

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

POLISH
ANATOMICAL
SOCIETY

POLISH SOCIETY
FOR CELL
BIOLOGY

VOL. 27, ISSUE 1/2000
(1-152)

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, cytoszkielet, połączenia międzykomórkowe – developmental biology, embryology, cytoskeleton, cell junctions – *Inst. Zoologii UJ, 30-060 Kraków, Ingardena 6*),

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

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

Maria OLSZEWSKA (komórki roślinne, informacja genetyczna w komórkach roślinnych i zwierzęcych – plant cells, genetic information in plant and animal cells – *Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin Instytutu Fizjologii i Cytologii UŁ, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16*),

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

Maciej ZABEL (histologia ogólna, endokrynologia, histochemia (immunocytochemia, hybrydocytochemia), ultrastruktura komórek – histology, endocrinology, histochemistry, immunocytochemistry, hybrydocytochemistry, cell ultrastructure – *Zakład Histologii AM, 50-368 Wrocław, ul. Chałubińskiego 6a*)

Jan ŻEROMSKI (patologia, immunologia, cytometria – pathology, immunology, cytometry – *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.

Recenzenci z tomu 26 PBK z 1999 r. zostali umieszczeni obok (na s. 1)

Referees of the volume 26, 1999 – on following page 1.

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

e-mail: www.mol.uj.edu.pl/pbk

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.

Wykaz recenzentów z tomu 26 – Referees of the volume 26 1999

prof. Halina Augustyniak,
prof. Teresa Banaś,
prof. Jolanta Barańska
prof. Grzegorz Bartosz,
prof. Barbara Bilińska,
prof. Szczepan Biliński,
prof. Wiesława Biczyskowa
prof. Lech Chyczewski
prof. Marian Dróżdź,
prof. Franciszek Dubert,
prof. Danuta Duś
prof. Wiesław W. Jędrzejczak,
doc. dr hab. Bożena Kamińska,
prof. Jerzy Kawiak,
prof. Wincenty Kilarski,
prof. Zbigniew Kmieć,
dr hab. Andrzej K. Kononowicz,
prof. Stanisław Lewak,
prof. Jolanta Małuszyńska,
prof. Jan Michejda,
prof. Andrzej Myśliwski,
prof. Olgierd Narkiewicz
prof. Maria J. Olszewska,
prof. Krystyna Ossowska
prof. Jerzy Ostrowski,

prof. Marek Pawlikowski
prof. Barbara Płytycz,
dr n. med. Monika Puzianowska-Kuźnicka,
dr hab. Elżbieta Pyza,
dr hab. Elżbieta Romanowska,
prof. Danuta Rożynkowa,
prof. Wiesława Rudnicka,
prof. Marian Saniewski,
doc. dr hab. Ewa Sikora,
prof. Piotr Stępień,
prof. Kazimierz Strzałka,
prof. Cezary Szczylik,
prof. Krzysztof Szyfter,
prof. Maria Śmiałowska
dr Małgorzata Tarczyńska,
prof. Andrzej Tretyn,
prof. Wiesław Trzeciak,
prof. Lucyna Witulińska
prof. Maciej Zabel,
prof. Włodzimierz Zagórski-Ostoja,
prof. Krzysztof Zeman
prof. Alojzy Zgirski,
prof. Michał Zimecki,
prof. Maciej Żylicz.

W tym Zeszycie Postępów Biologii Komórki

- Od stycznia br. „Postępy” mają stronę internetową: www.mol.uj.edu.pl/pbk. Można tam znaleźć tytuły artykułów z „Postępów” od roku 1990 oraz tytuły i streszczenia artykułów bieżących od stycznia 1999 r.
- Tradycyjnie staramy się informować o Noblistach z zakresu fizjologii i medycyny. W roku 1999 został nim Günter Blobel (s. 3).
- W dwu kolejnych artykułach na stronach: 53 i 68 przedstawiono sposób infekcji wirusem HIV-1 i rolę glikoproteiny gp120. Przedstawiono również próby immunizacji przeciw temu wirusowi.
- Peptydy z domeną koniczyno-podobną występują głównie w przewodzie pokarmowym. W artykule na stronie 125 opisano funkcje tych peptydów.

GÜNTER BLOBEL – NOBEL 1999*

JANINA KACZANOWSKA

Zakład Cytofizjologii Instytutu Zoologicznego Uniwersytetu Warszawskiego

Streszczenie: Nagrodę Nobla z fizjologii i medycyny w 1999 r. przyznano Günterowi Blobelowi. (*Postępy Biologii Komórki* 1999; 27: 3–16)

Summary: The 1999 Nobel Prize in Physiology and Medicine was granted to Günter Blobel. (*Advances in Cell Biology* 1999; 27: 3–16)

Jednym z kluczowych problemów biologii jest wykrycie mechanizmów powodujących, że **transkrypty (mRNA) tworzone na matrycy DNA w jądrze prowadzą do nieprzypadkowego rozmieszczenia białek w trójwymiarowej strukturze komórki eukaryotycznej**. W komórkach Prokaryota wykryto, że agregacja różnych enzymów z nukleoidem w wielkie kompleksy enzymatyczne umożliwia wydajną replikację DNA, transkrypcję informacyjnego mRNA, a następnie biosyntezę białek *in situ*. Ale te mechanizmy dotyczyły tylko komórek, w których istnieje możliwość bezpośredniego kontaktu molekuł na zasadzie ich swobodnej dyfuzji. Komórka eukaryotyczna ma wyodrębnione przedziały: jądrowy, cytoplazmatyczny, mitochondrialny i plastydowy poroizdzielane błonami. Funkcjonowanie komórki wymaga zatem zarówno segregacji molekuł, jak i mechanizmów wymiany i transportu cząsteczek pomiędzy tymi przedziałami. Dotychczas poznano cztery podstawowe typy mechanizmów nieprzypadkowego lokalizowania białek na terenie komórki:

- selektywną translację białek do obłonionych pęcherzyków siateczki śródplazmatycznej,
- posttranslacyjną, docelową segregację białek do różnych obłonionych pęcherzyków, następnie ich przemieszczanie i podczepianie do błony komórkowej z ewentualnym wydzielaniem zawartości na zewnątrz (sekrecją),

*Praca została wykonana w ramach tematu statutowego Instytutu Zoologicznego UW.

- dwukierunkową translokację białek i nukleoprotein przez pory otoczki jądrowej,
- docelowy transport różnych typów mRNA związanych z układem motorycznym cytoszkieletu i kontrolowaną przestrzennie albo translację transkryptów, albo ich degradację.

Okazało się, że zaburzenia w funkcjonowaniu mechanizmów sortowania białek w komórce są przyczyną szeregu chorób (np. muscowiscydoza), a zakłócenia w eksporcie mRNA z jądra wiążą się z wieloma chorobami wirusowymi.

