależności od potrzeb mogą być przekształcane w neurotransmitery, które później mogą być przez te komórki degradowane metabolicznie. Alternatywą może być również transport prekursora lub gotowego neuroprzekaźnika do krwi. W mózgowych komórkach endotelialnych występuje również N-metylotransferaza fenyletanolaminy przekształcająca noradrenalinę w adrenalinę [79], co sugeruje, że inaktywując aminy katecholowe komórki endotelialne stanowią dla nich barierę enzymatyczną [4, 78].

## X. WPROWADZANIE LEKÓW DO MÓZGU

Pewne substancje, takie jak np. chloramfenikol, są dobrze rozpuszczalne w tłuszczach i bez trudu przedostają się do mózgu, natomiast leki, które ze względu na swą budowę chemiczną rozpuszczają się gorzej w rozpuszczalnikach organicznych, musiałyby być podawane w wysokich stężeniach, aby odpowiednia dawka przeszła do mózgu. Niestety w przypadku wielu leków jest to niemożliwe ze względu na ich działania uboczne. Aby obejść tę niedogodność, w leczeniu wielu chorób mózgu, stosuje się inne strategie.

Pierwsza polega na czasowym otwarciu bariery, które umożliwi lekom przedostanie się do mózgu. W tym przypadku najczęściej podaje się hiperosmotyczny

roztwór glukozy, o którym wiadomo, iż rozluźnia połączenia zamknięte [56, 64]. Inne rozwiązanie polega na podaniu leku do płynu rdzeniowo-mózgowego. Kolejnym sposobem mogą być chemiczne modyfikacje leków. Wiadomo, że o przejściu danej substancji przez błonę komórkową w największym stopniu decyduje jej rozpuszczalność w tłuszczach, a następnie jej wielkość, ładunek elektrostatyczny oraz grupy funkcyjne wytwarzające wiązania wodorowe podczas pokonywania dwuwarstwy lipidowej [1, 75]. Dołączenie do cząsteczki grup hydrofobowych może jej ułatwić dotarcie do mózgu drogą dyfuzji przez błonę komórkową. Dodanie do pochodnych barbituranów dodatkowych grup metylowych zwiększa ich lipofilność oraz penetrację do mózgu [35]. Innym rozwiązaniem jest wytworzenie lipofilnego prekursora leku, z którego w mózgu jest uwalniana forma aktywna o większej polarności, np. heroina (diacetylmorfina) szybko pokonuje barierę krew-mózg ze względu na wysoką lipofilność, lecz w mózgu ulega hydrolizie do morfiny, która jest bardziej polarna i nie dyfunduje z powrotem do krwiobiegu, co wydłuża jej czas działania w mózgu [57]. Prekursory leków można również wytwarzać przez łączenie cząsteczek aktywnych z lipofilnym wektorem transportującym, takim jak np. pseudoglicerydy, które w mózgu wracają do swej aktywnej formy [25, 48]. Jednakże mimo zwiększania lipofilności leku w celu zwiększenia ilości związku pobieranego przez mózg, jego biologiczna aktywność może ulec obniżeniu w wyniku słabego oddziaływania leku z receptorem, jego metabolizowaniu i/lub wiązaniu się z białkami krwi.

Mimo zwiększania lipofilności leku, nie udaje się wprowadzić go do mózgu. Dzieje się tak za sprawą glikoproteiny-P, która ulega ekspresji w komórkach śródbłonna mózgowego [49]. Istnienie tego białka po raz pierwszy stwierdzono w komórkach nowotworowych, które wykazywały zwiększoną oporność na leki [47]. Glikoproteina-P należy do nadrodziny transporterów ABC (*ATP-Binding Cassete*), które do swego działania wymagają energii dostarczonej z ATP [38]. Mechanizm działania glikoproteiny-P pozostaje niewyjaśniony; najprawdopodobniej białko to pełni funkcję hydrofobowego odkurzacza usuwającego cząsteczki hydrofobowe z obszaru błony komórkowej, zanim dotrą one do cytoplazmy. Tłumaczyłoby to ogromne zróżnicowanie substratów dla glikoproteiny-P, gdyż wtedy czynnikiem decydującym o specyficzności wobec białka byłaby zdolność do oddziaływań z dwuwarstwą lipidową, a następnie do interakcji z białkiem. Wiele substancji lipofilnych o działaniu cytostatycznym, takich jak np. alkaloidy barwinka (winkrystyna i winblastyna), antybiotyki, takie jak: aktynomycyna oraz gramicydyna, cyklosporyna A czy digoksynina, są aktywnie usuwane z kapilar mózgowych przez glikoproteinę-P występującą w błonie luminalnej komórek śródbłonna mózgowego, w wyniku czego z krwi do mózgu przechodzi niewielka ilość tych związków [84]. Sposobem na dostarczanie do mózgu wymaganych ilości leków jest modyfikacja aktywności glikoproteiny-P. Obecnie znane są już inhibitory tego białka, takie jak np. werapamil [28], zdolne do wzmocnienia efektu terapeutycznego leków podawanych do mózgu [45].

## PODSUMOWANIE

Bariera krew-mózg to złożony i dynamiczny układ, który z jednej strony ma za zadanie chronić mózg przed szkodliwym działaniem czynników zewnętrznych, ograniczając swobodny dostęp substancji znajdujących się w krwiobiegu, a z drugiej strony umożliwia wymianę substancji między krwią a mózgiem. Nowe odkrycia pozwalają na coraz lepszą znajomość procesów zachodzących w obrębie bariery krew-mózg i umożliwiają jej praktyczne stosowanie. Wiedza na temat mechanizmów transportu przez barierę krew-mózg jest już wykorzystywana w leczeniu chorób mózgu. Dalsze doskonalenie terapii będzie zależało od lepszego zrozumienia mechanizmów zaangażowanych w transport substancji przez barierę oraz od opracowania metod dostarczania leków do ściśle określonych miejsc w mózgu tak, aby ograniczyć ich działanie uboczne.

## LITERATURA

- [1] ABRAHAM CS, DELI MA, JOO F, MEGYERI P, TORPIER G. Intracarotid tumor necrosis factor-alpha administration increases the blood-brain barrier permeability in cerebral cortex of the newborn pig: quantitative aspects of double-labelling studies and confocal laser scanning analysis. *Neurosci Lett* 1996; **208**: 85–88.
- [2] ANDERSON JM, BALDA MS, FANNING AS. The structure and regulation of tight junctions. *Curr Opin Cell Biol* 1993; **5**: 772–778.
- [3] BÄR T, WOLFF JR. The formation of capillary basement membranes during internal vascularization of the rat's cerebral cortex. *Z Zellforsch* 1972; **133**: 231–248.
- [4] BARAŃCZYK-KUŹMA A, AUDUS KL, BORCHARDT RT. Catecholamine-metabolizing enzymes of bovine brain microvessel endothelial cell monolayers. *J Neurochem* 1986; **46**: 1956–1960.
- [5] BERTLER A, ROSENGREN E. Possible role of brain dopamine. *Pharmacol Rev* 1966; **18**: 769–773.
- [6] BETZ AL. Sodium transport from blood to brain: inhibition by furosemide and amiloride. *J Neurochem* 1983; **41**: 1158–1164.
- [7] BETZ AL., GOLDSTEIN GW. Polarity of the blood-brain barrier: neutral amino acid transport into isolated brain capillaries. *Science* 1978; **202**: 225–227.
- [8] BOLTON SJ, ANTHONY DC, PERRY VH. Loss of the tight junction proteins occludin and zonula occludens-1 from cerebral vascular endothelium during neutrophil-induced blood-brain barrier breakdown *in vivo*. *Neuroscience* 1998; **86**: 1245–1257.
- [9] BRADBURY MW. Transport of iron in the blood-brain-cerebrospinal fluid system. *J Neurochem* 1997; **69**: 443–454.
- [10] BROADWELL RD, BALIN BJ, SALCMAN M, KAPLAN RS. Brain-blood barrier? Yes and no. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**: 7352–7356.
- [11] BUNDGAARD M, VAN DEURS B. Brain barrier systems in the lamprey. II. Ultrastructure and permeability of the choroid plexus. *Brain Res* 1982; **240**: 65–75.
- [12] CAVEDA L, CORADA M, MARTIN-PADURA I, MASCHIO AD, BREVARIO F, LAMPUGNANIMG, DEJANA E. Inhibition of cultured cell growth by vascular endothelial cadherin (cadherin-5/VE-cadherin). *Endothellium* 1994; **2**: 1–10.
- [13] CHAN PH, POLLACK E, FISHMAN RA. Differential effects of hypertonic mannitol and glycerol on rat brain metabolism and amino acids. *Brain Res* 1981; **225**: 143–153.

- [14] CHAN PH, SCHMIDLEY JW, FISHMAN RA, LONGAR SM. Brain injury, edema, and vascular permeability changes induced by oxygen-derived free radicals. *Neurology* 1984; **34**: 315–320.
- [15] CHRISTENSEN HN, LIANG M, ARCHER EG. A distinct Na<sup>+</sup>-requiring transport system for alanine, serine, cysteine, and similar amino acids. *J Biol Chem* 1967; **242**: 5237–5246.
- [16] CICCARELLO R, D'AVELLA D, GAGLIARDI ME, ALBIERO F, VEGA J, ANGILERI FF, TOMASELLO F. Time-related ultrastructural changes in an experimental model of whole brain irradiation. *Neurosurgery* 1996; **38**: 772–779;
- [17] CORNFORD EM, BRAUN LD, OLDENDORF WH. Carrier mediated blood-brain barrier transport of choline and certain choline analogs. *J Neurochem* 1978; **30**: 299–308.
- [18] CORNFORD EM, OLDENDORF WH. Independent blood-brain barrier transport systems for nucleic acid precursors. *Biochim Biophys Acta* 1975; **394**: 211–219.
- [19] DELORME P, GAYET J, GRINON G. Ultrastructural study on transcapillary exchanges in the developing telencephalon of the chicken. *Brain Res* 1970; **22**: 269–283.
- [20] DESCAMPS L, DEHOUCK MP, TORPIER G, CECHELLI R. Receptor-mediated transcytosis of transferrin through blood-brain barrier endothelial cells. *Am J Physiol* 1996; **270**: H1149–1158.
- [21] DOROVINI-ZIS K, PRAMEYA R, BOWMAN PD. Culture and characterization of microvascular endothelial cells derived from human brain. *Lab Invest* 1991; **64**: 425–436.
- [22] EARLE KL, MITROFANIS J. Development of glia and blood vessels in the internal capsule of rats. *J Neurocytol* 1998; **27**: 127–139.
- [23] ENNIS SR, REN XD, BETZ AL. Mechanisms of sodium transport at the blood-brain barrier studied with *in situ* perfusion of rat brain. *J Neurochem* 1996; **66**: 756–763.
- [24] ERLUKAR SD. New York, Raven Press, *Basic Neurochemistry* 1989; 151–182.
- [25] ESTES KS, BREWSTER ME, BODOR NS. A redox system for brain targeted estrogen delivery causes chronic body weight decrease in rats. *Life Sci* 1988; **42**: 1077–1084.
- [26] ESTRADA C, BREADY J, BERLINER J, CANCELLA PA. Choline uptake by cerebral capillary endothelial cells in culture. *J Neurochem* 1990; **54**: 1467–1473.
- [27] FARRELL CL, PARDRIDGE WM. Blood-brain barrier glucose transporter is asymmetrically distributed on brain capillary endothelial luminal and abluminal membranes: an electron microscopic immunogold study. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 5779–5783.
- [28] FENART L, BUEE-SCHERRER V, DESCAMPS L, DUHEM C, POUILLAIN MG, CECHELLI R, DEHOUCK MP. Inhibition of P-glycoprotein: rapid assessment of its implication in blood-brain barrier integrity and drug transport to the brain by an *in vitro* model of the blood-brain barrier. *Pharm Res* 1998; **15**: 993–1000.
- [29] FRANKE WW, COWIN P, GRUND C, KUHN C, KEPPRELL HP. [w] *Endothelial Cell Biology in Health and Disease* (ed.) Simionescu N, Simionescu M, Plenum Press, New York 1988; 147–166.
- [30] FURUSE M, HIRASE T, ITOH M, NAGAFUCHI A, YONEMURA S, TSUKITA S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 1993; **123**: 1777–1788.
- [31] GERHART DZ, ENERSON BE, ZHDANKINA OY, LEINO RL, DREWES LR. Expression of monocarboxylate transporter MCT1 by brain endothelium and glia in adult and suckling rats. *Am J Physiol (Endocrinol Metab)* 1997; **273**: E207–E213.
- [32] GHANDOUR MS, LANGLEY OK, ZHU XL, WAHEED A, SLY WS. Carbonic anhydrase IV on brain capillary endothelial cells: a marker associated with the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 6823–6827.
- [33] GOLDEN PL, MACCAGNAN TJ, PARDRIDGE WM. Human blood-brain barrier leptin receptor. Binding and endocytosis in isolated human brain microvessels. *J Clin Invest* 1997; **99**: 14–18.

- [34] GREENWOOD J, LOVE ER, PRATT OE. Kinetics of thiamine transport across the blood-brain barrier in the rat. *J Physiol (Lond)* 1982; **327**: 95–103.
- [35] GREIG NH. Implications of the blood-brain barrier and its manipulations. Neuwelt [red] w Plenum Press 1989; **1**: 311–367.
- [36] HAMADA H, TSURUO T. Purification of the 170- to 180-kilodalton membrane glycoprotein associated with multidrug resistance. 170- to 180-kilodalton membrane glycoprotein is an ATPase. *J Biol Chem* 1988; **263**: 1454–1458.
- [37] HARIK SI. Blood-brain barrier sodium/potassium pump: modulation by central noradrenergic innervation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 4067–4070.
- [38] HAWKINS RA, BIEBUYCK JF. Ketone bodies are selectively used by individual brain regions. *Science* 1979; **205**: 325–327.
- [39] HERVONEN H, SPATZ M, BEMBRY J, MURRAY MR. Studies related to the blood-brain barrier to monoamines and protein in pia-arachnoid cultures. *Brain Res* 1981; **210**: 449–454.
- [40] HOLASH JA, NODEN DM, STEWART PA. Re-evaluating the role of astrocytes in blood-brain barrier induction. *Dev Dyn* 1993; **197**: 14–25.
- [41] HURWITZ AA, BERMAN JW, RASHBAUM WK, LYMAN WD. Human fetal astrocytes induce the expression of blood-brain barrier specific proteins by autologous endothelial cells. *Brain Res* 1993; **625**: 238–243.
- [42] HWANG SM, WEISS S, SEGAL S. Uptake of L-[35S]cystine by isolated rat brain capillaries. *J Neurochem* 1980; **35**: 417–424.
- [43] JANZER RC, RAFF MC. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 1987; **325**: 253–257.
- [44] JEFFERIES WA, BRANDON MR, HUNT SV, WILLIAMS AF, GATTER KC, MASON DY. Transferrin receptor on endothelium of brain capillaries. *Nature* 1984; **312**: 162–163.
- [45] JOLLIET-RIANT P, TILLEMENT JP. Drug transfer across the blood-brain barrier and improvement of brain delivery. *Fundam Clin Pharmacol* 1999; **13**: 16–26.
- [46] JOÓ F. The cerebral microvessels in culture, an update. *J Neurochem* 1992; **58**: 1–17.
- [47] JULIANO RL, LING V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 1976; **455**: 152–162.
- [48] LAMBERT DM, MERGEN F, BERENS CF, POUPAERT JH, DUMONT P. Synthesis and pharmacological properties of 2-[S-acetylthiorphan]-1,3- diacylaminoopropan-2-ol derivatives as chimeric lipid drug carriers containing an enkephalinase inhibitor. *Pharm Res* 1995; **12**: 187–191.
- [49] LECHARDEUR D, SCHERMAN D. Functional expression of the P-glycoprotein mdr in primary cultures of bovine cerebral capillary endothelial cells. *Cell Biol Toxicol* 1995; **11**: 283–293.
- [50] LI CX, POZNANSKY MJ. Characterization of the ZO-1 protein in endothelial and other cell lines. *J Cell Sci* 1990; **97**: 231–237.
- [51] LOSSINSKY AS, VORBRODT AW, WISNIEWSKI HM. Ultracytochemical studies of vesicular and canalicular transport structures in the injured mammalian blood-brain barrier. *Acta Neuropathol (Berlin)* 1983; **61**: 239–245.
- [52] MACKIC JB, STINS M, MCCOMB JG, CALERO M, GHISO J, KIM KS, YAN SD, STERN D, SCHMIDT AM, FRANGIONE B, ZLOKOVIC BV. Human blood-brain barrier receptors for Alzheimer's amyloid-beta 1–40. Asymmetrical binding, endocytosis, and transcytosis at the apical side of brain microvascular endothelial cell monolayer. *J Clin Invest* 1998; **102**: 734–743.
- [53] MARUKI C, SPATZ M, UEKI Y, NAGATSU I, BEMBRY J. Cerebrovascular endothelial cell culture: metabolism and synthesis of 5-hydroxytryptamine. *J Neurochem* 1984; **43**: 316–319.
- [54] MERESSE S, DEHOUCK MP, DELORME P, BENSALD M, TAUBER JP, DELBART C, FRUCHART JC, CECHELLI R. Bovine brain endothelial cells express tight junctions and monoamine oxidase activity in long-term culture. *J Neurochem* 1989; **53**: 1363–1371.

- [55] MROCZKOWSKA JE, GALLA HJ, NALECZ MJ, NALECZ KA. Evidence for an asymmetrical uptake of L-carnitine in the blood-brain barrier *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **241**: 127–131.
- [56] NEUWELT EA, BARRANGER JA, BRADY RO, PAGEL M, FURBISH FS, QUIRK JM, MOOK GE, FRENKEL E. Delivery of hexosaminidase A to the cerebrum after osmotic modification of the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **78**: 5838–5841.
- [57] OLDENDORF WH. [w] *The Ocular and Cerebrospinal Fluids* (ed.) Bilo LZ, Davson H, Fenstermacher J. D Academic Press 1977; 177–190.
- [58] OLDENDORF WH. Carrier-mediated blood-brain barrier transport of short-chain monocarboxylic organic acids. *Am J Physiol* 1973; **224**: 1450–1453.
- [59] OLDENDORF WH, CORNFORD ME, BROWN WJ. The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann Neurol* 1977; **1**: 409–417.
- [60] OWMAN C, ROSENGREN E. Dopamine formation in brain capillaries--an enzymic blood-brain barrier mechanism. *J Neurochem* 1967; **14**: 547–550.
- [61] PARDRIDGE WM, OLDENDORF WH. Transport of metabolic substrates through the blood-brain barrier. *J Neurochem* 1977; **28**: 5–12.
- [62] PARDRIDGE WM, TRIGUERO D, BUCIAK J. Transport of histone through the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; **251**: 821–826.
- [63] PLATEEL M, TEISSIER E, CECHELLI R. Hypoxia dramatically increases the nonspecific transport of blood-borne proteins to the brain. *J Neurochem* 1997; **68**: 874–877.
- [64] RAPOPORT SI, THOMPSON HK. Osmotic opening of the blood-brain barrier in the monkey without associated neurological deficits. *Science* 1973; **180**: 971.
- [65] RICHTER JJ, WAINER A. Evidence for separate systems for the transport of neutral and basic amino acids across the blood-brain barrier. *J Neurochem* 1971; **18**: 613–620.
- [66] RISAU W, WOLBURG H. Development of the blood-brain barrier. *Trends Neurosci* 1990; **13**: 174–178.
- [67] ROBERTS RL, FINE RE, SANDRA A. Receptor-mediated endocytosis of transferrin at the blood-brain barrier. *J Cell Sci* 1993; **104**: 521–532.
- [68] ROSENSTEIN JM, MANI N, SILVERMAN WF, KRUM JM. Patterns of brain angiogenesis after vascular endothelial growth factor administration *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 7086–7091.
- [69] ROSSE RB, THEUT SK, BANAY-SCHWARTZ M, LEIGHTON M, SCARCELLA E, COHEN CG, DEUTSCH SI. Glycine adjuvant therapy to conventional neuroleptic treatment in schizophrenia: an open-label, pilot study. *Clin Neuropharmacol* 1989; **12**: 416–424.
- [70] RUBIN LL. Endothelial cells: adhesion and tight junctions. *Curr Opin Cell Biol* 1992; **4**: 830–833.
- [71] SANCHEZ DEL PINO MM, HAWKINS RA, PETERSON DR. Biochemical discrimination between luminal and abluminal enzyme and transport activities of the blood-brain barrier. *J Biol Chem* 1995; **270**: 14907–14912.
- [72] SANCHEZ DEL PINO MM, HAWKINS RA, PETERSON DR. Neutral amino acid transport by the blood-brain barrier. Membrane vesicle studies. *J Biol Chem* 1992; **267**: 25951–25957.
- [73] SANCHEZ DEL PINO MM, PETERSON DR, HAWKINS RA. Neutral amino acid transport characterization of isolated luminal and abluminal membranes of the blood-brain barrier. *J Biol Chem* 1995; **270**: 14913–14918.
- [74] SCHWEIGERER L, NEUFELD G, FRIEDMAN J, ABRAHAM JA, FIDDES JC, GOSPODAROWICZ D. Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth. *Nature* 1987; **325**: 257–259.
- [75] SEELIG A, GOTTSCHLICH R, DEVANT RM. A method to determine the ability of drugs to diffuse through the blood - brain barrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 68–72.

- [76] SENJO M, ISHIBASHI T, TERASHIMA T, INOUE Y. Correlation between astroglialogenesis and blood-brain barrier formation: immunocytochemical demonstration by using astroglia-specific enzyme glutathione S-transferase. *Neurosci Lett* 1986; **66**: 39–42.
- [77] SHULKIN BL, BETZ L, KOEPPE RA, AGRANOFF BW. Inhibition of Neutral Amino Acid Transport Across the Human Blood-Brain Barrier by Phenylalanine. *J Neurochem* 1995; **64**: 1252–1257.
- [78] SPATZ M, KANEDA N, SUMI C, NAGATSU I, CREVELING CR, NAGATSU T. The presence of catechol-o-methyltransferase activity in separately cultured cerebrovascular endothelial and smooth muscle cells. *Brain Res* 1986; **381**: 363–367.
- [79] SPATZ M, NAGATSU I, MARUKIC, YOSHIDA M, KONDO Y, BEMBRY J. The presence of phenylethanolamine-N-methyltransferase in cerebral microvessel and endothelial cultures. *Brain Res* 1982; **240**: 191–194.
- [80] STEELE RD. Blood-brain barrier transport of the alpha-keto acid analogs of amino acids. *Fed Proc* 1986; **45**: 2060–2064.
- [81] STEWART PA, HAYAKAWA K. Early ultrastructural changes in blood-brain barrier vessels of the rat embryo. *Brain Res Dev Brain Res* 1994; **78**: 25–34.
- [82] STEWART PA, WILEY MJ. Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: a study using quail--chick transplantation chimeras. *Dev Biol* 1981; **84**: 183–192.
- [83] STONE TW, CONNICK JH. Quinolinic acid and other kynurenines in the central nervous system. *Neuroscience* 1985; **15**: 597–617.
- [84] TSUJI A. P-glycoprotein-mediated efflux transport of anticancer drugs at the blood-brain barrier. *Ther Drug Monit* 1998; **20**: 588–590.
- [85] WAGNER HJ, PILGRIM C, BRANDL J. Penetration and removal of horseradish peroxidase injected into the cerebrospinal fluid: role of cerebral perivascular spaces, endothelium and microglia. *Acta Neuropathol (Berl)* 1974; **27**: 299–315.
- [86] WOLFF JE, BELLONI-OLIVI L, BRESSLER JP, GOLDSTEIN GW. Gamma-glutamyl transpeptidase activity in brain microvessels exhibits regional heterogeneity. *J Neurochem* 1992; **58**: 909–915.
- [87] ZAHRAOUI A, JOBERTY G, ARPIN M, FONTAINE JJ, HELLIO R, TAVITIAN A, LOUWARD D. A small rab GTPase is distributed in cytoplasmic vesicles in non polarized cells but colocalizes with the tight junction marker ZO-1 in polarized epithelial cells. *J Cell Biol* 1994; **124**: 101–115.

*Redaktor prowadzący – J. Kuźnicki*

*Otrzymano: 10.02. 1999 r.*

*Przyjęto: 16.04. 1999 r.*

*Adres autora: ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa*

*e-mail: joannamr@nencki.gov.pl*



## MOLEKULARNE PODSTAWY DZIAŁANIA I SYNCHRONIZACJI OKOŁODOBOWEGO OSCYLATORA BIOLOGICZNEGO

### MOLECULAR BASES OF BIOLOGICAL CIRCADIAN OSCILLATOR ACTIVITY AND SYNCHRONIZATION

Roland ŻĄDZIŃSKI, Jerzy Z. NOWAK

Zakład Amin Biogennych, Polska Akademia Nauk, Łódź

**Streszczenie:** Okołodobowe rytmy aktywności ruchowej, temperatury, aktywności enzymatycznej i pracy układu dokrewnego są zjawiskiem powszechnie występującym u zwierząt należących do różnych grup systematycznych. Obecność tego typu rytmów można obserwować również u roślin i grzybów. Ruchy rotacyjnie Ziemi wymusiły bowiem na ewoluujących formach życia wykształcenie mechanizmów umożliwiających im przetrwanie w zmieniających się w ciągu doby-roku warunkach bytowania. Chociaż środowisko zewnętrzne ma duży wpływ na te rytmy, przyczyną ich występowania są endogenne mechanizmy sterujące określane mianem zegara biologicznego. Badania nad zegarami biologicznymi u różnych gatunków mają już długą historię. Dopiero jednak ostatnie lata przyniosły serię odkryć, które pozwoliły na zrozumienie molekularnych podstaw funkcjonowania tych mechanizmów. Okazało się przy tym, że są to mechanizmy konserwatywne i uniwersalne. Zegary biologiczne człowieka, myszy i muszki owocowej zawierają bowiem te same elementy, mające takie samo znaczenie funkcjonalne. Wyraźne analogie można również odnaleźć porównując poznane mechanizmy zegara biologicznego zwierząt i grzybów.

(*Postępy Biologii Komórki* 1999; 26: 611–628)

**Słowa kluczowe:** rytmy okołodobowe, zegar biologiczny, PER, TIM, CLOCK, BMAL1, FRQ.

**Summary:** Circadian rhythms of motor activity, temperature, enzymatic activity and function of endocrine system(s) are common phenomena occurring in animals representing different systematic groups. Circadian rhythms are also observed in plants and fungi. Although such rhythms resulted from geophysical features of rotating Earth, being still under strong environmental influence, their existence and function is due to endogenous mechanisms embraced by the term "biological clock". Studies on biological clocks of different species have already long history. However, only last decade has brought several important discoveries that allowed investigators to understand molecular bases of the mechanisms underlying clock function. It turned out that these mechanisms are very conservative and universal. The biological clocks of human, mouse and fruit fly are composed of similar elements playing similar

functions. There are also many analogies between clock mechanisms occurring in animals and fungi. This review will present current knowledge in the field of biological timing systems in living organisms, with particular emphasis given to the latest developments in the concept and function of circadian clock mechanisms.

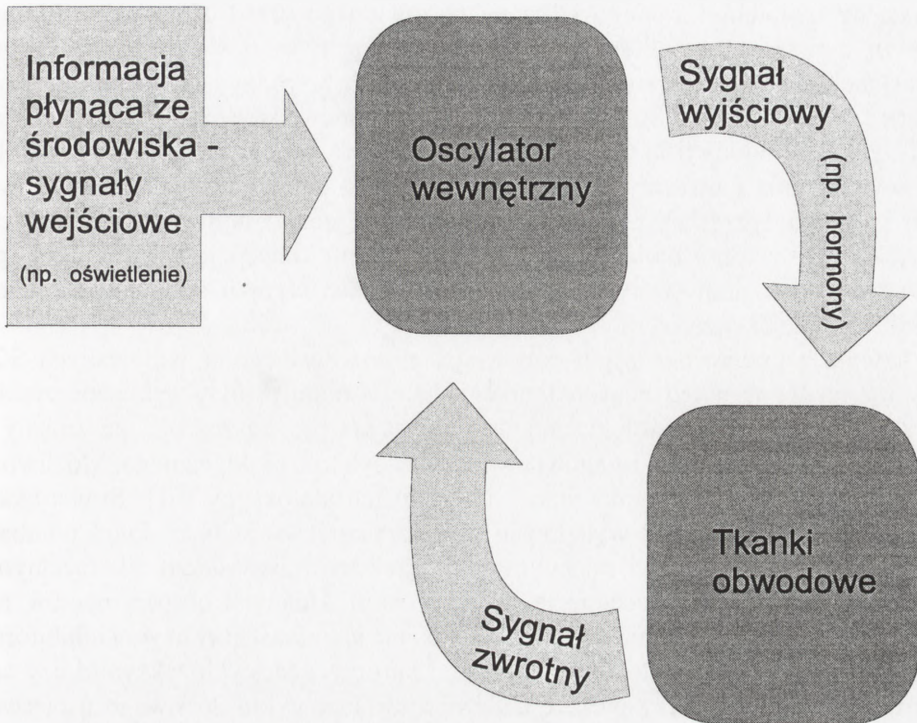
*(Advances in Cell Biology 1999; 26: 611–628)*

**Key words:** circadian rhythms, biological clock, PER, TIM, CLOCK, BMAL1, FRQ.

Cykliczność zjawisk przyrodniczych na Ziemi jest powszechna. Następujące po sobie pory roku, miesięczne cykle księżycowe czy wreszcie rytmy dobowe nie mogą być czynnikiem neutralnym dla organizmów żywych. Konieczność dostosowywania się czy wręcz wyprzedzania towarzyszących im zmian temperatury, oświetlenia, wilgotności i dostępności pożywienia w środowisku musiała stanowić silny bodziec w procesie ewolucji. Wymuszała bowiem istnienie mechanizmów, które z jednej strony mogłyby nadzorować procesy zachodzące w organizmie i umiejscawiać je w określonym punkcie cyklu, a z drugiej strony byłyby zdolne korygować ten wewnętrzny rytm zgodnie z sygnałami dochodzącymi ze środowiska zewnętrznego. Cykl dobowy obok cyklu rocznego stanowi najłatwiej zauważalny przejaw cykliczności w przyrodzie. Przemianom dnia i nocy towarzyszą zmiany w aktywności, cykliczne podnoszenie się i obniżanie temperatury ciała oraz zmiany w ubarwieniu. Są to zmiany zewnętrzne, które stanowią manifestację leżących u ich podłoża zmian biochemicznych. Jak do tej pory zebrano już bogatą kolekcję obserwacji rytmu dobowego w aktywności enzymatycznej bądź w pracy układu dokrewnego. Dawno stwierdzono, że poziom we krwi takich hormonów, jak np. ACTH, kortyzol, czy hormon wzrostu, ulega wyraźnym wahaniom dobowym. Hormonem, który zyskał szczególne zainteresowanie chronobiologów, jest melatonina. Ta pochodna tryptofanu jest wytwarzana głównie w szyszynce – organie uznawanym jeszcze niedawno za organ szczątkowy, a którego właściwości dokrewne stwierdzono dopiero w latach pięćdziesiątych. Melatoninie przypisuje się rolę chemicznego sygnału w cyklu dobowym w skali całego organizmu. Dobowe wahania w stężeniu tego hormonu są pochodną wahań w aktywności serotoninowej (arylo-alkilo-aminowej) N-acetylotransferazy (NAT) – enzymu, o kluczowym znaczeniu w regulacji biosyntezy melatoniny. Cykliczne, okołodobowe zmiany w aktywności NAT (wysoka – w nocy, niska – w ciągu dnia), a w konsekwencji w wydzielaniu melatoniny stanowią jednakże jedynie końcowy wynik funkcjonowania mechanizmów, które można byłoby ogólnie nazwać zegarem.

Zgodnie z poczynionymi wcześniej uwagami, zegar biologiczny, który spełniałby wymagania narzucone przez cykliczność dobowych zmian czynników środowiska, musiałby charakteryzować się trzema cechami (rys. 1):

- posiadaniem wewnętrznego oscylatora zdolnego do generowania rytmu 24-godzinnego;
- istnieniem mechanizmów, które pozwalałyby na dostrojenie zegara wewnętrznego z zewnętrznym rytmem dobowym;



RYSUNEK 1. Ogólny schemat funkcjonowania zegara biologicznego

- posiadaniem możliwości wyprowadzania sygnałów będących wypadkową rytmu wewnętrznego i informacji pochodzących ze środowiska.

Istotną cechą oscylatora biologicznego, szczególnie w przypadku organizmów zmiennocieplnych, powinna być również zdolność do kompensacji zmian w temperaturze środowiska.

U ssaków istnienie takiego oscylatora już dawno wiązano z jądrami nadskrzyżowaniowymi podwzgórza (SCN; ang. *suprachiasmatic nucleus*). Zwierzęta operacyjnie pozbawione tych struktur charakteryzowały się arytmia wielu spośród cyklicznie zachodzących procesów życiowych [51]. Rozregulowaniu podlegał również okołodobowy rytm melatoninowy. Z kolei przeszczep SCN prowadził do przywrócenia rytmiki okołodobowej u zwierząt, które jej uprzednio nie wykazywały, przy czym okres tak przywróconego rytmu był charakterystyczny dla dawcy przeszczepu [37]. Obecność SCN stanowi zatem warunek konieczny, ale jak widać również wystarczający dla generowania rytmu dobowego u ssaków. Za rolę SCN w utrzymywaniu rytmów okołodobowych przemawiają także dane anatomiczne. Jądra te bowiem są za sprawą neuronalnego szlaku siatkówkowo-podwzgórzowego (RHT; ang. *retino-hypothalamic tract*) funkcjonalnie powiązane z siatkówką, co po-

zwala na spełnienie drugiego warunku postawionego przed oscylatorem biologicznym, a mianowicie odbierania bodźców świetlnych, które stanowią podstawową informację o dobowym rytmie zmian zachodzących w środowisku. Z drugiej strony sporą frakcję komórek SCN stanowią ciała neuronów, których aksony unerwiają szyszynkę. W hodowli *in vitro* wykazano, że pojedyncze komórki SCN są zdolne do wytwarzania i utrzymywania rytmu dobowego swojej aktywności nerwowej. Jest to istotna przesłanka przemawiająca za przyjęciem hipotezy komórkowego charakteru oscylatora biologicznego, a odrzuceniem koncepcji wyjaśniającej powstawanie endogennych cykli okołodobowych jako wyniku kooperacyjnych oddziaływań międzyneuronalnych.

Jednym z przejawów rytmu dobowego, obserwowanego w izolowanych SCN czy też nawet w pojedynczych komórkach tej struktury, były cykliczne zmiany w aktywności elektrofizjologicznej. Istniało nawet przypuszczenie, że zmiany te są zmianami pierwotnymi i stanowią wahadło oscylatora biologicznego. Możliwości takiej przeczą jednak wyniki prac z użyciem tetrodotoksyny [61]. Stwierdzono, że całkowite zablokowanie wyładowań bioelektrycznych w SCN na skutek inkubacji tkanki w środowisku zawierającym ten związek było zjawiskiem odwracalnym i nie towarzyszyło mu przesunięcie w fazie cyklu. Udanych eksperymentów nad przesunięciem w fazie rytmu dobowego dokonano natomiast przy użyciu inhibitorów syntezy białek. Stosując takie związki, jak: puromycyna, cykloheksymid czy anizomycyna, udało się przyspieszyć bądź opóźnić fazę cyklu dobowego u pierwotniaków [11], grzybów [34], glonów [24], mięczaków [23], a także u kręgowców [55]. U ssaków rozregulowanie rytmu dobowego można było uzyskać podając inhibitory miejscowo – bezpośrednio do SCN [22]. Mechanizm, przez który inhibitory syntezy białka powodowały zaburzenia w rytmie dobowym, początkowo nie był jasny. Zjawisko to nie wykluczało właściwie żadnego z proponowanych w tym czasie wyjaśnień. Niemniej na podstawie tych właśnie danych zbudowano model transkrypcyjno/translacyjny oscylatora biologicznego, który znalazł później potwierdzenie w doświadczeniach opartych na metodach biologii molekularnej. Podstawą modelu było założenie mówiące o tym, że pierwotnym sygnałem cyklu dobowego jest zmienna ekspresja genu określonego białka o właściwościach autosupresyjnych. Zdolność takiego białka do bezpośredniego bądź pośredniego hamowania ekspresji swojego genu stanowiłaby w tym układzie ujemne sprzężenie zwrotne, pozwalające na rytmiczne wahania w jego ekspresji i na zamknięcie pętli mechanizmu leżącego u podstaw rytmiki okołodobowej. Jednocześnie takie czynniki, jak: tempo dojrzewania transkryptów i przemian potranslacyjnych, czas degradacji białka, szybkość, z jaką może ono przechodzić z cytoplazmy do jądra oraz jego zdolność do wiązania się z miejscami promotorowymi, byłyby wielkościami wyznaczającymi okres cyklu. Koncepcja transkrypcyjnego oscylatora rytmu okołodobowego postulowała istnienie białka(ek), których poziom w komórce, jak również poziom kodującego je mRNA, ulegałyby regularnym wahaniom okołodobowym. To zaś stanowiło wskazówkę co

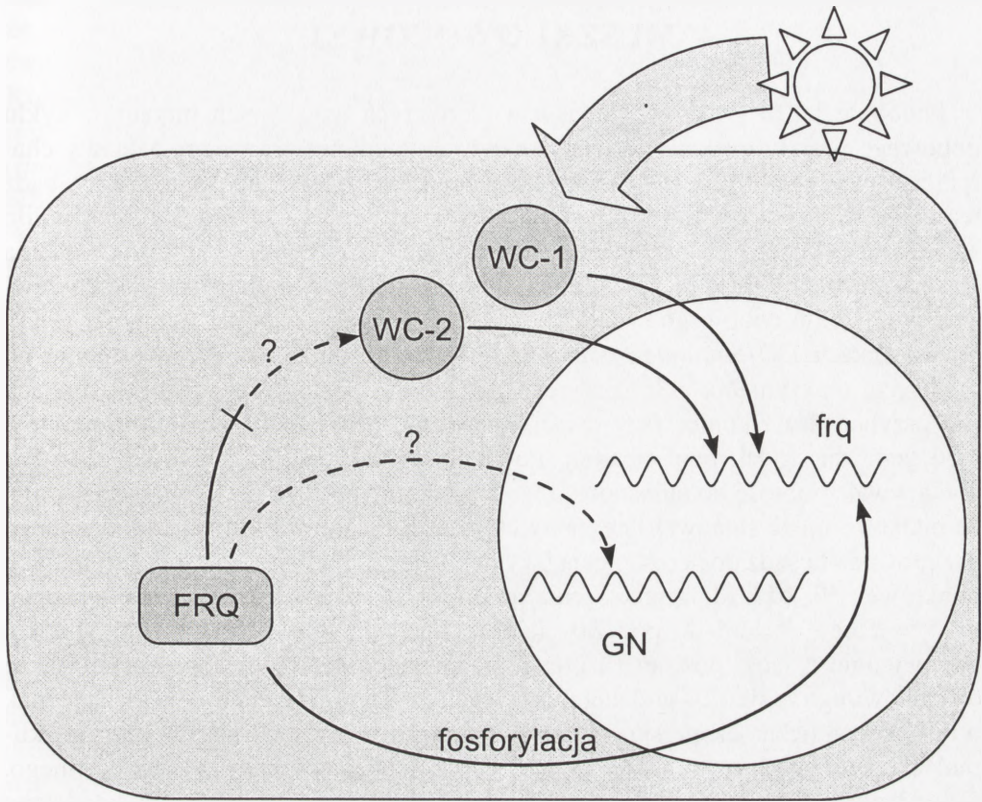
do kierunku dalszych badań w chronobiologii. Pierwszej udanej identyfikacji genów związanych z cyklem dobowym dokonano jednakże w inny sposób wykorzystując mutanty o zaburzonych rytmach dobowych. Mutanty takie wyselekcjonowano najpierw u muszki owocowej *Drosophila melanogaster*, a wkrótce potem u pleśni chlebowej *Neurospora crassa*.