Poznanie trzech pierwszych mechanizmów zawdzięczamy zarówno bezpośrednim badaniom Blobela, jak i badaniom zainspirowanym jego hipotezami. **Dorobek naukowy Güntera Blobela został uhonorowany nagrodą Nobla w roku 1999.**

1. ODKRYCIE ZJAWISKA KOTRANSLACJI; HIPOTEZA SYGNAŁOWYCH PEPTYDÓW I SYGNAŁOWEJ PEPTYDAZY

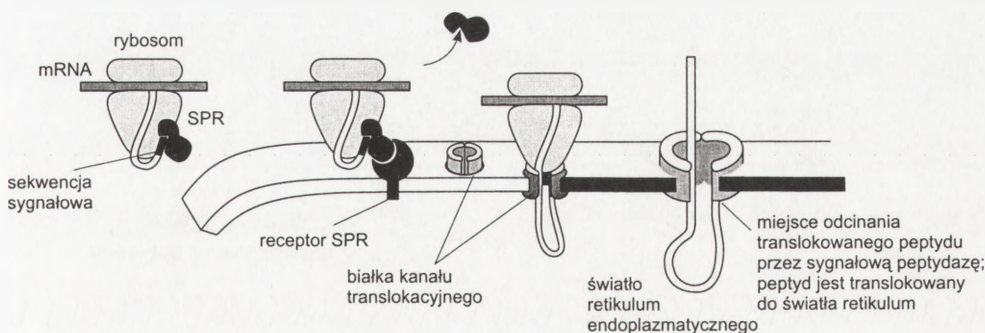
Już w latach sześćdziesiątych wykazano metodami cytochemicznymi, że wyodrębnione błonami śródkomórkowymi terytoria (zwane również przedziałami lub kompartmentami) komórki eukaryotycznej spełniają wyspecjalizowane funkcje, a błony poszczególnych przedziałów różnią się chemicznie. Błony komórki spełniają szereg funkcji związanych z regulacją stężenia i składu jonów, syntezą ATP, ciągłym odtwarzaniem dwuwarstwy lipidowej, importem prostych cząsteczek organicznych i nieorganicznych oraz wydzielaniem pewnych substancji na zewnątrz, na zasadzie albo dyfuzji, albo dyfuzji ułatwionej. Jednocześnie błony biologiczne stanowią wyraźną nieprzepuszczalną barierę dla większości białek rozpuszczonych w cytoplazmie (białek hydrofilowych).

Badania *in vitro* nad odtworzeniem (ang. *reconstitution*) biosyntezy białek w cytoplazmie wyizolowanej wraz z rybosomami, tRNA i enzymami pozwoliły w wielu przypadkach na translację białka kodowanego przez mRNA odrębnego gatunku np. syntezę białek roślinnych w cytoplazmie zwierzęcej. Wyniki te stanowiły ostateczny dowód na uniwersalny charakter mechanizmów translacji w komórkach eukaryotycznych. Natomiast nie odpowiadały na pytanie, dlaczego pewne typy mRNA kodujące białka sekrecyjne podlegają translacji wyłącznie w obecności siateczki śródplazmatycznej ziarnistej (ER), w której rybosomy są związane z błonami. W badaniach *in vitro* białka nie tworzyły się w cytosolu, natomiast translacja zachodziła w obecności ER, a wytworzone białka gromadziły się w pęcherzykach.

Szczegółowe badania Sabatiniego i Blobela [29], Blobela i Dobbersteina [5 i 6], doprowadziły do sformułowania zasadniczych zrębów hipotezy sygnałowej [7] rozwiniętej w kolejnych publikacjach [36, 25]. W badaniach nad biosyntezą hormonu

trzustki psa we frakcjach komórkowych okazało się, że rybosomy rozpoczynają syntezę peptydu hormonu w cytosolu po połączeniu mRNA z rybosomami w polisomy. Jednakże, po rozpoczęciu translacji tworzący początek peptydu zbudowanego z 19–21 aminokwasów, dalsze kontynuowanie translacji wymaga kontaktu utworzonego kompleksu (mRNA+ rybosom + początek peptydu) z cytosolową niskocząsteczkową nukleoproteiną rozpoznawczą, tzw. sn SRP (ang. *small nucleoprotein SIGNAL RECOGNITION PARTICLE*) oraz z receptorem znajdującym się w błonach ER [35, 15]. Wzajemne oddziaływanie kompleksu, SRP i receptora błonowego powoduje wytworzenie w tej błonie pewnego typu niejonowego kanału, przez który pierwsze odczytane sekwencje peptydu kierowane są wprost do wnętrza pęcherzyka i stanowią sygnał dla kontynuowania przerwanej translacji.

Te pierwsze kilkanaście aminokwasów tworzą tzw. SEKWENCJĘ SYGNAŁOWĄ decydującą o translokacji tworzącego się peptydu do wnętrza pęcherzyka. Oznacza to, że translacja i translokacja odbywają się łącznie (kotranslacja). Po zakończeniu translacji, w pęcherzyku wiele peptydów jest uwalnianych z kontaktu z błoną pęcherzyka przez enzym znajdujący się w jego wnętrzu, peptydaza sygnałowa odcina sekwencje sygnałowe [10]. Po zakończeniu translokacji, obcięte sekwencje sygnałowe podlegają degradacji, a skrócone, uwolnione peptydy podlegają dalszej obróbce posttranslacyjnej (np. glikosylacji powodującej właściwe fałdowanie cząsteczki i jej stabilność), natomiast uwolnione receptory kanału translokacyjnego podlegają rozproszeniu w błonie pęcherzyka. Równocześnie zarówno SRP, jak i rybosom odcepiają się od błon ER i mogą być użyte do następnej kotranslacji (rys. 1).

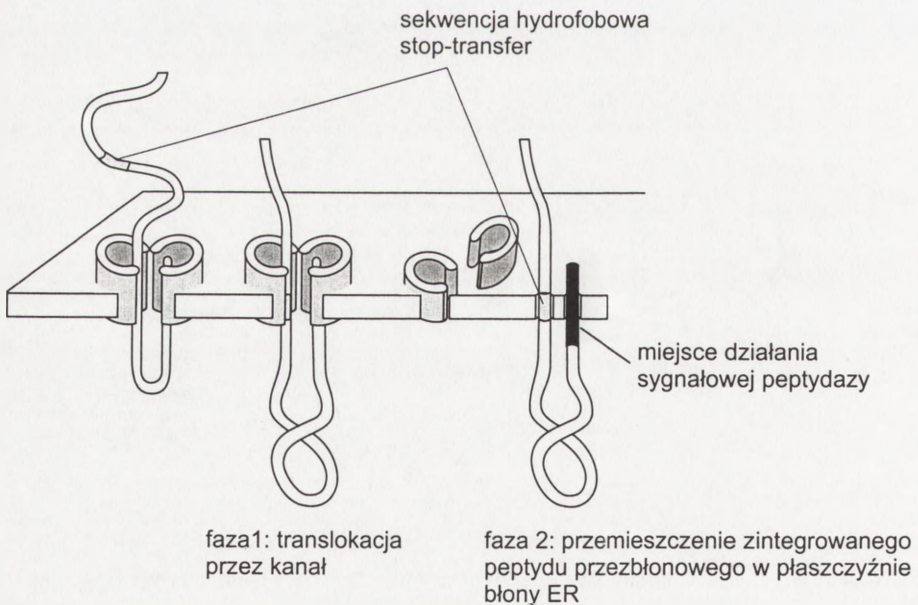


RYSUNEK 1. Schemat kotranslacji (wg rys. 14-13, s. 462 w Podstawy biologii komórki. Alberts i in. , PWN, 1999, nieco uproszczony [2])

2. STUDIA NAD ROZMIESZCZANIEM BIAŁEK W OBLONIONYCH ORGANELLACH; TOPOGENEZA BIAŁEK (BLOBEL [3])

Dalsze badania wykazały, że ukierunkowany transport przez błony odbywa się albo przez kotranslację, albo przez posttranslacyjny transport białek cytoplazmatycznych. Taki posttranslacyjny transport wymaga mechanizmu oddziaływania białka ze składnikami błony biologicznej umożliwiając albo ich przenikanie przez błonę, albo przynajmniej zakotwiczenie się w niej. Badania dotyczące istnienia sekwencji sygnałowych w białkach, decydujące o ich transporcie (translokacji) do różnych typów pęcherzyków lub ich błon zaowocowało poszukiwaniem w różnych typach białek sekwencji o charakterze „ADRESU” oraz przeszukiwaniem różnych białek wbudowywanych w strukturę dwuwarstwy lipidowej (tzw. białek przezbłonowych), które byłyby receptorem błonowym, czyli „ADRESATEM” dla translokacji (rys. 2) (Blobel [3]). Zainspirowany zarówno wynikami własnych badań (9 cytowanych własnych publikacji), jak i rozważaniami na temat ewolucyjnych teorii pochodzenia przedziałów (organelli) w komórce [19], zajął się charakterystyką i rozmieszczeniem białek w różnych organellach komórki eukaryotycznej, czyli inaczej mówiąc scharakteryzował topogenezę białek.

A. Błony biologiczne Eukaryota stanowią labirynt, w którym błona zewnętrzna komórki staje się błoną sieci siateczki śródplazmatycznej (ER) cytoplazmy, aby



RYSUNEK 2. Dwufazowa integracja białka przezbłonowego w błonie ER (rys. 14-15 , s. 463 w [2])

w niektórych miejscach kontynuować przebieg jako podwójna błona otoczki jądrowej. Można zatem przypuszczać, że w ewolucji prowadzącej do powstania komórki eukaryotycznej, wpuklenie błony zewnętrznej do jednorodnego regionu cytoplazmy mogło doprowadzić do powstania systemu siateczki śródplazmatycznej ziarnistej (ER), a także do siateczki śródplazmatycznej gładkiej aparatu Golgiego i licznych wyspecjalizowanych obłonionych pęcherzyków. Pęcherzyki te mogą wędrować w komórce i wtórnie łączyć się z powierzchnią komórki uwalniając wtedy na zewnątrz swoją zawartość.

Obecnie, w komórkach różnych Eukaryota **receptory dla kotranslacji** występują w błonach ER oraz w wewnętrznej błonie mitochondrium i błonie tylakoidu. Kotranslacja opiera się na oddziaływaniu receptorów błonowych z peptydami zawierającymi sekwencje sygnałowe.

Posttranslacyjny transport przez błony białek wytworzonych na terenie cytoplazmy przez błony wymaga sekwencji sygnałowych hydrofobowych nazwanych **sekwencjami insercji lub zakotwiczenia**, zdolnych do kotwiczenia w błonie.

Trwałą lokalizację peptydu w błonie, a więc translokację wywołującą powstanie białek przezbłonowych, powodują hydrofobowe **sekwencje typu stop-transfer** znajdujące się nie tylko na początku, ale też w dalszym odcinku polipeptydu. Sekwencje stop-transfer przerywają rozpoczęty przez sekwencje sygnałowe transport białka przez błonę i prowadzą do tego, że ta hydrofobowa sekwencja zostaje przemieszczona z kanału translokacyjnego wprost do dwuwarstwy fosfolipidowej. A więc mamy **dwa etapy procesu: pierwszy związany z przezbłonową translokacją przez kanał oraz drugi związany z przemieszczeniem bocznym w dwuwarstwie błony fosfolipidowej**. Ten podwójny proces integracji przezbłonowych białek w dwuwarstwie fosfolipidowej zapewnia asymetryczną orientację białka zintegrowanego z błoną. Jest to jednocześnie mechanizm tworzenia receptorów błonowych.

Taki transport posttranslacyjny jest charakterystyczny dla błon zewnętrznych mitochondriów i plastydów oraz błon tzw. organelli detoksyfikujących związanych z metabolizmem lipidów, czyli peroksysomów.

B. Można także przypuszczać, że powstanie komórki eukaryotycznej wiązało się z tworzeniem się głębokich wpukleń błony zewnętrznej takich, które opasały cały region chromatyny wyodrębniając w ten sposób ciągłą, ale podwójną otoczkę jądrową.

Obecna w komórce eukaryotycznej zewnętrzna i wewnętrzna błona tej otoczki ma odmienne białka i odrębne funkcje, a przestrzeń między nimi stanowi odrębne środowisko. Kontakt między wnętrzem jądra i cytoplazmą staje się możliwy dzięki bardzo złożonym mechanizmom transportu w obu kierunkach przez pory otoczki jądrowej penetrujące przez system podwójnych błon otoczki jądrowej.

C. Podobnie, błony mitochondriów i otoczka chloroplastów roślinnych są także podwójne, ale odmienne pod względem zarówno pochodzenia, jak i funkcji od kompartmentu jądrowego. Prawdopodobnie ewolucyjnie zarówno mitochondria,

jak i plastydy powstały w wyniku symbiozy między komórką zerną i jej pożartymi na zasadzie fagocytozy innymi gatunkowo komórkami. Mitochondria zapewne pochodzą z symbiontycznych bakterii tlenowych, a chloroplasty z pewnych cyjanobakterii.

Istnieją dowody na posttranslacyjny ukierunkowany transport przez dwie błony tzn. przez całą otoczkę mitochondrialną i chloroplastową. Sugeruje to (ale nie dowodzi), że w obu błonach ustawiane są naprzeciwko kanały translokujące białka w dwóch etapach najpierw przez jedną, a potem przez drugą błonę.