## GENY ZEGAROWE FRQ

Badania nad rytmem dobowym u *Neurospora crassa* mają już dosyć długą historię, sięgającą końca lat pięćdziesiątych [35]. Zainteresowanie, jakie wzbudził ten grzyb u chronobiologów, było pochodną charakterystycznej okołodobowej rytmiki wytwarzania konidiów. Nie bez znaczenia była również dobrze poznana genetyka tego organizmu, który jako jeden z pierwszych stał się obiektem badań biologów molekularnych. Pierwsze udane selekcje mutantów cyklu okołodobowego u *Neurospora crassa* zawdzięczamy zespołowi J.F. Feldmana [12]. Izolowane przez nich mutanty opisywano skrótem *frq* (od ang. *frequency*) i u większości z nich zaburzenia w rytmie dobowym wiązały się z mutacją w obrębie tego samego genu, nazwanego w związku z tym genem *frq*. Mutacje genu *frq* prowadziły do wydłużenia bądź skrócenia okresu rytmu, jak również w przypadku mutacji *frq*<sup>9</sup> do utraty zdolności do kompensacji zmian temperatury. W warunkach standardowych mutanty *frq*<sup>9</sup> charakteryzowały się całkowitą arytmia. Jak wykazały późniejsze prace, ekspresja genu *frq* przebiega rytmicznie, a okres rytmu pokrywa się z rytmem morfologicznych przemian obserwowanych *in vivo* [3]. Stała ekspresja *frq* w szczepach transformowanych nie była w stanie odtworzyć cyklu w mutantach *frq*<sup>9</sup>, jak również prowadziła do arytmii u pozostałych mutantów oraz u form dzikich\*. Sama obecność białka FRQ nie wystarczała zatem dla utrzymania cyklu. Udało się również wykazać autosupresyjny charakter produktów genu *frq*. Związana z innym promotorem stała ekspresja tego genu prowadziła do zablokowania ekspresji endogennego *frq*. Białko FRQ doskonale się zatem wpasowuje w transkrypcyjno/translacyjny model zegara biologicznego. Dodatkowych danych, po części potwierdzających ten model, dostarcza analiza sekwencji genu *frq*. Koduje on przynajmniej dwa transkrypty, z których dłuższy odpowiada zapewne białku FRQ. W białku tym, zbudowanym z 898 aminokwasów, można odnaleźć między innymi kwaśne sekwencje charakterystyczne dla czynników transkrypcyjnych, jądrowy sygnał lokalizujący, jak również sekwencje PEST (sekwencje bogate w kodony dla proliny (P), kwasu glutaminowego (E), seryny (S) i treoniny (T)), które charakteryzują białka ulegające szybkiej degradacji. Na ekspresję genu *frq* ma również wpływ ekspozycja na światło

\*Typ dziki jest terminem powszechnie stosowanym do określania organizmów lub szczepów niezmutowanych

– czynnik, który podobnie jak u innych organizmów, również u *N. crassa* może spowodować przesunięcie w fazie cyklu. Stwierdzono, że już krótkie naświetlanie w świetle widzialnym prowadziło do szybkiego i wyraźnego wzrostu ekspresji genu *frq*, nawet w obecności produktów tej ekspresji [7]. Szybkość, z jaką dochodzi do indukcji *frq*, pozwala przypuszczać, że może to być pierwotna odpowiedź na działanie światła. Rola genu *frq* i produktów jego ekspresji może być zatem dwojaka: obok udziału w generowaniu wewnętrznego rytmu okołodobowego, może również uczestniczyć w procesach dostrajania cyklu wewnętrznego do zewnętrznych cykli oświetlenia. Najnowsze dane wskazują na stosunkowo długi czas życia FRQ w komórce. Jego poziom osiąga maksimum w 4 godziny po pik *frq* mRNA, a następnie spada stopniowo do wartości minimalnej, co nieznacznie poprzedza kolejny pik *frq* mRNA. Sugeruje to możliwość oparcia pętli ujemnego sprzężenia zwrotnego na tylko jednym genie i białku, co sprowadzałoby model transkrypcyjno/translacyjnej regulacji cyklu dobowego do najprostszej z możliwych postaci. Wiadomo już jednakże, że opisywany układ w rzeczywistości nie jest tak prosty. Doświadczenia z użyciem znakowanych przeciwciał wskazują na istnienie alternatywnego białka FRQ, związanego z obecnością dodatkowego promotora w obrębie ORF (ang. *open reading frame*) genu *frq* [13]. Co więcej, obydwie formy FRQ ulegają intensywnej fosforylacji, która może być nie bez znaczenia dla potencjalnej aktywności transkrypcyjnej FRQ, jak również dla procesów degradacji tego białka. Dalszej komplikacji, ale również i zrozumienia cyklu okołodobowego *N. crassa* dostarczyły badania nad mutantami genów *white collar*: *wc-1* i *wc-2*. Geny *white collar* już od dawna wiązano z procesami odbierania bodźców świetlnych. Istniało zatem uzasadnione przypuszczenie, że ich mutacje mogą wpływać na rytm dobowy poprzez modulacje informacji świetlnych. Okazało się jednak, że oprócz udziału w synchronizacji rytmów endogennych z rytmem zmian czynników środowiska (mutanty *wc-1* są niewrażliwe na działanie światła), produkty ekspresji genów *wc* stanowią istotny element oscylatora u *N. crassa*. Zarówno mutanty *wc-1*, jak i *wc-2* nie są zdolne do utrzymania rytmu dobowego. O ile jednak produkty genu *wc-2* są absolutnie niezbędne do zamknięcia pojedynczej pętli sprzężenia zwrotnego, o tyle mutanty *wc-1* mogą przejść przez przynajmniej jeden cykl ekspresji *frq* [6]. Powyższe dane, jak również budowa białek WC (są to białka wiążące DNA, wykazujące duże podobieństwo do czynników transkrypcyjnych rodziny GATA) pozwoliły na stworzenie modelu oscylatora biologicznego *N. crassa*, w którym białko WC-2 byłoby odpowiedzialne za aktywację ekspresji genu *frq*, samo zaś podlegałoby pośredniej bądź bezpośredniej supresji przez białko FRQ (rys. 2). Tym samym WC-2 byłoby integralnym składnikiem pętli sprzężenia zwrotnego. W modelu tym, WC-1 byłoby białkiem modulującym działanie oscylatora oraz czynnikiem, którego zdolność do aktywacji ekspresji *frq* umożliwiałyby przesunięcie fazy cyklu dobowego *N. crassa* pod wpływem światła.



RYSUNEK 2. Model zegara biologicznego u *Neurospora crassa*: *GN* – geny będące pod bezpośrednią kontrolą oscylatora, a które nie uczestniczą w generowaniu rytmu dobowego

Znaczenie odkrycia roli genów *wc-1* i *wc-2* nie ogranicza się wyłącznie do lepszego zrozumienia mechanizmów funkcjonowania oscylatorów biologicznych. Rzuca również pewne światło na filogenezę tych mechanizmów. Zarówno WC-1, jak i WC-2 zawierają domenę PAS (PER/ARNT/SIM), która, jak się powszechnie uważa, jest odpowiedzialna za interakcje między białkami. Domena ta, choć można ją odnaleźć w białkach organizmów należących do różnych grup systematycznych, występuje dość rzadko. Można ją jednak spotkać w białkach związanych z recepcją światła u bakterii, roślin i grzybów oraz w białkach związanych z cyklem okołodobowym u owadów i kręgowców (patrz niżej). Produkty ekspresji genów *white collar* łączą w sobie cechy obydwu grup. Być może białka oscylatorów biologicznych, a przynajmniej niektóre z nich, wyodrębniły się właśnie z białek fotoreceptorowych.

## KLASYCZNE MUTANTY CYKLU DOBOWEGO MUSZKI OWOCOWEJ

Podobnie jak u grzybów, mutacje u pierwszych uzyskanych mutantów cyklu dobowego muszki owocowej związane były z pojedynczym genem. Mutanty charakteryzował wydłużony ( $per^L$ ) albo skrócony okres rytmu dobowego ( $per^S$ ), bądź też całkowita utrata rytmu ( $per^0$ ) [28]. Sklonowanie genu *period* [4,5] pozwoliło stwierdzić cykliczny charakter jego ekspresji [18], jak również cykliczne wahania w stężeniu białka PER [47]. Wahania miały miejsce zarówno w warunkach zewnętrznego cyklu dobowego światło-ciemność (LD), jak i w stałej ciemności (DD). W warunkach DD amplituda wahań była jednakże mniejsza. W odróżnieniu od cyklu *frq*, maksymalna ekspresja genu *per* u muszek hodowanych w warunkach LD przypadała na koniec fazy jasnej, natomiast maksymalny poziom produktów tego genu na środek fazy ciemnej. Podobnie jednak do FRQ, produkt genu *per* wykazywał zdolność do autosupresji, co wraz z innymi jego cechami wskazywało, że białko to może stanowić integralny element oscylatora. Ekspresja egzogenego *per* prowadziła bądź do przesunięcia fazy cyklu, jak to miało miejsce przy stymulacji punktowej [9], bądź do zmniejszenia amplitudy wahań w ekspresji endogenego *per*, do czego dochodziło podczas stałej stymulacji. W tym ostatnim przypadku, odpowiednio wysoki poziom ekspresji egzogenego *per* mógł doprowadzić także do całkowitego zaniku 24-godzinnej oscylacji *per*. Te same badania świadczą jednak o tym, że cykliczna ekspresja endogenego *per*, a w szczególności cykliczna akumulacja jego produktów może zachodzić przy stałej ekspresji *per* egzogenego. Co więcej stała ekspresja egzogenego *per* u mutantów  $per^0$  przywracała cykliczne wahania PER. Świadczyłoby to o tym, że choć poziom PER w komórce regulowany jest na poziomie transkrypcji [17], nie jest to jedyny mechanizm regulacji. Stosunkowo długi okres między maksymalną akumulacją mRNA i białka PER sugerował możliwość kontroli potranskrypcyjnej, co znalazło potwierdzenie eksperymentalne [63]. Na stężenie PER może mieć też wpływ kinetyka procesów degradacji tego białka, ta zaś może być modulowana przez zmiany potranslacyjne. Różnice w ruchliwości elektroforetycznej obserwowane między wyznakowanymi immunologicznie PER z różnych etapów cyklu potwierdziły modyfikacje potranslacyjne tego białka i wykazały dodatkowo, że za cykliczne zmiany w masie cząsteczkowej PER odpowiadają procesy fosforylacji [10]. Wyniki ostatnich badań wskazują, że procesy te zachodzą przy współdziałaniu produktów genu opisanego jako *dbt* (*double-time*) i że ich brak prowadzi bądź do zaburzeń cyklu dobowego, bądź do całkowitej jego utraty w warunkach stałej ciemności. Cechą charakterystyczną muszek owocowych nie mających genu *dbt* ( $dbt^P$ ) jest bardzo wysoki poziom PER oraz niskie ufosforylowanie tego białka [36]. Mutanty  $dbt^S$  (o skróconym okresie rytmu dobowego) i  $dbt^L$  (o wydłużonym cyklu) wykazywały odpowiednio przyspieszone



bądź spowolnione tempo fosforylacji PER. Analiza sekwencji genu *dbt* ujawniła, że koduje on białko będące homologiem ludzkiej kinazy kazeinowej I $\epsilon$ , co może świadczyć o bezpośrednim udziale produktów genu *dbt* w fosforylacji PER [27]. Kolejnym czynnikiem, który wpływa na poziom i lokalizację białka PER w komórce, jest inne białko, któremu ze względu na mutację, dzięki której zostało odkryte (*timeless*), nadano nazwę TIM [43]. Mutanty *tim* (*tim*<sup>01</sup>), obok zaburzeń okołodobowego rytmu aktywności motorycznej, charakteryzują się również odmiennym metabolizmem *per*. Chociaż ekspresja *per* u tych mutantów podlega fluktuacji, to jednak wahania w poziomie *per* RNA nie odpowiadają rytmice dobowej, a amplituda tych wahań ulega spłaszczeniu. Odmienna jest też lokalizacja w komórce PER, które u form dzikich może przechodzić do jądra komórkowego, natomiast u mutantów pozostaje w cytoplazmie [60]. Obecność sekwencji PAS w PER i ścisły związek jego przemian z genem *tim* stał się przesłanką hipotezy, zgodnie z którą regulacja PER jest kontrolowana między innymi poprzez dimeryzację z TIM. Chociaż zsekwencjonowanie genu *tim* wykazało brak sekwencji PAS w produkcie jego ekspresji [33], tworzenie kompleksów PER z TIM znalazło potwierdzenie doświadczalne. Stwierdzono bowiem, że PER może wchodzić w skład większych kompleksów białkowych, których masa cząsteczkowa odpowiadałaby masie cząsteczkowej postulowanych kompleksów PER-TIM, a których nie obserwuje się u mutantów *tim*<sup>0</sup> [62]. Powstawanie takich kompleksów jest zapewne niezbędnym etapem przechodzenia PER z cytoplazmy do jądra. Analiza sekwencji aminokwasowej wskazuje na obecność regionu zasadowego, który mógłby potencjalnie pełnić funkcje jądrowego sygnału lokalizacyjnego [33]. Bardzo istotne są w tym kontekście cykliczne wahania w ekspresji *tim*, których okres i faza są zgodne z rytmiką ekspresji *per* [44]. Podobne analogie w rytmie dobowym obserwuje się także w przypadku białek TIM i PER [62]. Obok regionu zasadowego, białko TIM zwiera również sekwencje silnie kwasowe, których obecność jest jedną z cech charakteryzujących domeny aktywujące niektórych czynników transkrypcyjnych. Rozpatrywano w związku z tym możliwość bezpośredniego uczestnictwa tego białka w zależnej od PER kontroli ekspresji genu *per*. Hipoteza ta jednak, wobec ostatnich odkryć, straciła rację bytu.

Odkrycie białka TIM pozwoliło również na lepsze zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za synchronizację endogennego rytmu okołodobowego z rytmem zewnętrznym. Okazało się bowiem, że białko to ulega szybkiej degradacji podczas ekspozycji na działanie światła [21, 32]. Analiza spektralna dodatkowo potwierdziła udział TIM w procesach synchronizacji. Degradacja TIM i przesunięcie w fazie rytmu aktywności motorycznej pod wpływem światła wykazywały bowiem identyczną zależność od długości fali stosowanego oświetlenia [53]. U muszek hodowanych w warunkach LD, ekspozycja na światło, a tym samym degradacja TIM we wczesnym okresie fazy ciemnej prowadziła do opóźnienia fosforylacji PER i wnikania tego białka do jądra. Opóźnienie to odpowiadało opóźnieniu fazy rytmu aktywności motorycznej. Podobną analogię można było stwierdzić przy ekspozycji

na światło w późnym okresie fazy ciemnej. W tym przypadku przyspieszeniu fazy rytmu aktywności motorycznej towarzyszyła przyspieszona fosforylacja PER [29].

## MUTANTY O ZABURZONYM CYKLU DOBOWYM U SSAKÓW

Pierwszymi ssakami, a jednocześnie kręgowcami, u których powodzeniem zakończyły się próby uzyskania mutantów cyklu dobowego, były chomiki syryjskie *Mesocricetus auratus* [38]. W warunkach stałej ciemności mutacja, której nadano nazwę *tau*, powodowała skrócenie cyklu dobowego o 2 godziny u potomstwa heterozygotycznego i o 4 godziny u homozygot. Rytmy dobowe u mutantów *tau*, szczególnie homozygotycznych, wykazywały również inną niż u osobników dzikich wrażliwość na światło. Chociaż istniało duże prawdopodobieństwo, że opisana mutacja dotyczy białka będącego integralnym składnikiem oscylatora biologicznego u ssaków, odkrycie to, ze względu na słabo poznaną genetykę *M. auratus*, stanowiło ślepą uliczkę. Dopiero w kilka lat później, po udanej mutagenizie, zespół J.S. Takahashi'ego wyizolował mutanty cyklu dobowego myszy [59] – gatunku, będącego już od dawna w kręgu zainteresowań genetyków. Pozwoliło to na późniejsze sklonowanie i zsekwencjonowanie związanego z tą mutacją genu *Clock* [26]. W przeciwieństwie do chemicznych mutantów, mutanty *Clock* utrzymywane w warunkach stałej ciemności wykazywały wydłużenie cyklu dobowego: u osobników heterozygotycznych o ok. 1 godzinę, a u homozygotycznych od 2 nawet do 5 godzin. U tych ostatnich dłuższe przebywanie w takich warunkach prowadziło ostatecznie do całkowitej utraty rytmu. Gen *Clock* jest sporą jednostką transkrypcyjną przekraczającą swoją długością 100 tysięcy par zasad, wśród których 2565 przypadłoby na ramkę odczytu, to zaś odpowiadałoby białku o masie ok. 96,4 kDa. Analiza sekwencji ORF wskazuje, że białko to powinno zawierać wiele potencjalnych miejsc fosforylacji oraz dwa miejsca N-glikozylacji, co mogłoby wiązać się z funkcją czynnika transkrypcyjnego. Najistotniejszą cechą produktu ekspresji *Clock* jest obecność domen PAS oraz bHLH (ang. *basic helix-loop-helix*). Pierwsza z nich, jak już pisaliśmy, odpowiada za tworzenie kompleksów między białkami i można ją odnaleźć w produktach ekspresji innych genów uczestniczących w regulacji cyklu dobowego: *per* i *white collar*. Dodatkowa obecność sekwencji bHLH wskazuje na zdolność białka CLOCK do wiązania się z DNA. Co istotne, sekwencja E-box, która stanowi miejsce wiążące dla niektórych czynników transkrypcyjnych zawierających domenę bHLH [54], została ostatnio zidentyfikowana w obrębie promotora genu *per* muszki owocowej [16]. Istnienie białka zbliżonego do CLOCK (zawierającego domeny bHLH i PAS) postulowane było już wcześniej w modelu regulacji cyklu dobowego muszki owocowej. Wkrótce okazało się, że przewidywania te

były jak najbardziej uzasadnione. Zanim jednak do tego doszło, odkryto białka homologiczne do muszowego PER u ssaków: myszy – mPER i człowieka - hPER.

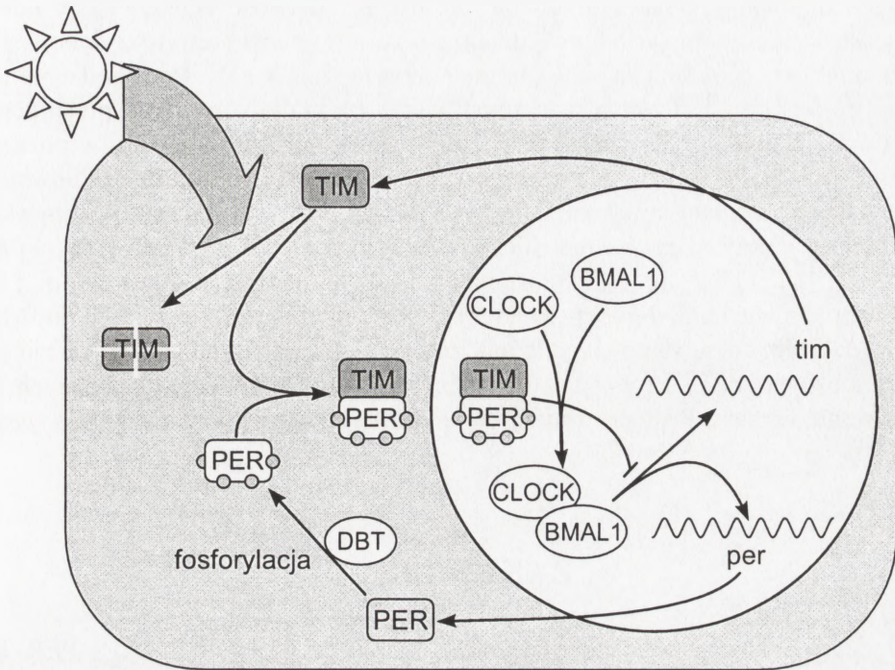
W badaniach immunohistochemicznych, prowadzonych na mózgu szczura, przy zastosowaniu przeciwciał dla białka PER *D. melanogaster*, stwierdzono obecność antygenów dla tych przeciwciał w SCN [48]. Stanowiło to zachętę do poszukiwań genów homologicznych do *per* u ssaków. Długo jednak podjęte działania nie przynosiły rezultatów i dopiero ostatnio zakończyły się sukcesem. Dwie niezależne grupy badawcze stwierdziły obecność zbliżonych sekwencji w genomie myszy i człowieka [52, 57]. Wkrótce potem okazało się, że zarówno u człowieka, jak i u myszy, genów wykazujących takie podobieństwo jest więcej [1, 56]. Zostały one opatrzone nazwami odpowiednio: *hper1* i *hper2* oraz *mper1*, *mper2* (lub też alternatywnie *h-rigui* i *m-rigui*) i *mper3*. Chociaż podobieństwo sekwencji między genem muszki owocowej a jej ssaczymi homologami nie było wysokie (geny mysie i ludzkie zawierają np. sekwencje bHLH – nieobecne w genie *per*), homologia sekwencji PAS, które zawierały się w tych genach, była najwyższa spośród wszystkich innych genów kodujących domenę PAS. Co istotniejsze, zachowanie się mysich odpowiedników *per*, które poddano bliższej analizie wskazywało, że geny te mogą uczestniczyć w regulacji cyklu okołodobowego. Ekspresja tych genów była szczególnie silna w tkankach związanych z rytmem okołodobowym, w szczególności w SCN i charakteryzowała się wyraźnymi wahaniami dobowymi. Odmiennie w stosunku do *per*, ekspresja *mper1* w SCN była maksymalna w środkowym okresie fazy jasnej. Co ciekawe, stwierdzono przesunięcie w fazie rytmu pomiędzy różnymi tkankami. I tak na przykład, pik ekspresji *mper1* w siatkówce oraz w mózdzku w komórkach Purkiniego był opóźniony w stosunku do SCN o ok. 6 godzin. Inny był też wpływ światła na ekspresję *mper1*. Podobnie jak miało to miejsce w przypadku genów *frq*, ekspozycja na światło prowadziła do gwałtownego wzrostu ekspresji *mper1* [46]. Towarzyszyło temu przesunięcie fazy cyklu. Oscylacja ekspresji genu *mper2* również podlega synchronizacji z zewnętrznym rytmem zmian dnia i nocy, jednakże gen ten nie jest indukowany sygnałem świetlnym. Przesunięcie w fazie ekspresji *mper2* jest zatem zjawiskiem wtórnym i najprawdopodobniej zależy od zmian w ekspresji *mper1*. Ponieważ ekspresja genu *mper2* jest poprzedzona ekspresją *mper1* o ok. 4 godziny, istnieje pewne prawdopodobieństwo tego, że również wahania *mper2* są jedynie pochodną rytmiki *mper1*.

## ZAMKNIĘCIE PĘTLI

Konserwatyzm, jaki obserwowano w mechanizmach regulacji cyklu okołodobowego, obecność białek PER u ssaków, jak również domniemanie istnienia białka zawierającego domeny bHLH i PAS u owadów, dały impuls do badań, które osta-

tecznie doprowadziły do sklonowania i identyfikacji genów, których produkty pozwoliły domknąć pętlę rytmu okołodobowego muszki owocowej. W wyniku prowadzonych na szeroką skalę mutagenizacji i poszukiwań nowych szczepów o zaburzonym cyklu okołodobowym uzyskano mutanta opisanego początkowo jako *Jrk* [2]. Homozygoty *Jrk/Jrk* charakteryzowały się całkowitą utratą rytmu aktywności ruchowej w warunkach stałej ciemności, jak również (z nielicznymi wyjątkami) w warunkach dzień/noc. Mutacja miała charakter semidominujący i także organizmy heterozygotyczne *Jrk/+* wykazywały zaburzenia bądź nawet całkowitą utratę rytmu. Stwierdzono również, że mutanty *Jrk* wykazują niski poziom białek PER i TIM. Sklonowanie genu *Jrk* wykazało, że koduje on homolog mysiego genu *Clock* (stąd opisano go jako *dClock* bądź *Clk*). U mutantów *Jrk* w genie tym doszło do zamiany pojedynczej zasady, w wyniku czego pojawił się przedwczesny kodon terminujący i utrata 1/4 C-końcowej części białka. W doświadczeniach z wykorzystaniem konstrukcji genu lucyferazy i promotorów *per* bądź *tim* wykazano w sposób bezpośredni, że dCLOCK może indukować ekspresję genów *per* i *tim* oraz że zgodnie z przewidywaniami indukcja ta zachodzi przy udziale sekwencji E-box w obrębie promotora tych genów [8]. Mutacje w tym rejonie znosiły zdolność dCLOCK do indukcji transkrypcji w promotorach genów *per* i *tim*. Jednocześnie stała ekspresja genów *per* i *tim* (z promotora aktywny 5C) prowadziła do 4,5-krotnego spadku poziomu zależnej od dCLOCK transkrypcji z sekwencji E-box promotorów *per* i *tim* [8]. Efekt ten nie występował w przypadku nieobecności białka dCLOCK bądź wtedy, gdy sekwencja E-box była zmutowana. Może to świadczyć o bezpośredniej inhibicji aktywności transkrypcyjnej dCLOCK przez białka PER i TIM. Jeśli się uwzględni obecność sekwencji PAS w białku PER, inhibicja ta mogłaby zachodzić przez związanie się kompleksu PER-TIM lub samego PER (rola TIM ograniczałaby się w takim przypadku jedynie do umożliwienia przejścia PER z cytoplazmy do jądra) z białkiem dCLOCK. Bezpośrednia inhibicja aktywności transkrypcyjnej białka dCLOCK przez dimer PER-TIM oznaczałaby ostateczne zamknięcie pętli sprzężenia zwrotnego odpowiedzialnego za generowanie rytmu okołodobowego muszki owocowej.

Istotnym uzupełnieniem wyłaniającego się modelu było odkrycie udziału genu *dbm11* w omawianych procesach. Ssaczy homolog tego genu został odkryty uprzednio jako sierocy czynnik transkrypcyjny (MOP3) [19]. U muszki owocowej mutacja w obrębie tego genu była przyczyną zaburzeń rytmu okołodobowego u mutantów *cycle* (*cyc*) [40]. Mutacja *cyc* prowadziła do zaburzeń, których charakter był zbliżony do zmian obserwowanych u mutantów *Jrk* (*dClock*). To, jak również zdolność mysiego BMAL1 do wiązania się z CLOCK [20] pozwala przypuszczać, że białko dBMAL1 tworząc dimery z dCLOCK uczestniczy w indukcji transkrypcji genów *per* i *tim* (rys. 3). Dane płynące z prac nad myszami pozwalają sądzić, że ssaczy mechanizm kontroli rytmu dobowego doskonale pasuje do modelu opisanego powyżej. Region promotorowy *mper1* zawiera trzy sekwencje E-box identyczne z



RYSUNEK 3. Proponowany mechanizm generowania rytmu dobowego w komórkach owadów i ssaków (opis w tekście)

obserwowanymi u muszki owocowej, wszystkie z nich stanowią potencjalne miejsca regulacji ekspresji *mper1* przez heterodimer CLOCK-BMAL1. Co więcej, obecność przynajmniej jednego z nich jest warunkiem koniecznym aktywacji transkrypcji *mper1* przez CLOCK-BMAL1 [15].

Opisany model TIM-PER-CLOCK-BMAL1 regulacji cyklu okołodobowego wykazuje wyraźne analogie z wcześniej przedstawionym modelem oscylatora u *N. crassa*. Stanowi tym samym dodatkowy argument przemawiający za uniwersalnością mechanizmów leżących u podstawy działania oscylatora rytmów okołodobowych. Próby odnalezienia białka PER u innych organizmów przyczyniły się jednakże do podważenia postulowanej uniwersalności. Jednym z pierwszych organizmów, u których udało się zidentyfikować gen i białko homologiczne do PER, był jedwabnik dębowy (*Antheraea pernyi*) [39]. Podobnie jak u muszki owocowej, funkcje tego genu związane są z utrzymaniem rytmu okołodobowego. Zarówno ekspresja tego genu, jak i akumulacja produktów tej ekspresji zachodzi w sposób rytmiczny. Przy istniejących różnicach w sekwencji, ekspresja pochodzącego od tej śmy analogu genu *per* u mutantów muszki owocowej *per<sup>0</sup>* prowadzi do odbudowania rytmu okołodobowego u tych mutantów [30]. Pomimo tego mechanizm funkcjonowania oscylatora biologicznego u *A. pernyi* zdaje się odbiegać od poznanych wcześniej.

Prace I. Saumana i S.M. Repperta wykazały, że obecność białka PER i TIM w komórkach neuronalnych odpowiedzialnych za utrzymywanie rytmu dobowego u *Antheraea pernyi* ogranicza się wyłącznie do cytoplazmy [41]. Przechodzenie tych białek do jądra nie jest zatem warunkiem koniecznym dla kontroli ekspresji genów *per* i *tim*. Ci sami badacze stwierdzili jednocześnie istnienie oscylacji w poziomie antysensownego RNA i zgodnie z ich przypuszczeniami, właśnie one odpowiadają za powstanie rytmu dobowego u *A. pernyi*. Chociaż ekspresja genu *per* w komórkach neuronalnych ćmy *A. pernyi* nie zależy od wahań poziomu produktów swojej ekspresji, oscylacja PER nie jest zapewne jedynie zbędną pozostałością wcześniej funkcjonujących mechanizmów i produktem ubocznym cyklicznej ekspresji *per*. Mogą one w dalszym ciągu stanowić składnik zegara biologicznego, chociaż już nie jako element oscylatora, lecz raczej jako element mechanizmów wyprowadzających. Zahamowanie syntezy PER prowadziło bowiem do zmian behawioralnych *A. pernyi* [42].

## ZAKOŃCZENIE

Opisany powyżej model oscylatora biologicznego CLOCK-BMAL1-PER-TIM nie jest jedynym mechanizmem kontrolującym rytmikę okołodobową. Obok niego, do najlepiej poznanych należy mechanizm okołodobowej regulacji aktywności NAT. Przełomowe znaczenie w zrozumieniu mechanizmów kontroli aktywności tego enzymu miały prace J. Stehlego i P. Sassone-Corsi, którzy jako pierwsi zaproponowali model oparty o czynniki transkrypcyjne należące do rodziny CREB/ATF [50]. Decydującą rolę w tym modelu mają dwa białka. Pierwszym z nich jest CREB (ang. *cAMP response element binding protein*), którego forma ufosforylowana tworzy dimery spełniające funkcję aktywatorów transkrypcji genu kodującego NAT. Drugim białkiem rodziny CREB/ATF o podstawowym znaczeniu w kontroli transkrypcji NAT jest ICER (ang. *inducible cAMP early repressor*). Właśnie to białko, będące produktem alternatywnej ekspresji genu CREM (*cAMP – response element modulator*), jest odpowiedzialne za funkcjonowanie pętli ujemnego sprzężenia zwrotnego, której oscylacja w sposób ujemny reguluje zdolność do aktywacji transkrypcji NAT przez CREB. W kontroli poziomu melatoniny uczestniczą jeszcze inne mechanizmy. Prace prowadzone przez grupę D.C. Kleina wskazują na możliwość udziału procesów proteolitycznych w degradacji cząsteczek NAT pod wpływem światła [14]. Nie bez znaczenia zdają się być również procesy na poziomie ponadkomórkowym. Stwierdzono bowiem, że chociaż pojedyncze neurony SCN hodowane *in vitro* są zdolne do generowania rytmu okołodobowego swojej aktywności elektrofizjologicznej, to ich fazy wykazują z czasem wyraźne zróżnicowanie [61]. Istnieje zatem konieczność zewnętrznej synchronizacji. W procesie tym może ucze-

stniczyć między innymi melatonina. Hormon ten ma liczne receptory w obrębie SCN [58]. Podana w odpowiednim momencie cyklu, melatonina może wpływać na aktywność elektryczną neuronów SCN [45], jak również w sposób trwały przesuwać fazę tej aktywności [49]. Wiadomo również, że melatonina wpływa na wykazującą rytmikę okołodobową ekspresję *c-fos* w SCN [25] oraz na procesy fosforylacji CREB [31]. Ta kolejna, utworzona częściowo przez melatoninę, pętla sprzężenia zwrotnego nie jest zapewne ostatnią, z jaką mamy do czynienia w procesach generowania rytmów okołodobowych. W przyszłości czeka nas być może odkrycie kolejnych oscylatorów biologicznych. Obok mechanizmów, które leżą u podstaw ich działania, kwestią szczególnie ciekawą jest charakter wzajemnych oddziaływań między oscylatorami. Obserwując gwałtowny postęp w dziedzinie, jaką jest chronobiologia, można się spodziewać, że niektóre z tych problemów znajdą rozwiązanie już wkrótce.

## LITERATURA

- [1] ALBRECHT U, SUN ZS, EICHELE G, LEE CC. A differential response of two putative mammalian circadian regulators, *mper1* and *mper2*, to light. *Cell* 1997; **91**: 1055–1064.
- [2] ALLADA R, WHITE NE, SO WV, HALL JC, ROSBASH M. A mutant *Drosophila* homolog of mammalian Clock disrupt circadian rhythms and transcription of period and timeless. *Cell* 1998; **93**: 791–804.
- [3] ARONSON BD, JOHNSON KA, LOROS JJ, DUNLAP JC. Negative feedback defining a circadian clock: autoregulation of the clock gene *frequency*. *Science* 1994; **263**: 1578–1584.
- [4] BARGIELLO TA, YOUNG MW. Molecular genetics of a biological clock in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 2142–2146.
- [5] CITRI Y, COLOT HV, JACQUIER AC, YU Q, HALL JC, BALTIMORE D, ROSBASH M. A family of unusually spliced biologically active transcripts encoded by a *Drosophila* clock gene. *Nature* 1987; **326**: 42–47.
- [6] CROSTHWAITE SK, DUNLAP JC, LOROS JJ. *Neurospora wc-1* and *wc-2*: transcription, photoresponses, and the origins of circadian rhythmicity. *Science* 1997; **276**: 763–769.
- [7] CROSTHWAITE SK, LOROS JJ, DUNLAP JC. Light-induced resetting of a circadian clock is mediated by a rapid increase in *frequency* transcript. *Cell* 1995; **81**: 1003–1012.
- [8] DARLINGTON TK, WAGNER-SMITH K, CERIANI M.F, STAKINS D, GEKAKIS N, STEEVES TDL, WEITZ CJ, TAKAHASHI JS, KAY SA. Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. *Science* 1998; **280**: 1599–1603.
- [9] EDERY I, RUTILA JE, ROSBASH M. Phase shifting of the circadian clock by induction of the *Drosophila* period protein. *Science* 1994; **263**: 237–240.
- [10] EDERY I, ZWIEBEL LJ, DEMBINSKA ME, ROSBASH M. Temporal phosphorylation of the *Drosophila* period protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 2260–2264.
- [11] FELDMAN J. Lengthening the period of a biological clock in *Euglena* by cycloheximide, an inhibitor of protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1967; **57**: 1080–1087.
- [12] FELDMAN JF, HOYLE MN. Isolation of circadian clock mutants of *Neurospora crassa*. *Genetics* 1973; **75**: 605–613.