Blobel [3] zwrócił także uwagę na to, że specyficzne sekwencje aminokwasowe w białkach translokowanych i w białkach receptorów błonowych mogą występować w skądinąd bardzo różnych chemicznie typach białek. Sekwencje o charakterze „adresu” i „adresata” natomiast decydują o asymetrii transportu i o różnicach w poszczególnych typach błon. Wykazano, że usunięcie tych sekwencji, np. przez peptydazy w białkach przezbłonowych, albo odwrotnie wprowadzanie tych sekwencji metodami molekularnymi do białek cytoplazmatycznych decydowało o ich ostatecznej lokalizacji w komórce.

3. BADANIA NAD WŁASNOŚCIAMI KANAŁU TRANSLOKACYJNEGO BIAŁEK. HIPOTEZA BRAMKOWANIA [31]

Chociaż hipoteza sekwencji sygnałowych [7] ukierunkowujących kotranslację i translokację posttranslacyjną rozpuszczalnych białek cytosolowych do wnętrza pęcherzyków ER zgadzała się z danymi doświadczalnymi, nadal nieznanne są mechanizmy transportu białka przez kanał.

Wstępne doświadczenia wykazały, że ma on prawdopodobnie charakter wodnego kanału [16] wytworzonego przez białka transbłonowe receptora oraz białka zewnętrzne (kompleksu rybosomalnego, SRP i sekwencji sygnałowych patrz punkt 1). Powstało więc pytanie, czy taki kanał ma własności kanału jonowego.

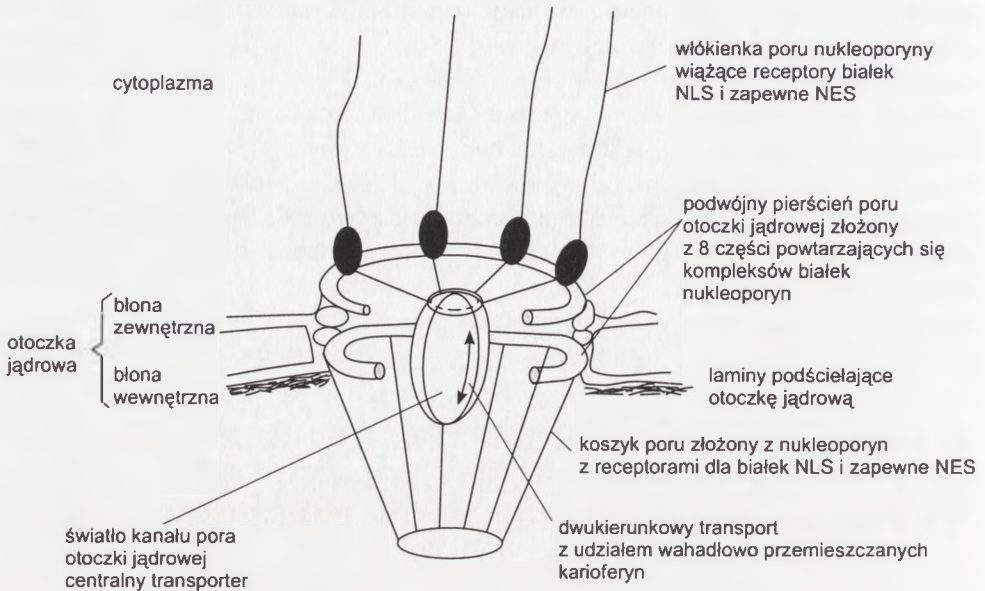
Przy użyciu technik elektrofizjologicznych badano przewodnictwo jonów w różnych fazach kotranslacji w izolowanych błonach ER trzustki psa i w błonie komórki prokaryotycznej (*Escherichia coli*) [32]. Szczególnie interesujące było porównanie zdolności do przewodzenia jonowego kanałów w obecności rybosomów uczestniczących w niezakończonej kotranslacji i w rybosomach, w których tworzony peptyd był przedwcześnie uwalniany z rybosomu w obecności puromycyny. Badania te wykazały, że tworzony na rybosomie i translokowany przez kanał peptyd zatyka kanał i nie pozwala na przewodzenie jonów, podczas gdy usunięcie peptydu (przez puromycynę) umożliwia to przewodzenie.

Dalsze badania nad przewodnictwem jonowym kanału kontaktującego się z rybosomem pozwoliło sformułować hipotezę bramkowania; **kontakt sekwencji sygnałowej peptydu z receptorem powoduje organizację kanału wodnego w błonie biologicznej w tzw. konformacji otwartej**. Sekwencja sygnałowa peptydu uwalniana jest z SRP, w sposób zależny od hydrolizy GTP, i wtedy wiąże się do podjednostki białka kanału. Tworzony w trakcie dalszej kotranslacji peptyd przybiera formę pętli wypełniającej światło kanału i niedozwalającej na jego zamknięcie. Prawdopodobnie, zakończenie translokacji białka do środka pęcherzyka i odłączenie rybosomu po przeciwnej stronie błony powoduje powstanie konformacji tzw. zamkniętego kanału. A więc występują kolejno mechanizmy prowadzące do konformacji kanału w sposób powodujący jego otwarcie w okresie translokacji, a następnie zamknięcie po zakończeniu tego procesu (bramkowanie).

4. FUNKCJONOWANIE KOMPLEKSÓW BIAŁEK PORÓW OTOCZKI JĄDROWEJ (NUKLEOPORYN) I CZYNNIKÓW TRANSLOKACJI (KARIOFERYN) W IMPORCIE BIAŁEK DO JĄDRA

Sekwencje NLS (*nuclear localization signal*) są adresem kierującym białka do jądra [27]. W przeciwieństwie do opisanych powyżej mechanizmów ukierunkowanej translokacji białek przez błony fosfolipidowe; kanał wytworzony przez por otoczki jądrowej jest tak duży, że mogą przezeń przenikać zarówno białka sfałdowane, jak też ich kompleksy, a małe rozpuszczalne w wodzie cząsteczki o masie poniżej 50 kDa mogą swobodnie dyfundować w obu kierunkach. Por służy zarówno do importu odpowiednich białek do jądra, jak też do eksportu nukleoprotein, mRNA i innych cząsteczek z jądra. Działa wobec tego dwukierunkowo. Kompleks białek poru nie jest zdolny do wbudowywania białek w błonę fosfolipidową, tak jak to jest w przypadku wszystkich mechanizmów translokacji białek opisanych powyżej.

Pory otoczki jądrowej, NPC (*nuclear pore complex*) stanowią bardzo duże struktury tworzące kanały przechodzące przez całą otoczkę jądrową. Co najmniej 50 różnych białek wchodzi w obręb złożonej struktury NPC w otoczce jądrowej kręgowców, a około 30 w znacznie mniejszych porach drożdży. **Białka stanowiące strukturę poru otoczki jądrowej (NPC) nazwano nukleoporynami, czyli białkami NUP (*NUcleoPorins*)**. Otoczkę składa się z ośmiu powtórzonych kompletów białek tworzących pierścień zakotwiczony w sposób ciągły zarówno z błoną cytoplazmatyczną, jak i z błoną jądrową otoczki. Pierścień ten po stronie jądrowej wiąże się z warstwą lamin podścielających otoczkę jądrową. Do światła kanału utworzonego przez pierścień wystaje odpowiednio osiem struktur przypominających szprychy (*spokes*) ograniczające jego światło do około 25 nm średnicy. W środku kanału



RYСУNEK 3. Budowa i skład kompleksów poru jądrowego (wg [34] uproszczony)

znajduje się luźno osadzona zatyczka nie związana strukturalnie, nosząca nazwę centralnego transportera. Od strony cytoplazmatycznej NPC wystaje osiem włókienek cytoplazmatycznych prawdopodobnie odbierających sygnał rozpoczynający import białka, a więc białek nukleoporynowych o charakterze receptorów dla transportowanych białek. Po stronie błony wewnętrznej otoczki wystaje ośmiokrotnie wzmacniony koszyk białek nukleoporynowych uwalniających importowane białka do wnętrza jądra i receptorów dla eksportu nukleoprotein i białek o charakterze wahadłowo pracujących przenośników i regulatorów procesów transportu [34] (rys. 3).

Import białek wytworzonych w cytoplazmie, a kierowanych do jądra związany jest z występowaniem w nich sekwencji noszących nazwę **sekwencji lokalizacji jądrowej NLS** (*nuclear localization signal*). Jest co najmniej kilka typów sekwencji NSL odrębnych dla białek jądrowych używanych w dojrzewaniu tRNA w jąderku, wiążących mRNA, białek podjednostek rybosomalnych i białek wiążących małe jądrowe RNA. Zatem występują różne sekwencje NLS, ale można je uszeregować w dwa nadrzędne typy: pojedyncze np. w antygenie T SV40 z NLS typu sekwencji

PKKKRKV (z decydującym motywem bogatym w lizynę wyróżnionym tłustym drukiem) i dwuczęściowe np. w nukleoplasminie z sekwencją KRPAATKKAG-QAKKK (z dwoma odcinkami bogatymi w lizynę wytłuszczonymi).

Istnieje **rodzina białek przenośnikowych pośredniczących w mechanizmie translokacji białek NSL przez por otoczki jądrowej, nazwanych łącznie karioferynami** (*KAaryoPherins*) lub krócej KAP. Do białek translokujących typu KAP należą importyna alfa, importyna beta i transportyna. Oba typy sekwencji NSL mają powinowactwo do podjednostki alfa (importyny alfa) heterodimerowego receptora karioferynowego. Druga podjednostka tego receptora, mianowicie importyna beta (*importin beta*) wiąże się do importyny alfa. Wykazano również, że aktywny import prawie wszystkich (są wyjątki) białek do jądra wymaga aktywności hydrolitycznej specjalnej GTP-azy typu Ran (Ran GTPazy). Wciąż poszukiwane są odpowiednie białka nukleoporynowe (NUP) o charakterze receptorów, które wiązałyby białka niosące ligandy NLS, które wraz z karioferynami kierowałyby jego dalszą translokacją do jądra.

Badanie nad mechanizmami importu białek przez pory otoczki jądrowej Blobel zainicjował opublikowaniem metody izolacji porów otoczki jądrowej drożdży [28] i charakterystyką NUP 145 to jest nukleoporyny o masie molekularnej 145 kDa zawierającej liczne powtórzenia sekwencji glicyny-leucyny-feniloalaniny-glicyny (motywu GLFG). NUP 145 jest niezbędny dla utrzymania struktury poru otoczki jądrowej drożdży [37]. Podobne, ale nie identyczne, powtarzalne motywy (XFXFG) zidentyfikowano w nukleoporynach występujących na filamentach zewnętrznych i w strukturze koszyka NPC w otoczce jądrowej komórek wątroby szczura [26]. U drożdży wykryto również homologi karioferyn alfa i beta ssaków. Te karioferyny wypreparowane z drożdży mogą utworzyć funkcjonalny heterodimer z białkami z sekwencjami NLS; a cały kompleks wprowadzony do komórek ssaków lokuje się w okolicy receptorów porów otoczki jądrowej [9].

Dalsze badania Blobela i współpracowników [20, 23] wykazały, że same heterodimery karioferyny alfa i beta, (bez udziału białka niosącego sekwencje NLS) wiążą się z powtarzalnymi motywami typu XFXFG różnych nukleoporyn poru otoczki jądrowej, ale nie wiążą się do nukleoporyn posiadających powtarzalne motywy GLFG. Następnie wykazano [24], że miejsce wzajemnego wiązania karioferyny alfa z karioferyną beta pokrywa się z miejscem wiązania sekwencji NSL. Wobec tego kompleks karioferyny alfa i beta rozpada się przy wiązaniu białka z sekwencjami NLS, a wtedy karioferyny uwalniają się od wiązania z nukleoporyną o powtarzalnych motywach FXFG. Z kolei inkubacja *in vitro* kompleksu karioferyn alfa i beta z Ran GTP prowadzi do uwolnienia karioferyny alfa z heterodimeru i związania Ran GTP z karioferyną beta. Takie zależności nie zachodzą w przypadku nieaktywnego RanGDP [12].

Tak złożone interakcje wiązania i uwalniania białka z sekwencjami NSL z karioferynami i nukleoporynami o powtarzalnych motywach XFXFG zasugerowały

model „rakietkowego odbijania się” w kanale poru translokowanego białka z sekwencjami NSL. Model zakłada statystycznie przypadkowe i przejściowe wiązanie i odczepianie translokowanego białka NLS z karioferynami wiążącymi się i uwalnianymi z kontaktu z różnymi nukleoporynami niosącymi motywy XFXFG wyszczelniającymi kanał, a przemienne stany wiązania i rozpadu heterodimeru karioferynowego byłyby regulowane przez Ran GTP. Dodatkowe doświadczenia [27] prowadzą do wniosku, że prawdopodobnie hydroliza Ran GTPazy nie jest potrzebna do rozpadu heterodimeru karioferynowego, natomiast jest niezbędna do odczepienia enzymu Ran od karioferyny beta. A więc jest potrzebna do odtworzenia z powrotem wstępnego rozdziału białek kooperujących w transporcie, co stanowi o możliwości powtórzenia całego cyklu w poszczególnych etapach translokacji białka w kanale poru.

Ostatnie badania Blobela i współpracowników [33] dotyczą białek łączących struktury NPC z wnętrzem jądra i roli proteolizy w biogenezie niektórych nukleoporyn [13].