- [13] GARCEAU NY, LIU Y, LOROS JJ, DUNLAP JC. Alternative initiation of translation and time-specific phosphorylation yield multiple forms of the essential clock protein FRAQUEN-CY. *Cell* 1997; **89**: 469–476.
- [14] GASTEL JA, ROSEBOOM PH, RINALDI PA, WELLER JL, KLEIN DC. Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. *Science* 1998; **279**: 1358–1360.
- [15] GEKAKIS N, STAKNIS D, NGUYEN HB, DAVIS FC, WILSBACHER LD, KING DP, TAKAHASHI JS, WEITZ CJ. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 1998; **280**: 1564–1569.
- [16] HAO H, ALLEN DL, HARDIN PE. A circadian enhancer mediates PER-dependent mRNA cycling in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 1997; **17**: 3687–3693.
- [17] HARDIN PE, HALL JC, ROSBASH M. Circadian oscillations in period gene mRNA levels are transcriptionally regulated. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 11711–11715.
- [18] HARDIN PE, HALL JC, ROSBASH M. Feedback of the *Drosophila period* gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature* 1990; **343**: 536–540.
- [19] HOGENESH JB, CHAN WK, JACKIW VH, BROWN BC, GU Y-Z, PRAY-GRANT M, PERDEW GH, BRADFIELD CA. Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interact with the components of the dioxin signaling pathway. *J Biol Chem* 1997; **272**: 8581–8593.
- [20] HOGENESH JB, GU Y-Z, JAIN S, BRADFIELD CA. The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 5474–5479.
- [21] HUNTER-ENSOR M, OUSLEY A, SEHGALN A. Regulation of the *Drosophila* protein Timeless suggests a mechanism for resetting the circadian clock by light. *Cell* 1996; **84**: 677–685.
- [22] INOUE SIT, TAKAHASHI JS, WOLLNIK F, TUREK FW. Inhibitor of protein synthesis phase shifts a circadian pacemaker in mammalian SCN. *Am J Physiol* 1988; **255**: R1055–R1058.
- [23] JACKLET JW. Neuronal circadian rhythm: phase shifting by a protein synthesis inhibitor. *Science* 1977; **198**: 69–71.
- [24] KARAKASHIAN M, SCHWEIGER H. Evidence for a cycloheximide-sensitive component in the biological clock of *Acetabularia*. *Exp Cell Res* 1976; **98**: 303–312.
- [25] KILDUFF TS, LANDEL H.B, NAGY GS, SUTIN EL, DEMENT WC, HELLER HC. Melatonin influence Fos expression in the rat suprachiasmatic nucleus. *Mol Brain Res* 1992; **16**: 47–56.
- [26] KING DP, ZHAO Y, SANGORAM AM, WILSBACHER LD, TANAKA M, ANTOCH MP, STEEVES TDL, VITATERNA MH, KORNHAUSER JM, LOWREY PL, TUREK FW, TAKAHASHI JS. Positional cloning of the mouse circadian *Clock* gene. *Cell* 1997; **89**: 641–653.
- [27] KLOSS B, PRICE JL, SAEZ L, BLAU J, ROTHENFLUH A, WESLEY CS, YOUNG MW. The *Drosophila* clock gene *double-time* encodes a protein closely related to human casein kinase II. *Cell* 1998; **94**: 97–107.
- [28] KONOPKA RJ, BENZER S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; **68**: 2112–2116.
- [29] LEE C, PARIKH V, ITSUKAICHI T, BAE K, EDERY I. Resetting the *Drosophila* clock by photic regulation of PER and a PER-TIM complex. *Science* 1996; **271**: 1740–1744.
- [30] LEVINE JD, SAUMAN I, IMBALZANO M, REPPERT SM, JACKSON FR. Period protein from the giant silkworm *Antheraea pernyi* functions as a circadian clock element in *Drosophila melanogaster*. *Neuron* 1995; **15**: 147–157.
- [31] MCNULTY S, ROSS AW, BARRETT P, HASTINGS MH, MORGAN PJ. Melatonin regulates the phosphorylation of CREB in ovine pars tuberalis. *J Neuroendocrinol* 1994; **6**: 523–532.



- [32] MYERS MP, WAGER-SMITH K, ROTHENFLUH-HILFIKER A, YOUNG MW. Light-induced degradation of TIMELESS and entrainment of the *Drosophila* circadian clock. *Science* 1996; **271**: 1736–1740.
- [33] MYERS MP, WAGNER-SMITH K, WESLEY CS, YOUNG MW, SEGHAL A. Positional cloning and sequence analysis of the *Drosophila* gene, *timeless*. *Science* 1995; **270**: 805–808.
- [34] NAKASHIMA H, PERLMAN J, FELDMAN JF. Cycloheximide-induced phase shifting of circadian clock of *Neurospora*. *Am J Physiol* 1981; **241**: R31–R35.
- [35] PITTENDRIGH CS, BRUCE VG, ROSENZWEIG NS, RUBIN ML. A biological clock in *Neurospora*. *Nature* 1959; **184**: 169–170.
- [36] PRICE JL, BLAU J, ROTHENFLUH A, ABODEELY M, KLOSS B, YOUNG MW. *double-time* is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell* 1998; **94**: 83–95.
- [37] RALPH MR, FOSTER RG, DAVIS FC, MENAKER M. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 1990; **247**: 975–978.
- [38] RALPH MR, MENAKER M. A mutation of the circadian system in golden hamster. *Science* 1988; **241**: 1225–1227.
- [39] REPPERT SM, TSAI T, ROCA AL, SAUMAN I. Cloning of a structural and functional homolog of the circadian clock gene *period* from the giant silkworm *Antheraea pernyi*. *Neuron* 1994; **13**: 1167–1176.
- [40] RUTILA JE, SURI V, LE M, SO WV, ROSBASH M, HALL JC. CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila period* and *timeless*. *Cell* 1998; **93**: 805–814.
- [41] SAUMAN I, REPPERT SM. Circadian clock neurons in the silkworm *Antheraea pernyi*: novel mechanisms of Period protein regulation. *Neuron* 1996; **17**: 889–900.
- [42] SAUMAN I, TSAI T, ROCA AL, REPPERT SM. Period protein is necessary for circadian control of egg hatching behavior in the silkworm *Antheraea pernyi*. *Neuron* 1996; **17**: 901–909.
- [43] SEHGAL A, PRICE JL, MAN B, YOUNG MW. Loss of circadian behavioral rhythms and per RNA oscillations in the *Drosophila* mutant *timeless*. *Science* 1994; **263**: 1603–1606.
- [44] SEHGAL A, ROTHENFLUH-HILFIKER A, HUNTER-ENSOR M, CHEN Y, MYERS MP, YOUNG MW. Rhythmic expression of *timeless*: a basic for promoting circadian cycles in *period* gene regulation. *Science* 1995; **270**: 808–810.
- [45] SHIBATA S, CASSONE VM, MOORE RY. Effects of melatonin on neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus *in vitro*. *Neurosci Lett* 1989; **97**: 140–144.
- [46] SHIGEYOSHI Y, TAGUCHI K, YAMAMOTO S, TAKEKIDA S, YAN L, TEI H, MORIYA T, SHIBATA S, LOROS JJ, DUNLAP JC, OKAMURA H. Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the *mPer1* transcript. *Cell* 1997; **91**: 1043–1053.
- [47] SIWICKI KK, EASTMAN C, PETERSEN G, ROSBASH M, HALL JC. Antibodies to the *period* gene product of *Drosophila* reveal diverse tissue distribution and rhythmic changes in the visual system. *Neuron* 1988; **1**: 141–150.
- [48] SIWICKI KK, SCHWARTZ WJ, HALL JC. An antibody to *Drosophila period* protein labels antigens in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *J Neurogenetics* 1992; **8**: 33–42.
- [49] STARKEY SJ, WALKER MP, BERESFORD IJ, HAGAN RM. Modulation of the rat suprachiasmatic circadian clock by melatonin *in vitro*. *Neuroreport* 1995; **6**: 1947–1951.
- [50] STEHLE JH, FOULKES NS, MOLINA CA, SIMONNEAUX V, PÉVET P, SASSONE-CORSI P. Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. *Nature* 1993; **365**: 314–320.
- [51] STEPHAN FK, ZUCKER I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972; **69**: 1583–1586.
- [52] SUN ZS, ALBRECHT U, ZHUCHENKO O, BAILEY J, EICHELE G, LEE CC, RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila period* gene. *Cell* 1997; **90**: 1003–1011.

- [53] SURI V, QIAN Z, HALL JC, ROSBASH M. Evidence that the TIM light response is relevant to light-induced phase shifts in *Drosophila melanogaster*. *Neuron* 1998; **21**: 225–234.
- [54] SWANSON HI, CHAN WK, BRADFIELD CA. DNA binding specificities and pairing rules of the Ah receptor, ARNT, and SIM proteins. *J Biol Sci* 1995; **270**: 26292–26302.
- [55] TAKAHASHI JS, TUREK FW. Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, perturbs the phase of a mammalian circadian pacemaker. *Brain Res* 1987; **405**: 199–203.
- [56] TAKUMI T, TAGUCHI K, MIYAKE S, SAKAKIDA Y, TAKASHIMA N, MATSUBARA C, MAEBAYASHI Y, OKUMURA K, TAKEKIDA S, YAMAMOTO S, YAGITA K, YAN L, YOUNG MW, OKAMURA H. A light-independent oscillatory gene *mPer3* in mouse SCN and OVL. *EMBO J* 1998; **17**: 4753–4759.
- [57] TEIH, OKAMURA H, SHIGEYOSHI Y, FUKUHARA C, OZAWA R, HIROSEM, SAKAKI Y. Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila period* gene. *Nature* 1997; **389**: 512–516.
- [58] VANECEK J. Cellular mechanism of melatonin action. *Physiol Rev* 1998; **78**: 687–721.
- [59] VITATERNA MH, KING DP, CHANG A-M, KORNHAUSER JM, LOWREY PL, MCDONALD JD, DOVE WF, PINTO LH, TUREK FW, TAKAHASHI JS. Mutagenesis and mapping of a mouse gene *Clock*, essential for circadian behavior. *Science* 1994; **264**: 719–725.
- [60] VOSSHALL LB, PRICE JL, SEHGAL A, SAEZ L, YOUNG MW. Block in nuclear localization of *period* protein by a second clock mutation, timeless. *Science* 1994; **263**: 1606–1609.
- [61] WELSH DK, LOGOTHETIS DE, MEISTER M, REPPERT SM. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 1995; **14**: 697–706.
- [62] ZENG H, QIAN Z, MYERS MP, ROSBASH M. A light-entrainment mechanism for the *Drosophila* circadian clock. *Nature* 1996; **380**: 129–135.
- [63] ZWIEBEL LJ, HARDIN PE, LIU X, HALL JC, ROSBASH M. A post-transcriptional mechanism contributes to circadian cycling of a per- $\beta$ -galactosidase fusion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 3882–3886.

Redaktor prowadzący – S. Biliński

Otrzymano: 12.02. 1999 r.

Przyjęto: 01.05 1999 r.

Adres autorów: ul. Tylna 3, 90-950 Łódź-1

## MOLEKULARNE MECHANIZMY AKTYWACJI LIMFOCYTÓW T – PRZENOSZENIE SYGNAŁU DO JĄDRA KOMÓRKOWEGO\*

### MOLECULAR EVENTS DURING T CELL ACTIVATION – SIGNAL TRANSDUCTION INTO THE NUCLEUS

Agata KOSMACZEWSKA\*, Lidia CISZAK\*, Irena FRYDECKA\*\*\*

\*Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu; \*\*Katedra i  
Klinika Hematologii i Chorób Rozrostowych AM we Wrocławiu

*Streszczenie:* Limfocyty T są wyspecjalizowane w swoistym rozpoznawaniu obcych antygenów, prezentowanych przez cząsteczki MHC na komórkach prezentujących antygen (APC). Dzięki strukturalnemu i funkcjonalnemu współdziałaniu receptora limfocyta T (TCR) i kompleksu CD3 sygnał aktywacji zostaje przekazany przez błonę do wnętrza komórki. Aktywacja spoczynkowych limfocytów T za pośrednictwem TCR/CD3 jest indukowana przez zasadnicze w tym procesie reakcje fosforylacji i defosforylacji regulujące funkcje i interakcje wielu molekuł sygnałowych. Kluczową rolę w kaskadzie sygnałowej pełni reszta fosfotyrozyny sekwencji ITAM łańcucha CD3- $\zeta$ . Stymulacja antygenowa limfocytów T prowadzi w komórce do kaskady reakcji biochemicznych, powstania wielu przekaźników sygnału i inicjacji wtórnych szlaków sygnałowych wpływających na ekspresję czynników transkrypcyjnych genów cytokin (IFN- $\gamma$ , IL-2). Warunkiem ich aktywacji jest integracja sygnałów płynących z TCR/CD3 i CD28. Aktywacja komórki T jest funkcjonalną konsekwencją stymulacji antygenowej, wiodącą do proliferacji komórek, produkcji cytokin oraz indukcji funkcji efektorowych.  
(*Postępy Biologii Komórki* 1999; 26: 629–650)

*Słowa kluczowe:* limfocyt T, TCR/CD3, stymulacja antygenowa, transdukcja sygnału.

*Summary:* T cells are specialized to recognition of antigens presented by MHC molecules on APC (antigen presenting cells). Due to structural and functional cooperation of T cell antigen receptor (TCR) with CD3 complex, the activation signal is transmitted through the plasma membrane. Activation of rested T cells occurs upon antigen or monoclonal antibody stimulation. This process is induced by the events of phosphorylation or dephosphorylation which regulates the interactions between signaling molecules. The pivotal role in signaling cascade plays phosphotyrosine residue in ITAM motifs of CD3- $\zeta$

\*Praca sponsorowana przez grant KBN nr 4 P05B 008 12.

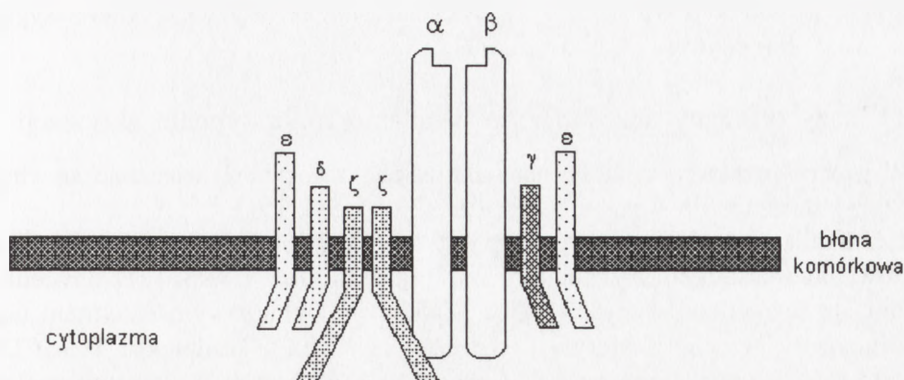
chain. Antigen stimulation of T cells leads to cascade of biochemical events and creates many signaling messengers. Second signaling pathway up-regulates the transcriptional factors expression of cytokine genes (IFN- $\gamma$ , IL-2). The most important event is integration of signaling cascades from TCR/CD3 and CD28. The activation of T cells is a functional consequence of antigen stimulation leading to proliferation, cytokine production and induction of effector functions.

(*Advances in Cell Biology* 1999; 26: 629–650)

*Key words:* T cell, TCR/CD3, antigen stimulation, signal transduction.

## WPROWADZENIE

Do zapoczątkowania odpowiedzi odpornościowej, zarówno humoralnej jak i komórkowej, wymagana jest prezentacja antygeny pomocniczym limfocytom T przez komórki prezentujące antygen (APC – ang. *antigen presenting cells*). Funkcję komórek APC spełniają makrofagi, komórki dendrytyczne i limfocyty B, mające na swojej powierzchni antygeny zgodności tkankowej klasy II (MHC – ang. *major histocompatibility complex*). Antygeny ulegają degradacji pod wpływem enzymów lizosomalnych w komórkach fagocytujących APC. Polega ona w swej istocie na rozwinięciu struktury globularnej białek antygenowych do struktury szkieletowej. Niefagocytujące komórki APC degradują antygen prawdopodobnie przy pomocy proteinaz błonowych. Produkty trawienia antygeny wiążą się z antygenami MHC klasy II w retikulum endoplazmatycznym, skąd są przenoszone w postaci kompleksu na powierzchnię komórek APC. Związanie peptydu antygenowego przez swoiste ugrupowanie aminokwasowe z antygenem zgodności tkankowej zapewnia mu odpowiednią orientację przestrzenną sprzyjającą ekspozycji epitopów, wiążących się z receptorem limfocytów T – TCR (ang. *T-cell receptor*). Częsteczka MHC spełnia podwójną rolę w prezentacji antygeny: uczestniczy w ułożeniu przestrzennym epitopów oraz pośrednio wpływa na odpowiednie usieciowanie receptorów TCR na limfocytach T. Pierwszym sygnałem aktywującym limfocyt T jest związanie struktury TCR/CD3 z kompleksem obcy antygen – własny antygen zgodności tkankowej klasy II. Drugim niezbędnym sygnałem jest kostymulacja dodatkowych cząsteczek obecnych na powierzchni komórek T, wśród których najistotniejszą rolę przypisuje się antygenowi CD28 otrzymującemu drugi sygnał od cząsteczek rodziny B.7 (CD80, CD86) obecnych na powierzchni komórek prezentujących antygen (APC). Jedną z funkcjonalnych konsekwencji stymulacji antygenowej powierzchniowego kompleksu TCR/CD3 jest aktywacja limfocyta T. Aktywowane limfocyty T proliferują dając początek klonom komórek potomnych, które za pomocą wydzielanych limfokin (m.in. IL-2) angażują inne komórki układu odpornościowego. Kompleks TCR/CD3 składa się z receptora limfocytów T (TCR) o strukturze polimorficznego heterodimeru  $\alpha\beta$ , który jest wyspecjalizowany w swoistym rozpoznawaniu antygenów oraz niepolimorficznego kompleksu CD3, składającego się z 6 łańcuchów polipeptydowych



RYSUNEK 1. Struktura kompleksu TCR/CD3 (na podstawie [75]):  $\alpha, \beta$  – łańcuchy receptora TCR odpowiedzialne za swoiste rozpoznanie antygeny;  $\gamma, \delta, \epsilon, \zeta$  – podjednostki kompleksu CD3 uczestniczące w przenoszeniu sygnału aktywującego

( $\gamma, \delta, \epsilon$  i  $\zeta$ ) (rys. 1). Łańcuch  $\zeta$  pełni kluczową rolę w transdukcji sygnału aktywacji ze względu na obecność w jego domenie cytoplazmatycznej 3 sekwencji ITAM (ang. *Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif*), zawierających tyrozynę stanowiącą substrat dla komórkowych kinaz tyrozynowych [26, 74].

## TRANSDUKCJA SYGNAŁU PRZEZ KINAZY TYROZYNOWE

Aktywacja spoczynkowych limfocytów T za pośrednictwem kompleksu TCR/CD3 jest indukowana przez zasadnicze w tym procesie reakcje fosforylacji i defosforylacji, regulujące funkcje i interakcje wielu molekuł sygnałowych [77]. Jedną z najwcześniejszych zmian biochemicznych o kluczowym znaczeniu, obserwowaną w następstwie aktywacji limfocyta T, jest wydatne zwiększenie aktywności kinaz tyrozynowych z rodziny Src, Syk, Csk, Tec [55] oraz swoistej dla limfocytów T fosfatazy CD45 [45], która reguluje ich wzajemne oddziaływanie. Istnieje wiele eksperymentalnych dowodów zasadniczego znaczenia fosfotyrozyny w reakcjach kaskady sygnałowej [58]. Enzymy biorące aktywny udział w procesie przekazywania sygnału we wnętrzu komórki wiążą się za pomocą domen SH2 z resztami fosfotyrozyny odpowiednich białek. Postuluje się również duże znaczenie białek adaptorowych (SHC, p36, Grb2 i in.), których zasadniczą funkcją jest „sprzęganie” ze sobą innych białek za pośrednictwem domen SH2 i SH3 [26, 56]. Polipeptydy tworzące kompleks TCR/CD3 nie mają aktywności enzymatycznej, natomiast poprzez ścisły związek z kinazami tyrozyny  $p56^{lck}$  i  $p59^{lyn}$  (należącymi do rodziny

Src) oraz kinazą ZAP-70 (z rodziny Syk) uczestniczą w przekazywaniu sygnału i aktywacji limfocytów T [2, 5, 28, 77].

### Kinazy tyrozyny uczestniczące w przenoszeniu sygnału aktywacji

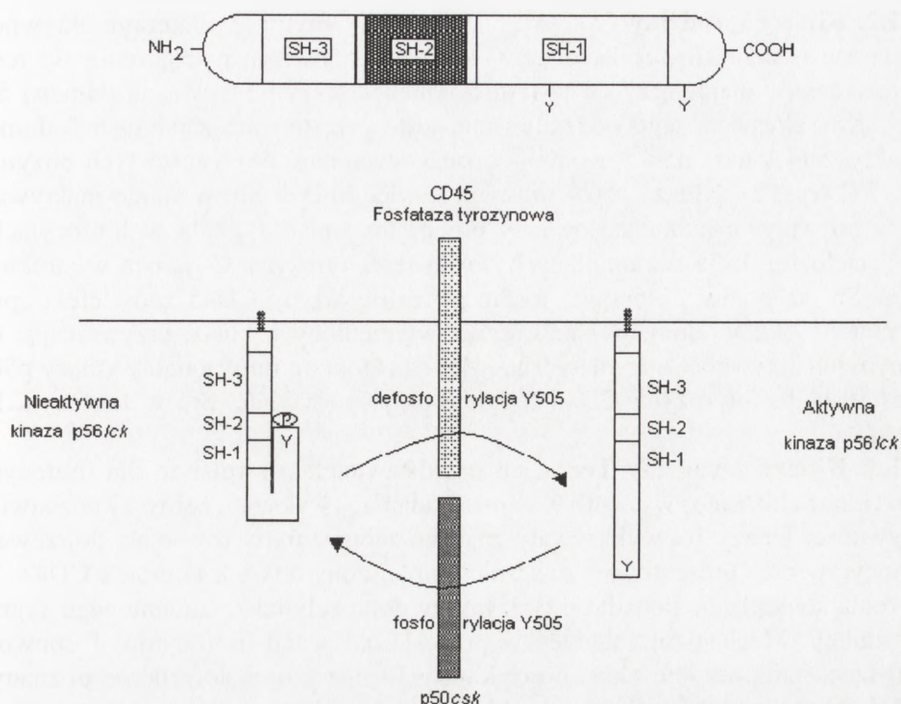
W proces przekazywania sygnału aktywacji limfocyta T włączone są kinazy tyrozyny, należące do 4 rodzin: Src, Csk, Tec i Syk [51].

**1.1. Kinazy z rodziny Src**, czyli p56<sup>lck</sup> i p59<sup>fyn</sup>, pełnią zasadniczą rolę w zainicjowaniu transdukcji sygnału [25, 28, 74]. Van Oers i wsp. [71] dowiedli w badaniach na modelu mysim, że kinaza p56<sup>lck</sup> jest kluczowym enzymem uczestniczącym w procesie fosforylacji tyrozyny łańcucha  $\zeta$  kompleksu TCR/CD3 i kinazy Zap-70 (ang. *zeta-associated protein*). W reakcjach fosforylacji molekuł sygnałowych w limfocycie T uczestniczy także kinaza p59<sup>fyn</sup> [12], jednakże obie kinazy Src nie mają zdolności całkowitego wzajemnego zastępowania się w reakcjach fosforylacji. Bu i wsp. [7] wykazali, że zmniejszenie aktywności kinazy p59<sup>fyn</sup> może być tylko częściowo kompensowane przez kinazę p56<sup>lck</sup>. Do prawidłowego przebiegu procesu pobudzenia limfocytów T konieczna jest więc optymalna aktywność obu kinaz Src.

Kinazy p56<sup>lck</sup> i p59<sup>fyn</sup> zbudowane są z kilku charakterystycznych domen (rys. 2), które odpowiadają za aktywację i komórkową lokalizację tych enzymów [56, 64]:

- **część N-końcowa** – określa swoistość kinazy, kinaza p56<sup>lck</sup> może wiązać się z cząsteczką CD4 lub CD8, zaś kinaza p59<sup>fyn</sup> łączy się zwykle z łańcuchem  $\zeta$  kompleksu TCR/CD3 oraz podjednostkami CD3 $\gamma$  i CD3 $\epsilon$  [65, 72];
- **domeny: SH2 i SH3** (ang. *Src-homology regions 2 and 3*) – domena SH2 odgrywa istotną rolę w wiązaniu białek, które w swoich sekwencjach mają ufosforylowaną tyrozynę, swoiście rozpoznawaną przez SH2 [61]; natomiast domena SH3 rozpoznaje regiony bogate w prolinę, np. w strukturze PI3-kinazy;
- **domena katalityczna SH1** – w obrębie domeny katalitycznej SH1 znajduje się miejsce wiążące ATP, dzięki czemu jest ona bezpośrednio zaangażowana w fosforylację reszt tyrozynowych sekwencji ITAM oraz autofosforylację; autofosforylacja reszt: Tyr 394 w kinazie p56<sup>lck</sup> i Tyr 420 w p59<sup>fyn</sup> powoduje wzrost aktywności tych enzymów [56, 72];
- **część C-końcowa** – stanowi domenę regulatorową enzymu; obecne w jej obrębie reszty tyrozyny (Tyr 505 w kinazie p56<sup>lck</sup> i Tyr 531 w kinazie p59<sup>fyn</sup>) ulegają fosforylacji za pomocą kinazy p50<sup>csk</sup>, co umożliwia ich oddziaływanie z własną domeną SH2 [52].

Ponieważ kinazy Src nie mają w swojej strukturze regionów zewnątrzkomórkowych i błonowych, ich kontakt z wewnętrzną stroną błony komórkowej jest możliwy dzięki współdziałaniu tych enzymów z ko-receptorami błonowymi (CD4 i CD8) oraz w wyniku przyłączenia kwasu myrystylowego do N-końca enzymu.



RYSUNEK 2. Budowa kinaz z rodziny Src (za [64]): SH1 – domena katalityczna enzymu; SH2 i SH3 – domeny uczestniczące w wiązaniu białek szlaku sygnałowego; COOH – domena C-końcowa; NH<sub>2</sub> – region N-końcowy; Y – miejsca fosforylacji; poniżej – postać nieaktywna kinazy Srcx z ufosforylowanym regionem C-końcowym przyłączonym do własnej domeny SH2; postać aktywna Src powstaje wskutek defosforylacji domeny C-końcowej i przestrzennego odblokowania domeny katalitycznej SH1

Związanie kwasu myrystylowego umożliwia oddziaływanie kinazy z lipidami błony komórkowej [56].

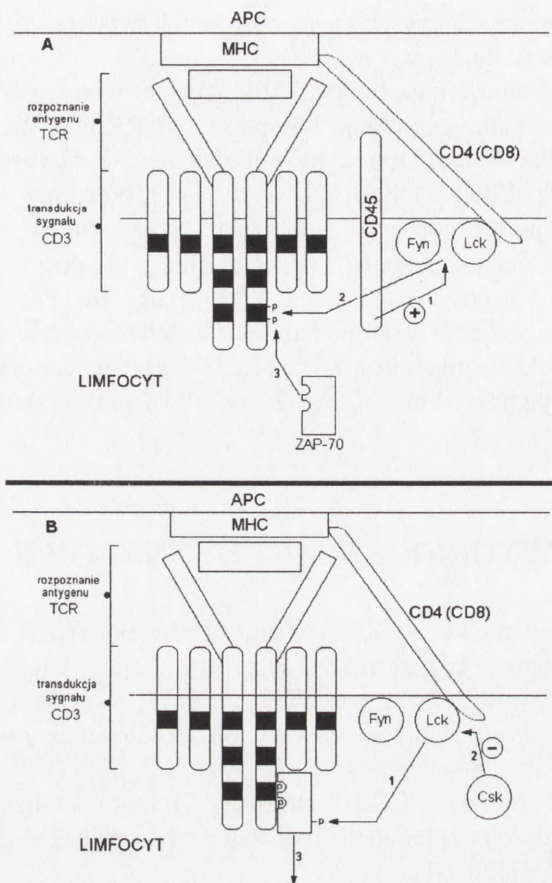
Dowodzono, że proces fosforylacji tyrozyny sekwencji ITAM zachodzi dopiero po wyeksponowaniu reszt tyrozynowych kinazie p59<sup>lyn</sup> dzięki reorientacji przestrzennej całego kompleksu TCR/CD3. Zmiany konformacyjne tej struktury możliwe są dzięki współdziałaniu z ko-receptorem błonowym CD4 lub CD8 [65]. Warunkiem niezbędnym do funkcjonalnego połączenia cząsteczki CD4 z kompleksem TCR/CD3 jest wcześniejsza interakcja CD4 z kinazą p56<sup>lck</sup> za pośrednictwem jej domeny N-końcowej. Ten fragment kinazy jest bogaty w cysteinę, przy pomocy której wiąże się z resztą cysteinową łańcucha cytoplazmatycznego ko-receptora powierzchniowego CD4 lub CD8 [25, 75]. Fosforylacja CD3- $\zeta$  jest więc konsekwencją interakcji kinazy p56<sup>lck</sup> z cząsteczką CD4 z następowym połączeniem kinazy p59<sup>lyn</sup> z łańcuchem  $\zeta$  kompleksu TCR/CD3.

**1.2. Kinazy z rodziny Csk** ( $p50^{csk}$ ) są negatywnymi regulatorami aktywności kinaz Src poprzez fosforylację ich C-końca umożliwiającą połączenie się reszty fosfotyrozyny znajdującej się w tym fragmencie enzymu z własną domeną SH2 [56]. Konsekwencją tego oddziaływania jest „przestrzenne zamknięcie” domeny katalitycznej kinaz:  $p56^{lck}$  i  $p59^{lyn}$  z zahamowaniem aktywności tych enzymów [41, 77] (rys. 2). Kinaza  $p50^{csk}$  utrzymuje więc kinazy Src w stanie inaktywacji, przez co wpływa hamująco na cały proces transmisji sygnału w limfocytach T [74]. Defosforylacja wspomnianych wyżej reszt tyrozyny C-końca w strukturze kinaz Src za pomocą błonowej fosfatazy fosfotyrozyny CD45 znosi efekt „przestrzennej blokady” domeny katalitycznej wymienionych kinaz, przywracając tym samym ich aktywność enzymatyczną [41]. Antagonizm funkcjonalny kinazy  $p50^{csk}$  i fosfatazy fosfotyrozyny CD45 reguluje aktywność kinaz Src w limfocytach T (rys. 3).

**1.3. Kinazy z rodziny Tec** – ich przedstawicielem swoistym dla limfocytów T jest kinaza Itk. Liao i wsp. [40] w swoich badaniach wykazali, że myszy pozbawione aktywności kinazy Itk wykazywały znaczne zaburzenia w rozwoju i dojrzewaniu tymocytów oraz prezentowały znacznie zmniejszony odsetek komórek CD4+. Zaburzenia stwierdzone ponadto u tych myszy dotyczyły także zmienionego sygnału transdukcji. Mechanizm zaburzeń w procesie aktywacji limfocytów T spowodowanych zahamowaniem aktywności kinazy Itk nie został dotychczas poznany.

**1.4. Kinazy z rodziny Syk** – członkiem tej rodziny kinaz włączonych w transmisję sygnału w limfocycie T jest ZAP-70 [9, 10, 16, 23]. Znaczenie kinazy ZAP-70 udowodniono w badaniach na ludzkich komórkach T, pochodzących od pacjentów z zaburzeniami odporności związanymi z niedoborem ZAP-70 [2, 16]. Jak wcześniej wspomniano, w trakcie przekazywania sygnału aktywacji w limfocycie T pierwszym krokiem o zasadniczym znaczeniu jest fosforylacja tyrozyny sekwencji ITAM w łańcuchu  $\zeta$ , co odbywa się głównie przy udziale kinazy  $p59^{lyn}$  (choć w niektórych komórkach za proces ten odpowiedzialna jest kinaza  $p56^{lck}$ ) [28, 55, 58]. Do ufosforylowanych sekwencji ITAM przyłącza się następnie kinaza ZAP-70. Enzym ten jest niemembranową kinazą tyrozyny o masie ok. 70 kDa, mającą na swoim C-końcu podwójną domenę SH2 [10, 23, 27]. Po przyłączeniu kinaza ZAP-70 ulega następnej aktywacji przy udziale kinaz Src ( $p56^{lck}$  lub  $p59^{lyn}$ ) [28], co schematycznie przedstawiono na rysunku 3. Hatada i wsp. [23] jako pierwsi zbadali strukturę krystalograficzną tandemu domen SH2 kinazy ZAP-70, wykazując ich strukturalne przystosowanie do wiązania się z dwiema resztami fosfotyrozyny sekwencji ITAM. Przyłączenie tandemu domen SH2 do każdej z 3 sekwencji ITAM ma kluczowe znaczenie dla przekazywania sygnału w obrębie limfocyta T [5, 78]. Niedobór kinazy ZAP-70 wynikający z defektu genetycznego prowadzi do nieprawidłowości w różnicowaniu i proliferacji oraz uzyskiwaniu funkcji efektorowych przez komórkę T, manifestujących się selektywnym niedoborem limfocytów T oraz nawracającymi i uporczywymi zakażeniami wirusowymi, grzybiczymi i pasożyt-





RYSUNEK 3. Indukcja aktywności kinaz PTK: A – 1) defosforylacja i aktywacja kinaz Src (Lck i Fyn), 2) fosforylacja sekwencji ITAM, 3) przyłączenie kinazy ZAP-70 do ufosforylowanych sekwencji ITAM łańcucha CD3 $\zeta$ ; B – 1) fosforylacja i aktywacja kinazy ZAP-70, 2) fosforylacja C-końca kinaz Src przez p50<sup>Csk</sup> z następnym zahamowaniem ich aktywności, 3) zaangażowanie i aktywacja kolejnych molekuł szlaku sygnałowego

niczymi [2, 16, 78]. Jakkolwiek badania Isakova i wsp. [29] dowiodły, że przyłączenie kinazy ZAP-70 do ufosforylowanej sekwencji ITAM jest interakcją o wysokim powinowactwie, to poszczególne ufosforylowane motywy ITAM łańcucha  $\zeta$  mogą wykazywać różny stopień powinowactwa w stosunku do kinazy ZAP-70. Stwierdzono bowiem, że do ufosforylowanych sekwencji ITAM mogą wiązać się poza kinazą ZAP-70 inne molekuły uczestniczące w kaskadzie sygnałowej (PI-3 kinaza, dimer białek Grb/Sos) [17]. Obecność aż 3 sekwencji ITAM w łańcuchu  $\zeta$  sprawia, że odgrywa on kluczową rolę w przekazywaniu sygnału przez błonę komórki T. Pozostałe podjednostki wchodzące w skład kompleksu CD3 mają po jednej sekwencji

ITAM w swoich domenach cytoplazmatycznych, tak więc ich rola w procesie aktywacji komórki T jest mniejsza.

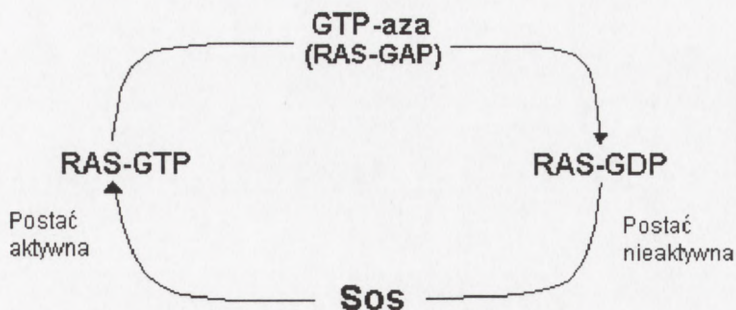
Katalityczna aktywność oraz funkcja ZAP-70 jest regulowana przez reakcje fosforylacji uwarunkowane stymulacją kompleksu TCR/CD3. W strukturze kinazy ZAP-70 znajdują się 3 reszty tyrozyny odpowiedzialne za regulację aktywności tego enzymu (Y292, Y492 i Y493). Tyrozyna Y493, położona w obrębie domeny katalitycznej enzymu, jest odpowiedzialna za aktywację kinazy ZAP-70 pod wpływem fosforylującej ją kinazy p56<sup>lck</sup> [9]. Natomiast ufosforylowanie dwóch pozostałych reszt tyrozynowych (Y292 i Y 492) doprowadza do zahamowania aktywności enzymu, zaś kinazy odpowiedzialne za ich fosforylację nie zostały dotąd określone. W świetle licznych doniesień [23, 37] wydaje się, że istotniejszą rolę w blokowaniu aktywności kinazy ZAP-70 odgrywa przyłączenie inhibitorów do tyrozyny Y492.

## WTÓRNE SZLAKI SYGNAŁOWE

Dzięki zaangażowaniu kinazy ZAP-70 przez kompleks TCR/CD3-CD4 dochodzi do fosforylacji kolejnych przekazników sygnału i inicjacji wtórnych szlaków sygnałowych [55, 64]:

- zależnego od białka Ras, prowadzącego do kaskadowej aktywacji kinaz serynowo-treoninowych;
- zależnego od fosfolipazy PLC1 (fosfolipazy C), która katalizuje hydrolizę difosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP2) do diacyloglicerolu (DAG) oraz trisfosforanu inozytolu (IP3) [56, 64].

Wtórne szlaki sygnałowe prowadzą w efekcie do aktywacji różnych czynników transkrypcyjnych, które po związaniu z regionem promotorowym genów cytokin i ich receptorów, szczególnie IL-2, IL-2R i IFN- $\gamma$ , umożliwiają ich ekspresję i w następstwie produkcję cytokin. Przebieg wtórnych szlaków sygnałowych przedstawiono na rysunku 5. Inicjacja wtórnych szlaków sygnałowych możliwa jest dzięki włączeniu do kaskady sygnałowej białek adaptorowych, których funkcja polega na „sprzęganiu” ze sobą innych białek [60, 64, 77]. Kinaza ZAP-70 włącza do szlaku przewodzenia sygnału zakotwiczone w błonie komórkowej białko adaptorowe p36 przez fosforylację reszt tyrozynowych. Ufosforylowane białko p36 spełnia podwójną funkcję: uczestniczy w przyłączeniu kompleksu Grb2/Sos do TCR/CD3 oraz zaangażowaniu fosfolipazy PLC $\gamma$ 1 [60] (rys. 5). Białko Grb2 także zaliczane jest do białek adaptorowych. Jego prosta budowa strukturalna sprzyja wypełnianiu funkcji łączenia – zbudowane jest z domeny SH2 otoczonej dwiema domenami SH3 (SH3-SH2-SH3), które wiążą sekwencje białka Sos bogate w prolinę. Po utworzeniu dimeru Grb2/Sos następuje jego związanie przy pomocy domeny SH2 (należącej

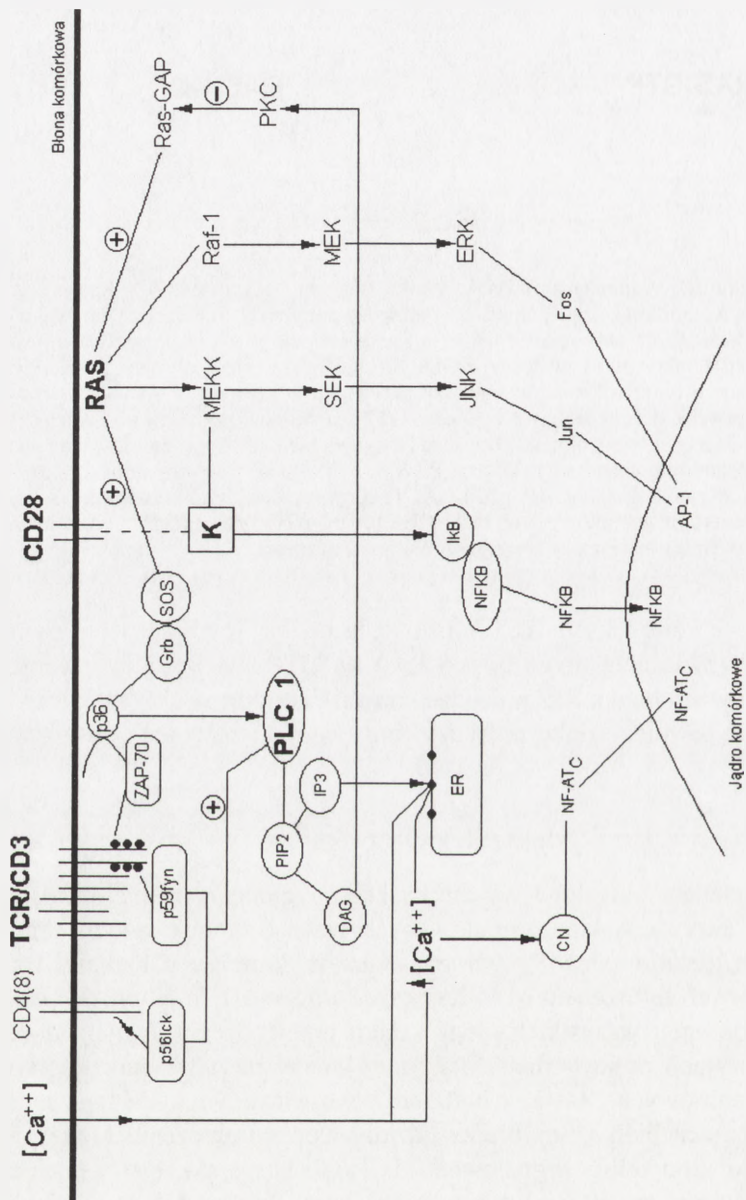


**RYСУNEK 4.** Cykliczna regulacja aktywności białka Ras (na podstawie [64]): Ras jest białkiem związanym z błoną komórkową, zaliczonym do białek wiążących GTP (białka G o niskiej masie cząsteczkowej), wykazujących aktywność GTP-azy; Ras występuje w komórce w dwóch postaciach: związanej z GTP (postać aktywna) i związanej z GDP (postać nieaktywna); stosunek postaci Ras-GTP do Ras-GDP decyduje o tym, czy Ras jest białkiem aktywnym w komórce T i wynika z równowagi dynamicznej między szybkością hydrolizy związanego GTP a szybkością wymiany związanej cząsteczki GDP na GTP pochodzącej z cytozolu; aktywność GTP-azowa białka Ras jest regulowana przez grupę białek zwanych białkami aktywującymi GTP-azę (RAS -GAPs) – ang. *GTP-ase activating proteins*; w komórkach ssaków odkryto 2 białka GAP: p120-GAP i neurofibrominę, natomiast do protein regulujących wymianę nukleotydów guaninowych na białku Ras (GDP→GTP) należą białka adaptorowe: Sos i prawdopodobnie Yav wpływające na aktywację szlaku Ras-zależnego

do białka Grb2) z kompleksem TCR/CD3. Rola białka Sos polega na wymianie cząsteczki GDP (związanej przez białko Ras) na GTP. W wyniku tego procesu dochodzi do aktywacji białka Ras w drodze konwersji do formy aktywnej Ras-GTP, a co za tym idzie również szlaku przekazywania sygnału zależnego od białka Ras [56] (rys. 4).

### Szlak zależny od Ras

Najlepiej zbadaną i określoną wtórną kaskadą sygnałową zainicjowaną przez białko Ras jest aktywacja kinaz regulowanych zewnątrzkomórkowym sygnałem ERKs (ang. *extracellular signal regulated kinases*), które są członkami rodziny kinaz aktywowanych mitogenem MAPKs (ang. *mitogen-activated protein kinases*) [14, 64]. Do aktywacji wszystkich kinaz szlaku przewodzenia sygnału dochodzi w wyniku fosforylacji odpowiednich dla danej kinazy reszt serynowych, tyrozynowych lub treoninowych. Ras jest białkiem zakotwiczonym w błonie, które po aktywacji za pomocą białka Sos bierze udział w przemieszczeniu kinazy Raf 1 z cytoplazmy do kompleksu sygnałowego TCR/CD3 (rys. 5). Raf 1 jest kinazą Ser/Thr (o podwójnej swoistości) aktywowaną przez kinazę białkową C (PKC). Ras i Raf 1 są enzymami indukującymi kaskadową aktywację kinaz Ser/Thr w limfocycie T (Ras-Raf1-MAPK), wpływając na aktywację czynników transkrypcyj-



RYSUNEK 5. Śródkomórkowe kaskady sygnałowe indukowane stymulacją kompleksu TCR/CD3 i kostymulacją antygenu CD28: wstępne etapy aktywacji i wiązanie szlaki sygnałowe prowadzące do aktywacji czynników transkrypcyjnych i indukcji ekspresji genów cytokin, K – szlak sygnałowy zależny od kostymulacji

nych genów cytokin [14, 25, 47]. Zaktywowana kinaza Raf 1 wpływa bezpośrednio na ekspresję genu *c-jun* oraz pośrednio genu *c-fos*. Ufosforylowane białko Jun ma szczególne znaczenie, albowiem wchodzi w skład kilku czynników transkrypcyjnych genu IL-2 i IL-2R:

- łączy się z produktem białkowym genu *c-fos* (białko Fos), tworząc dimeryczny czynnik AP1; białko AP1 stanowi z kolei składową jądrową czynnika transkrypcyjnego NF-AT [41, 64];
- ponadto białko Jun jest składnikiem strukturalnym czynnika transkrypcyjnego Oct/OAP-40 [38, 67, 68].

W fosforylację białka Jun zaangażowane są kinazy JNK (ang. *Jun N-terminal kinases*; izoformy JNK1 i JNK2), aktywowane w szlaku sygnałowym zależnym od kostymulacji limfocyta T przy udziale antygeny CD28 [15, 38, 63].

### Szlak zależny od fosfolipazy PLC $\gamma$ 1

Białko adaptorowe p36, oprócz zaangażowania do kompleksu Grb2/Sos i inicjacji szlaku zależnego od Ras, uczestniczy też we włączeniu do kompleksu sygnałowego fosfolipazy PLC $\gamma$ 1, aktywowanej za pomocą kinazy p56<sup>lck</sup>, co inicjuje wtórny szlak zależny od PLC $\gamma$ 1 [41, 60]. Fosfolipaza PLC $\gamma$ 1 katalizuje reakcję hydrolizy difosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP2) do diacyloglicerolu (DAG) i 1,4,5-trisfosforanu inozytolu (IP3) [40]. DAG tworzy w obecności jonów Ca<sup>++</sup> kompleks z obecnymi w cytoplazmie kinazami Ser/Thr, określanymi wspólną nazwą kinazy białkowej C (PKC), i jednocześnie ją uaktywnia. Rola PKC w procesie aktywacji limfocytów T nie jest w chwili obecnej do końca poznana. Przypisuje się jej pomocniczą funkcję w aktywowaniu czynników transkrypcyjnych NF-AT oraz AP-1 [29]. Ponadto aktywowana PKC hamuje aktywność GTP-azy Ras (zwaną białkiem Ras-GAP), przesuując równowagę między formą aktywną Ras-GTP a formą nieaktywną Ras-GDP w kierunku postaci aktywnej, co nasila proces transdukcji sygnału [64] (rys. 4).

Rola IP3 polega na uwolnieniu jonów wapniowych z magazynów wewnątrzkomórkowych (retikulum endoplazmatyczne – RE) [31, 64]. Wewnątrzkomórkowy wzrost stężenia wapnia wymagany jest do aktywacji kalcyneuryny, wpływającej na aktywację czynników transkrypcyjnych. Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca<sup>++</sup> ma dwa źródła: wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe. Wewnątrzkomórkowe pochodzenie jonów Ca<sup>++</sup> uzależnione jest od powstania IP3 i jego związania ze swoistym receptorem w obszarze retikulum endoplazmatycznego. Mobilizacja jonów Ca<sup>++</sup> we wnętrzu komórki pochodzących z RE jest sygnałem inicjującym dokomórkowy napływ jonów Ca<sup>++</sup>. Proces ten jest prawdopodobnie możliwy dzięki czynnikiowi CIF (ang. *calcium influx factor*) oraz białku CAML (ang. *calcium-signal modulating cyclophilin ligand*), które dodatkowo wpływa na aktywność kalcyneuryny. Niedostateczny napływ jonów wapniowych do komórki z zewnątrz wpływa na zaburzenia w proliferacji stymulowanych komórek T, ponieważ dla produkcji

IL-2 wymagany jest długotrwały wzrost stężenia jonów  $\text{Ca}^{++}$  w komórce utrzymujący się ok. 1–2 h, podczas gdy jony  $\text{Ca}^{++}$  z magazynów wewnątrzkomórkowych napływają bardzo szybko, osiągając maks. stężenie w czasie ok. 1 min od związania się  $\text{IP}_3$  ze swoim receptorem w obszarze RE. Napływ jonów  $\text{Ca}^{++}$  z RE stanowi więc jedynie bodziec dla napływu wapnia ze środowiska limfocyta T [64]. Wzrost stężenia jonów  $\text{Ca}^{++}$  w komórce T jest niezbędny do prawidłowej aktywności kalcyneuryny. Kalcyneuryna (CN) jest białkową fosfatazą serynową, składającą się z 2 podjednostek: domeny katalitycznej (CN-A) wiążącej kalmodulinę i domeny regulatorowej (CN-B) wiążącej wapń wewnątrzkomórkowy. Fosfatazowa aktywność CN wymagana jest do regulacji ekspresji czynnika transkrypcyjnego NF-AT (ang. *nuclear factor of activated T cells*) specyficznego dla limfocytów T [11, 64]. W procesie aktywacji komórki T kalcyneuryna sprzyja uaktywnieniu czynnika NF-AT i jego przemieszczeniu się do jądra oraz połączeniu z czynnikiem AP1 (dimer Fos/Jun – zależny od Ras) w procesie wiązania z promotorem genu IL-2. Ponadto w nie wyjaśniony bliżej sposób wpływa na aktywność czynników Oct/OAP-40 i NF- $\kappa$ B [11].

## INTEGRACJA SZLAKÓW AKTYWACYJNYCH

Panuje zgodny pogląd, że izolowana interakcja kompleksu TCR/CD3 z antygenem nie jest wystarczająca do pobudzenia limfocytów T do proliferacji, różnicowania i produkcji cytokin. Komórki T po stymulacji wyłącznie kompleksu TCR/CD3 nie uzyskują swoich pełnych funkcji efektorowych, osiągając stan anergii, czyli niereaktywności na bodźce antygenowe [57]. Dało to podstawę do stworzenia dwusygnałowego modelu aktywacji limfocytów T [41]. Limfocyty T do pełnej aktywacji wymagają kostymulacji wielu dodatkowych cząsteczek znajdujących się na ich powierzchni. Dowiedziono, że kluczową rolę w kostymulacji limfocyta T odgrywa połączenie jego antygeny powierzchniowego CD28 z cząsteczką B7 (CD80, CD86) znajdującą się na powierzchni komórki prezentującej antygen (APC) [42]. Dopiero w wyniku tej interakcji limfocyt T osiąga stan pełnej aktywacji, zdolność do proliferacji, różnicowania i uzyskiwania funkcji efektorowych [42, 43, 44]. Miarą osiągnięcia stanu aktywacji przez komórkę T jest określenie zdolności do produkcji cytokin (w szczególności IL-2, IFN- $\gamma$ ) oraz proliferacji. Udowodniono, że sygnały płynące z TCR/CD3 i CD28 łączą się na etapie szlaku zależnego od białka Ras [56] (rys. 5). Badania nad transdukcją sygnału van Liera i wsp. [65] dowodzą, że po stymulacji wyłącznie antygeny CD28 w komórce obserwuje się obniżony poziom PIP2, brak wewnątrzkomórkowej mobilizacji jonów  $\text{Ca}^{++}$  i translokacji kinazy białkowej C (PKC) z cytoplazmy do jądra komórkowego (procesów obserwowanych po stymulacji kompleksu TCR/CD3). Fakt ten sugeruje, że sygnał

aktywacji komórki po stymulacji antygenem CD28 biegnie torem niezależnym od kaskady sygnałowej TCR/CD3. Doniesienia te uzupełnione stwierdzeniem niewrażliwości szlaku sygnałowego CD28 na inhibitory kinaz tyrozynowych (cyklosporyna A) dowodzą jasno, że CD28 używa swojego, niezależnego od TCR/CD3 sposobu transdukcji sygnału.

Receptor CD28 w wyniku stymulacji rekrutuje do swojego szlaku sygnałowego PI3-kinazę, aktywując ją przy tym [32, 62]. Warunkiem efektywnego związania PI3-kinazy przez łańcuch cytoplazmatyczny antygenem CD28 jest uprzednie ufosforylowanie tyrozyny obecnej w sekwencji YXXM w strukturze CD28 (Y – tyrozyna, X – in. aminokwas, M – metionina) [52, 56]. Obecność motywu YXXM (podobnego do sekwencji ITAM) stwierdzono ponadto w wielu receptorach wiążących się z PI3-kinazą, np. CTLA-4 [73]. Ufosforylowanie motywu YXXM w łańcuchu cytoplazmatycznym antygenem CD28 zachodzi prawdopodobnie pod wpływem kinaz tyrozynowych (być może p56<sup>lck</sup>, p59<sup>lyn</sup>, ZAP-70 lub in.), uaktywnionych we wczesnym etapie przekazywania sygnału z TCR/CD3 [35, 45]. Na uwagę zasługuje ponadto fakt, że fosforylacja tyrozyny łańcucha cytoplazmatycznego CD28 zachodzi (nawet w warunkach nieobecności sygnału kostymulującego) pod wpływem kinaz aktywowanych w szlaku TCR/CD3, co zapoczątkowuje wiązanie i aktywację PI3-kinazy, jednak tylko w stopniu minimalnym. Dopiero w wyniku kostymulacji CD28 dochodzi do dalszej rekrutacji PI3-kinazy i istotnego wzrostu jej aktywności, co dostarcza drugiego sygnału do stabilizacji i transkrypcji mRNA oraz produkcji cytokin. Sposób, w jaki kinaza PI3 wpływa na stabilizację mRNA genów cytokin, sprzyjającą nasileniu procesów transkrypcyjnych, nie został dotychczas dokładnie poznany [56].

## AKTYWACJA CZYNNIKÓW JĄDROWYCH

W wyniku złożonych procesów komórkowych sygnał pobudzenia limfocyta T dociera do jądra komórkowego. Pierwszymi oznakami dotarcia zintegrowanych sygnałów pobudzenia komórki T jest nasilenie ekspresji mRNA genów tzw. natychmiastowej odpowiedzi na mitogen (m. in. *fos* i *jun*), a także mRNA dla genów cytokin i receptorów cytokin. Z powodu zasadniczego znaczenia interleukiny-2 (IL-2) w procesie aktywacji limfocyta T wiele prac badawczych skupiło swoją uwagę właśnie na problemie regulacji ekspresji genu Il-2 i Il-2R. Il-2 jest cytokiną niezbędną do aktywacji, proliferacji i różnicowania limfocytów T. Zdolność do syntezy i uwalniania Il-2 mają jedynie aktywowane komórki T CD4+ w odpowiedzi na stymulację TCR/CD3 i kostymulację CD28. Stwierdzono, że największy poziom syntezy i sekrecji Il-2 przypada ok. 24 h po stymulacji komórki T [69].

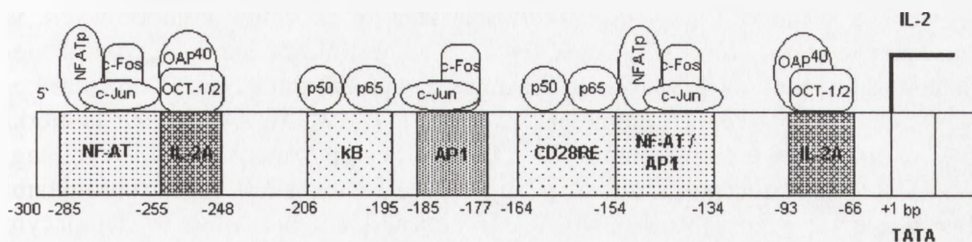
Liczne eksperymenty [22, 59] dostarczyły informacji na temat budowy regionu regulatorowego genu Il-2 warunkującego indukcję ekspresji genu w odpowiedzi

na stymulację komórki T. Promotor genu IL-2 zawiera w swojej strukturze nukleotydowej miejsca: NF- $\kappa$ B, NF-AT, AP-1, Oct 1, ARRE-1 (nazywany też IL-2A), CD28RC, wiążące swoiste czynniki transkrypcyjne [8, 22] (rys. 6). Badania porównawcze regionów promotorowych genu IL-2 w ludzkich i mysich komórkach T sugerują bardzo duży stopień homologii (86%) dowodzący wysokiej zachowawczości miejsc wiążących czynniki transkrypcyjne zarówno pod względem sekwencji, jak i pełnionych funkcji [22, 50].

Ważną rolę w procesie przenoszenia sygnału w komórce T spełniają wtórne przekaźniki aktywujące kaskady komórkowych kinaz białkowych. Niektóre z nich przemieszczają się do jądra komórkowego i indukują transkrypcję genów kodujących tzw. indukowalne czynniki transkrypcyjne, jak AP-1 i Oct/OAP-40. Interesująco przedstawia się proces indukcji ekspresji czynnika AP-1 związany ściśle z przebiegiem dwóch szlaków sygnałowych: TCR/CD3 i CD28. Czynniki AP-1 jest dimerem zbudowanym z połączenia jednego białka z rodziny Fos (c-Fos, Fos B, Fra 1 i 2) z białkiem rodziny Jun (c-Jun, JunB, JunD) [1, 30]. Aktywność każdego z białek regulowana jest przez dwie różne grupy kinaz: białka Fos aktywowane są w szlaku przekaźnictwa kinaz MAPK, natomiast białka Jun związane są z aktywnością kinaz JNK/SAPK (ang. *stress-activated protein kinases*) [47], których powstanie wymaga integracji szlaków sygnałowych biegnących ze stymulowanych receptorów TCR/CD3 i CD28 [38]. Obydwa szlaki pobudzenia biegną równolegle, a ich ostatnie ogniwa przemieszczają się do jądra komórki T. Tam kinazy ERK 1 i ERK 2 fosforylują tzw. kompleks potrójny (ang. *ternary complex*) związany z promotorem genu *c-fos* [20]. Kompleks ten jest odpowiedzialny za inicjację transkrypcji genu *c-fos* prowadzącą do syntezy białka c-Fos. Podobny proces związany z fosforylacją kompleksu inicjującego toczy się w obrębie promotora genu *c-jun*. Powstałe w ten sposób białka c-Jun i c-Fos łączą się w dimer AP-1 w obszarze jądra komórkowego [1]. Warunkiem niezbędnym do pełnienia funkcji aktywatora transkrypcji genów cytokin przez białko AP-1 jest uprzednie ufosforylowanie obu jego składników przez swoiste kinazy: białko c-Fos fosforylowane jest przez kinazę FRK (ang. *Fos regulating kinase*), natomiast białko c-Jun aktywowane jest pod wpływem kinaz JNK [47]. Powstanie czynnika AP-1 uwarunkowane jest więc przez jednoczesne pobudzenie kilku kaskad sygnałowych związanych ze stymulacją kompleksu TCR/CD3 i antygeny CD28. Wydaje się, że do faktycznej integracji sygnałów aktywacyjnych w limfocycie T dochodzi dopiero na poziomie czynników transkrypcyjnych.

Czynnik AP-1 wskutek oddziaływania z białkiem TBP (ang. *TATA-box binding protein*) uzyskuje zdolność inicjowania transkrypcji w miejscu startu syntezy mRNA genu IL-2. Poszczególne białka wchodzące w skład rodziny Fos i Jun mają różne właściwości i kompleksy AP-1 utworzone przez różne ich kombinacje mogą posiadać odmienne właściwości. Otóż stwierdzono inny skład czynnika transkrypcyjnego AP-1 w komórkach T proliferujących, a inny w komórkach T apoptotycznych [33]. To właśnie skład kompleksu AP-1 determinuje jego zdolność łączenia się z pro-





RYSUNEK 6. Region promotorowy genu IL-2: poszczególne miejsca NF-AT, IL-2A, AP-1, kB, CD28RE promotora przyłączają swoje czynniki indukujące transkrypcję genu IL-2; TATA – kluczowa sekwencja wymagana do zainicjowania transkrypcji genu IL-2 przez polimerazę RNA II

motorem genu IL-2. Wykazano, że kontakt z białkami TBP uczestniczącymi w inicjacji transkrypcji genów cytokin mają tylko czynniki transkrypcyjne utworzone przez białka c-Fos i c-Jun. Cechą wyróżniającą AP-1 spośród innych czynników transkrypcyjnych jest dwójakie oddziaływanie na promotor genu IL-2: z jednej strony poprzez bezpośrednie połączenie ze swoistym dla siebie miejscem oraz pośrednio przez ułatwianie przyłączenia innych czynników transkrypcyjnych do regionu regulatorowego genu (NF-AT, Oct).

W promotorze genu IL-2 zidentyfikowano ponadto dwa miejsca ARRE-1 (inaczej nazywane IL-2A) swoiste dla indukowalnych czynników transkrypcyjnych Oct 1 i 2 (ang. *octamer binding protein*) [34]. Czynniki te wykazują różnice w lokalizacji tkankowej: Oct 1 jest spotykany w komórkach większości tkanek, natomiast lokalizacja czynnika Oct 2 jest ograniczona do limfocytów B i części populacji limfocytów T. Badania Ullmanna i wsp. [67] potwierdziły udział czynnika Oct 1 oraz jego ko-aktywatora – białka OAP-40 [66] w indukcji ekspresji genu IL-2 i jej syntezie przez stymulowane limfocyty T. OAP-40 (ang. *octamer associated protein*) jest białkiem wykazującym homologię strukturalną z białkami JunD i c-Jun, których indukcja związana jest ze szlakiem sygnałowym wrażliwym na cyklosporynę A [68]. Obecność czynnika OAP-40 ma zasadnicze znaczenie w aktywacji miejsca ARRE-1, zwiększa siłę wiązania czynnika Oct z tym miejscem oraz umożliwia czynnikowi Oct indukowanie transkrypcji mRNA dla genu IL-2. Podobnie do NF-ATc regulacja aktywności czynników OAP i Oct zależy od aktywności kalcyneuryny [11, 41]. Poza współpracą Oct z białkiem OAP-40 sugeruje się dodatkowo współdziałanie funkcjonalne pomiędzy czynnikami Oct 1 i AP-1, mogące wynikać z bliskiego położenia ich miejsc wiążących w promotorze genu IL-2 [54].

W przeciwieństwie do indukowalnych czynników transkrypcyjnych produkowanych *de novo* w odpowiedzi na stymulację komórki T, czynniki transkrypcyjne, takie jak NF-AT i NF- $\kappa$ B, występują w cytoplazmie w postaci nieaktywnej i po stymulacji receptorów błonowych ulegają aktywacji oraz przemieszczeniu do jądra komórkowego, gdzie wiążą się ze swoistymi miejscami w promotorze genu IL-2.

Stymulacja komórki T powoduje aktywację szeregu enzymów komórkowych, w tym kalcyneuryny, której aktywność fosfatazowa jest niezbędna do aktywacji nieznanego substratu umożliwiającego przemieszczenie czynnika NF-AT do jądra komórkowego i połączenia z kompleksem AP-1 [11, 19]. W środowisku komórki T wyróżnia się dwie formy białek NF-AT: postać cytoplazmatyczną NF-ATc (ang. *NF-AT cytosolic*) oraz postać NF-ATp (ang. *NF-AT pre-existing*), będące produktami dwóch różnych genów [30, 49]. NF-ATc jest czynnikiem pierwotnie występującym w cytoplazmie limfocytów T, podczas gdy NF-ATp ma bardziej rozpowszechnioną lokalizację tkankową [24, 46]. Oba czynniki mają w swojej strukturze podobne domeny, z których jedna wykazuje wysoki stopień homologii z czynnikiem transkrypcyjnym NF- $\kappa$ B. Dotychczas zidentyfikowano dwa miejsca wiążące czynniki NF-AT w regionie regulatorowym genu IL-2 [13], które znajdują się w bliskiej odległości od miejsc wiążących czynnik AP-1. Bliskość lokalizacji tych czynników transkrypcyjnych sugeruje możliwość ich współpracy w procesie łączenia się w regionie regulatorowym genu IL-2. Co więcej, połączenie czynnika NF-AT ze swoim dla niego miejscem w kooperacji z czynnikiem AP-1 stabilizuje to wiązanie i warunkuje prawidłowy przebieg procesów transkrypcyjnych [30]. Wykazano bowiem, że mutacja w miejscu AP-1 uniemożliwia związanie i prawidłowe wypełnianie funkcji przez czynnik transkrypcyjny NF-AT [8]. Wyjątkowe znaczenie czynnika AP-1 w procesie transkrypcji genu IL-2 w jądrze limfocytów T zostało dodatkowo potwierdzone w badaniach z wykorzystaniem transfekcji zmutowanego białka c-Jun TAM-67 do linii komórkowej Jurkat (pozbawionej białka c-Jun) [53], którego ekspresja hamowała endogenną aktywność transkrypcyjną zarówno czynnika AP-1, jak i NF-AT, a w konsekwencji zablokowanie syntezy IL-2. Natomiast nie odnotowano wpływu transfekcji białka TAM-67 do komórek Jurkat na aktywność czynników NF- $\kappa$ B i Oct 1. Dodatkowo, wszczepienie prawidłowego genu *c-fos* do komórek T izolowanych ze śledziony mysz transgeniczných [51] skutkowało wyraźnym nasileniem poziomu ekspresji czynnika transkrypcyjnego AP-1 w komórkach stymulowanych przeciwciałem anti-CD3 bez wpływu na ekspresję czynników NF-AT, NF- $\kappa$ B i Oct 1. Podwyższona aktywność transkrypcyjna czynnika AP-1 sprzyjała wzmożeniu i przedłużeniu ekspresji genu IL-2 oraz nasilała produkcję tej cytokiny przez stymulowane limfocyty T.

Czynniki transkrypcyjne NF- $\kappa$ B, należące do rodziny Rel, stanowią drugą grupę czynników występujących w cytoplazmie komórki w postaci nieaktywnego kompleksu czynnika NF- $\kappa$ B połączonego z inhibitorem I $\kappa$ B. Fosforylacja i proteolityczna degradacja inhibitora I $\kappa$ B powoduje uwolnienie aktywnego czynnika NF- $\kappa$ B z kompleksu i jego przemieszczenie do jądra komórkowego z następowym związaniem z promotorem genu IL-2 [64]. Prawdopodobny mechanizm hamowania aktywności czynnika NF- $\kappa$ B przez podjednostkę I $\kappa$ B polega na maskowaniu sygnału lokalizacji jądrowej, który umożliwia przemieszczenie się białka NF- $\kappa$ B do jądra komórki T. Dotychczas zidentyfikowano 5 białek pełniących rolę aktywatorów transkrypcji

rozpoznających swoiste miejsce *kB* w promotorze genów cytokin: NF-*kB*1 (p105), NF-*kB*2 (p100), Rel-A (p65), Rel-B i c-Rel [8]. Wszystkie białka rodziny Rel, pomimo dość powszechnego występowania tkankowego, pełnią szczególną rolę w komórkach układu odpornościowego. Dwa z nich, mianowicie NF-*kB*1 i NF-*kB*2, syntetyzowane są w postaciach prekursorowych, które pod wpływem proteolizy uwalniają dojrzałe czynniki NF-*kB*1 (p50) oraz NF-*kB* 2 (p52) [18]. Czynniki NF-*kB* jest dimerem utworzonym z różnych kombinacji czynników rodziny Rel. Różnice strukturalne izoform tego czynnika decydują o sposobie regulacji transkrypcji genów cytokin: obecność w jądrze komórki podjednostek p50, p52, p65 i c-Rel koreluje z procesem indukowania transkrypcji, podczas gdy homodimer p50/p50 hamuje ekspresję genu IL-2. Stymulacja ludzkich limfocytów T prowadzi do szybkiej akumulacji heterodimerskich kompleksów NF-*kB* (p65/p50) rozpoznających swoiste miejsce *kB* w promotorze genu IL-2R, które w procesie aktywacji limfocytów T wypierają homodimery p50/p50 z miejsc *kB* promotora genu IL-2 [3]. Procesy wiodące do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF-*kB* wydają się być związane z kostymulacją CD28 [76]. Udowodniono, że przenoszenie sygnałów kostymulujących w szlaku zależnym od stymulacji CD28 prowadzi do szybszej inaktywacji inhibitora *I $\kappa$ B* z następowym aktywniejszym przemieszczaniem się podjednostek p50, p65 i c-Rel do jądra ludzkich obwodowych komórek T [6, 39].

W świetle wielu badań tylko połączenie czynników transkrypcyjnych z wszystkimi specyficznymi dla nich miejscami w regionie promotorowym zapewnia prawidłową ekspresję genu IL-2. Nieprzyłączenie choćby jednego czynnika transkrypcyjnego do promotora decyduje o drastycznym zredukowaniu poziomu ekspresji IL-2, obserwowanym w anergicznym limfocytach T przy braku kostymulacji CD28 [21]. Indukcja ekspresji genu IL-2 i jej sekrecja inicjuje drugą fazę aktywacji limfocytów T, niezależną od transdukcji sygnału z TCR/CD3, bowiem dotyczy ona odpowiedzi komórki T na cytokiny.

## PODSUMOWANIE

W ciągu ostatnich lat stopień poznania procesów biochemicznych odpowiedzialnych za transmisję sygnałów pobudzenia limfocyta T z receptorów powierzchniowych do wnętrza komórki znacznie się wzbogacił. Wiadomo, że transdukcja sygnału jest swoistym sposobem tłumaczenia charakteru związanego ligandu na język łańcuchowych reakcji śródkomórkowych prowadzących do transkrypcji genów cytokin i ukształtowania funkcjonalnego fenotypu aktywowanych komórek T. Badania transgeniczne oraz transfekcje komórkowe czynników, które w sposób pozytywny lub negatywny wpływają na transdukcję sygnału w limfocycie T, pozwoliły na zidentyfikowanie wielu kluczowych molekuł uczestniczących w tym procesie.

Uważa się, że w komórce istnieje jeszcze wiele nie scharakteryzowanych dotąd substratów ulegających fosforylacji w odpowiedzi na stymulację TCR/CD3. Być może niektóre z nich są odpowiedzialne za jakościowe zróżnicowanie odpowiedzi limfocytów T na różne rodzaje bodźców antygenowych. Pomimo tak dużej znajomości fizjologii i patologii związanej ze stymulacją limfocytów T, wiele cząsteczek i procesów komórkowych nadal pozostaje nie wyjaśnionych. Istnieje duża konieczność prowadzenia dalszych badań eksperymentalnych, które umożliwiłyby stosowne manipulowanie odpowiedzią immunologiczną za pomocą odpowiednich interwencji terapeutycznych.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ANGEL P, KARIN M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell proliferation and transformation. *Bioch Biophys Acta* 1991; **1072**: 129–157.
- [2] ARPAIA E, SHAHUR M, DADI H, COHEN A, ROIFMAN CM. Defective T cell receptor signalling and CD8+ thymic selection in humans lacking ZAP-70 kinase. *Cell* 1994; **76**: 947–958.
- [3] BAEUERLE PA, HENKEL T. Function and activation of NF- $\kappa$ B in the immune system. *Ann Rev Immunol* 1994; **12**: 141–179.
- [4] BOISE LH, PETRYNIAK B, MOA X. The NF-AT-1 DNA binding complex in activated T-cells contains Fra-1 and Jun B. *Mol Cell Biol* 1993; **13**: 1911–1919.
- [5] BOLEN JB. Protein tyrosine in the initiation of antigen receptor signaling. *Curr Opin Immunol* 1995; **7**: 306–311.
- [6] BRYAN RG, LAI JH. Effect of CD28 signal transduction on c-rel in human peripheral blood T-cells. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 7933–7942.
- [7] BU JW, SHAW AS, CHAN AC. Analysis of the interaction of ZAP-70 and Syk kinases with the T-cell antigen receptor by plasmon resonance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 5106–5110.
- [8] BURLINSON EL, OZANNE BW, CUSHLEY W. Cytokines and transcription factors in regulation of lymphocyte function. [w] Harnett MM, Rigley KP [red] *Lymphocyte signalling: mechanisms, subversion and manipulation*. Chichester, New York : Wiley J & Sons 1997: 309–335.
- [9] CHAN AC, DALTON M, JOHNSON R, KONG GH, WANG T, THOMA R, KUROSAKI T. Activation of ZAP-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function. *EMBO J* 1995; **14**: 2499–2508.
- [10] CHAN AC, IWASHIMA M., TURCK CW, WEISS A. ZAP-70: a 70 kD protein-tyrosine kinase that associated with the TCR zeta chain. *Cell* 1992; **71**: 649–662.
- [11] CLIPSTONE NA, CRABTREE GR. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T lymphocyte activation. *Nature* 1992; **357**: 695–697.
- [12] COOKE MP, ABRAHAM KM, FORBUSH KA, PERIMUTTER RM. Regulation of T cell receptor signaling by a src family protein-tyrosine kinase (p59 fyn). *Cell* 1991; **65**: 281–291.
- [13] CORTHESE Y B, KAO PN. Purification by DNA affinity chromatography of two polypeptides that contact the NF-AT DNA binding site in the interleukin 2 promoter. *J Biol Chem* 1994; **269**: 20682–20690.
- [14] DAVIS RJ. The Mitogen-activated Protein Kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 1993; **268**: 14553–14556.

- [15] DERIJARD B, HIBI M, WU IH, BARRETT T, SU B, DENG T, KARIN M, DAVIS RJ. JNK I: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 1994; **76**: 1025–1037.
- [16] ELDER ME, LIN D, CLEVER J, CHAN AC, HOPE TJ, WEISS A, PARSLow T. Human severe combined immunodeficiency due to a defect in ZAP-70, a T cell tyrosine kinase. *Science* 1994; **264**: 1596–1599.
- [17] EXLEY M, VARTIKOVSKI L, PETER M, SANCHO J, TERHORST C. Association of phosphatidylinositol 3-kinase with a specific sequence of the T cell receptor zeta chain is dependent on T cell activation. *J Biol Chem* 1994; **269**: 15140–15146.
- [18] FAN CM, MANIATIS T. Generation of p50 the subunit of NF-kB by processing of p105 through an ATP-dependent pathway. *Nature* 1991; **354**: 395–398.
- [19] FLANAGAN WF, CORTHESEY B, BRAM RJ, CRABTREE GR. Nuclear association of a T cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature* 1991; **352**: 803–897.
- [20] GILLE H, KORTENJANN M, THOMAE O, MOOMAW C, SLAUGHTER C, BOBB MH, SHAW PE. ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. *EMBO J* 1995; **14**: 951–962.
- [21] GO C, MILLER J. Differential induction of transcription factors that regulate the interleukin gene during anergy induction and restimulation. *J Exp Med* 1992; **175**: 1327–1336.
- [22] GRANELLI-PIPERNO A, NOLAN P. Nuclear transcription factors that bind to elements of the IL-2 promoter. Induction requirements in primary human T-cells. *J Immunol* 1991; **15**: 2734–2739.
- [23] HATADA MH, LU X, LAIRD ER, GREEN J, MORGENSTERN JP, LOU M., MARR CS, PHILLIPS TB, RAM MK, THERIAULT KET AL. Molecular basis for interaction of the protein tyrosine kinase ZAP-70 with the T cell receptor. *Nature* 1995; **376**: 32–38.
- [24] HOEY T, SUN YL, WILLIAMSON K, XU X. Isolation of two new members of the NF-AT gene family and functional characterization of the NF-AT proteins. *Immunity* 1995; **2**: 461–472.
- [25] HOWE LR, WEISS A. Multiple kinases mediate T-cell receptor signaling. *Trends Biochem Sci* 1995; **20**: 59–64.
- [26] IRVING BA, WIESS A. The cytoplasmic domain of the T cell receptor chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. *Cell* 1991; **64**: 891–901.
- [27] ISAKOV N, WANGE RL, BURGESS WH, WATTS JD, AEBERSHOLD R, SAMELSON LE. ZAP-70 binding specificity to T cell receptor tyrosine-based activation motifs: the tandem SH2 domains of ZAP-70 bind distinct tyrosine-based activation motifs with varying affinity. *J Exp Med* 1995; **181**: 375–380.
- [28] IWASHIMA M., IRVING BA, VAN OERS NSC, CHAN AC, WEISS A. Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science* 1994; **263**: 1136–1139.
- [29] JAIN J, VALGE-ARCHER VE, SINSKEY AJ, RAO A. The AP-1 site at 150 bp, but not the NF-kB site, is likely to represent the major target of protein kinase C in the interleukin 2 promoter. *J Exp Med* 1992; **175**: 853–862.
- [30] JAIN J, MINER Z, RAO A. Analysis of the pre-existing and nuclear forms of nuclear factor of activated T cells. *J Immunol* 1993; **151**: 837–848.
- [31] JAYARAMAN T, ONDRIASOVA E, ONDRIAS K, HARNICK DJ, MARKS AR. The inositol 1,4,5-triphosphate receptor is essential for T cell receptor signalling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 6007–6011.
- [32] JUNE CH, BLUESTONE JA, NADLER LM, THOMPSON CB. The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today* 1994; **15**: 321–331.
- [33] KAMINSKA B, FILIPKOWSKI RK, ZURKOWSKA G, LASON W, PRZEWLOCKI R, KACZMAREK L. Dynamic changes in composition of AP-1 transcription factor DNA binding activity in rat brain following kainate induced seizures and cell death. *Eur J Neurosci* 1994; **6**: 1558–1566.