5. BADANIA NAD DWUKIERUNKOWYM TRANSPORTEM W PORACH JĄDROWYCH: REGULACJA IMPORTU BIAŁEK I EKSPORTU NUKLEOPROTEIN I KARIOFERYN Z JĄDRA

Obecnie wiadomo, że por otoczki jądrowej działa dwukierunkowo: nie tylko importuje białka jądrowe do środka i wyprowadza rybonukleoproteiny (*RNP particle*) do cytoplazmy, ale także reguluje dwukierunkowe przemieszczenia karioferyn i innych białek kontrolujących procesy translokacji. Ekspediowanie RNP z terenu jądra do cytoplazmy wiąże się z przejściowymi odkształceniami struktury koszyka po stronie jądrowej poru, a towarzyszy temu jednoczesny import pewnych białek do jądra [8]. Podobnie zahamowanie aktywności Ran GTPazy (np. w mutancie drożdży) prowadzi do jednoczesnego zatrzymania zarówno importu białek, jak i eksportu mRNA [30]. Z drugiej strony są inne dane wskazujące na to, że translokacja niektórych białek nie wymaga hydrolizy żadnych trójfosforanów nukleotydowych (szczegółowe omówienie problemu w artykule Talcott i Moore [4]). A więc naprawdę nie wiadomo, jaki jest mechanizm i napęd takich dwukierunkowych translokacji.

Badania Blobela i współpracowników dowodzą, że rola Ran GTP jest jednak prawdopodobnie wieloraka i bardzo ważna; poza rolą RanGTP w rozpadzie heterodimeru karioferyny, uczestniczy on także w powrotnym eksporcie karioferyny alfa z części jądrowej poru do części cytoplazmatycznej po translokacji białek NLS (ruch wahadłowy karioferyn). W powrocie karioferyny alfa do części cyto-

plazmatycznej poru uczestniczy nukleoporyna NUP153 zlokalizowana w koszyczku NPC [21]. Zatem być może aktywność Ran GTP jest raczej związana z mechanizmem odtwarzania systemu asymetrii rozmieszczenia białek uczestniczących w translokacji (*resetting system*) niż z napędem samej translokacji w porze otoczki jądrowej. **Współczesne prace Blobela i współpracowników dotyczą właśnie różnych aspektów asymetrii procesów zachodzących po obu stronach NPC** [20, 17, 38].

Nowe horyzonty badań nad eksportem białek i nukleoprotein z jądra otworzyły pionierskie odkrycia ostatnich lat wykazujące, że: A. białka wiążące się z RNA są czynnikami regulującymi albo eksport, albo zatrzymanie RNA w jądrze, B. eksport jest regulowany przez fosforylację i defosforylację pewnych białek kontrolujących ten proces i C. eksport mRNA jest regulowany przez przebieg dojrzewania mRNA (przebieg wycinania intronów i modyfikację 5' i 3' końców transkryptów mRNA). Oznacza to, że **podstawowe procesy regulujące funkcjonowanie jądra związane są z procesami regulacji transportu w porze otoczki jądrowej**. Kilka grup badawczych poszukuje sekwencji NES (*nuclear export signal*) w eksportowanych kompleksach rybonukleoprotein. Takie sekwencje znaleziono w dwóch białkach, to jest w inhibitorze kinazy białkowej PKI wyłączającym aktywację pewnej klasy czynników transkrypcyjnych (sekwencja NES; LALKLAGLDI), i w białku Rev związanym z eksportem mRNA kodującym białko wirusa AIDS, które hamuje wycinanie intronów zarówno we własnym mRNA HIV, jak i w innych transkryptach RNA gospodarza (NES; LPPLRLTL) [14]. Otwiera się zatem nowy rozdział badań dotyczący nie tylko kontroli translokacji między jądrem a cytoplazmą, ale także regulacji aktywacji czynników transkrypcyjnych i procesów związanych z chorobami wirusowymi (np. AIDS).

Te odkrycia spowodowały, że **drugim współczesnym nurtem badań Blobela i współpracowników są białka regulujące eksport mRNA** [1,18,12]. Już z wcześniejszych badań Blobela i innych grup badaczy wiadomo, że wiele nukleoporyn zawiera powtarzalne motywy FG, XFXFG lub GLFG i że motyw XFXFG ma powinowactwo do karioferyn. Okazało się jednak, że te motywy nukleoporyn wiążą również bezpośrednio sekwencje NES kilku białek związanych z regulacją funkcjonowania jądra. Zatem, być może, wspólne lub podobne sekwencje receptorowe nukleoporyn (bogate w motywy FG) uczestniczą w sprzężeniu importu pewnych białek do jądra i w eksporcie rybonukleoprotein.

W ciągu ostatnich dwóch lat zaistniało szereg nowych pytań dotyczących mechanizmów dwukierunkowej translokacji cząsteczek przez por otoczki jądrowej, a 67-letni noblista Günter Blobel wiąże zaskakujące wciąż nowe dane z wybiegającymi w przyszłość hipotezami. Nic więc dziwnego, że Jego wykład pod znamienym tytułem „*Nuclear transport: KAPs, NUPs and RAN*” [4] kończący sesję Europejskiego Kongresu Biologii Komórki w Bolonii (11 maja 1999 r.) przyciągnął uwagę zarówno licznych słuchaczy, jak i dziennikarzy.

Przeglądając internetowy wydruk publikacji noblisty z ostatnich lat od połowy 1995 r. do czerwca 1999 r. obejmujący aż 45 (!) pozycji zdałam sobie sprawę, że Profesor Blobel reprezentuje współczesny model uczonego. Jest to wybitnie utalentowany strateg, koordynator i zapewne inspirator badań, które łączą wydajność i elegancję standardu prezentowanych doświadczeń z ambitnymi, ale ostrożnymi odniesieniami teoretycznymi. Nie rozumiem, w jaki sposób można bezbłędnie i szybko realizować tak ambitne projekty badawcze. Prawdopodobnie połączenie zalet utalentowanego inspiratora, a zapewne również związanie z tym możliwości wpływu na finansowanie zaprojektowanych badań tworzą współczesnego Noblistę.