- [34] KARNITZ LM, SUTOR SL, ABRAHAM RT. The Src-family kinase, Fyn, regulates the activation of phosphatidylinositol 3-kinase in an interleukin-2-responsive cell line. *J Exp Med* 1994; **179**: 1799–1808.
- [35] KAMPS MP, CORCORAN T, LEBOWITZ JH, BALTIMORE D. The promoter of the human interleukin-2 gene contains two octamer-binding sites and is partially activated by the expression of Oct-2. *Mol Cell Biol* 1990; **10**: 5464–5472.
- [36] KLIG S, CHIARAMONTE L, VERMA RS. The T cell receptor gene and its association with human diseases. *Exp Clin Immunogenet* 1992; **9**: 117–124.
- [37] KONG G, DALTON M., WARDENBURG JB, STRAUS D, KUROSAKI T, CHAN AC. Distinct tyrosine phosphorylation sites in ZAP-70 mediate activation and negative regulation of antigen receptor function. *Mol Cell Biol* 1996; **16**: 5026–5035.
- [38] KYRIAKIS JM, BANERJEE P, NIKOLAKAKI E, DAI T, RUBIE EA, AHMAD MF, AVRUCH J, WOODGET JR. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinase. *Nature* 1994; **369**: 156–160.
- [39] LAI JH, TAN TH. CD28 signalling causes a sustained down-regulation of I kappa B alpha which can be prevented by the immunosuppressant rapamycin. *J Biol Chem* 1994; **269**: 30077–30080.
- [40] LIAO XC, LITTMAN DR. Altered T cell receptor signaling and disrupted T cell development in mice lacking Itk. *Immunity* 1995; **3**: 757–769.
- [41] LICHTMAN AH. T lymphocyte activation. *Curr Opin Haematol* 1993: 160–166.
- [42] LINSLEY PS, BRADEY W, GROSMARE L, ARUFFO A, DAMLENK, LEDBETTER JA. Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J Exp Med* 1991; **173**: 721–730.
- [43] LINSLEY PS, LEDBETTER JA. The role of CD28 during T cell responses to antigen. *Ann Rev Immunol* 1993; **11**: 191–212.
- [44] LINSLEY PS, CLARK EA, LEDBETTER JA. T cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 5031–5035.
- [45] LU Y, PHILLIPS CA, BJORND AHL JM, TREVILLYAN JM. CD28 signal transduction: tyrosine phosphorylation and receptor association of phosphoinositide 3-kinase correlate with  $Ca^{2+}$  independent costimulatory activity. *Eur J Immunol* 1994; **24**: 2732–2739.
- [46] MASUDA ES, NAITO Y, TOKUMITSU H, CAMPBELL D, SAITO F, HANNUM C, ARAI K, ARAI N. NFATx, a novel member of the nuclear factor of activated T cells family that is expressed predominantly in the thymus. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 2697–2706.
- [47] MINDEN A, LIN A, MCMAHON M, LANGE-CARTER C, DERIJARD B, DAVIS RJ, JOHNSON GL, KARIN M. Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science* 1994; **266**: 1719–1723.
- [48] NEEL BG. Role of phosphatases in lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* 1997; **9**: 405–420.
- [49] NORTHROP JP, HO SN, CHEN L. NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T cell activation. *Nature* 1994; **369**: 497–502.
- [50] NOVAK TJ, WHITE PM, ROTHENBERG EV. Regulatory anatomy of the murine interleukin-2 gene. *Nucl Acid Res* 1990; **18**: 4523–4533.
- [51] OCHI Y, KOIZUMI T, KOBAYASHI S. Analysis of IL-2 gene regulation in c-fos transgenic mice. Evidence for an enhancement of IL-2 expression in splenic T cells stimulated via TCR/CD3 complex. *J Immunol* 1994; **153**: 3485–3490.
- [52] PAGES F, RAGUENEAU M., ROTTAPPEL R, TRUNEH A, NUNES J, IMBERT J, OLIVE D. Binding of PI 3-kinase to CD28 is required for T cell signalling. *Nature* 1994; **369**: 327–329.
- [53] PETRAK D, MEMON SA, BIRRER MJ, ASHWELL JD, ZACHARCHUK CM. Dominant negative mutant of c-jun inhibits NF-AT transcriptional activity and prevents IL-2 gene transcription. *J Immunol* 1994; **153**: 2046–2051.

- [54] PFEUFFER T, KLEIN-HESSLING S, HEINFLING A. Octamer factors exert a dual effect on the IL-2 and IL-4 promoters. *J Immunol* 1994; **153**: 5572–5585.
- [55] QUIAN D, WEISS A. T cell antigen receptor signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 1997; **9**: 205–212.
- [56] RUDD CE, JANSSEN O, YUN-CAI C, DA SILVA A., RAAB M, PRASAD KVS. Two step TCR/CD3-CD4 and CD28 signaling in T cells : SH2/SH3 domains, protein-tyrosine and lipid kinases. *Immunol Today* 1994; **15**: 225–234.
- [57] SCHWARTZ RH. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 1990; **248**: 1349–1355.
- [58] SEFTON BM, CAMPBELL MA. The role of tyrosine protein phosphorylation in lymphocyte activation. *Ann Rev Cell Biol* 1991; **7**: 257–274.
- [59] SHIBUYA H, TANIGUCHI T. Identification of multiple cis-elements and trans-acting factors involved in the induced expression of the IL-2 gene. *Nucl Acid Res* 1989; **17**: 9173–9184.
- [60] SIEH M, BATZER A, SCHLESSINGER J, WEISS A. GRB2 and phospholipase C-gamma 1 associate with a 36- to 38-kilodalton phosphotyrosine protein after T cell receptor stimulation. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 4435–4442.
- [61] SONGYANG Z, SHOELSON SE, CHAUDHURI M., GISH G, PAWSON T, HASER WG. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 1993; **72**: 767–778.
- [62] STEIN PH, FRASER JD, WEISS A. The cytoplasmic domain of CD28 is both necessary and sufficient for costimulation of IL-2 secretion and association with PI 3-kinase. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 3392–3402.
- [63] SU B, JACINTO E, HIBI M, KALLUNKI T, KARIN M, BEN NY. JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes. *Cell* 1994; **77**: 727–736.
- [64] TAYLOR-FISHWICK DA, JUNE CH, SIEGEL JN. Antigen receptor structure and signaling in T cells. [w] Harnett MM, Ringley KP [red] *Lymphocyte signalling: mechanisms, subversion and manipulation*. Chichester, New York, Wiley J & Sons 1997: 31–50.
- [65] TIMSON GL, KONG AN, SAMELSON LE, SHAW AS. p59 fyn tyrosine kinase associates with multiple T cell receptor subunit through its unique amino-terminal domain. *Mol Cell Biol* 1992; **12**: 5438–5446.
- [66] UCKUN FM, SCHIEVEN GL, DIBIRDIK I, CHANDAN-LANGLIE M, TUEL-AHLGREN L, LEDBETTER JA. Stimulation of protein tyrosine phosphorylation, phosphoinositide turnover, and multiple previously unidentified serine, threonine-specific protein kinases by the pan B-cell receptor CD40/Bp50 at discrete developmental stages of human T-cell ontogeny. *J Biol Chem* 1991; **266**: 17478–17485.
- [67] ULLMAN KS, FLANAGAN WM, EDWARDS CA, CRABTREE GR. Activation of early gene expression in T lymphocytes by Oct-1 and an inducible protein, OAP-40. *Science* 1991; **254**: 558–562.
- [68] ULLMAN KS, NORTHROP JP, ADMON A, CRABTREE GR. Jun family members are controlled by a calcium-regulated, cyclosporin A-sensitive signaling pathway in activated T lymphocytes. *Genes Dev* 1993; **7**: 188–196.
- [69] ULLMAN KS, NORTHROP JP, VERWEIJ CL, CRABTREE GR. Transmission of signals from the T lymphocytes antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation and immune function: the missing link. *Ann Rev Immunol* 1990; **8**: 421–452.
- [70] VAN LIER RA, BROUWER M., DEGROOT E, KRAMER I, AARDEN L, VERHOEVEN A. T cell receptor/CD3 and CD28 use distinct intracellular signaling pathways. *Eur J Immunol* 1991; **21**: 1775–1778.
- [71] VAN OERS NSC, LOWIN-KROPF B, FINLAY D, CONNOLLY K, WEISS A. T cell development is abolished in mice lacking both Lck and Fyn protein tyrosine kinases. *Immunity* 1996; **5**: 429–436.

- [72] VEILLETTE A, BOOKMAN MA, HORAK EM, SAMELSON LE, BOLEN JB. Signal transduction through the CD4 receptor involves the activation of the internal membrane tyrosine-protein kinase p56 lck. *Nature* 1991; **350**: 62–66.
- [73] WATERHOUSE P, MARENGERE LE, MITTRUCKER H-W, MAK TW. CTLA-4, a negative regulator of T-lymphocyte activation. *Immunol Rev* 1996; **53**: 183–207.
- [74] WEISS A, LITTMAN DR. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 1994; **76**: 263–274.
- [75] WEISSMAN AM. The T cell antigen receptor: a multisubunit signaling complex. *Chem Immunol* 1994; **59**: 1–18.
- [76] WINGREN AG, PARRA E, VARGA M, KALLAND T, SJOGREN HO, HEDLUND G, DOHLSTEN M. T cell activation pathways: B7, LFA-3 and ICAM-1 shape unique T cell profiles. *Crit Rev Immunol* 1995; **15**: 235–253.
- [77] ZENNER G, ZUR HAUSER JD, BURN P, MUSTELINT. Towards unraveling the complexity of T cell signal transduction. *BioEsseys* 1995; **17**: 967–975.
- [78] ZHAO Q, WEISS A. Enhancement of lymphocyte responsiveness by a gain-of-function mutation of ZAP-70. *Mol Cell Biol* 1996; **16**: 6765–6774.

*Redaktor prowadzący – Maciej Zabel*

*Otrzymano: 07.04. 1999 r.*

*Przyjęto: 17.05. 1999 r.*

*Adres autorów: 53-114 Wrocław, ul. R. Weigla 12*



## CYKLOOKSYGENAZY, NIESTEROIDOWE LEKI PRZECIWZAPALNE I RAKI JELITA GRUBEGO – CZĘŚĆ I

### CYCLOOXYGENASES, NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS AND COLON CANCERS – PART I

Rafał KAMIŃSKI, Katarzyna KOZAR, Jakub GOŁĄB\*

Zakład Immunologii, Instytut Biostruktury, Akademia Medyczna w Warszawie

*Streszczenie:* W ciągu ostatnich 30 lat pojawiło się wiele publikacji, z których wynika, że jednym z ważnych etapów w procesie transformacji nowotworowej w obrębie przewodu pokarmowego, a szczególnie jelita grubego, jest zwiększenie ekspresji indukowalnego enzymu uczestniczącego w produkcji prostaglandyn – cyklooksygenazy-2 (COX-2). Chociaż mechanizm tej zwiększonej ekspresji nadal nie został całkowicie wyjaśniony, to fakt, iż w kolejnych stadiach progresji raków jelita grubego dochodzi do coraz większego stężenia COX-2 oraz prostaglandyn w guzach, skłonił badaczy do zastosowania blokujących ten enzym niesteroidowych leków przeciwzapalnych w celu sprawdzenia ich potencjalnego wpływu chemoprewencyjnego. Obecnie wiadomo, że leki z tej grupy zapobiegają powstawaniu nowotworów przewodu pokarmowego u zwierząt doświadczalnych, którym podano karcinogeny chemiczne. Leki te są również efektywne w zmniejszaniu liczby i rozmiarów polipów w modelach zwierzęcych oraz u ludzi z rodzinną gruczolakowatością polipową. Istnieją również obserwacje, z których wynika, że niesteroidowe leki przeciwzapalne zmniejszają częstość występowania oraz śmiertelność z powodu nowotworów jelita grubego u ludzi. W pracy tej, podzielonej na dwie części, opisano, w jaki sposób może dochodzić do zwiększenia ekspresji COX-2 w komórkach nowotworowych i w jakich mechanizmach ta zwiększona ekspresja ułatwia progresję nowotworów (część I). Podsumowano również wyniki opublikowanych dotychczas obserwacji epidemiologicznych i klinicznych oraz podjęto próbę wyjaśnienia potencjalnych mechanizmów przeciwnowotworowego działania niesteroidowych leków przeciwzapalnych (część II).

(*Postępy Biologii Komórki*, 1999; 26: 651–666)

*Słowa kluczowe:* cyklooksygenaza, rak jelita grubego, niesteroidowe leki przeciwzapalne

\*Jakub Gołąb jest stypendystą Fundacji Na Rzecz Nauki Polskiej.

*Summary:* During the last 30 years numerous reports implicating a potential involvement of inducible prostaglandin synthase – cyclooxygenase-2 (COX-2) and prostaglandins in the neoplastic transformation, especially of gastrointestinal tract, have been published in the literature. Although the exact mechanism of increased COX-2 and prostaglandins expression in tumor cells are still contentious and highly speculative these have nonetheless prompted the evaluation of potential chemopreventive efficacy of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. These drugs proved chemopreventive activity in laboratory animals that received chemical carcinogens and were also effective in reducing the size and number of polyps in animal models and in humans with familial adenomatous polyposis. Numerous reports reveal that nonsteroidal anti-inflammatory drugs are also capable of reducing the incidence of and mortality from large bowel tumors. In this two part review the potential mechanisms of increased tumor expression of COX-2 and how this increased expression might facilitate the progression of malignancy are discussed (part I). The results of epidemiologic and clinical trials together with the mechanisms of antitumor action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs are summarized in part II.

*(Advances in Cell Biology 1999; 26: 651–666)*

*Key words:* cyclooxygenase, colon cancer, nonsteroidal anti-inflammatory drugs

## WPROWADZENIE

W relatywnie krótkim czasie przeprowadzono setki badań klinicznych, oceniających chemoprewencyjne działanie wielu substancji. Większość z nich to niekontrolowane badania kliniczne, źle zaplanowane i wynikające najprawdopodobniej z ogromnego zaangażowania badaczy, którzy za wszelką cenę chcieli jak najszybciej zwrócić uwagę na potencjalną skuteczność własnych hipotez. Niejednokrotnie skutek był zupełnie odwrotny do zamierzonego – nieprawidłowo zaplanowane i w rzeczywistości nie zawsze skuteczne schematy chemoprewencji przyćmiły wyniki solidnie przeprowadzonych badań, w których zaobserwowano nieznaczny, ale istotny, korzystny efekt chemoprewencyjny. W ciągu ostatnich 20 lat pojawiło się wiele publikacji, z których wynika, że niesteroidowe leki przeciwzapalne zmniejszają, nawet o 50%, częstość powstawania oraz umieralność z powodu nowotworów przewodu pokarmowego. Chociaż nadal nie możemy być w 100% pewni skuteczności prewencyjnego działania tych leków, wyniki eksperymentów *in vitro*, wyniki badań na zwierzętach doświadczalnych oraz obserwacje kliniczne, wydają się zachęcać nawet największych sceptyków do regularnego przyjmowania niesteroidowych leków przeciwzapalnych, takich jak: kwas acetylosalicylowy, piroksykam, sulindak, indometacyna, ibuprofen.

### 1. GŁÓWNE ZASTOSOWANIA I MECHANIZM DZIAŁANIA NIESTEROIDOWYCH LEKÓW PRZECIWPALNYCH

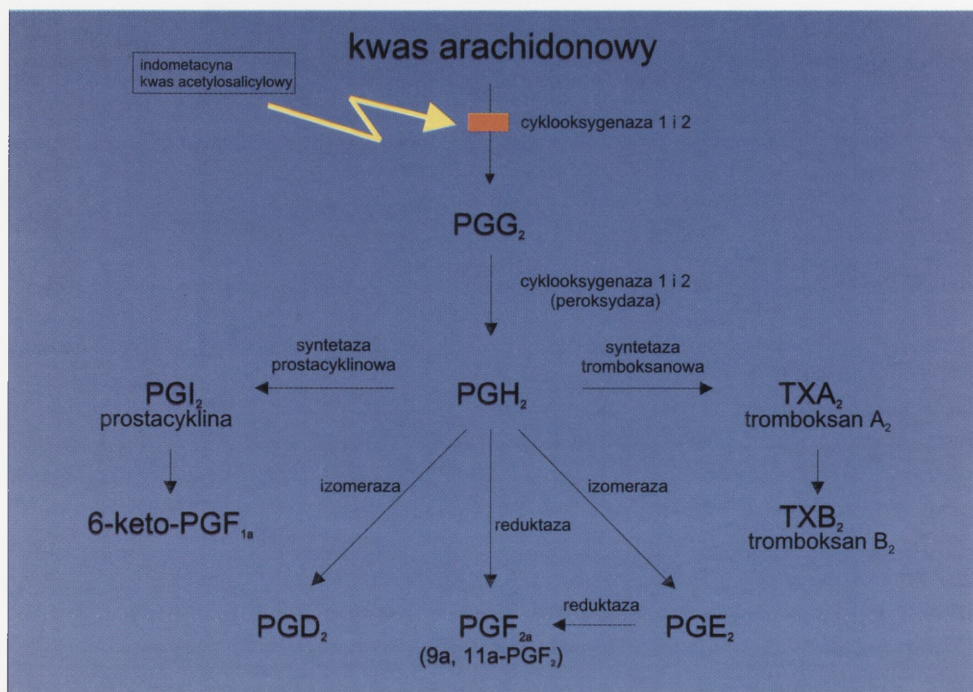
W 1883 roku niemiecki koncern Bayer rozpoczął produkcję nowego leku o właściwościach przeciwbólowych i przeciwzapalnych – kwasu acetylosalicylowego, znanego do dziś pod nazwą Aspirin. Inicjatorem pomysłu był jeden z pracowników koncernu, chemik Felix Hoffman, który w trosce o stan zdrowia ojca, cierpiącego

z powodu reumatoidalnego zapalenia stawów zainteresował swoim projektem potężną firmę farmaceutyczną. Od tego czasu rozpoczęła się era niesteroidowych leków przeciwzapalnych.

Oprócz kwasu acetylosalicylowego w powszechnym użyciu w leczeniu infekcji grypopodobnych oraz stanów zapalnych znajdują się również inne leki z tej potężnej grupy: sulindak, naproksen, ibuprofen, piroksykam i wiele innych. Niektóre z nich znalazły również inne zastosowania. Obecnie kwas acetylosalicylowy jest niezbędnym lekiem w terapii choroby niedokrwiennej serca [18]. Otrzymują go chorzy z wszczepami wewnątrznaczyniowymi i po operacjach wymiany zastawki serca [3]. Indometacynę stosują neonatolodzy u dzieci z przetrwałym przewodem tętniczym Botala [14], natomiast położnicy wykorzystują działanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych w celu zahamowania przedwczesnych skurczów macicy u kobiet w ciąży [33]. Bardzo obiecująca wydaje się również profilaktyka choroby Alzheimera przy użyciu niesteroidowych leków przeciwzapalnych [1, 31, 52].

Chociaż kwas acetylosalicylowy był z powodzeniem stosowany przez prawie sto lat, dopiero w 1971 roku Vane powiązał terapeutyczny efekt tego leku z hamowaniem biosyntezy prostaglandyn. Wraz z rozwojem możliwości badawczych i diagnostycznych pojawiało się coraz więcej doniesień o molekularnych zasadach działania niesteroidowych leków przeciwzapalnych. W latach osiemdziesiątych udowodniono hamowanie przez niesteroidowe leki przeciwzapalne enzymu, zwanego syntetazą prostaglandyn lub cyklooksygenazą (COX) [53]. Prostaglandyny (PG), substancje o właściwościach hormonalnych, działające parakrynnie, powstają z dwudziestowęglowego kwasu arachidonowego (rys. 1) – składnika błony komórkowej i pełnią w organizmie wiele funkcji. Uczestniczą w regulacji gospodarki wodno-elektrolitowej, napięcia ścian naczyń krwionośnych oraz produkcji cytokin przez makrofagi [10,61]. Są mediatorami w procesie owulacji, ułatwiają pęknięcie dojrzałego pęcherzyka jajnikowego przy wzroście lutropiny; umożliwiają utrzymanie ciąży i prawidłowy przebieg porodu pobudzając skurcze mięśniówki gładkiej [10, 28]. Prostaglandyny działają cytoprotekcyjnie na śluzówkę żołądka, a ich niedobór jest jednym z czynników ryzyka choroby wrzodowej [10]. Uczestniczą również w procesach zapalnych i przekazywaniu nerwowym [10]. Z ich obecnością w ośrodkowym układzie nerwowym wiąże się występowanie takich objawów infekcji, jak: gorączka i ból [10]. Prostaglandyny stymulują dojrzewanie prekursorów osteoblastów i osteoklastów, regulując równowagę między procesami resorpcji i odbudowy kości. Tromboksany, których bogatym źródłem są płytki krwi, działają silnie kurcząc na naczynia krwionośne odgrywając znaczącą rolę w procesie krzepnięcia krwi. Prostacyklina (PGI<sub>2</sub>), uwalniana przede wszystkim z komórek śródbłonna, hamuje agregację płytek i rozkurcza naczynia [10].

W organizmie funkcjonują dwie izoformy cyklooksygenaz. Pierwsza, zwana konstytutywną (cCOX lub COX-1), występuje niemal we wszystkich typach komórek [59]. Druga – indukowalna forma enzymu (iCOX lub COX-2) wykrywana jest



RYSUNEK 1. Szlak przemian kwasu arachidonowego, skróty: PGG<sub>2</sub> i PGH<sub>2</sub> – prekursorzy prostaglandyn, prostacyklin i tromboksanów; PGD, PGF, PGE – prostaglandyny D, F i E; PGI<sub>2</sub> – prostacyklina; TX – tromboksan

w nielicznych narządach, na przykład w żołądku [20], nerce [17] i mózgu [4, 5]. Znaczne ilości COX-2 można wykryć w komórkach, na które działają odpowiednie bodźce, między innymi: czynniki wzrostu (TGFβ, TGFα, EGF, FGF, PDGF, ECGF), cytokiny (IL-1β, IL-1α, IL-3, IL-6, IL-10, TNF-α, IFN-γ), hormony (LH, FSH, noradrenalina, parathormon), mitogeny (LPS, estry forbolu) oraz serotonina i endotelina [10, 19, 50]. Synteza COX-2 ulega natomiast zahamowaniu pod wpływem IL-4, IL-10 i glikokortykosteroidów [10]. Cyklooksygenaza-1 warunkuje utrzymanie odpowiedniego poziomu prostaglandyn niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania tkanek i narządów. Natomiast wysokie stężenia formy indukowalnej towarzyszą przede wszystkim stanom zapalnym i chorobom nowotworowym. Obie izoformy różnią się wrażliwością na niesteroidowe leki przeciwzapalne. Niektóre leki z tej grupy są nieselektywnymi inhibitorami cyklooksygenaz o dużo większym powinowactwie do COX-1 niż do COX-2. Wśród nich można wymienić kwas acetylosalicylowy, sulindak, piroksydam, indometacynę, diklofenak. U około 25% chorych, przewlekłe stosujących te leki, obserwuje się efekty uboczne, a u 5% występują groźne dla zdrowia powikłania – nefrotoksyczność, hepatotoksyczność, powstawanie owrzodzeń w przewodzie pokarmowym, a nawet encefalopatie [10].

TABELA 1. Wybrane selektywne i nieselektywne inhibitory COX-2

Inhibitor cyklooksygenaz	IC <sub>50</sub> COX-1 [μM]	IC <sub>50</sub> COX-2 [μM]	IC <sub>50</sub> COX-1/COX-2
<b>Selektywne inhibitory COX-2</b>			
NS-398	16,8	0,1	0,006
Flosulid	>72,3	0,015	0,0002
PD 164387	>100	0,14	0,001
DuP 697	0,8	0,01	0,01
SC-58125	>100	0,09	0,007
SC-58635 (Celecoxib)	13	0,04	0,003
SC-558	17	0,009	0,0005
DFU	50	0,04	<0,001
Meloksikam	4,8	0,43	0,09
Nimesulid	9,2	0,52	0,06
Etodolak	34	3,4	0,1
L-745, 337	369	1,5	0,004
<b>Nieselektywne inhibitory</b>			
Piroksykam	0,0005	0,3	600
Indometacyna	0,028	1,68	60
Diklofenak	1,57	1,1	0,7
Kwas acetylosalicylowy	1,67	278	166

Toksyczność ta wynika głównie z blokowania COX-1. Skłoniło to do poszukiwań selektywnych inhibitorów cyklooksygenazy-2, do których zaliczamy między innymi: nimesulid, meloksikam, etodolak, SC58125, NS398, celecoxib [36]. Te leki nie hamują COX-1 w tak znacznym stopniu jak leki poprzedniej generacji, ale należy wspomnieć, że dotychczas nie udało się zsyntezować substancji hamującej tylko COX-2 i nie wpływającej na aktywność COX-1 (tab. 1) [29, 60].

## 2. RAKI JELITA GRUBEGO

Raki jelita grubego są w krajach wysoko rozwiniętych drugą pod względem częstości przyczyną zgonu z powodu nowotworów. Są natomiast najczęstszą przyczyną zgonów, jeśli wyeliminowane zostaną raki powstające w wyniku palenia papierosów. W krajach wysoko rozwiniętych do 70 roku życia nowotwór jelita grubego powstaje u 50% osób, a u 1 na 10 spośród nich ulega on złośliwieniu. W około 15% przypadków rak jelita grubego ma podłoże dziedziczne (tab. 2).

Większość zmian złośliwych rozwija się na podłożu istniejących gruczolaków okrężnicy i odbytnicy [45]. Obecnie wiadomo o co najmniej dwóch jednostkach chorobowych – polipowatość gruczolakowata rodzinna (ang. *familial adenomatous*

TABELA 2. Ryzyko powstania raka jelita grubego w przeciągu całego życia osobnika

	Ryzyko powstania raka jelita grubego
Ogólna populacja	1 : 20 do 1 : 50
Jedna osoba w rodzinie w wieku > 45 lat*	1 : 17
Jedna osoba w rodzinie w wieku < 45 lat*	1 : 10
Dwie osoby w rodzinie*	1 : 6
Trzy osoby w rodzinie*	1 : 2

\*Dotyczy krewnych I stopnia (na podstawie [24])

*polyposis* – FAP) i dziedziczna niepolipowata skłonność do powstawania raków okrężnicy (ang. *hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma* – HNPCC), które predysponują do powstawania raka [23].

HNPCC dziedziczy się w sposób autosomalny dominujący. Charakteryzuje się występowaniem licznych przypadków raka okrężnicy u członków jednej rodziny. W zespole nie stwierdza się polipów przewodu pokarmowego. Zmiany nowotworowe pojawiają się u ludzi w młodym wieku (poniżej 45 roku życia) i są zlokalizowane przede wszystkim w części proksymalnej jelita grubego [22, 30, 43]. U chorych z HNPCC obserwuje się również zwiększone ryzyko wystąpienia innych nowotworów, przede wszystkim błony śluzowej macicy, jajnika, żołądka, dróg moczowych, jelita cienkiego i pęcherzyka żółciowego [6]. Przyczyną choroby jest defekt w obrębie genów kodujących enzymy niezbędne do naprawy błędów poreplikacyjnych (*mismatch repair*) [22, 30, 43].

FAP jest również chorobą autosomalną, dziedziczącą się w sposób dominujący. Przeciętnie występuje z częstością 1 na 7000 osób [22]. U chorych w obrębie całego przewodu pokarmowego powstaje ogromna liczba (nawet około tysiąca!) polipów. Przyczyna zespołu tkwi w mutacji jednego allelu genu APC (ang. *adenomatous polyposis coli*) [39]. Osoba z pojedynczym defektem genu odziedziczonym od rodziców niekoniecznie choruje na raka. Znajduje się natomiast w grupie zwiększonego ryzyka w porównaniu z resztą populacji. Niezbędna do inicjacji procesu nowotworowego jest somatyczna mutacja drugiego, dotąd prawidłowego, allelu [24].

Nie leczona polipowata gruczolakowatość rodzinna nieuchronnie prowadzi do powstania raka jelita grubego. W tej chwili leczenie sprowadza się do całkowitego usunięcia okrężnicy (kolektomia) i połączenia jelita krętego z odbytnicą. Chorzy przez długi czas pozostają pod obserwacją, aby ewentualnie wcześniej wykryć nowe polipy i raka. Odnotowano, że u 1/3 pacjentów po kolektomii dochodzi do całkowitej, spontanicznej regresji polipów końcowego odcinka jelita grubego. Mimo to zabieg chirurgiczny nie znosi ryzyka ewentualnej transformacji nowotworowej. Wiadomo, że u pacjentów z FAP dochodzi do przyspieszenia proliferacji i przesunięcia się

obszaru rozrodczego komórek krypt jelitowych wyżej (z ang. *aberrant crypt foci*), co koreluje z możliwością rozwoju raka.

Mutacja w obrębie genu APC nie jest jedyną, niezbędną do transformacji nowotworowej zmianą w obrębie genomu komórki. Zaobserwowano, że aby komórka uległa przekształceniu w nowotworową, musi „uzbierać” kilka dodatkowych mutacji, w obrębie innych genów supresji nowotworowej oraz w obrębie protoonkogenów. Z obserwacji epidemiologicznych wynika, że z reguły liczba tych mutacji wynosi od 6 do 11 (rys. 2).

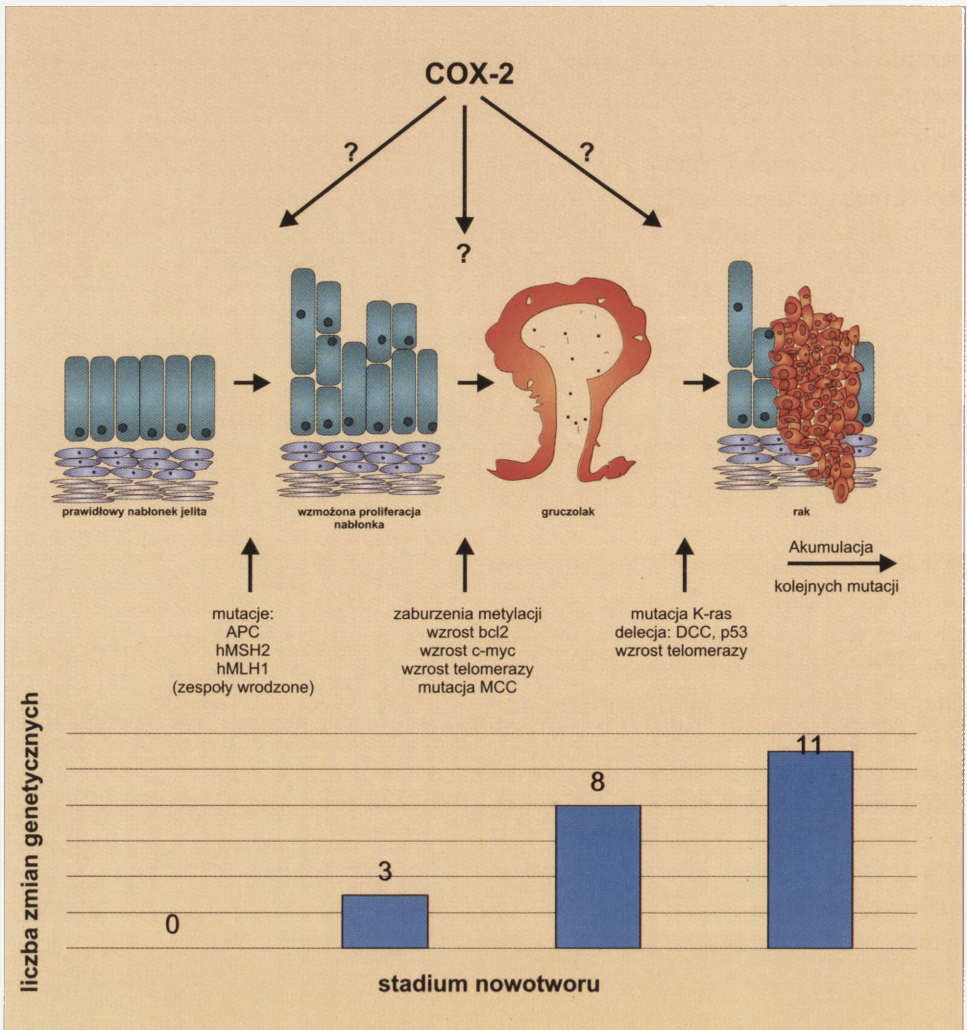
### 3. CYKLOOKSYGENAZY W RAKACH JELITA GRUBEGO

Szereg danych wskazuje, że istnieje związek między zwiększonymi: stężeniem i aktywnością cyklooksygenaz a zaawansowaniem wzrostu raków jelita grubego. Już w latach siedemdziesiątych zaobserwowano większe stężenie PGE<sub>2</sub> w wycinkach pobranych z guzów przewodu pokarmowego niż w otaczającej te guzy prawidłowej śluzówce jelit [2]. Nieco później zwrócono uwagę na to, że w naczyniach żylnych, drenujących okolice nowotworów przewodu pokarmowego stężenie PGE<sub>2</sub> jest znacznie większe niż we krwi tętniczej dopływającej do guzów oraz że stężenie to jest tym większe, im bardziej inwazyjny jest nowotwór [35]. W tabeli 3 przedstawiono stężenia prostaglandyn w poszczególnych stadiach rozwoju raków jelita grubego.

Równoległe ze wzrostem stężenia prostaglandyn, rośnie stężenie COX-2 w guzach nowotworowych (tab. 3). W większości wypadków towarzyszy temu spadek stężenia COX-1. Obserwacje te mogą mieć ogromne implikacje kliniczne, bowiem sugerują możliwość zastosowania selektywnych inhibitorów COX-2 w prewencji, a być może również w terapii nowotworów jelita grubego [27, 46].

TABELA 3. Stężenia PGE<sub>2</sub>, COX-2 i bcl-2 w poszczególnych stadiach rozwoju raka jelita grubego

Źródło	Stężenie PGE <sub>2</sub> [pg/mg tkanki]	Stężenie COX-2	Stężenie bcl-2
Śluzówka jelita grubego	147	Norma	Norma
Polip	165	↑	↑
Gruzołak	227	↑ ↑	↑ ↑
Rak	440	↑ ↑ ↑	↑ ↑ ↑



RYSUNEK 2. Schemat przedstawiający etapy transformacji nowotworowej w jelicie grubym; progresja nowotworowa wiąże się z powstawaniem w komórkach kolejnych zmian genetycznych (mutacji); inwazyjny rak wywodzący się z jelita grubego ma od 6 do 11 takich zmian genetycznych; nie wiadomo, w którym momencie dochodzi do zwiększenia produkcji COX-2

#### 4. W JAKI SPOSÓB DOCHODZI DO INDUKCJI CYKLO-OKSYGENAZY-2?

Nadal nieznanym jest mechanizm zwiększonej produkcji COX-2 w komórkach nowotworowych. Wzrost stężenia cyklooksygenazy-2 w nowotworach koreluje ze stopniem zaawansowania tych zmian. COX-2 można wykryć w około 43% gru-



czolaków oraz w 86% raków jelita grubego [11]. Choć dotychczas nie określono precyzyjnie, w którym momencie, w przebiegu transformacji w obrębie komórek nabłonkowych jelita grubego, dochodzi do zwiększenia produkcji COX-2, wiele wskazuje, że jest to zjawisko wtórne do mutacji na przykład w APC albo w obrębie innych protoonkogenów lub genów supresorowych nowotworów. Niewykluczone jest również, że nabycie przez komórki nowotworowe zdolności do zwiększonej syntezy COX-2 jest jednym z kluczowych etapów transformacji w obrębie jelita grubego. Potwierdzają to obserwacje u myszy Min/+, będących modelem występującego u ludzi zespołu FAP (patrz niżej). Myszy Min/+, nie mają jednego allelu APC (APC<sup>Δ716/+</sup>). Jeśli dodatkowo myszom tym wyłączono jeden lub oba allele genu kodującego COX-2, zaobserwowano znaczne zmniejszenie liczby polipów w przewodzie pokarmowym (tab. 4).

Zaobserwowano, że pobudzenie komórek przez TGF- $\alpha$  prowadzi do indukcji genu kodującego COX-2 [8]. Podobnie działa szereg innych czynników wzrostu, cytokin i hormonów [51], hipoksja [47], niektóre promotory nowotworowe [51] oraz sole kwasów żółciowych [62]. Wszystkie te czynniki działają jednak na komórki przejściowo i nadal nie ma ścisłych danych wskazujących na to, czy zwiększona ekspresja genów kodujących COX-2 jest wynikiem nieustannego działania wymienionych substancji czy też wynika z trwałego nabycia (na przykład w wyniku określonej mutacji) zdolności do zwiększonej produkcji tego enzymu. Na potwierdzenie tej ostatniej hipotezy zaobserwowano, że transfekcja komórek nabłonkowych pochodzących z jelita grubego genem kodującym zmutowany *H-ras* prowadzi do 9-krotnego zwiększenia w tych komórkach mRNA dla COX-2 i 12-krotnego zwiększenia stężenia enzymu [48].

TABELA 4. Wpływ delecji jednego lub obu alleli COX-2 na liczbę spontanicznie powstających polipów u myszy Min/+, liczbę polipów oceniano w 10 tygodniu życia

Fenotypy myszy	Liczba polipów	% redukcji względem myszy Min/+
APC <sup>Δ716/+</sup> /COX-2 <sup>+/+</sup>	652±198	–
APC <sup>Δ716/+</sup> /COX-2 <sup>+/-</sup>	224±123	66
APC <sup>Δ716/+</sup> /COX-2 <sup>-/-</sup>	93±98	86

## 5. W JAKI SPOSÓB CYKLOOKSYGENAZY SPRZYJAJĄ POWSTAWANIU NOWOTWORÓW?

Skoro nabycie zdolności do zwiększonej produkcji COX-2 wydaje się być ważnym etapem w procesie transformacji nowotworowej warto zadać pytanie, w jaki sposób zdolność ta może przyczyniać się do powstawania nowotworów.

Po pierwsze, COX-2 może przekształcać nieaktywne prokarcinogeny do aktywnych pochodnych, wiążących się z DNA i indukujących mutacje. Jak już wspomniano (rys. 1), cyklooksygenazy mają dwie aktywności katalityczne. Podczas gdy aktywność cyklooksygenazowa jest w miarę swoista wobec kwasu arachidonowego, okazuje się, że aktywność peroksydazowa jest nieselektywna [25]. Obok PGG, cyklooksygenazy redukują szereg innych związków hydroperoksydowych. W reakcjach tych donorem elektronów mogą być między innymi: policykliczne wodorowęglany aromatyczne, aflatoksyny, halogenowane pestycydy, aminy aromatyczne i fenole, które ulegają aktywacji [13]. Dość istotne jest to, że wiele spośród wymienionych prokarcinogenów znajduje się w pożywieniu. W nieobecności cyklooksygenaz zostałyby one wydalone z organizmu w postaci nieaktywnej.

Innym karcinogenem powstającym w wyniku działania cyklooksygenaz jest malonyldialdehyd (MDA) – produkt degradacji PGH<sub>2</sub> [25]. Im większa aktywność cyklooksygenaz, tym większa produkcja PGH i tym większe stężenie MDA w tkance.

Wreszcie ostatni mechanizm prokarcinogennego działania cyklooksygenaz może polegać na powstawaniu rodników peroksydowych w wyniku peroksydacji lipidów [25]. Rodniki peroksydowe są niezwykle stabilne w porównaniu z innymi rodnikami tlenowymi i mają wybitną łatwość dyfuzji [25]. Mogą one epoksydować podwójne wiązania szeregu prokarcinogenów, takich jak: dihydroksy-dibenzantracen i benzapiren-8,8-diol, które następnie indukują mutacje DNA [25].

Szereg danych wskazuje również, że prostaglandyny mogą działać bezpośrednio na komórki nowotworowe lub na niestransformowane kolonocyty, pobudzając ich proliferację. Na przykład PGE<sub>2</sub> zwiększa proliferację komórek nowotworowych wywodzących się z gruczołaków jelita grubego – HT-29 i SW1116 [40]. Podany myszom stabilny metabolit PGE<sub>2</sub> – dimetylo-PGE<sub>2</sub> prawie 4-krotnie zwiększa proliferację kolonocytów [40]. Jeśli prostaglandyny, produkowane lokalnie przez komórki nowotworowe, mogą pobudzać proliferację, to zmniejszenie produkcji prostaglandyn przez niesteroidowe leki przeciwzapalne powinno tę proliferację zmniejszyć. Zgodnie z tymi założeniami szereg nieselektywnych inhibitorów cyklooksygenaz, takich jak: kwas acetylosalicylowy, indometacyna, sulindak, pirokсыkam, naproksen oraz selektywnych inhibitorów COX-2 (NS-398, MF-tricyclic, nimesulid), zmniejsza proliferację komórek nowotworowych, zatrzymując je w fazie G1 cyklu [12, 49]. Nieoczekiwanie leki te mogą niekiedy hamować proliferację

komórek nowotworowych nie mających cyklooksyzgenaz i nie produkujących prostaglandyn [16]. Ponadto, dodanie prostaglandyn do hodowli komórek zatrzymanych w fazie G1 cyklu w wyniku działania indometacyny nasila, a nie znosi efekt antyproliferacyjny (mimo że prostaglandyny samodzielnie działały mitogenicznie na komórki nowotworowe!) [9].

Zwiększonej produkcji cyklooksyzgenaz towarzyszy zwiększenie siły adhezji do białek macierzy pozakomórkowej. Komórki nabłonka jelitowego szczura RIE-S (*rat intestinal epithelium*) transfekowane genem dla COX-2 mogą przykleić się i rosnać na podłożu matrygelowym (mieszanka białek macierzy pozakomórkowej) i są odporne na proapoptotyczne działanie kwasu masłowego [56]. Takich właściwości nie mają komórki dzięki tej linii. Im większe stężenie w komórkach nowotworowych COX-2, tym mniejsze stężenie antyapoptotycznego białka bcl-2 i receptora dla TGF- $\beta$ 2 [56]. Ekspresji genu dla COX-2 towarzyszy również brak kadheryny E [56]. Wprowadzenie do komórek nowotworowych wywodzących się z jelita grubego genu kodującego COX-2 zwiększa wydzielanie przez te komórki metaloproteinaz 2 i 9 [57] oraz szeregu czynników pobudzających angiogenezę (VEGF, bFGF, PDGF, TGF- $\beta$ , NO, endotelina-1) [58].

Produkt cyklooksyzgenaz – PGE<sub>2</sub> działa supresyjnie na układ odpornościowy. Zmniejsza między innymi aktywność komórek NK, LAK i cytotoksycznych limfocytów T, hamuje proliferację tych komórek redukując liczbę receptorów dla IL-2 [37].

Dane te wskazują zatem, że obecność COX-2 jest jednym z kluczowych etapów, umożliwiających uzyskanie przez komórki nowotworowe cech pełnej złośliwości: zwiększona proliferacja, uniknięcie apoptozy i anoikis (wzrost niezależny od przylegania do podłoża), utrata adhezji do komórek sąsiadujących (utrata kadheryny E), pobudzenie angiogenezy, bez której guz nie może urosnąć większy niż 2–3 mm<sup>3</sup>, naciekanie tkanek (wydzielanie metaloproteinaz), dawanie przerzutów (zmniejszone wydzielanie prostacyklin i wzrost aktywności prokoagulacyjnej) i wreszcie uniknięcie swoistej odpowiedzi odpornościowej.

## 6. CHEMOPREWENCYJNE DZIAŁANIE NIESTEROIDOWYCH LEKÓW PRZECIWPALNYCH – OBSERWACJE U ZWIERZĄT DOŚWIADCZALNYCH

W ciągu ostatnich 20 lat opublikowano wiele prac, w których opisano prewencyjne działanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych w modelach zwierzęcych, w których nowotwory indukowano karcinogenami chemicznymi. Prawie we wszystkich badaniach obserwowano silne i trwające wiele tygodni po ukończeniu terapii działanie tych leków. Autorom udało się odnaleźć zaledwie jedną pracę, w której efekt chemo-

prewencyjny obserwowano tylko w okresie podawania zwierzętom niesteroidowych leków przeciwzapalnych [32], jedną publikację, w której nie wykazano protekcyjnego działania tych leków oraz jedną, w której zaobserwowano wzmocnienie promocyjnego wpływu karcinogenu na powstawanie raka skóry [15].

Jednym z najczęściej stosowanych karcinogenów chemicznych, indukujących nowotwory przewodu pokarmowego jest azoksymetan (AOM). Regularnie, 52 tygodnie po dwukrotnym podaniu 15 mg/kg AOM, u 80% zwierząt doświadczalnych powstają raki okrężnicy. Najczęściej są to nieinwazyjne gruczolakoraki (około 60%), ale u wielu myszy (30–40%) obserwowane są niezwykle złośliwe raki. Często powstaje więcej niż jedna zmiana nowotworowa. Kilka niesteroidowych leków przeciwzapalnych (piroksykam, indometacyna, kwas acetylosalicylowy, ibuprofen, sulindak oraz selektywne inhibitory COX-2: celecoksib, NS398, nimesulid) zmniejsza częstość występowania i liczbę zmian nowotworowych u zwierząt, które otrzymały AOM [21, 41, 38]. Sulindak działa prewencyjnie nawet wówczas, gdy jest podawany aż 14 tygodni po podaniu szczurom karcinogenu [41]. Niesteroidowe leki przeciwzapalne zmniejszają także częstość występowania nowotworów przewodu pokarmowego, indukowanych innymi karcinogenami, takimi jak: 1,2-dimetylohydrazyna, metylnitrozomocznik oraz metyloazoksymetanol (tab. 5).

TABELA 5. Podsumowanie badań, w których udokumentowano chemoprewencyjne działanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych

NLPZ	Karcinogen	Zwierzę	Rok	Pozycja literatury
Piroksykam	MAM	Szczur	1983	[48]
Piroksykam	MNU	Szczur	1984	[45]
Piroksykam	AOM	Szczur	1987	[53]
Piroksykam	AOM	Szczur	1991	[51]
Piroksykam	AOM	Szczur	1996	[43]
Kwas acetylosalicylowy	DMH	Szczur	1992	[10]
Kwas acetylosalicylowy	AOM	Szczur	1993	[55]
Sulindak	DMH	Mysz	1988	[35]
Sulindak	AOM	Szczur	1995	[50]
Sulfon sulindaku	AOM	Szczur	1997	[44]
Kwas meklofenamowy	DMH	Szczur	1984	[34]
Indometacyna	MAM	Szczur	1980	[25]
Indometacyna	DMH	Szczur	1980	[46]
Indometacyna	MNU	Szczur	1983	[41]
Indometacyna	DMH	Szczur	1983	[47]
Indometacyna	MNU	Szczur	1984	[37]
Calecoksib (SC-58635)	AOM	Szczur	1996	[56]
Calecoksib (SC-58635)	AOM	Szczur	1998	[23]

Skróty karcinogenów: AOM – azoksymetan, DMH – 1,2-dimetylohydrazyna, DMN – dimetylonitrozoamina, MAM – metyloazoksymetanol, MNU – *N*-metylo-*N*-nitrozomocznik

Warto również dodać, że niesteroidowe leki przeciwzapalne skutecznie zapobiegają powstawaniu wielu innych nowotworów indukowanych karcinogenami chemicznymi. Efekt chemoprewencyjny zaobserwowano w wypadku raków: przełyku [25, 54], wątroby [55], płuc [44], sutka [34], skóry [26] i pęcherza moczowego [42]. Niektóre niesteroidowe leki przeciwzapalne zmniejszają również ryzyko powstawania raków jelita grubego po napromieniowaniu [36].

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ANDERSEN K, LAURENT LJ, OTT A, HOES AW, BRETELER MM, HOFMAN A. Do nonsteroidal anti-inflammatory drugs decrease the risk of Alzheimer's disease? The Rotterdam study. *Neurology* 1995; **45**: 1441–1445.
- [2] BENNETT A, DEL TACCA M, STAMFORD IF, ZEBRO T. Prostaglandins from tumors of human large bowel. *Brit J Cancer* 1977; **35**: 881–884.
- [3] BLOMBACK M, KRONLUND P, ABERG B, FATAH K, HANSSON LO, EGBERG N, MOOR E, CARLSSON K. Pathologic fibrin formation and cold-induced clotting of membrane oxygenators during cardiopulmonary bypass. *J Cardiothoracic Vasc Anesth* 1995; **9**: 34–43.
- [4] BREDER CD, DEWITT D, KRAIG RP. Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. *J Comp Neurol* 1995; **355**: 296–315.
- [5] BREDER CD, SAPER CB. Expression of inducible cyclooxygenase mRNA in mouse brain after systemic administration of bacterial lipopolysaccharide. *Brain Res* 1996; **713**: 64–69.
- [6] BURKE W, PETERSEN G, LYNCH P, BOTKIN J, DALY M, GARBER J, KAHN M, MCTIERNAN A, OFFIT K, THOMPSON E, VARRICCHIO C. Recommendations for Follow-up Care of Individuals With an Inherited Predisposition to Cancer: I. Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer. *JAMA* 1997; **277**: 915–919.
- [7] CAIGNARD A, M. M, REISSER D, THOMAS D, MARTIN F. Effects of cimetidine and indomethacin on the growth of dimethylhydrazine-induced or transplanted intestinal cancer in the rat. *Brit J Cancer* 1984; **50**: 661–665.
- [8] COFFEY RJ, HAWKEY CJ, DAMSTRUP L, GRAVES-DEAL R, DANIEL VC, DEMPSEY PJ, CHINERY R, KIRKLAND SC, DUBOIS RN, JETTON TL, MORROW JD. Epidermal growth factor receptor activation induces nuclear targeting of cyclooxygenase-2, basolateral release of prostaglandins, and mitogenesis in polarizing colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 657–662.
- [9] DEMELLO MCF, BAYER BM, BEAVAN MA. Evidence that prostaglandins do not have a role in a cytostatic action of antiinflammatory drugs. *Biochem Pharmacol* 1980; **29**: 311–318.
- [10] DUBOIS RN, ABRAMSON SB, CROFFORD L, GUPTA RA, SIMON LS, VAN DE PUTTE LB, LIPSKY PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 1998; **12**: 1063–1073.
- [11] EBERHART CE, COFFEY RJ, RADHIKA A, GIARDIELLO FM, FERRENBACH S, DUBOIS RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994; **107**: 1183–1188.
- [12] ELDER DJE, PARASKEVA C. NSAIDs to prevent colorectal cancer: a question of sensitivity. *Gastroenterology* 1997; **113**: 1999–2008.
- [13] ELING TE, D.C. T, FOUREMAN GC, CURTIS JF, HUGHES MF. Prostaglandin H synthase and xenobiotic oxidation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1990; **30**: 1–45.
- [14] FARINA A, DI LUZIO L, CARINCI P. Fetal ductus arteriosus constriction, indomethacin, and gestational age. *Am J Obstet Gynecol* 1998; **178**: 256–259.

- [15] FISCHER SM, GLEASON GL, MILLS GD, SLAGA TJ. Indomethacin enhancement of TPA tumor promotion in mice. *Cancer Lett* 1980; **10**: 343–350.
- [16] HANIF R, PITTAS A, FENG Y, KOUTSOS MI, QIAO L, STAIANO-COICO L, SHIFF LI, RIGGS B. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin-independent pathway. *Biochem Pharmacol* 1996; **52**: 237–245.
- [17] HARRIS RC, MCKANNA JA, AKAI Y, JACOBSON HR, DUBOIS RN, BREYER, MD. Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest* 1994; **94**: 2504–2510.
- [18] HENNEKENS CH. Aspirin in the treatment and prevention of cardiovascular disease. *Annu Rev Public Health* 1997; **18**: 37–49.
- [19] HERSCHMAN HR. Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1299**: 125–140.
- [20] KARGMAN S, CHARLESON S, CARTWRIGHT M, FRANK J, RIENDEAU D, MANCINI J, EVANS J, O'NEILL G. Characterization of prostaglandin G/H synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey and human gastrointestinal tracts. *Gastroenterology* 1996; **111**: 445–454.
- [21] KAWAMORI T, RAO CV, SEIBERT K, REDDY BS. Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *Cancer Res* 1998; **58**: 409–412.
- [22] KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Lessons from Hereditary Colorectal Cancer. *Cell* 1996; **87**: 159–170.
- [23] KRAJEWSKA WM, MIYNARSKI W, WÓJCIK M. Genetyczne podstawy transformacji nowotworowej jelita grubego. *Post Biol Kom* 1996; **23**: 279–298.
- [24] LEVY DB, SMITH KJ, BEAZER-BARCLAY Y, HAMILTON SR, VOGELSTEIN B, KINZLER KW. Inactivation of both APC alleles in human and mouse tumors. *Cancer Res* 1994; **54**: 5953–5958.
- [25] LEVY GN. Prostaglandin H synthases, nonsteroidal antiinflammatory drugs, and colon cancer. *Faseb J* 1997; **11**: 234–247.
- [26] LOPRINZI CL, VERMA AK. Dose and schedule of oral retinoic acid and indomethacin needed to effectively inhibit phorbol ester-induced epidermal ornithine decarboxylase activity. *Carcinogenesis* 1985; **6**: 1589–1592.
- [27] MAEKAWA M, SUGANO K, SANO H, MYIAZAKI S, USHIAM M, FUJITA S, GOTODA T, YOKOTA T, OHKURA H, KAKIZOE T, SEKIYA T. Increased expression of cyclooxygenase-2 to -1 in human colorectal cancers and adenomas, but not in hyperplastic polyps. *Jpn J Clin Oncol* 1998; **28**: 421–426.
- [28] MAJERUS PW. Prostaglandins: Critical roles in pregnancy and colon cancer. *Current Biology* 1998; **8**: R87–R89.
- [29] MARNETT LJ, KALGUTKAR AS. Design of selective inhibitors of cyclooxygenase-2 as nonulcerogenic anti-inflammatory agents. *Curr Opin Chem Biol* 1998; **2**: 482–490.
- [30] MARRA GC, BOLAND R. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes, and historical perspectives. *J Natl Cancer Inst* 1995; **87**: 1114–1125.
- [31] MCGEER PL, SCHULZER M, MCGEER EG. Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies. *Neurology* 1996; **47**: 425–432.
- [32] MOORGHEN M, INCE P, FINNEY KJ, SUNTER JP, APPLETON DR, WATSON DJ. A protective effect of sulindac against chemically-induced primary colonic tumours in mice. *J Pathol* 1988; **156**: 341–347.
- [33] MORALES WJ, MAHAV H. Efficacy and safety of indomethacin compared with magnesium sulfate in the management of preterm labor: a randomized study. *Am J Obstet Gynecol* 1993; **169**: 97–102.
- [34] MORECKI S, YACOVLEV L, SLAVIN S. Effect of indomethacin on tumorigenicity and immunity induction in a murine model of mammary carcinoma. *Int J Cancer* 1998; **75**: 894–899.

- [35] NARISAWA T, KUSAKA H, YAMAZAKI Y, TAKAHASHI M, KOYAMA H, KOYAMA K, FUKAURA Y, WAKIZAKA A. Relationship between blood plasma prostaglandin E2 and liver and lung metastases in colorectal cancer. *Dis Colon & Rectum* 1990; **33**: 840–845.
- [36] NORTHWAY MG, SCOBAY MW, CASSIDY KT, GEISINGER KR. Piroxicam decreases postirradiation colonic neoplasia in the rat. *Cancer* 1990; **66**: 2300–2305.
- [37] PARHAR RS, LARA PK. PGE2-mediated inactivation of various killer lineage cells by tumor bearing host macrophage. *J Leuk Biol* 1985; **46**: 474–484.
- [38] PIAZZA GA, ALBERTS DS, HIXSON LJ, PARANKA NS, LI H, FINN T, BOGERT C, GUILLEN JM, BRENDEL K, GROSS PH, SPERL G, RITCHIE J, BURT RW, ELLSWORTH L, AHNENDJ, PAMUKCU R. Sulindac sulfone inhibits azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats without reducing prostaglandin level. *Cancer Res* 1997; **57**: 2909–2915.
- [39] PRESCOTT SM, WHITE RL. Self-promotion? Intimate connections between APC and prostaglandin H synthase-2. *Cell* 1996; **87**: 783–786.
- [40] QIAO L, KOZONI V, TSIJULIAS GJ, KOUTSOS MI, HANIF R, SHIFF SJ, RIGAS B. Selected eicosanoids increase the proliferation rate of human colon carcinoma cell lines and mouse colonocytes *in vivo*. *Biochem Biophys Acta* 1995; **1258**: 215–223.
- [41] RAO CV, RIVENSON A, SIMI B, ZANG E, KELLOFF G, STEELE V, REDDY BS. Chemoprevention of colon carcinogenesis by sulindac, a nonsteroidal anti-inflammatory agent. *Cancer Res* 1995; **55**: 1464–1472.
- [42] RAO KVN, DETRISAC CJ, STEELE VE, HAWK ET, KELLOFF GJ, MCCORMICK DL. Differential activity of aspirin, ketoprofen and sulindac as cancer chemopreventive agents in the mouse urinary bladder. *Carcinogenesis* 1996; **17**: 1435–1438.
- [43] RHYU MS. Molecular mechanisms underlying hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1996; **88**: 240–251.
- [44] RIOUX N, CASTONGUAY A. Prevention of NKK-induced lung tumorigenesis in A/J mice by acetylsalicylic acid and NS-398. *Cancer Res* 1998; **58**: 5354–5360.
- [45] SADLER RS, GALANKO JC, MURRAY SC, HELM JF, WOOSLEY JT. Aspirin an nonsteroidal anti-inflammatory agents and risk for colorectal adenomas. *Gastroenterology* 1998; **114**: 441–447.
- [46] SANO H, KAWAHITO Y, WILDER RL, HASHIRAMOTO A, MUKAI S, ASAI K, KIMURA S, KATO H, KONDO M, HLA T. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; **55**: 3785–3789.
- [47] SCHMEDTJE JF, JI J-S, DUBOIS RN, RUNGE MS. Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF-B p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1997; **272**: 601–608.
- [48] SHENG GG, SHAO J, SHENG H, HOOTON EB, ISAKSON PC, MORROW JD, COFFEY RJ, DUBOIS RN, BEAUCHAMP RD. A selective cyclooxygenase 2 inhibitor suppresses the growth of H-ras-transformed rat intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 1997; **113**: 1883–1891.
- [49] SHIFF SJ, KOUTSOS MI, QIAO L, RIGAS B. Nonsteroidal antiinflammatory drugs inhibit the proliferation of colon adenocarcinoma cells: effects on cell cycle and apoptosis. *Exp Cell Res* 1996; **222**: 179–188.
- [50] SMITH WL, DEWITT DL. Biochemistry of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and synthase-2 and their differential susceptibility to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Seminal Nephrol* 1995; **15**: 179–194.
- [51] SMITH WL, DEWITT DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Adv Immunol* 1996; **62**: 167–213.
- [52] STEWART WF, KAWAS C, CORRADA M, METTER EJ. Risk of Alzheimer's disease and duration of NSAID use. *Neurology* 1997; **48**: 626–632.
- [53] TAKETO MM. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (Part I). *J Natl Cancer Inst* 1998; **90**: 1529–1536.

- [54] TAKETO MM. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part II). *J Natl Cancer Inst* 1998; **90**: 1609–1620.
- [55] TANAKA T, KOJIMA T, OKUMURA A, SUGIE S, MORI H. Inhibitory effect of the non-steroidal anti-inflammatory drugs, indomethacin and piroxicam on 2-acetylaminofluorene-induced hepatocarcinogenesis in male ACI/N rats. *Cancer Lett* 1993; **68**: 111–118
- [56] TSUJII M, DUBOIS RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 1995; **83**: 493–501.
- [57] TSUJII M, KAWANO S, DUBOIS RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 3336–3340.
- [58] TSUJII M, KAWANO S, TSUJI S, SAWAOKA H, HORI M, DUBOIS RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998; **93**: 705–716.
- [59] VANE JR, BAKHLE YS, BOTTING RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998; **38**: 97–120.
- [60] WALLACE JL. Selective COX-2 inhibitors: is the water becoming muddy? *Trends Pharm Sci* 1999; **20**: 4–6.
- [61] WILLIAMS JA, SHACTER E. Regulation of macrophage cytokine production by prostaglandin E2. Distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2. *J Biol Chem* 1997; **272**: 25693–25699.
- [62] ZHANG F, SABBARAMAIAH K, ALTORKIN, DANNENBERG AJ. Dihydroxy bile acids activate the transcription of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 1998; **273**: 2424–2428.

*Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak*

*Otrzymano: 29.03. 1999 r.*

*Przyjęto: 25.05. 1999 r.*

*Adres autorów: ul. Chatubińskiego 5, 02-004 Warszawa*

*E-mail: jgolab@ib.amwaw.edu.pl*



## CYKLOOKSYGENAZY, NIESTEROIDOWE LEKI PRZECIWZAPALNE I RAKI JELITA GRUBEGO – CZĘŚĆ II

### CYCLOOXYGENASES, NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS AND COLON CANCERS – PART II

Katarzyna KOZAR, Rafał KAMIŃSKI, Jakub GOŁĄB\*

Zakład Immunologii, Instytut Biostruktury, Akademia Medyczna w Warszawie

*Streszczenie:* W ciągu ostatnich 30 lat pojawiło się wiele publikacji, z których wynika, że jednym z ważnych etapów w procesie transformacji nowotworowej w obrębie przewodu pokarmowego, a szczególnie jelita grubego, jest zwiększenie ekspresji indukowalnego enzymu uczestniczącego w produkcji prostaglandyn – cyklooksygenazy-2 (COX-2). Chociaż mechanizm tej zwiększonej ekspresji nadal nie został całkowicie wyjaśniony, to fakt, iż w kolejnych stadiach progresji raków jelita grubego dochodzi do coraz większego stężenia COX-2 oraz prostaglandyn w guzach, skłonił badaczy do zastosowania blokujących ten enzym niesteroidowych leków przeciwzapalnych w celu sprawdzenia ich potencjalnego wpływu chemoprewencyjnego. Obecnie wiadomo, że leki z tej grupy zapobiegają powstawaniu nowotworów przewodu pokarmowego u zwierząt doświadczalnych, którym podano karcinogeny chemiczne. Leki te są również efektywne w zmniejszaniu liczby i rozmiarów polipów w modelach zwierzęcych oraz u ludzi z rodzinną gruczolakowatością polipowatą. Istnieją również obserwacje, z których wynika, że niesteroidowe leki przeciwzapalne zmniejszają częstość występowania oraz śmiertelność z powodu nowotworów jelita grubego u ludzi. W pracy tej, podzielonej na dwie części, opisano, w jaki sposób może dochodzić do zwiększenia ekspresji COX-2 w komórkach nowotworowych i w jakich mechanizmach ta zwiększona ekspresja ułatwia progresję nowotworów (część I). Podsumowano również wyniki opublikowanych dotychczas obserwacji epidemiologicznych i klinicznych oraz podjęto próbę wyjaśnienia potencjalnych mechanizmów przeciwnowotworowego działania niesteroidowych leków przeciwzapalnych (część II).

(*Postępy Biologii Komórki* 1999; 26: 667–683)

*Słowa kluczowe:* cyklooksygenaza, rak jelita grubego, niesteroidowe leki przeciwzapalne

\*Jakub Gołąb jest stypendystą Fundacji Na Rzecz Nauki Polskiej.

*Summary:* During the last 30 years numerous reports implicating a potential involvement of inducible prostaglandin synthase – cyclooxygenase-2 (COX-2) and prostaglandins in the neoplastic transformation, especially of gastrointestinal tract, have been published in the literature. Although the exact mechanism of increased COX-2 and prostaglandins expression in tumor cells are still contentious and highly speculative these have nonetheless prompted the evaluation of potential chemopreventive efficacy of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. These drugs proved chemopreventive activity in laboratory animals that received chemical carcinogens and were also effective in reducing the size and number of polyps in animal models and in humans with familial adenomatous polyposis. Numerous reports reveal that nonsteroidal anti-inflammatory drugs are also capable of reducing the incidence of and mortality from large bowel tumors. In this two part review the potential mechanisms of increased tumor expression of COX-2 and how this increased expression might facilitate the progression of malignancy are discussed (part I). The results of epidemiologic and clinical trials together with the mechanisms of antitumor action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs are summarized in part II. (*Advances in Cell Biology* 1999; 26: 667–683)

*Key words:* cyclooxygenase, colon cancer, nonsteroidal anti-inflammatory drugs

## 1. MYSI MODEL FAP I CHEMOPREWENCYJNE DZIAŁANIE NIESTEROIDOWYCH LEKÓW PRZECIWPALNYCH

Chociaż zespół FAP odpowiedzialny jest za powstawanie zaledwie kilku procent raków jelita grubego u ludzi, to badania zmienionej nowotworowo tkanki jelita grubego wykazały, że w 85% przypadków niedziedzicznych raków okrężnicy i odbytnicy dochodzi do mutacji genu *Apc*. Wydaje się, że jest to jeden z etapów inicjujących transformację nowotworową w obrębie przewodu pokarmowego. Istnieje również zwierzęcy model polipowatości jelit – myszy C57BL/6J-*Min/+* (*Min/+*), ze zmutowaną wersją mysiego genu *Apc*. W ich przewodzie pokarmowym do 10 tygodnia życia powstaje około 600–700 polipów, które doprowadzają do śmierci myszy między 16 a 18 tygodniem życia z powodu anemii i niedrożności jelitowej. Z niewiadomych przyczyn polipy u myszy *Min/+* tworzą się głównie w jelicie cienkim, podczas gdy u pacjentów z FAP zdecydowanie dominują w okrężnicy. Niemniej jednak myszy *Min/+* stanowią dobry, bo przede wszystkim jednolity genetycznie model do badań wpływu różnych substancji pochodzenia egzogenego (w tym również leków) na mechanizmy leżące u podstaw transformacji nowotworowej.

Oshima i wsp. [31] badali obecność polipów w jelitach myszy *Min/+* ze zmutowaną wersją genu dla *Cox-2*. U myszy kontrolnych z pojedynczą mutacją genu *Apc* i bez mutacji genu *Cox-2* oznaczonych jako  $APC^{\Delta 716/+}/COX-2^{+/+}$  liczba polipów w 10 tygodniu wynosiła  $652 \pm 198$ , u myszy z pojedynczą mutacją genu *Apc* i pojedynczą mutacją w *Cox-2* ( $APC^{\Delta 716/+}/COX-2^{+/-}$ ) zaobserwowano  $224 \pm 123$  polipy (34% kontroli), a u myszy z pojedynczą mutacją *Apc* i podwójną mutacją w *Cox-2*

TABELA 1. Wpływ delecji jednego lub obu alleli COX-2 na liczbę spontanicznie powstających polipów u myszy Min/+, liczbę polipów oceniano w 10 tygodniu życia

Fenotyp myszy	Liczba polipów	% redukcji względem myszy Min/+
APC <sup>Δ716/+</sup> /COX-2 <sup>+/+</sup>	652±198	–
APC <sup>Δ716/+</sup> /COX-2 <sup>+/-</sup>	224±123	66
APC <sup>Δ716/+</sup> /COX-2 <sup>-/-</sup>	93±98	86

(APC<sup>Δ716/+</sup>COX-2<sup>-/-</sup>) były 93±98 polipy (14% kontroli) (tab. 1). Rozmiar polipów u myszy APC<sup>Δ716/+</sup>COX-2<sup>-/-</sup> był znacznie mniejszy, ich średnica nie przekraczała 2,0 mm. Ponadto u myszy APC<sup>Δ716/+</sup>COX-2<sup>-/-</sup> nie znaleziono ani jednego polipa w obrębie jelita grubego. Dla porównania, u myszy APC<sup>Δ716/+</sup>COX-2<sup>+/-</sup> znaleziono średnio 2 polipy w jelicie grubym, zaś u myszy APC<sup>Δ716/+</sup>COX-2<sup>+/+</sup> od 5, nawet do 15 [31].

Z obserwacji tych wynika, że obecność COX-2 jest bardzo ważnym, choć nie jedynym, czynnikiem sprzyjającym powstawaniu polipów. Potwierdzają to wcześniejsze obserwacje kliniczne. W latach osiemdziesiątych zaobserwowano, że podawanie sulindaku zmniejsza liczbę polipów oraz ryzyko powstania nowotworów przewodu pokarmowego u pacjentów z FAP. Wyniki tych obserwacji znalazły także potwierdzenie w badaniach na zwierzętach. U myszy Min/+ leczonych sulindakiem w dawce 320 ppm przez okres 60 dni zaobserwowano spadek liczby i średnicy polipów o 95% w porównaniu z grupą kontrolną [11]. Równie silny efekt terapeutyczny wykazała Boolbol i wsp. [7] podając myszom w wodzie pitnej sulindak w dawce ok. 0,5±0,1 mg dziennie, odnotowując zmniejszenie liczby polipów z 11,9±7,8 w grupie kontrolnej do 0,1±0,1. Okazuje się jednak, że efekt terapii wygasa po przerwaniu leczenia. Czterdziestodniowa suplementacja diety sulindakiem z następującą po tym czterdziestodniową przerwą spowodowała wzrost liczby polipów z 2,0±0,8 do 28,0±6,0, a ich średnicy z 0,92±0,08 mm do 1,14±0,03 mm.

U myszy Min/+ leczonych piroksykamem w dawkach 0, 50, 100 i 200 ppm przez okres 6 tygodni zaobserwowano wyraźny spadek liczby polipów w obrębie całego jelita cienkiego. W porównaniu z grupą kontrolną (17,3±2,7) liczba polipów zmniejszyła się do 5,2±1,2 przy dawce 50 ppm, 4,5±1,0 przy 100 ppm i 2,1±1,1 w grupie o najwyższym stężeniu piroksykamu, tj. do 12% wartości początkowej [24]. Ritland i wsp. [38] zaobserwowali zmniejszenie o 94,4% liczby polipów stosując przez 70 dni piroksykam w dawce 200 ppm. Ta sama dawka po 170 dniach ciągłej terapii zmniejszyła liczbę polipów o 95,7% w porównaniu z grupą kontrolną.

Kwas acetylosalicylowy podawany myszom w codziennej diecie w ilości 500 µg, co stanowi odpowiednik przyjmowanej przez człowieka dziennej dawki 80–110 mg, po 10 tygodniach leczenia zredukował liczbę polipów o 44% [4].

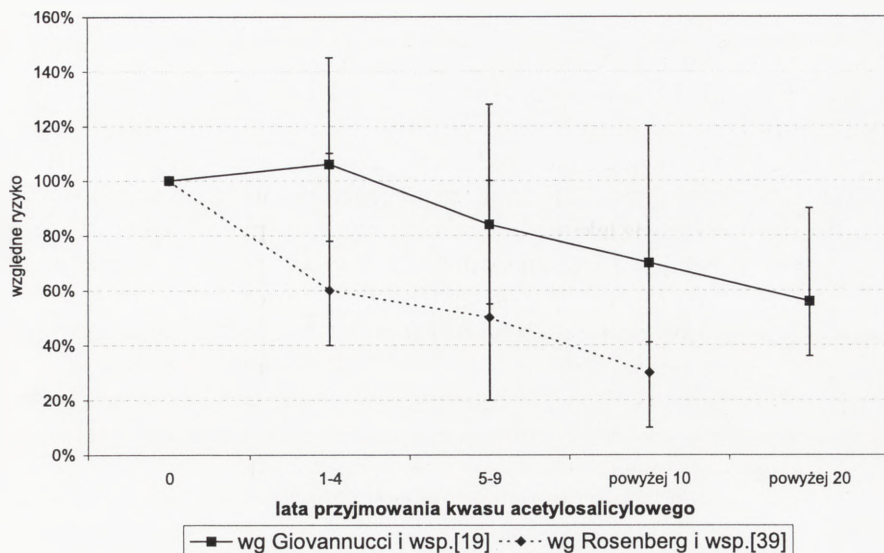
Spadek liczby polipów zaobserwowano również dodając do karmy myszy Min/+ kwas acetylosalicylowy przez okres 7 tygodni. W porównaniu z grupą kontrolną ( $35,8 \pm 4,4$ ) u myszy leczonych dawką 250 ppm liczba polipów zmniejszyła się do  $16,0 \pm 2,3$  [5].

Mimo że największe nadzieje pokładane są w możliwości stosowania niesteroidowych leków przeciwzapalnych w zapobieganiu chorobom nowotworowym, istnieją dane wskazujące, iż leki te są również efektywne w przypadku już istniejących polipów jelita. Dwudniowe leczenie sulindakiem takich polipów doprowadziło do regresji 19% polipów (z  $36,0 \pm 7,0$  do  $29,0 \pm 3,0$ ). Po czterodniowym leczeniu odnotowano regresję 75% polipów (z  $36,0 \pm 7,0$  do  $9,0 \pm 1,0$ ), a po dwudziestu dniach terapii zanotowano jeszcze dodatkowy choć już niewielki spadek ich liczby z  $36,0 \pm 7,0$  do  $7,0 \pm 2,0$  [11]. Równie zadowalające wyniki przynosi terapia piroksykamem. Leczenie polipów dawką 200 ppm przez okres 100 dni spowodowało redukcję ich liczby o 96% w porównaniu z grupą kontrolną [24].

## 2. CHEMOPREWENCYJNE DZIAŁANIE NIESTEROIDOWYCH LEKÓW PRZECIWPALNYCH U LUDZI

Wyniki prac, prowadzonych przez Kudo i wsp. oraz Pollarda i wsp. [25, 34], wielokrotnie potwierdzone przez innych naukowców, stały się punktem wyjścia do badań epidemiologicznych oceniających potencjalne zmniejszenie ryzyka powstania nowotworów u ludzi przez niesteroidowe leki przeciwzapalne.

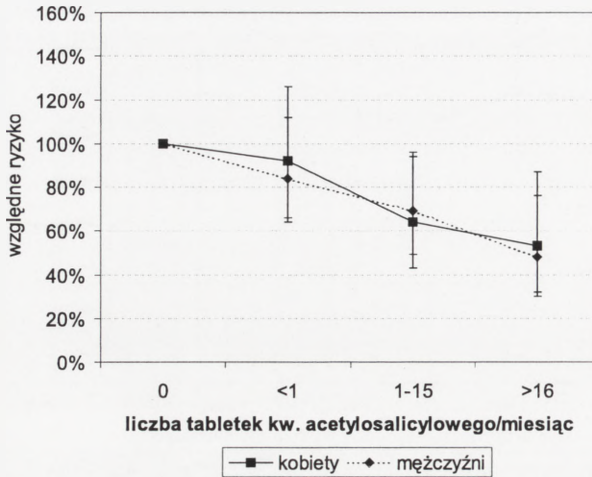
W 1983 r., a potem w 1989 r., Waddell i wsp. jako pierwsi opublikowali wyniki swoich obserwacji, z których wynika, że sulindak zmniejsza liczbę i rozmiary polipów u pacjentów z FAP [53, 54]. Z badań tych wynika, że przyjmowany codziennie sulindak w dawce 300–400 mg przez okres 6–12 miesięcy spowodował całkowitą regresję polipów. Efekt terapii ustąpił jednak po przerwaniu leczenia. W innych badaniach zaobserwowano, że doustne podawanie sulindaku w ilości 150 mg dwa razy dziennie przez 9 miesięcy zmniejszyło u pacjentów z FAP liczbę polipów o 44% ( $P=0,014$ ) i średnicę o 35% ( $P<0,001$ ) w porównaniu z grupą kontrolną [18]. Znaczną redukcję liczby i wielkości polipów odnotowała również Spagnesi i wsp. po terapii sulindakiem w dawce 100 mg dwa razy dziennie. Badaniem objęto 20 pacjentów z FAP, w tym 14 po zabiegu kolektomii. Przed leczeniem liczba polipów u pacjentów po zabiegu operacyjnym wynosiła  $10,08 \pm 8,05$ , a u chorych nie operowanych  $13,5 \pm 7,8$ , natomiast średnica odpowiednio  $1,0 \pm 0,57$  mm i  $0,9 \pm 0,6$  mm. Sześćdziesięciodniowa terapia zredukowała liczbę polipów do  $2,53 \pm 3,4$  u pacjentów po IRA i do  $2,5 \pm 2,4$  u chorych nie operowanych. Średnica polipów zmniejszyła się odpowiednio do  $0,57 \pm 0,54$  mm i  $0,5 \pm 0,4$  mm.



RYSUNEK 1. Względne ryzyko zachorowania na nowotwory jelita grubego w przypadku regularnego przyjmowania aspiryny

W roku 1988 ukazała się praca australijskich badaczy, w której wykazano korelację między spożywaniem kwasu acetylosalicylowego a zmniejszonym ryzykiem występowania raka okrężnicy. Wykazano jednocześnie, że steroidowe leki przeciwzapalne, które zmniejszają produkcję prostaglandyn, nie redukują ryzyka gruczolaków i gruczolakoraków okrężnicy [26]. Największe badania dotyczące stosowania niesteroidowych leków przeciwzapalnych w zapobieganiu rakom okrężnicy objęło ponad 600 000 osób i wykazało odwrotnie proporcjonalną korelację między dawką przyjmowanego kwasu acetylosalicylowego a częstością występowania nowotworów jelita grubego i zgonów spowodowanych nowotworem [49]. Podobną zależność wykazało następnie wielu innych badaczy [19, 20, 36, 39, 40].

Warto zwrócić uwagę na fakt, że zwiększenie efektu prewencyjnego koreluje z wydłużeniem czasu przyjmowania niesteroidowych leków przeciwzapalnych (rys. 1) [19, 20, 39, 40]. Silny efekt prewencyjny obserwuje się po terapii prowadzonej kwasem acetylosalicylowym przez okres dłuższy niż 5 lat. Najlepsze jednak rezultaty odnotowano u osób przyjmujących te leki ponad 10–20 lat. Jeśli względne ryzyko (RR – ang. *relative risk*) w okresie 5–9 lat przyjmowania kwasu acetylosalicylowego wynosi od 0,84 (95% przedział ufności: 0,55–1,28) [19] do 0,6 (0,2–1,0) [40], to w okresie późniejszym dla osób przyjmujących kwas acetylosalicylowy powyżej dziesięciu lat RR waha się w granicach między 0,3 (0,1–0,7) a 0,56 (0,36–0,9) [19, 40].