LITERATURA

- [1] AITCHISON JD, ROUT MP, BLOBEL G. Kap104p: A karyopherin involved in the nuclear transport of messenger RNA binding proteins. *Science* 1996; **274**: 624–627.
- [2] ALBERTS B, BRAY D, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P. Podstawy biologii komórki. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1999.
- [3] BLOBEL G. Intracellular protein topogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980, **77**: 1496–1500.
- [4] BLOBEL G. Nuclear transport: KAPS, NUPS and RAN. *E.C.B.O. Congress*; 1999, Abstracts p. 37.
- [5] BLOBEL G, DOBBERSTEIN B. Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol* 1975 a; **67**: 835–851.
- [6] BLOBEL G, DOBBERSTEIN B. Transfer of proteins across membrane. *J Cell Biol* 1975 b; **67**: 852–862.
- [7] BLOBEL G, WALTER P, CHANG CN, GOLDMAN B, ERICKSON AH, LINGAPPA VR. Translocation of proteins across membranes: the signal hypothesis and beyond. *Symp Soc Exp Biol* 1979; **33**: 9–36.
- [8] DWORETZKY SI, FELDHERR CM. Translocation of RNA-coated gold particles through the nuclear pores of oocytes. *J Cell Biol* 1988; **106**: 575–584.
- [9] ENENKEL C, BLOBEL G, REXACH M. Identification of a yeast karyopherin heterodimer that targets import substrate to mammalian nuclear pore complexes. *J Biol Chem* 1995; **270**: 16499–16502.
- [10] EVANS EA, GILMORE R, BLOBEL G. Purification of microsomal signal peptidase as a complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 581–585.
- [11] FLOER M, BLOBEL G. Putative reaction intermediates in Crm1- mediated nuclear protein export. *J Biol Chem* 1999; **274**: 16279–16286.
- [12] FLOER M, BLOBEL G, REXACH M. Disassembly of RanGTP-karyopherin beta complex, an intermediate in nuclear protein import. *J Biol Chem* 1997; **272**: 19538–19546.
- [13] FONTOURA BMA, BLOBEL G, MATUNIS MJ. A conserved biogenesis pathway for nucleoporins: Proteolytic processing of a 186-kilodalton precursor generates Nup98 and the novel nucleoporin, Nup96. *J Cell Biol* 1999; **144**: 1097–1112.
- [14] GERACE L. Nuclear export signals and the fast track to the cytoplasm. *Cell* 1995; **82**: 341–344.
- [15] GILMORE R, BLOBEL G. Transient involvement of signal recognition particle and its receptor in the microsomal membrane prior to protein translocation. *Cell* 1983; **35**: 677–685.

- [16] GILMORE R, BLOBEL G. Translocation of secretory proteins across the microsomal membrane occurs through an environment accessible to aqueous perturbants. *Cell* 1985; **42**: 497–505
- [17] HURVITZ ME, STRAMBIO DE CASTILLIA C, BLOBEL G. Two yeast nuclear pore complex proteins involved in mRNA export form a cytoplasmically oriented subcomplex. *Proc Natl Acad Sci* 1998; **95**: 11241–11245.
- [18] KRAEMER D, BLOBEL G. mRNA binding protein mmp 41 localizes to both nucleus and cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 9119–9124.
- [19] MARGULIS L. Origin of Eukaryotic Cells. ed. Yale Univ. Press, New Haven, Ct. 1970.
- [20] MATUNIS MJ, WU JA, BLOBEL G. SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein, RanGAP1, to the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 1998; **140**: 499–509.
- [21] MOROIANU J, BLOBEL G, RADU A. RanGTP-mediated nuclear export of karyopherin alpha involves its interaction with the nucleoporin Nup153. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 9699–9704.
- [22] MOROIANU J, HIJIKATA M, BLOBEL G, RADU A. Mammalian karyopherin alpha1beta and alpha2beta heterodimers: alpha 1 or alpha subunit binds nuclear localization signal and interacts with peptide repeat containing nucleoporins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 6532–6566.
- [23] MOROIANU J, RADU A, BLOBEL G. Nuclear protein import: Ran-GTP dissociates the karyopherin alpha beta heterodimer by displacing alpha from an overlapping binding site on beta. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996 a; **93**: 7059–7062 .
- [24] MOROIANU J, RADU A, BLOBEL G. The binding site of karyopherin alpha for karyopherin beta overlaps with a nuclear localization sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 b; **93**: 6572–6576.
- [25] NICCHITTA C, MIGLIACCIO G, BLOBEL G. Reconstitution of secretory protein translocation from detergent solubilized rough microsomes. *Methods Cell Biol* 1991; **34**: 263–285.
- [26] RADU A, BLOBEL G, MOORE MS. Identification of a protein complex that is required for nuclear protein import and mediates docking of import substrate to distinct nucleoporins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; **92**: 1769–1773.
- [27] REXACH M, BLOBEL G. Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell* 1995; **83**: 683–692.
- [28] ROUT M, BLOBEL G. Isolation of the yeast nuclear pore complex. *J Cell Biol* 1993; **123**: 771–783.
- [29] SABATINI DD, BLOBEL G. Controlled proteolysis of nascent polypeptides in rat liver cell fractions. II. Location of the polypeptides in rough microsomes. *J Cell Biol* 1970; **45**: 146–157.
- [30] SCHLENSTEDT G, WONG DH, KOEPP DM, SILVER PA. Mutants in a yeast Ran binding protein are defective in nuclear transport. *EMBO J* 1995; **14**: 5367–5378.
- [31] SIMON SM, BLOBEL G. A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell* 1991; **65**: 371–380.
- [32] SIMON SM, BLOBEL G, ZIMMERBERG J. Large aqueous channels in membrane vesicles derived from the rough endoplasmic reticulum of canine pancreas or the plasma membrane of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 6175–6180.
- [33] STRAMBIO DE CASTILLIA. C, BLOBEL G, ROUT MP. Proteins connecting the nuclear pore complex with the nuclear interior. *J Cell Biol* 1999; **144**: 839–855.
- [34] TALCOTT B, MOORE MS. Getting across the nuclear pore complex. *Trends in Biol Sci* 1999; **9**: 312–318.
- [35] WALTER P, BLOBEL G. Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein transport across the endoplasmic reticulum. *Nature* 1982, **299**: 691–698.
- [36] WALTER P, BLOBEL G. Preparation of microsomal membranes for cotranslational protein translocation. *Methods Enzymol* 1983; **96**: 84–93.

- [37] WENTE S, BLOBEL G. NUP145 encodes a novel yeast glycine-leucine - phenylalanine -glycine (GLFG) nucleoporin required for nuclear envelope structure. *J Cell Biol* 1994; **125**: 955–969.
- [38] YASEEN NR, BLOBEL G. Cloning and characterization of human karyopherin beta 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **96**: 5516–5521.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 01.12. 1999 r.

Przyjęto: 09.12.1999 r.

Adres autora: 00-927 Warszawa, Krakowskie Przedmieście 26/28.

CYKL KSANTOFILOWY W WARUNKACH STRESU ABIOTYCZNEGO*

THE XANTHOPHYLL CYCLE UNDER ABIOTIC STRESS

Renata MATYSIAK, Gabriela LORENC-PLUCIŃSKA

Instytut Dendrologii PAN, Kórnik

Streszczenie: W artykule omówiono parametry opisujące cykl ksantofilowy i jego powiązanie z fluorescencją chlorofilu oraz przedstawiono fotoochronną rolę cyklu ksantofilowego w fotosyntezie. Przedyskutowano również zmiany aktywności cyklu ksantofilowego w aspekcie rytmiki dobowej i sezonowej oraz pod wpływem działania abiotycznych czynników stresowych, takich jak: wysoka i niska temperatura, okresowy niedobór wody, deficyt składników mineralnych i substancji odżywczych oraz zanieczyszczenia przemysłowe.