RYSUNEK 2. Ryzyko zgonu z powodu raka jelita grubego w zależności od częstości spożywanego kwasu acetylosalicylowego [49]

Najnowsze wyniki badań prowadzone przez Smalleya i wsp. [45] obejmujące grupę ponad 100,000 osób w wieku 65 lat i starszych dowodzą zmniejszenia ryzyka wystąpienia raka odbytnicy o 19% (RR=0,81), raka okrężnicy wstępującej o 52% (RR=0,48) i raka okrężnicy zstępującej o 23% (RR=0,77). Niewątpliwie istnieje także związek między dawką przyjmowanego kwasu acetylosalicylowego a ewentualnym rozwinięciem nowotworu i ryzykiem zgonu (rys. 2). Z badań Thuna i wsp. wynika, że ryzyko to kształtuje się od 0,84 (0,64–1,12) dla mężczyzn i 0,92 (0,66–1,26) dla kobiet w wypadku przyjmowania mniej niż jednej tabletki (325 mg) na miesiąc do odpowiednio 0,48 (0,3–0,76) i 0,53 (0,32–0,87), gdy dawka kwasu acetylosalicylowego przekracza 16 tabletek miesięcznie [49]. Korelacja nie jest tak wyraźna w wynikach badań opublikowanych przez Rosenberg i wsp. [39]. Może to być spowodowane przyjmowaniem kwasu acetylosalicylowego w różnych dawkach dziennych – od pół (162,5 mg) do 2 tabletek (650 mg), zupełnie inaczej niż w pozostałych badaniach, gdzie regularne przyjmowanie kwasu acetylosalicylowego oznaczało maksymalnie dwie lub mniej tabletek tygodniowo. W pracy Rosenberg i wsp. [39] nie uwzględniono dawki 80 mg dziennie, którą aktualnie zaleca się w celu zmniejszenia ryzyka wystąpienia choroby niedokrwiennej serca [39]. Wyniki przeprowadzonych do tej pory badań epidemiologicznych podsumowano w tabeli 2.

Wiadomo, że zaprzestanie terapii niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi na okres dłuższy niż rok nie tylko znosi efekt chemoprewencyjny, a nawet podwyższa

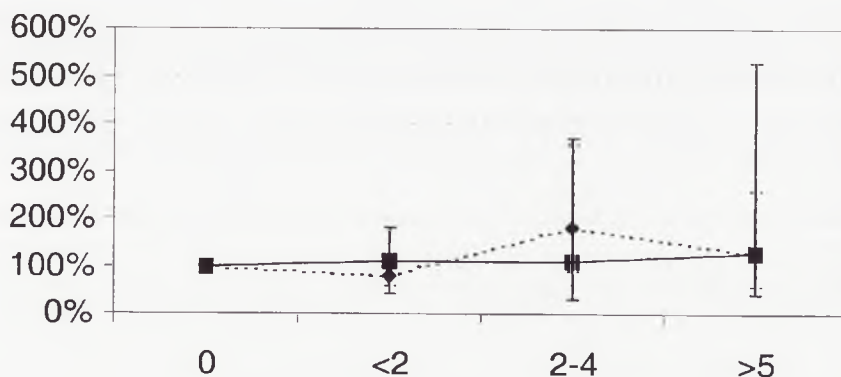
TABELA 2. Ryzyko zachorowania lub zgonu z powodu raka jelita grubego

Piśmiennictwo	RR – kobiety	RR – mężczyźni	Średnie ryzyko
Kune [26]	0,49	0,58	0,53
Thun [49]	0,92–0,53	0,84–0,48	
Rosenberg [40]	0,8	0,6	0,9–0,5
Rosenberg [41]			0,6–0,3
Giovanucci [20]		0,7–0,38	
Giovanucci [19]	1,06–0,56		

W tabeli ukazano dane dla osób regularnie przyjmujących kwas acetylosalicylowy (tzn. nie rzadziej niż raz w miesiącu)

niewiele ryzyko wystąpienia choroby nowotworowej jelita grubego. Efekt jest tym bardziej dramatyczny, im dłużej przyjmowano leki przed zaprzestaniem dalszej kuracji (rys. 3) [39, 40].

Autorom udało się dotrzeć do dwóch doniesień, w których nie dopatrzono się związku między przyjmowaniem niesteroidowych leków przeciwzapalnych a ryzykiem raka jelita grubego. W 1993 roku takie wyniki otrzymał Gann i wsp., prawdopodobnie jednak przyjmowana dawka leku była zbyt mała i okres badania zbyt krótki [17]. Regularne przyjmowanie kwasu acetylosalicylowego przez Kalifornijczyków w podeszłym wieku (średnia wieku 73 lata) zwiększyło zapadalność na raka jelita grubego, raka pęcherza i nerki, podwyższyło również ryzyko choroby



### lata przyjmowania kwasu acetylosalicylowego

- ■ - według [40] - ◆ - według [39]

RYSUNEK 3. Ryzyko wystąpienia zmiany nowotworowej w obrębie jelita grubego w rok po zaprzestaniu długotrwałego leczenia NLPZ [45,46]

niedokrwiennej serca. U pacjentów tych niejednokrotnie stwierdzano krwawienia z przewodu pokarmowego, wrzody żołądka i zaćmę. Wyraźnie wzrosła również możliwość rozwinięcia raka nerki u mężczyzn (RR=6,28), co może korelować z istotną rolą, jaką odgrywają w nerce enzymy docelowe dla niesteroidowych leków przeciwzapalnych.

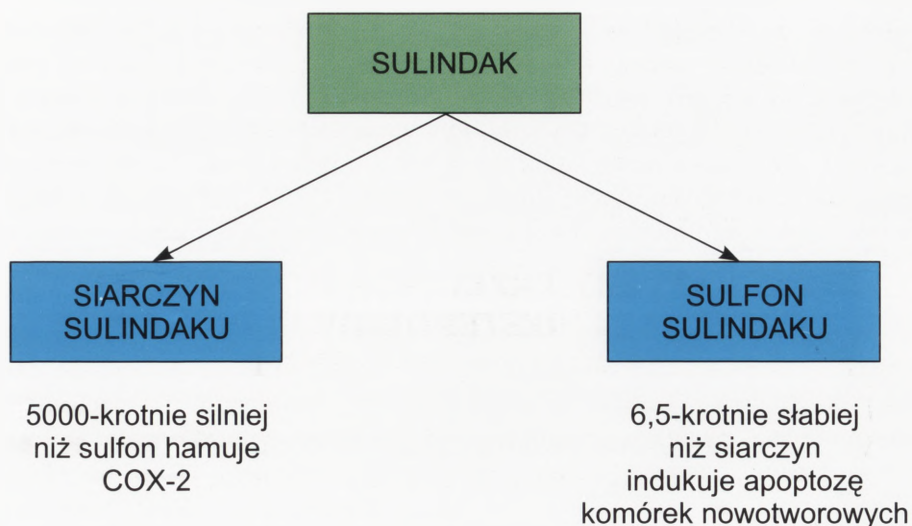
### **3. MECHANIZMY PRZECIWNOWOTWOROWEGO DZIAŁANIA NIESTEROIDOWYCH LEKÓW PRZECIWPALNYCH**

#### **3.1. Czy przeciwnowotworowe działanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych wynika z blokowania cyklooksygenaz?**

Choć istnieje wiele danych sugerujących bezpośredni wpływ niesteroidowych leków przeciwzapalnych na komórki nowotworowe, nadal wiele kontrowersji budzi mechanizm ich działania. Do niedawna wydawało się, że za przeciwnowotworowe właściwości niesteroidowych leków przeciwzapalnych odpowiedzialne jest blokowanie cyklooksygenaz i syntezy prostaglandyn, które, jak już omówiono, są produkowane przez komórki nowotworowe i mogą pobudzać ich proliferację. Szereg antyoksydantów zmniejsza produkcję prostaglandyn w komórkach nowotworowych w wyniku blokowania transkrypcji genu dla COX-2 i wywiera tym samym efekt antyproliferacyjny [10]. Zupełnie nieoczekiwanie okazało się jednak, że sulfon sulindaku, metabolit nie hamujący cyklooksygenaz, zapobiega powstawaniu nowotworów u myszy otrzymujących karcinogeny chemiczne [47]. Zaobserwowano również, że sulindak zmniejsza liczbę nowotworów płuc u zwierząt otrzymujących karcinogeny chemiczne, ale w płucach badanych zwierząt wykrywano jedynie pochodną sulfonową sulindaku [32]. Na marginesie warto dodać, że sulindak podawany doustnie ulega metabolizmowi w przewodzie pokarmowym w wyniku aktywności flory bakteryjnej. Powstające dwa metabolity: siarczyn i sulfon mają zupełnie odmienne właściwości. Jedynie siarczyn blokuje cyklooksygenazy (rys. 4) [27].

O tym, że zahamowanie produkcji prostaglandyn przez niesteroidowe leki przeciwzapalne nie jest głównym (jeśli w ogóle jest) mechanizmem działania przeciwnowotworowego, świadczą również wyniki doświadczeń, w których badano wpływ indometacyny i karprofenu na wzrost raków sutka u myszy. Otóż oba te leki silnie zahamowały produkcję prostaglandyn, ale tylko indometacyna zwolniła wzrost guzów [27]. Wreszcie okazało się, że indometacyna hamuje podziały komórek nowotworowych dopiero w dawkach znacznie przekraczających wymagane do zahamowania produkcji prostaglandyn. Pochodna kwasu acetylosalicylowego, NCX-4016, nie blokująca cyklooksygenaz, ale indukująca produkcję tlenu azotu





RYSUNEK 4. Główne metabolity sulindaku oraz najważniejsze między nimi różnice w działaniu

(NO) wywiera silniejszy efekt chemoprewencyjny u szczurów niż kwas acetylosalicylowy [3].

Ketoprofen, ketorolak i flubiprofen są niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi, pochodnymi kwasu 2-arylo propionowego, które występują w dwóch odmianach enancjomerycznych: *S* i *R*. Choć jedynie enancjomery prawoskrętne (*S*) hamują cyklooksygenazy [8], obie formy w podobnym stopniu działają antyproliferacyjnie [30] potwierdzając, że zahamowanie cyklooksygenaz nie jest niezbędne w ich działaniu przeciwnowotworowym. Dla porównania, steroidowe leki, blokujące COX-2, takie jak na przykład deksametazon, nie mają działania przeciwnowotworowego [27]. Są to niezwykle ważne obserwacje w aspekcie klinicznym, bowiem do zwiększenia produkcji COX-2 dochodzi w późnych etapach transformacji nowotworowej w obrębie jelita grubego, a wiele wskazuje na to, że selektywne inhibitory COX-2 mogą znaleźć zastosowanie w chemoprewencji, indukując apoptozę komórek we wczesnych etapach nowotworzenia. Ponadto aż w 60% gruczolaków i w około 15 raków jelita grubego nie dochodzi do zwiększenia produkcji COX-2.

### 3.2. Wpływ niesteroidowych leków zapalnych na proliferację komórek nowotworowych

Za efekt przeciwnowotworowy niesteroidowych leków przeciwzapalnych odpowiedzialne mogą być: działanie antyproliferacyjne, indukcja apoptozy lub nekrozy.

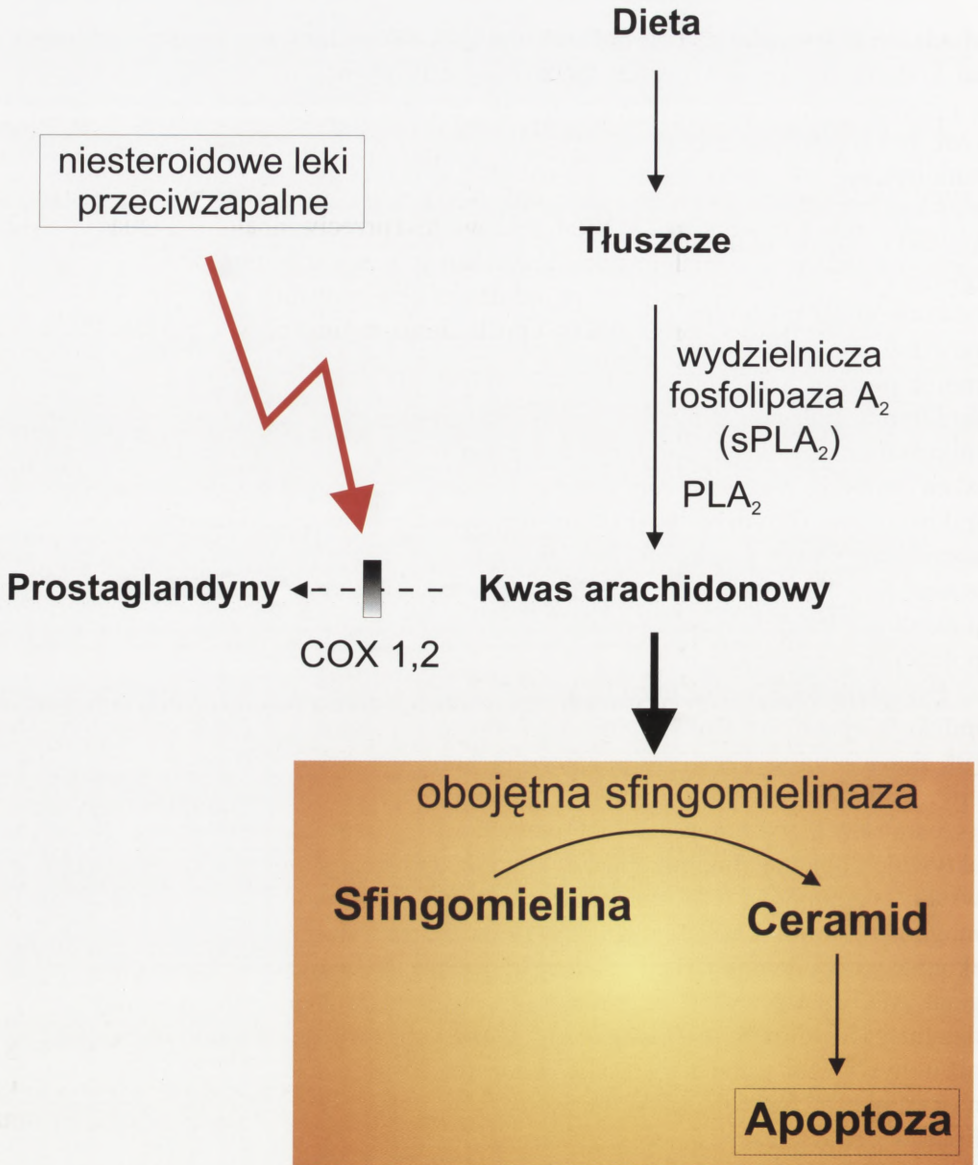
Badanie wpływu niesteroidowych leków przeciwzapalnych na te trzy procesy nie dało jak dotychczas jednoznacznych odpowiedzi. Wykazano między innymi, że kwas acetylosalicylowy, piroksydam, naproksen oraz indometacyna zwiększały proporcję komórek zatrzymanych w fazie G1 oraz zmniejszały liczbę komórek w fazie S [43]. Ponadto kwas acetylosalicylowy oraz indometacyna, ale nie piroksydam i naproksen zmniejszały liczbę komórek w fazie G2/M. Zahamowanie progresji cyklu komórkowego korelowało ze zmniejszeniem stężenia dwóch kinaz zależnych od cyklin: p34<sup>cdc2</sup> i p33<sup>cdk2</sup> [43]. Ustalono, że sulindak zwiększa stężenie p53 oraz p21WAF/Cip1 – białka hamującego progresję cyklu komórkowego w wyniku blokowania aktywności kinaz zależnych od cyklin [21]. W odróżnieniu od powyższych obserwacji ani sulindak [13], ani NS398 [15] nie wydają się działać antyproliferacyjnie na komórki nowotworowe. Najprawdopodobniej mechanizm ich działania polega na indukcji apoptozy [34]. Podobnie, komórki nowotworowe inkubowane z indometacyną, piroksydamem oraz naprokselem [43], ale nie z kwasem acetylosalicylowym [46], mają morfologiczne cechy apoptozy. Rzeczywiście wiele obserwacji potwierdziło, że niektóre niesteroidowe leki przeciwzapalne mogą indukować apoptozę komórek nowotworowych. Na uwagę zasługuje również fakt, że indukcja apoptozy przez niesteroidowe leki przeciwzapalne jest procesem niezależnym od obecności cyklooksygenaz w komórce. Na przykład sulfon sulindaku, który jest 5000-krotnie słabszym inhibitorem COX od siarczynu, zaledwie 6,5-krotnie słabiej od niego indukuje apoptozę komórek nowotworowych (rys. 4) [33]. Nie mniej ważny jest fakt, iż metabolity sulindaku indukują apoptozę komórek nowotworowych niezależnie od fazy cyklu, w której się znajdują. W odróżnieniu od sulindaku, 5-fluorouracyl, najskuteczniejszy chemioterapeutyk w leczeniu nowotworów przewodu pokarmowego indukuje apoptozę głównie komórek proliferujących [33]. NS398, selektywny inhibitor COX-2 indukuje apoptozę komórek nowotworowych zarówno mających, jak i nie mających COX-2 [15].

Sulindak z jeszcze jednego względu wydaje się przewyższać inne niesteroidowe leki przeciwzapalne. Zaobserwowano, że działając na komórki nowotworowe może on zmniejszać produkcję cyklin A, B1 [21] i D1 [1], zwiększać stężenie proapoptotycznego białka Bak [1] oraz zmniejszać ilość antyapoptotycznego białka Bcl2 [50].

Kolejnym, niezwykle ważnym zagadnieniem związanym ze stosowaniem niesteroidowych leków przeciwzapalnych w chemoprewencji jest selektywność ich działania. Hamowanie proliferacji kolonocytów byłoby dość poważnym ograniczeniem stosowania tych leków. Obserwacje kliniczne nie potwierdzają takich obaw. Sulindak indukuje apoptozę komórek nowotworowych w obrębie polipów, ale nie w zdrowej śluzówce jelita grubego u pacjentów z zespołem FAP [16]. Ponadto niesteroidowe leki przeciwzapalne działają tym silniej na komórki nowotworowe, im bardziej są one stransformowane (im więcej mają mutacji). Kwas acetylosalicylowy działa efektywniej na komórki raka jelita grubego niż na komórki po-

chodzące z gruczolaka [14]. Sulfon sulindaku silniej indukuje apoptozę działając na komórki raka sutka mające zmutowany gen *H-ras*, niż działając na komórki z prawidłowym genem [48]. Podczas gdy tę ostatnią obserwację można wyjaśnić tym, że sulindak może bezpośrednio blokować *H-ras* i to zarówno jego aktywność katalityczną, jak i wiązanie się z Raf1 [22], zupełnie niejasny jest mechanizm silniejszego działania piroksykamu i selektywnego inhibitora COX-2 (SC-58125) na komórki mające zmutowany *H-ras* [42, 44]. Niezwykle interesujących obserwacji dostarczyły badania wpływu niesteroidowych leków przeciwzapalnych na komórki nowotworowe pochodzące od pacjenta z rodzinną niepolipową skłonnością do powstawania nowotworów jelita grubego (HNPCC). Charakterystyczną cechą komórek nowotworowych pochodzących od tych pacjentów jest niestabilność mikrosatelitarna, polegająca między innymi na gromadzeniu się mutacji w regionach mikrosatelitarnych. Niestabilność tę można mierzyć ilościowo w komórkach nowotworowych. W pewnym uproszczeniu można założyć, że im większa niestabilność mikrosatelitarna, tym bardziej stransformowana jest komórka. Okazuje się, że kwas acetylosalicylowy i sulindak indukują tym silniej apoptozę takich komórek, im więcej powstało w nich mutacji. Innymi słowy, niesteroidowe leki przeciwzapalne powodują selekcję komórek najbardziej stabilnych genetycznie, czyli o najmniejszym potencjale guzotwórczym.

Pozostaje dość istotne pytanie: w jaki sposób niesteroidowe leki przeciwzapalne indukują apoptozę? Dość interesującą hipotezę przedstawił Chan i wsp. (rys. 5) [9]. Badacze ci wykazali, że apoptoza indukowana przez niesteroidowe leki przeciwzapalne jest nie tyle rezultatem zmniejszenia produkcji prostaglandyn, co zwiększenia stężenia w komórkach ich prekursora – kwasu arachidonowego. Kwas ten aktywuje obojętną sfingomielinazę, która działając na sfingomielinę katalizuje powstanie ceramidów, a te, jak udowodniono w wielu modelach doświadczalnych, mogą aktywować kaskadę sygnałów prowadzących do apoptozy. Hipoteza ta doskonale pasuje do obserwacji u myszy transgeniczných, nie mających jednego allelu genu APC (patrz wyżej) oraz mających nieaktywne allele genu kodującego wydzielniczą fosfolipazę A<sub>2</sub> (*Pla2g2a*). U myszy tych powstaje 4-krotnie więcej polipów niż u myszy Min/+, nie mających jedynie jednego allelu APC [12, 29]. Jak pokazano na rysunku 5, fosfolipaza A<sub>2</sub> uczestniczy w produkcji kwasu arachidonowego z lipidów znajdujących się w pożywieniu. Im mniej kwasu arachidonowego, tym słabsza aktywacja sfingomielinazy i tym mniejsza produkcja ceramidów. Niewykluczone, że zużywanie kwasu arachidonowego przez COX-2, której produkcja wzrasta w komórkach nowotworowych, jest jednym z mechanizmów sprzyjających transformacji nowotworowej. Ta hipoteza znajduje również potwierdzenie w obserwacjach klinicznych, z których wynika, że dieta polegająca na spożywaniu odpowiednich lipidów, ubogich w kwas arachidonowy, sprzyja powstawaniu nowotworów jelita grubego [55].



RYSUNEK 5. Jeden z potencjalnych mechanizmów indukcji apoptozy przez niesteroidowe leki przeciwzapalne

### 3.3. Wpływ niesteroidowych leków przeciwzapalnych na angiogenezę oraz układ odpornościowy

Jak już wspomniano, nabycie przez komórki nowotworowe zdolności do zwiększonej ekspresji genu kodującego COX-2 prowadzi, między innymi, do wzrostu wydzielania szeregu czynników proangiogennych oraz do pobudzenia wytwarzania nowych naczyń krwionośnych. Niesteroidowe leki przeciwzapalne, hamując COX-2, mogłyby zatem potencjalnie zahamować ten proces i uniemożliwić wzrost guza. Rzeczywiście, gastroenterolodzy już od dawna obserwowali, że przyjmowanie kwasu acetylosalicylowego prowadzi do upośledzenia angiogenezy w obrębie ziarniny, w gojących się owrzodzeniach żołądka [23]. Zarówno selektywny inhibitor COX-2 – NS-398, jak i nieselektywna indometacyna hamują wydzielanie czynników proangiogennych przez komórki nowotworowe [51]. Indometacyna, sulindak i ketoprofen, ale nie acetaminofen (Paracetamol) lub kwas acetylosalicylowy hamują angiogenezę rogówkową u myszy, indukowaną bFGF i VEGF [52]. Zwiększają także antyangiogenne działanie talidomidu [52] oraz IL-12 [Gołąb i wsp., praca wysłana do druku], a efekt ten koreluje ze zwolnieniem wzrostu nowotworów i wydłużeniem przeżycia zwierząt doświadczalnych. Inny niesteroidowy lek przeciwzapalny – diklofenak, hamuje angiogenezę i zwalnia wzrost guzów po podaniu w postaci maści z 2,5% kwasem hialuronowym [41].

Warto również zwrócić uwagę na immunomodulujące działanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Indometacyna eliminuje immunosupresyjne działanie prostaglandyn, zwiększając aktywność komórek NK i proliferację limfocytów T [6]. Interesujące jest to, że w aspekcie immunomodulującym niesteroidowe leki przeciwzapalne nie wydają się działać na komórki nowotworowe, ale przede wszystkim na makrofagi naciekające guzy i wydzielające pokaźne ilości prostaglandyn. Co prawda zaobserwowano, że piroksykam zwiększa ekspresję cząsteczek MHC na powierzchni komórek nowotworowych [37], ale nie wyjaśniono, czy jest to rzeczywiście efekt bezpośredniego działania na komórki nowotworowe czy też rezultat hamowania produkcji prostaglandyn przez naciekające guzy makrofagi. Prostaglandyny są jednymi z najsilniejszych endogennych substancji, zmniejszających liczbę cząsteczek MHC na powierzchni komórek [2]. Niestety, wydaje się, że niesteroidowe leki przeciwzapalne zdolne są do pobudzania odpowiedzi immunologicznej oraz wynikającego z tego zwolnienia wzrostu guzów jedynie we wczesnych fazach procesu rozrostowego. Zaobserwowano, że jeśli podawanie indometacyny rozpoczęte zostanie w chwili, gdy guz osiągnie względnie duże rozmiary, to może nawet dojść do przyspieszenia jego wzrostu. Podana we wczesnym etapie wzrostu, wywierała silne działanie przeciwnowotworowe [28].

#### 4. PODSUMOWANIE

Z przedstawionych w tej pracy danych wynika, że niesteroidowe leki przeciwzapalne zapobiegają powstaniu nowotworów u zwierząt laboratoryjnych otrzymujących karcinogeny chemiczne oraz zmniejszają liczbę i rozmiary polipów u myszy Min/+ oraz u ludzi z rodzinną gruczolakowatością polipową. Z badań epidemiologicznych wynika, że leki te zmniejszają, nawet o 50%, częstość powstawania oraz śmiertelność z powodu raków jelita grubego u ludzi. Niestety nie przeprowadzono dotychczas prospektywnych badań klinicznych ostatecznie stwierdzających, że leki te mają działanie chemoprewencyjne. Największe dotychczas tego typu badania zostały przedwcześnie zakończone ze względu na silne protekcyjne działanie kwasu acetylosalicylowego, zmniejszające częstość zawałów serca.

Nie wiadomo, które niesteroidowe leki przeciwzapalne są najskuteczniejsze w aspekcie chemoprewencji, w jakiej dawce powinny być przyjmowane, w jakim wieku należy rozpocząć profilaktykę i jak długo należy ją kontynuować. Miejmy nadzieję, że niedługo poznamy odpowiedzi na te ważne pytania.

#### PIŚMIENNICTWO

- [1] ARBER N, HAN EK, SGAMBATO A, PIAZZA GA, DELOHERY TM, BEGEMANN M, WEGHORST CM, KIM N-H, PAMUKCU R, AHNEN DJ, REED JC, WEINSTEIN IB, HOLT PR. A K-ras oncogene increases resistance to sulindac-induced apoptosis in rat enterocytes. *Gastroenterology* 1997; **113**: 1892–1900.
- [2] ARVIND P, PAPAVALASSILOU ED, TSIOLIAS GJ, QIAO L, LOVELACE CI, DUCEMAN B, RIGAS B. Prostaglandin E2 down-regulates the expression of HLA-DR antigen in human colon adenocarcinoma cell lines. *Biochemistry* 1995; **34**: 5604–5609.
- [3] BAK AW, MCKNIGHT W, LI P, DEL SOLDANO P, CALIGNANO A, CIRINO G, WALLACE JL. Cyclooxygenase-independent chemoprevention with an aspirin derivative in a rat model of colonic adenocarcinoma. *Life Sci* 1998; **62**: 367–373.
- [4] A M. Chemoprevention of spontaneous intestinal adenomas in the adenomatous polyposis coli Min mouse model with aspirin. *Gastroenterology* 1998; **114**: 873–878.
- [5] BARNES CJ, LEE M. Chemoprevention of spontaneous intestinal adenomas in the adenomatous polyposis coli Min mouse model with aspirin. *Gastroenterology* 1998; **114**: 873–877.
- [6] BIGDA J, MYŚLIWSKI A. Indometacin inhibits kidney metastasis in Bomirski melanoma-bearing hamsters, and modulates natural killer cytotoxic activity of tumor hosts *in vivo* and *in vitro*. *Anicancer Res* 1998; **18**: 3549–3554.
- [7] BOOLBOL SK, DANNENBERG AJ, CHADBURN A, MARTUCCI C, GUO XJ, RAMONETTI JT, ABREU-GORIS M, NEWMARK HL, LIPKIN ML, DECOSSE JJ, BERTAGNOLI MM. Cyclooxygenase-2 overexpression and tumor formation are blocked by sulindac in a murine model of familial adenomatous polyposis. *Cancer Res* 1996; **56**: 2556–2560.
- [8] CARBAZA A, CABRE F, ROTLLAN E, GOMEZ M, GUTIERREZ M, GARCIA L, MAULEON D. Stereoselective inhibition of inducible cyclooxygenase by chiral nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J Clin Pharmacol* 1996; **36**: 505–512.

- [9] CHAN TA, MORIN PJ, VOGELSTEIN B, KINZLER KW. Mechanisms underlying nonsteroidal antiinflammatory drug-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 681–686.
- [10] CHINERY R, BEAUCHAMP RD, SHYR Y, KIRKLAND SC, COFFEY RJ, MORROW JD. Antioxidants reduce cyclooxygenase-2 expression, prostaglandin production, and proliferation in colorectal cancer cells. *Cancer Res* 1998; **58**: 2323–2327.
- [11] CHIU CH, MCENTEE MF, WHELAN J. Sulindac causes rapid regression of preexisting tumors in Min/+ mice independent of prostaglandin biosynthesis. *Cancer Res* 1997; **57**: 4267–4273.
- [12] CORMIER RT, HONG KH, HALBERG RB, HAWKINS TL, RICHARDSON P, MULHERRAR R, DOVE WF, LANDER ES. Secretory phospholipase *Pla2g2a* confers resistance to intestinal tumorigenesis. *Nat Genet* 1997; **17**: 88–91.
- [13] DUBOIS RN, AWAD J, MORROW J, ROBERTS LJ, BISHOP PR. Regulation of eicosanoid production and mitogenesis in rat intestinal epithelial cells by transforming growth factor alpha and phorbol ester. *J Clin Invest* 1994; **93**: 493–498.
- [14] ELDER DJE, HAGUE A, HICKS DJ, PARASKEVA C. Differential growth inhibition by the aspirin metabolite salicylate in human colorectal tumor cell lines: enhanced apoptosis in carcinoma and *in vitro*-transformed adenoma relative to adenoma cell lines. *Cancer Res* 1996; **56**: 2273–2276.
- [15] ELDER DJE, HALTON DE, HAGUE A, PARASKEVA C. Induction of apoptotic cell death in human colorectal carcinoma cell lines by a cyclooxygenase-2 (COX-2)-selective nonsteroidal anti-inflammatory drug: independence from COX-2 protein expression. *Clin Cancer Res* 1997; **3**: 1679–1683.
- [16] ELDER DJE, PARASKEVA C. NSAIDs to prevent colorectal cancer: a question of sensitivity. *Gastroenterology* 1997; **113**: 1999–2008.
- [17] GANN PH, MANSON JE, GLYNN RJ, BURING JE, HENNEKENS CH. Low-dose aspirin and incidence of colorectal tumors in randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 1993; **85**: 1220–1224.
- [18] GIARDIELLO FM, HAMILTON SR, KRUSH AJ, PIANTADOSI S, HYLIND LM, CELANO P, BOOKER SV, ROBINSON CR, OFFERHAUS GJ. Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1993; **328**: 1313–1316.
- [19] GIOVANNUCCI E, EGAN KM, HUNTER DJ, STAMPFER MJ, COLDITZ GA, WILLETT WC, SPEIZER FE. Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. *N Engl J Med* 1995; **333**: 609–614.
- [20] GIOVANNUCCI E, RIMM EB, STAMPFER MJ, COLDITZ GA, ASCHERIO A, WILLETT WC. Aspirin use and the risk for colorectal cancer and adenoma in male health professionals. *Ann Intern Med* 1994; **121**: 241–246.
- [21] GOLDBERG Y, NASSIF II, PITTAS A, TSAI LL, DYNLACHT BB, RIGAS B, SHIFF SJ. The anti-proliferative effects of sulindac and sulindac sulfide on HT-29 colon cancer cells: alterations in tumor suppressor and cell-cycle regulatory proteins. *Oncogene* 1996; **12**: 893–901.
- [22] HERRMANN C, BLOCK C, GEISEN C, HAAS K, WEBER C, WINDE G, MOROY T, MULLER O. Sulindac sulfide inhibits Ras signaling. *Oncogene* 1998; **17**: 1769–776.
- [23] HUDSON N, BALSITIS M, EVERITT S, HAWKEY CJ. Angiogenesis in gastric ulcers: impaired in patients taking non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Gut* 1995; **37**: 191–194.
- [24] JACKOBY RF, MARSCHALL DJ, NEWTON MA, NOVAKOVIC K, TUTSCH K, COLE CE, LUBERT RA, KELLOFF GJ, VERMA A, MOSER AR, DOVE WF. Chemoprevention of spontaneous intestinal adenomas in the *Apc*<sup>Min</sup> mouse model by the nonsteroidal anti-inflammatory drug piroxicam. *Cancer Res* 1996; **56**: 710–714.
- [25] KUDO T, NARISAWA T, ABO S. Antitumor activity of indometacin on methylazoxymethanol-induced large bowel tumors in rats. *Gann* 1980; **71**: 260–264.

- [26] KUNE GA, KUNE S, WATSON LF. Colorectal cancer risk, chronic illnesses, operations, and medications: case control result from the Melbourne Colorectal Cancer Study. *Cancer Res* 1988; **48**: 4399–4304.
- [27] LEVY GN. Prostaglandin H synthases, nonsteroidal antiinflammatory drugs, and colon cancer. *Faseb J* 1997; **11**: 234–247.
- [28] MACA RD. Inhibition of the growth of Lewis lung carcinoma by indomethacin in conventional, nude, and beige mice. *J Biol Response Modif* 1988; **7**: 568–580.
- [29] MACPHEE M, CHEPENIK KP, LIDDELL RA, NELSON KK, SIRACUSA LD, BUCHBERG AM. The secretory phospholipase A2 gene is a candidate for the Mom1 locus, a major modifier of APC<sup>Min</sup>-induced intestinal neoplasia. *Cell* 1995; **81**: 957–966.
- [30] MCCRACKEN JD, WECHTER WJ, LIU Y, CHASE RL, KANTOCI D, MURRAY ED, QUIGGLE DD, MINEYAMA Y. Antiproliferative effects of the enantiomers of flubiprofen. *J Clin Pharmacol* 1996; **36**: 540–545.
- [31] OSHIMA M, DINCHUK JE, KARGMAN SL, OSHIMA H, HANCOCK B, KWONG E, TRZASKOS JM, EVANS JF, TAKETO MM. Suppression of intestinal polyposis in Apc<sup>D716</sup> knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 1996; **87**: 803–809.
- [32] PEPIN P, BOUCHARD L, NICOLE P, CASTONGUAY A. Effects of sulindac and oltipraz on the tumorigenicity of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in A/J mouse lung. *Carcinogenesis* 1992; **13**: 341–348.
- [33] PIAZZA GA, RAHM AK, FINN TS, FRYER BH, LI H, STOUMEN AL, PAMUKCU R, AHNEN DJ. Apoptosis primarily accounts for the growth-inhibitory properties of sulindac metabolites and involves a mechanism that is independent of cyclooxygenase inhibition, cell cycle arrest, and p53 induction. *Cancer Res* 1997; **57**: 2452–2459.
- [34] PIAZZA GA, RAHM ALK, KRUTZSCH M, SPERL G, PARANKA NS, GROSS PH, BRENDEL K, BURT RW, ALBERTS DS, PAMUKCU R, AHNEN DJ. Antineoplastic drugs sulindac sulfide and sulfone inhibit cell growth by inducing apoptosis. *Cancer Res* 1995; **55**: 3110–3116.
- [35] POLLARD M, LUCKERT PH. Indomethacin treatment of rats with dimethylhydrazine-induced intestinal tumors. *Cancer Treat Rep* 1980; **64**: 1323–1327.
- [36] REEVES MJ, NEWCOMB PA, TRENTHAM-DIETZ A, STORER BE, REMINGTON PL. Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and protection against colorectal cancer in women. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 1996; **5**: 955–960.
- [37] RIGAS B, TSIOLIAS GJ, ALLAN C, WALI RK, BRASITUS TA. The effect of bile acids and piroxicam on MHC antigen expression in rat colonocytes during colon cancer development. *Immunology* 1994; **83**: 319–323.
- [38] RITLAND SR, GENDLER SJ. Chemoprevention of intestinal adenomas in the Apc<sup>Min</sup> mouse by piroxicam: kinetics, strain effects and resistance to chemosuppression. *Carcinogenesis* 1999; **20**: 51–58.
- [39] ROSENBERG L, LOUIK C, SHAPIRO S. Nonsteroidal antiinflammatory drug use and reduced risk of large bowel carcinoma. *Cancer* 1998; **82**: 2326–2333.
- [40] ROSENBERG L, PALMER JR, ZAUBER AG, WARSCHAUER ME, STOLLEY PD, SHAPIRO S. A hypothesis: nonsteroidal anti-inflammatory drugs reduce the incidence of large bowel cancer. *J Natl Cancer Inst* 1991; **83**: 355–358.
- [41] SEED MP, BROWN JR, FREEMANTLE CN, PEPWORTH JL, COLVILLE-NASH PR, WILLIS D, SOMERVILLE KW, ASCULAI S, WILLOUGHBY DA. The inhibition of colon-26 adenocarcinoma development and angiogenesis by topical diclofenac in 2.5% hyaluronan. *Cancer Res* 1997; **57**: 1625–1629.
- [42] SHENG GG, SHAO J, SHENG H, HOOTON EB, ISAKSON PC, MORROW JD, COFFEY RJ, DUBOIS RN, BEAUCHAMP RD. A selective cyclooxygenase 2 inhibitor suppresses the growth of H-ras-transformed rat intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 1997; **113**: 1883–1891.



- [43] SHIFF SJ, KOUSTSOS MI, QIAO L, RIGAS B. Nonsteroidal antiinflammatory drugs inhibit the proliferation of colon adenocarcinoma cells: effects on cell cycle and apoptosis. *Exp Cell Res* 1996; **222**: 179–188.
- [44] SINGH J, KULKARNI N, KELLOFF G, REDDY BS. Modulation of azoxymethane-induced mutational activation ras protooncogenes by chemopreventive agents in colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1994; **15**: 1317–1323.
- [45] SMALLEY W, RAY WA, DAUGHERTY J, GRIFFIN MR. Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and incidence of colorectal cancer. *Arch Intern Med* 1999; **159**: 161–166.
- [46] SUBBEGOWDA R, FROMMEL TO. Aspirin toxicity for human colonic tumor cells results from necrosis and is accompanied by cell cycle arrest. *Cancer Res* 1998; **58**: 2772–2776.
- [47] THOMPSON HJ, BRIGGS S, PARANKA NS, PAMUKCU R, PIAZZA GA, BRENDEL K, GROSS PH, AHNEN DJ. Inhibition of mammary carcinogenesis in rats by sulfone metabolite of sulindac. *J Natl Cancer Ins* 1995; **87**: 1259–1260.
- [48] THOMPSON HJ, JIANG C, LU J, MEHTA RG, PIAZZA GA, PARANKA NS, PAMUKCU R, AHNEN DJ. Sulfone metabolite of sulindac inhibits mammary carcinogenesis. *Cancer Res* 1997; **57**: 994–998.
- [49] THUN MJ, NAMBOODIRI MM, HEATH CW. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N Engl J Med* 1991; **325**: 1593–1596.
- [50] TSUJII M, DUBOIS RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 1995; **83**: 493–501.
- [51] TSUJII M, KAWANO S, TSUJI S, SAWAOKA H, HORI M, DUBOIS RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998; **93**: 705–716.
- [52] VERHEUL HMW, PANIGRAHY D, YUAN J, D'AMATO RJ. Combination oral antiangiogenic therapy with thalidomide and sulindac inhibits tumour growth in rabbits. *Brit J Cancer* 1999; **79**: 114–118.
- [53] WADDELL WR, GANSER GF, CERISE EJ, LOUGHRY RW. Sulindac for polyposis of the colon. *Am J Surg* 1989; **157**: 175–178.
- [54] WADDELL WR, LOUGHRY RW. Sulindac for polyposis of the colon. *J Surgl Oncol* 1983; **24**: 83–87.
- [55] WILLETT WC, STAMPFER MJ, COLDITZ GA, ROSNER BA, SPEIZER FE. Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N Engl J Med* 1990; **323**: 1664–1672.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 29.03. 1999 r.

Przyjęto: 25.05. 1999 r.

Adres autorów: ul. Chatubińskiego 5, 02-004 Warszawa

E-mail: jgolab@ib.amwaw.edu.pl



**PIĄTE EUROPEJSKIE SYMPOZJUM:  
*CALCIUM BINDING PROTEINS IN NORMAL  
AND TRANSFORMED CELLS***

**NORDKIRCHEN/MUENSTER, NIEMCY, 30.07.–2.08.1998 r.**

Europejskie sympozja poświęcone białkom wiążącym wapń są organizowane co dwa lata w różnych krajach. Spotkania te mają już swoją tradycję i cieszą się zasłużoną renomą wśród naukowców. Piąte z kolei spotkanie odbyło się w Nordkirchen koło Muenster, znanego ośrodka uniwersyteckiego położonego w północno-zachodniej części Niemiec (Westfalia, 150 km na północny wschód od Duesseldorfu i 250 km na północ od Frankfurtu nad Menem). Sympozjum zgromadziło prawie dwustu uczestników i wykładowców z Europy Zachodniej, a także z Polski, Rosji, Ukrainy, Brazylii, Australii, Japonii i Stanów Zjednoczonych. Muenster, założone w 792 r. pod mianem Mimigernaford, miasto o bogatej historii, której ślady widoczne są na każdym kroku, przeżyło szczególnie burzliwe chwile w okresie wojen religijnych, wojny trzydziestoletniej i, jak reszta Europy, w czasach II wojny światowej. Obecnie jest znaczącym ośrodkiem administracyjnym, rezydencją biskupów, szczyli się także czwartym co do wielkości uniwersytetem w Niemczech, w którym pobiera nauki 45 tysięcy studentów. Ośrodek uniwersytecki ma bardzo bogate tradycje również w badaniach nad białkami wiążącymi wapń, stąd powierzenie organizacji sympozjum naukowcom z Muenster ma swoje uzasadnienie. Szczegółowość Piątego Europejskiego Sympozjum na temat Białek Wiążących Wapń polega nie tylko na tradycji i miejscu, gdzie zostało zorganizowane, ale także na tym, że spotkanie to jest pierwszym od chwili utworzenia Europejskiego Towarzystwa Wapniowego (ECS). W ramach programu sympozjum przewidziano pierwsze walne zebranie członków Towarzystwa, którego zadaniem był wybór władz. Powstanie Towarzystwa z siedzibą w Brukseli zostało, zgodnie z prawodawstwem Unii Europejskiej, zatwierdzone przez króla Alberta II w specjalnym dokumencie – *arrêté royal*, podpisanym 22 września 1997 r. i opublikowanym 15 listopada w *Moniteur Belge*. Przewodniczącym Komitetu Założycielskiego ECS został C.W. Heizmann ze Szwajcarii, a pierwszym członkiem honorowym R.P.J. Williams (fot.



FOTOGRAFIA 1. Profesor R.J.P. Williams (z prawej), nestor badań nad rolą jonów wapnia w komórce i honorowy członek Europejskiego Towarzystwa Wapniowego, w towarzystwie jednej z uczestniczek sympozjum w Nordkirchen, dr J.J. Yang z USA (z lewej)

Informacje na temat Towarzystwa, możliwości zostania członkiem tej organizacji, sympozjów naukowych oraz szeroko pojętej współpracy naukowej można uzyskać pod adresem: *Dr R. Pochet, Lab. Histology. U.L.B., Faculte de Medicine, Campus Erasme, CP 620, 808, route de Lennik B-1070, Bruxelles, Belgium, e-mail: r-pochet@ulb.ac.be lub na stronie internetowej: <http://ecs.u-strasbg.fr>.*

Program naukowy Sympozjum obejmował pięć sesji poświęconych następującym zagadnieniom: „*Ca<sup>2+</sup> sensing and signalling*”, „*Ca<sup>2+</sup> regulated events and C2 domain Ca<sup>2+</sup> binding proteins*”, „*Annexins*”, „*EF hand proteins 1: calmodulin and calmodulin-regulated proteins*” i „*EF hand proteins 2: S100 proteins and miscellaneous*” (łącznie 29 wykładów) i dwie sesje plakatowe. Program był zatem bardzo napięty, ale mnogość poruszonych zagadnień i poziom wystąpień wynagrodziły uczestnikom czas spędzony w salach wykładowych. Wykład inauguracyjny *Kinetics of activation of capacitative calcium entry* został wygłoszony przez J.W. Putneya Jr. (USA), twórcę teorii pojemnościowego mechanizmu wnikania jonów

1), profesor Uniwersytetu w Oxford, chemik, wybitny badacz wapnia i zagadnień związanych z ewolucją białek wiążących wapń. Towarzystwo skupia ponad stu badaczy z 23 krajów europejskich, w tym z Polski, i powstało w celu promocji tematyki wapniowej, organizacji sympozjów, stymulacji współpracy międzynarodowej i wymiany informacji oraz pomocy w rozwoju tej dziedziny i zdobywaniu środków na prowadzenie badań. W trakcie trwania Piątego Sympozjum w Nordkirchen komitet organizacyjny Towarzystwa, zgodnie z wolą uczestników walnego zebrania członków ECS, uległ przekształceniu we władzę Towarzystwa. Przewodniczącym został wybrany C.W. Heizmann (Szwajcaria), Wiceprzewodniczącym R. Donato (Włochy), Sekretarzem Generalnym R. Pochet (Belgia) i Skarbnikiem J. Haiech (Francja). Osoby te, wraz F. Russo-Marie (Francja) i C.B. Klee (USA), utworzyły jednocześnie komitet organizacyjny Szóstego Sympozjum, które odbędzie się w 2000 r. w Paryżu.

wapnia do komórek niepobudliwych (Putney Jr., J.W. : A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7, 1–12, 1986).

W trakcie obrad, szczególnie wiele miejsca poświęcono niedawno odkrytym białkom wiążącym wapń i fosfolipidy, zawierającym w swoich cząsteczkach domenę C2, której struktura i mechanizm wiązania jonów wapnia różnią się zarówno od domeny "EF-hand", jak i od domeny wiążącej  $\text{Ca}^{2+}$  i fosfolipidy w cząsteczkach aneksyn (tzw. *annexin fold*). Białka C2 biorą udział w tak ważnych procesach komórkowych, jak: transport pęcherzykowy, wydzielanie neuroprzekaźników i przekazywanie sygnałów. Zagadnienia te omówili w swoich wystąpieniach między innymi T.C. Südhof (USA), który wygłosił wykład na temat synaptotagminy, białka odgrywającego rolę receptora  $\text{Ca}^{2+}$  w procesie egzocytozy w komórkach nerwowych (*C2-domains as universal  $\text{Ca}^{2+}$ -binding modules: synaptotagmins and more*) oraz C.E. Creutz (USA), który omówił kopiny i trikalbiny, białka spełniające prawdopodobnie podobną funkcję co synaptotagmina, ale w komórkach pierwotniaków i drożdży (*The copines and the tricalbins: novel C2 domain-containing proteins*).

Na symposium zorganizowano także specjalną sesję poświęconą rodzinie białek wiążących się z błonami w sposób zależny od jonów wapnia, aneksynom. Większość wykładów w tej sesji omawiała wyniki najnowszych badań dotyczących struktury aneksyn, świadczących, że te rozpuszczalne białka wiążące wapń mogą w specyficznych warunkach tworzyć w błonie plazmatycznej i błonach organelli komórkowych kanały specyficzne dla  $\text{Ca}^{2+}$  (R. Huber, Niemcy, *Structure and function of annexins, peripheral membrane proteins and voltage regulated ion channels*) lub dla anionów (H.T. Haigler, USA, *Structure and topography of annexin XII on bilayers*). Ta zaskakująca właściwość aneksyn może mieć znaczenie w regulacji homeostazy wapnia w komórce (S.E. Moss, Wielka Brytania, *Regulation of calcium-signaling by annexins*).

Tradycyjnie wiele miejsca poświęcono białkom, w których cząsteczkach występują domeny wiążące jony wapnia o strukturze *EF-hand*. Sesji dotyczącej kalmoduliny i jej funkcji regulatorowej, a więc na temat białek zawierających miejsca wiązania  $\text{Ca}^{2+}$  o klasycznej strukturze *EF-hand*, przewodniczył wybitny badacz tych białek, twórca paradygmatu *EF-hand*, R.H. Kretsinger, USA (Kretsinger R.H., Nockolds C.E., Coffee C.J., Bradshaw R.A. *The structure of a calcium binding protein from a carp muscle*. Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol. 36, 217–220, 1971). W tej części szczególne zainteresowanie słuchaczy wzbudziły wykłady J.R. Dedmana (USA) na temat roli kalmoduliny w cyklu komórkowym zlokalizowanej w jądrze (*Targeted and spatiotemporal inhibition of calmodulin in the nucleus*) oraz C.B. Klee (USA) na temat regulacji aktywności zależnej od  $\text{Ca}^{2+}$  fosfatazy, kalcyneuryny, w komórkach poddanych stresowi oksydacyjnemu (*Control of protein phosphorylation by calcium and oxidative stress*). Białkom S100, które w swojej cząsteczce zawierają miejsca wiązania jonów wapnia o strukturze podobnej do, ale nie identycznej ze strukturą "EF-hand", poświęcono odrębną sesję, której prze-

wodniczyli L. van Eldik (USA) i R. Pochet (Belgia). Organizatorzy tej sesji położyli duży nacisk na udział białek S100 w etiologii nowotworów i innych chorób (R. Barraclough, Wielka Brytania, "*Calcium binding protein S100A4 (p9Ka) and mutants of cancer cells*"; A. Polans, USA, "*Identification and differential expression of calcium binding proteins associated with ocular melanoma*"; C. Sorg, Niemcy, "*Novel function of MRP8 and MRP14 in inflammatory reactions*"). Szczególna rola, jaką odgrywają w komórce białka S100, polega na tym, że jakkolwiek powinowactwem do  $\text{Ca}^{2+}$  białka te przypominają kalmodulinę, ale inne cechy zbliżają je raczej do aneksyn i białek zawierających domenę C2.

Pewnym zaskoczeniem mógł być fakt tylko niewielkiego udziału w symposium badaczy zajmujących się białkami transportującymi jony wapnia w komórce (M. Treiman, Dania, *CAT, a fluorescent analogue of thapsigargin, is a potent inhibitor and a conformational probe of skeletal muscle  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase*). Tematyce tej poświęcono także niewiele miejsca w czasie sesji posterowej. Wśród ponad stu plakatów zgłoszonych na symposium tylko kilka omawiało ATPazę transportującą jony wapnia, większość dotyczyła różnych aspektów badań nad klasycznymi białkami EF-hand, białkami S100 i nad aneksynami.

Zastanawiając się, na podstawie wyników zaprezentowanych w Nordkirchen, nad kierunkami, w jakich zmierzają obecnie badania nad białkami wiążącymi wapń, wydaje się, że jednym z podstawowych jest udział tych białek w różnego rodzaju patologich i stanach chorobowych. Swierdzono na przykład, że u podłoża migreny leży m.in. mutacja w podjednostce 1A zależnego od napięcia kanału wapniowego typu P/Q (R.R. Frants, Holandia, "*Migraine and ataxia: episodic and chronic features of neuronal CACNA1A channelopathies*"). Wykazano również, że dziedziczne choroby związane z zaburzeniami homeostazy wapnia w płynach ustrojowych, wywołane są przez mutacje receptora wapnia zewnątrzkomórkowego – CaR (*calcium-sensing receptor*), prowadzące w konsekwencji do nieprawidłowości w gospodarce wapniowej organizmu (R.V. Thakker, Wielka Brytania, "*Molecular genetics and disorders of the calcium-sensing*"). W porównaniu zatem z poprzednimi europejskimi Sympozjami na temat białek wiążących wapń (trzecim w Zurichu, 1994 r., patrz R.J.P. Williams: „Calcium-binding proteins in normal and transformed cells, meeting report”, *Cell Calcium* 16, 339–346; czwartym w Peruggi, 1996 r., patrz Williams R.J.P.: „Calcium binding proteins in normal and transformed cells, meeting report”, *Cell Calcium* 20, 87–93), Piąte Sympozjum w Muenster (patrz Williams R.J.P.: „Calcium in health and disease, meeting report”, *Cell Calcium* 24, 233–237) dobitnie wskazuje na znaczenie, jakie ma zachowanie homeostazy wapnia w organizmie i jakie ma udział różnorodnych wzajemnie powiązanych białek wiążących wapń (ponad 100 w organizmie człowieka) w tym procesie.

W trakcie trwania symposium ogłoszono konkurs na najlepszy plakat prezentowany w Nordkirchen. Nagrodę ufundowało Europejskie Towarzystwo Wapniowe. W komisji oceniającej wzięły udział Panie Profesor C.B. Klee z USA, L. van

Eldik z USA, A. Lewit-Bentley z Francji i F. Russo-Marie z Francji. Miło jest nam poinformować Czytelników, że dwie równorzędne nagrody ECS przyznano D. Marilley i B. Schwallerowi z Instytutu Histologii i Embriologii Ogólnej we Fribourgu (Szwajcaria), za plakat *Calretinin and its alternatively spliced form calretinin-22k have distinct functions in the control of colon adenocarcinoma cell growth* oraz J. Bendorowicz-Pikuła i S. Pikuła z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN w Warszawie za plakat *Adenosine 5-triphosphate – a new regulator of annexin VI function* (fot. 2).

Wyróżnienie Towarzystwa otrzymał również C. Sorg wraz z zespołem badaczy z Uniwersytetu z Muenster za cykl plakatów na temat białek MRP8 i MRP14 i ich roli w procesach zapalnych. Wręczenie nagród Towarzystwa miało bardzo uroczysty charakter i było połączone z bankietem, który został zor-

organizowany na terenie skansenu wiejskiej architektury niemieckiej z przełomu XVII i XVIII wieku (Mühlehof), położonego nad przepięknym jeziorem Aasee. W trakcie uroczystości przyznano również honorowe członkostwo Towarzystwa C.B. Klee, za szczególne zasługi w powstaniu i organizacji ECS. Wśród innych pozanaukowych atrakcji sympozjum organizatorzy przewidzieli wycieczkę do Muenster połączoną z wizytą na ulicy tzw. kuchni piwnych, które jeszcze w XIX wieku, ze względu na jakość dostarczanej do miasta wody i możliwość zarażenia groźnymi chorobami, warzyły dla mieszkańców Muenster znakomite piwo jako jedyne źródło płynów dla rodziny na cały dzień.

Piąte Sympozjum zorganizowane było na terenie starej siedziby rodowej przypominającej zarówno architekturą, jak i otoczeniem miniaturowy Wersal (fot. 3). Miasteczko Nordkirchen także zachwycało ciszą, czystością i uprzejmością mieszkańców, co przyczyniło się do wspaniałej atmosfery panującej na sympozjum. Wszyscy uczestnicy sympozjum byli zachwyceni zarówno poziomem merytorycznym sesji naukowych, możliwością przeprowadzenia interesujących dyskusji z największymi autorytetami badań nad wapniem oraz nawiązania ciekawych kontaktów, jak i wspaniałym otoczeniem, oprawą sympozjum i gościnnością gospodarzy.



FOTOGRAFIA 2. J. Bendorowicz-Pikuła, laureatka nagrody Europejskiego Towarzystwa Wapniowego za najlepszy plakat prezentowany na sympozjum



FOTOGRAFIA 3. Widok ogólny na kompleks pałacowy w Nordkirchen, w którym odbywały się obrady Piątego Europejskiego Sympozjum na temat Białek Wiążących Wapń

Szczególne podziękowania należą się w tym względzie profesorom V. Gerke z Uniwersytetu w Muenster i R. Pochetowi z Brukseli.

Miłe wspomnienia dla uczestników z Polski to także spotkania z naukowcami polskiego pochodzenia, profesorami M. Treimanem z Kopenhagi i K. Palczewskim z Waszyngtonu. Niewątpliwie każdy z nas zachowa nadzieję ponownego spotkania w tym gronie na Szóstym Sympozjum na temat Białek Wiążących Wapń, które odbędzie się w Paryżu, w roku 2000.

*Joanna Bandorowicz-Pikuła, Sławomir Pikuła*

*Redaktor prowadzący – J. Kuźnicki*



**PIĄTE MIĘDZYNARODOWE SEMINARIUM:  
MEMBRANE SKELETON – REGULATORY  
FUNCTION IN NORMAL AND ABNORMAL CELLS  
SZKLARSKA PORĘBA/WROCŁAW, 11–13.06. 1998 r.**

Piąte Seminarium poświęcone szkieletowi podbłonowemu, kolejne spotkanie z serii międzynarodowych seminariów biologii molekularnej, organizowanych co roku dla upamiętnienia profesor W. Mejsbaum-Katzenellenbogen, odbyło się tym razem w Szklarskiej Porębie, w bardzo gościnnym, pięknie położonym i oferującym dobrą kuchnię hotelu Olimp. Sponsorami seminarium były m.in. Ministerstwo Edukacji Narodowej, Polska Sieć Biologii Molekularnej i Komórkowej UNESCO/PAN i Uniwersytet Wrocławski. Seminarium zostało zorganizowane przez profesora A.F. Sikorskiego z Uniwersytetu Wrocławskiego, przy współdziałaniu profesorów S.R. Goodmana (Mobile, USA) i J. Szopy (Wrocław). Program seminarium obejmował trzy sesje naukowe:

- *Erythrocyte membrane skeleton and its defects in pathological red cells,*
- *Erythropoiesis and dyserythropoiesis,*
- *Membrane skeleton of nonerythroid cells and its defects oraz*
- *Participation of membrane skeletal proteins in signal transduction and other regulatory roles.*

Łącznie zaplanowano dwadzieścia osiem 30- i 40-minutowych wystąpień i sesję posterową obejmującą około 40 doniesień. Z przewidzianych wykładów nie odbył się tylko jeden, jednak nie z winy organizatorów, ale warunków pogodowych, które uniemożliwiły dotarcie wykładowcy. Tę drobną niedogodność wynagrodzili uczestnikom seminarium (około 70 osób) inni wybitni specjaliści z USA, Niemiec, Francji, Włoch, Wielkiej Brytanii, Szwecji, Finlandii i Słowenii, wśród nich tak znani badacze, jak: S.R. Goodmann (Mobile, USA), J.H. Hartwig (Boston, USA), S.B. Shoet (San Francisco, USA), J. Delaunay (Le Kremlin-Bicetre, Francja), V. Bennett (Durham, USA), N. Mohandas (Berkeley, USA), D. Aunis (Strasbourg, Francja) i V. Gerke (Muenster, Niemcy). Fakt, że tak wielu znakomitych badaczy



FOTOGRAFIA: Uczestnicy Piątego Seminarium Biologii Molekularnej na temat Organizacji Cytoszkieletu przed hotelem Olimpia, w Szklarskiej Porębie

przyjęto zaproszenie, jest osobistym sukcesem A.F. Sikorskiego, ale dowodzi również, naszym skromnym zdaniem, coraz większego zainteresowania, jakie budzi nasz kraj w środowisku naukowym zagranicą zarówno przemiany polityczne w Polsce, jak i zmiany w samej nauce. Nic dziwnego, że dla wielu gości z USA i Europy Zachodniej, spotkanie w naszym kraju z tak wieloma kolegami z całego świata było nie lada zaskoczeniem; jeden z uczestników seminarium wyraził taką opinię *explicité*, dziękując organizatorom za świetny program naukowy seminarium.

Wykład inauguracyjny seminarium, wygłoszony przez S.R. Goodmanna (*The spectrin membrane skeleton: a key element in sickle cell disease*), dotyczył interesującego zagadnienia wpływu N-acetyl cysteiny, stosowanego klinicznie antyoksydanta, na odwracanie zmian patologicznych powstających w cytoszkielecie erytrocytów przyjmujących kształt sierpowaty (tzw. *irreversibly sickled cells*). Kontynuując tę tematykę S.B. Shohet, San Francisco, USA, omówił najnowsze osiągnięcia dotyczące wpływu konformacji białka pasma trzeciego na powstawanie zmian patologicznych polegających na wroście adhezji erytrocytów do nabłonka wyściełającego ściany naczyń krwionośnych (*Never facets of sickle cell adhesiveness*). Charakterystyce ogólnej organizacji cytoszkieletu poświęcone były wykłady J.H. Hartwiga, Boston, USA (*The structure of the resting and activated platelet cytoskeleton*) i M. Hortscha, Ann Arbor, USA (*The LI family of neural cell adhesion molecules – linking cell adhesion to membrane skeleton organization*). Interesujące wykłady dwóch badaczy

zajmujących się aneksynami dotyczyły mechanizmów egzocytozy (D. Aunis Strasbourg, Francja: *Regulation of exocytosis by cytoskeleton in neuroendocrine cells*) i różnych aspektów regulacji transportu pęcherzykowego w komórce (V. Gerke, Muenster, Niemcy: *Annexins and membrane dynamics*). Wiele uwagi poświęcono szczegółowej analizie różnych białek cytoszkieletu, m.in. ankiryny (V. Bennett, Durham, USA: *Molecular physiology of ankyrins: lessons from ankyrin A and ankyrin knock-out mice*), białka 4.1 (N. Mohandas Berkeley, USA: *Protein 4.1 and its homologues – function in erythroid and non-erythroid cells*) i spektryny (K. Djinović-Carugo, Heidelberg, Niemcy: *Crystal structure of F-actin binding domain from human  $\beta$ -spectrin*; R.I. MacDonald, Evanston, USA: *Structural studies of cloned segments of chicken brain  $\beta$ -spectrin*; A.J. Baines, Canterbury, Wielka Brytania: *Beta II spectrins and fodaxins: interacting proteins in many tissues*). Rozważaniom tym towarzyszyły wykłady na temat analizy zmian molekularnych cytoszkieletu w stanach patologicznych (B. Pace, Mobile, USA: *Modulated human globin gene expression: role for antisense expression vectors*; E.J. Luna, Shrewsbury, USA: *Actin-binding proteins in motile cells*; J.C. Pinder, London, Anglia: *The muscles of malaria*; A. Wahlin, Umea, Szwecja: *Congenital dyserythropoietic anemia type III*; S.N. Wickramasinghe, London, Anglia: *New information of congenital dyserythropoietic anemia. Type I*; J. Delaunay: *Hereditary dehydrated stomatocytosis: recent advances*; S. Eber, Getynga, Niemcy: *Hereditary elliptocytosis. Influence of trans-acting low expression alleles on disease severity*; M.C. Lecomte, Paris, Francja: *Tissue-distribution of two alpha fodrin isoforms: characterization and study of their sensitivity to calpain*).

Część wykładów dotyczyła wpływu fosfolipidów i wapnia na organizację cytoszkieletu (L. Backman, Umea, Szwecja: *Calcium in spectrin function*; S. Svetina, Ljubljana, Słowenia: *Cytoskeleton-bilayer interaction and red blood cell shapes*; A.F. Sikorski, Wrocław: *Interactions of spectrins with phospholipids: possible physiological role*). Duże zainteresowanie uczestników seminarium wzbudziły również wykłady na temat roli białek cytoszkieletu w transporcie pęcherzykowym między błonami endoplazmatycznego retikulum i aparatu Golgiego (E.S. Sztul, Birmingham, USA: *Molecular events during ER to Golgi membrane traffic: role of cytoskeletal proteins*; K. Beck, Davis, USA: *A spectrin membrane skeleton of the Golgi complex*). Streszczenia zarówno wykładów, jak i posterów opublikowano w wydawanym przez profesorów J. Szopę, A. Kozubka i A.F. Sikorskiego oficjalnym czasopiśmie Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki *Cellular and Molecular Biology Letters*, tom 3, zeszyty 2 i 4 z 1998 r.

Zarówno z przebiegu sesji naukowych oraz dyskusji, jak i opierając się na opiniach kularowych można z całym przekonaniem stwierdzić, że naukowy poziom seminarium zorganizowanego w Szklarskiej Porębie był bardzo wysoki. Towarzyszyły mu miła atmosfera roztaczana przez organizatorów i fachowa pomoc ich młodych kolegów, pracowników naukowych i studentów z Uniwersytetu Wroc-

ławskiego. Choć pogoda niedopisała, wieczorne spotkania towarzyskie przyczyniły się do nawiązania wielu przyjaznych kontaktów, tak że niektórzy uczestnicy z wyraźnym żalem opuszczali gościnne podwoje hotelu Olimp. Należy przypuszczać, że seminaria tego typu wejdą na stałe do kalendarza międzynarodowych spotkań naukowych. Ich kameralność, dobra organizacja i wybór miejsca spotkania gwarantują zainteresowanie uczestników również w przyszłości. Więcej informacji na temat seminariów można zdobyć pod adresem:

Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Wrocławski,  
ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław,  
fax: (071) 3252930, e-mail: mejsem@angband.microb.uni.wroc.pl,  
strona internetowa: <http://www.microb.uni.wroc.pl>.

*Joanna Bandorowicz-Pikuła i Sławomir Pikuła*

*Redaktor prowadzący – J. Kuźnicki*

## KOMUNIKAT

Uprzejmie informujemy, że Komisja Biologii Starzenia PAN oraz Redakcja „Postępów Biologii Komórki” organizują w dniu 27 listopada (sobota) 1999 roku w Warszawie (Instytut Biostruktury Akademii Medycznej, ul. Chałubińskiego 5, sala im. Paszkiewicza, godz. 11–15) jednodniową konferencję naukowo-szkoleniową na temat:

### STARZENIE SIĘ W ASPEKCIE KOMÓRKOWYM

#### Program:

- 1. *Andrzej Myśliwski*: Wprowadzenie
- 2. *Ryszard Oliński, Marek Jurgowiak*: Wolnorodnikowe modyfikacje zasad azotowych DNA i ich rola w procesie starzenia się i chorobach wieku podeszłego
- 3. *Tomasz Biliński*: Rola mechanizmów antyoksydacyjnych w procesie starzenia się – Badania modelowe
- *Przerwa na kawę*
- 4. *Jolanta Myśliwska*: Zmiany ekspresji receptorów na powierzchni limfocytów w procesie starzenia się człowieka
- 5. *Maciej Kurpisz*: Komórki gonady męskiej w procesie starzenia się
- 6. *Zbigniew Kmiec*: Związane ze starzeniem modyfikacje w działaniu hormonów uwarunkowane zmianami na poziomie receptorowym i efektorowym
- 7. *Podsumowanie*

Wpisowe konferencji wynosi 5,- zł, za co uczestnik otrzymuje suplement z drukowanymi wykładami, nie jest wymagane wcześniejsze zgłoszenie się. Dodatkowe informacje można uzyskać pod adresami:

Komisja Biologii Starzenia PAN, Katedra Histologii i Immunologii AM  
w Gdańsku, ul. Dębinki, tel. (58) 3491430, fax (58) 3023673;  
e-mail: zkmiec@amedec.amg.gda.pl

Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, ul. Marymoncka 99,  
01-813 Warszawa, tel. 834 68 47, 8340344, fax 8340470;  
e-mail: jkawiak@cmkp.edu.pl

*prof. dr hab. Jerzy Kawiak   prof. dr hab. Andrzej Myśliwski   prof. dr hab. Zofia Osuchowska*

## Wskazówki przygotowania rysunków i streszczeń do publikacji w PBK

Dostarczane na dyskietkach teksty powinny być napisane w Wordzie, wersja 6,0 lub wcześniejsza. Jeśli w tekst zostały wstawione rysunki, powinny one zostać umieszczone osobno na dyskietce. Powinny to być albo mapy bitowe (.TIF, .PCX), albo pliki z Corela, wersja 5,0 lub wcześniejsza. Każda wersja Worda lub Corela pozwala na zachowanie pracy w formacie wersji wcześniejszej.

Cennik odbitek prac dla Autorów w 1997 r.

Liczba odbitek	50	100	200	400
Cena zł	40,00	60,00	80,00	100,00

Zamówienie na odbitki **musi** być złożone wraz z przesłaną korektą pracy.

Wprowadzamy nowy standard **streszczeń** w „Postęпах”. Streszczenie po polsku będzie jak dotychczas pierwsze przed streszczeniem w języku angielskim. Streszczenie ma mieć następującą strukturę:

j. polski		j. angielski
Podstawy zagadnienia:	jedno zdanie	Background:
Podtytuły:	do każdego podtytułu 3–5 zdań	Subtitles:
Wnioski:	2 zdania	Conclusions:
Słowa kluczowe:	do 8 słów	Key words:

Takie streszczenia standardowe mogą być ważne, gdyż obecnie czyta się je komputerowo. Treść streszczenia zachęca bądź nie zachęca do przeczytania całego artykułu.

Prosimy również Autorów o podawanie adresów e-mail, o ile je mają.

## Warunki prenumeraty kwartalnika **POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI**

### *Prenumerata na rok 1999*

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1999 pod adresem:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; tel. 8340 344, fax. 8340 470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl

na konto: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa;

Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 12401053-40006576-2700-401112-001.

Cena prenumeraty rocznika na rok 1999:

dla instytucji (bibliotek) wynosi 60 zł,

a dla odbiorców indywidualnych 20 zł.

Subscription orders for **POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI** for 1999 should be placed at local press distributors or directly at Editorial Board of

**POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI**, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland, tel. 8340 344, fax. 8340 470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl:

On account: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa;

Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa, No 12401053-40006576-2700-401112-001.

Price per year 20 dollars USA.

# INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, nie publikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem biochemicznym, histologicznym, anatomicznym i embriologicznym. Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody redakcji publikowane w innych periodykach. Prosimy Autorów o nadsyłanie prac bezpośrednio do Redaktorów odpowiedniej specjalności (adresy na 2 str. okładki), a do Redakcji w Warszawie tylko te artykuły, które nie odpowiadają żadnej z wymienionych specjalności.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

1) artykuły przeglądowe nie przekraczające 15 stron maszynopisu i do 100 pozycji bibliograficznych koniecznie z ostatnich 5 lat (natomiast wcześniejsze prace mogą być pracami przeglądowymi);

2) doniesienia z ostatniej chwili na 3–5 stronach maszynopisu z kilkoma pozycjami bibliograficznymi ostatniego roku (licząc od daty wysłania do redakcji);

3) listy do redakcji (do 1 strony maszynopisu).

Tekst pracy i załączniki należy przesyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 w układzie normalnym 1800 znaków na stronie. Ostateczna wersja tekstu i rysunki (wskazówki s. 696) powinna być przysłana na dyskietce 3,5" jako plik (file) Windows lub ASCII. Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona dla redakcji winna zawierać: imiona, nazwiska, tytuły naukowe autorów i adresy: w pracy, domowy wraz z telefonem i e-mail, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rysunków. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następna strona powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 1 str.) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (Index Medicus), o ile są tam zawarte. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rysunków, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, rys. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawić alfabetycznie według następującego wzoru:

[1] HNILICA LS, McLURE ME, SPEI.TZBERG TC. Histone biosynthesis and the cell cycle. [w] Philips MP, Schwartz E (red.) Histone and Nucleohistones. London, New York: Philips, Plenum Press 1977: 60–64.

[2] SACHSENMAJER W, REMY V, PLATTNER R. Initiation of synchronous mitosis in Physarium polycephalum. Exptl Cell Res 1980; 2: 41–48.

Tabele, opisy schematów i rysunków powinny być załączone na oddzielnych stronach. Schematy i rysunki muszą być wykonane w postaci nadającej się do reprodukcji. Fotografie powinny być kontrastowe i wykonane na błyszczącym papierze. Wymiary poszczególnych rysunków, schematów i fotografii nie mogą przekraczać 125 x 180 mm lub ich połowy. Jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, należy podać, skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na reprodukcję, jeżeli materiały te zamieszcza się w niezmienionej formie. Wszystkie załączniki muszą być opatrzone na odwrocie nazwiskiem pierwszego autora i oznaczeniem góry i dołu ilustracji. Stosowane jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu doby. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 1 egz. zeszytu PBK z opublikowaną pracą oraz mogą zamówić odbitki odpłatnie odsyłając korektę, cennik w PBK. Redakcja prosi o propozycję do 5 osób (nazwisko, imię, adres, fax), które byłyby odpowiednimi recenzentami maszynopisu, nie powinny jednak być pracownikami instytucji, w której pracuje autor, ani jego współpracownikami. Poprawioną po recenzji wersję pracy należy zwrócić do redakcji koniecznie w ciągu 30 dni. Redakcja zrezygnuje z publikacji maszynopisu, którego autorzy do 30 dni nie odpowiedzą na list redaktora.

Redakcja prosi także głównego Autora o dołączenie do maszynopisu podpisanej odpowiedzi na następujące pytania:

Dołączono 2 kopie maszynopisu,	Treść pracy nie była uprzednio publikowana i nie została	
tabel i rycin.	wysłana do innej redakcji.	<i>tak nie</i>
Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę.	Dołączono kopię pracy na dyskietce z podaniem nazwy	<i>tak nie</i>
Jest zgoda osób, których informacje niepubli-	pliku i użytego programu edycyjnego z komputera IBM	<i>tak nie</i>
cowane są zamieszczone w tekście artykułu	Odpowiadam za całość pracy opisanej w zał. maszyn.	<i>tak nie</i>
Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w "Postęпах Biologii Komórki" przechodzi na własność reda-		<i>podpis</i>
kcji i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji.		

SPIS TREŚCI – CONTENTS

W tym Zeszyście	445
MARZAŁEK A., BŁOTNA-FILIPIAK M., WITT M., BICZYSKO W.: Zespół Kartagenera jako zespół nieruchomych rzęsek – Przegląd wiadomości The Kartagener's syndrome as an immotile cilia syndrome – An overview	447
BARTMAŃSKA J.: Rola systemu c-Kit/SCF w regulacji procesu spermatogenezy ssaków Role of the c-Kit/SCF system in regulation of mammalian spermatogenesis	461
BOBIŃSKI R., OLCZYK K., KRZYŻOWSKA-BOBIŃSKA E., JANIC W.: Syndekany – Proteoglikany transmembranowe – Syndecans – Transmembrane proteoglycans	477
LENARTOWICZ E., DĘBSKA G.: Oddziaływanie jonów $Zn^{2+}$ w zwierzęcych komórkach niepobudliwych – Action of $Zn^{2+}$ ions in animal nonexcitable cells	491
MAŁUSZYŃSKA J.: Porównawcze badania organizacji genomu roślinnego Comparative study of plant genome organization	507
CZERPAK R., BAJGUZ A.: Aktywność fizjologiczno-biochemiczna poliamin w adaptacji roślin do stresów Physiological and biochemical activity of polyamines in plant adaptation to stresses	523
CISZAK L., WOŁOWIEC D., KOSMACZEWSKA A., BOĆKO D., FRYDECKA I.: Białkowe inhibitory kinaz cyklino-zależnych z rodziny p16: Budowa, właściwości biochemiczne i rola biologiczna The p16 family of the protein cyclin-dependent kinase inhibitors: Structure, biochemical properties and biological function	539
ROŻYŃKOWA D., FILIP A.: Endogenne białka przeciwdziałające apoptozie Endogenous apoptosis inhibiting proteins	561
KWIATKOWSKA D., KWIATKOWSKA-KORCZAK J.: Kwas retinowy: jego metabolizm i mechanizm działania Retinoic acid: Its metabolism and mechanism of action	579
MROCZKOWSKA J. E.: Bariera krew-mózg – The blood-brain barrier	593
ŻADZIŃSKI R., NOWAK J. Z.: Molekularne podstawy działania i synchronizacji okołodobowego oscylatora biologicznego Molecular bases of biological circadian oscillator activity and synchronization	611
KOSMACZEWSKA A., CISZAK L., FRYDECKA I.: Molekularne mechanizmy aktywacji limfocytów T – Przenoszenie sygnału do jądra komórkowego Molecular events during T cell activation – Signal transduction into the nucleus	629
KAMIŃSKI R., KOZAR K., GOŁĄB J.: Cyklooksygenazy, niesteroidowe leki przeciwzapalne i raki jelita grubego – Część I Cyclooxygenases, nonsteroidal anti-inflammatory drugs and colon cancers – Part I	651
KAMIŃSKI R., KOZAR K., GOŁĄB J.: Cyklooksygenazy, niesteroidowe leki przeciwzapalne i raki jelita grubego – Część II Cyclooxygenases, nonsteroidal anti-inflammatory drugs and colon cancers – Part II	667
Piąte Europejskie Sympozjum: <i>Calcium binding proteins in normal and transformed cells</i> Nordkirchen/Muenster, Niemcy, 30.07.–2.08.1998 r.	685
Piąte Międzynarodowe Seminarium: <i>Membrane skeleton. regulatory function in normal and abnormal cells</i> Szklarska Poręba/Wrocław, 11–13.06.1998 r.	691
Komunikat	695
Wskazówki przygotowania rysunków i warunki prenumeraty	696

Indeks 369705