(*Postępy Biologii Komrki 2000; 27: 17–29*)

Słowa kluczowe: cykl ksantofilowy, fluorescencja chlorofilu, czynniki stresowe.

Summary: This paper discusses the xanthophyll cycle, its regulation and components and a connection with chlorophyll a fluorescence and describes the importance of the xanthophyll cycle as a photoprotection mechanism of photosynthesis. The influence of abiotic stress factors such as high and low temperature, temporary water and nutrient deficit and environmental pollution on xanthophyll cycle and chlorophyll fluorescence are also explored.

(*Advances in Cell Biology 2000; 27: 17–29*)

Key words: xanthophyll cycle, chlorophyll fluorescence, stressing factors.

Wykaz stosowanych skrótów: **PSI** – fotoukład I, **PSII** – fotoukład II, **LHCII** – zbierający światło kompleks chlorofil a/b-białko związany z PSI i PSII, **CPPSII** – zbierający światło kompleks chlorofil a-białko z kompleksu rdzeniowego PSII, **D₁** i **D₂** – białka stanowiące centra reakcji PSII, **F₀** – fluorescencja początkowa, **F_m** – fluorescencja maksymalna, **F_v'/F_m'** – miara sprawności fotochemicznej PSII, **F_v/F_m** – miara fotochemicznej wydajności PSII w warunkach równowagi, **q_N** – współczynnik niefotochemicznego wygaszenia fluorescencji (NPQ), **q_P** – współczynnik fotochemicznego wygaszenia fluorescencji, **ØPSII** – kwantowa wydajność transportu elektronów w PSII, **Rfd** – indeks vitalności.

*Praca dofinansowana przez Fundację Współpracy Polsko-Niemieckiej ze środków Republiki Niemiec w ramach grantu nr 3264/97/IS6.

1. WSTĘP

Cykl ksantofilowy (rys. 1) przebiega u roślin wyższych, paprotników, mszaków oraz w kilku grupach glonów [2 i prace tam cytowane]. Najczęściej definiowany jest jako odwracalna, światłozależna przemiana barwników ksantofilowych [13, 14]. Określa się go również jako cykl wiolaksantofilowy lub jako alternatywny system askorbinowo-glutationowy rozpraszający nadmiar zgromadzonej energii świetlnej przez transformację wiolaksantyny do zeaksantyny [9, 13].

Dla aktywacji cyklu ksantofilowego niezbędna jest obecność barwników ksantofilowych, takich jak: zeaksantyna, wiolaksantyna i anteraksantyna [10, 67]. Barwniki te stanowią utlenione formy karotenoidów, które przez wygaszanie reaktywnego, singletowego tlenu w stanie wzbudzonym ($^1\text{O}_2^\bullet$) i usuwanie wolnych rodników chronią błony tylakoidowe przed ich fotodynamicznym uszkodzeniem [13, 18, 24].

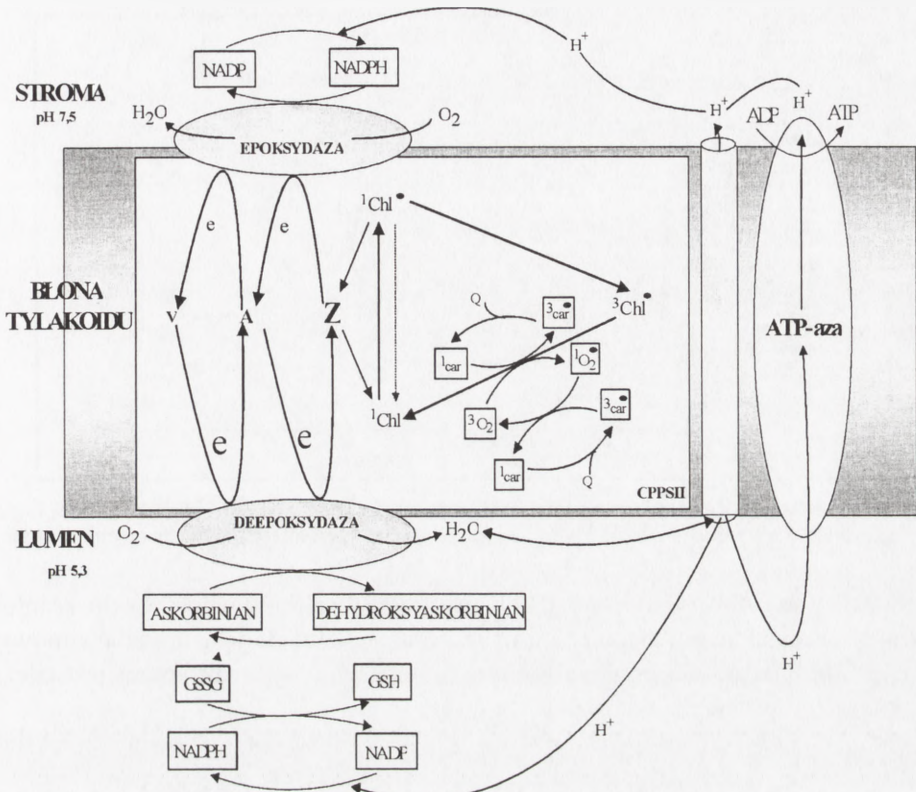
Zawartość barwników biorących udział w cyklu ksantofilowym jest różna. U roślin zacienionych notuje się zwiększenie zawartości luteiny z równoczesnym obniżeniem zawartości zeaksantyny, anteraksantyny i wiolaksantyny. Przy wroście następcznym zwiększa się udział barwników następująco: chlorofil *a* > chlorofil *b* > neoksantyna > β -karoten > zeaksantyna > anteraksantyna > wiolaksantyna > luteina [64].

Cykl ksantofilowy zachodzi w błonach tylakoidów, w korowej i rdzeniowej części PSII i PSI oraz w zbierającym światło kompleksie chlorofil *a/b*-białko (LHCII) związanym z PSI i PSII [55]. Rozpoczyna się deepoksydacją, czyli fotyczną przemianą wiolaksantyny przez anteraksantynę do zeaksantyny, katalizowaną przez deepoksydazę [2]. Enzym ten jest aktywny w kwaśnym (5,8–6,3) pH światła tylakoidów [50]. Do aktywacji cyklu ksantofilowanego wymagany jest także askorbinian, NADPH lub FMNH₂ oraz monogalaktozydylodwucyloglicerol (MGDG) [2, 9, 18].

Reakcją przeciwstawną do deepoksydacji jest epoksydacja. Przebiega ona w ciemności lub przy średniej intensywności oświetlenia i katalizowana jest przez epoksydazę, przy współdziałaniu cząsteczkowego tlenu oraz NADPH [11].

Istnieje zależność między natężeniem fotosyntezy i aktywnością cyklu ksantofilowego w następstwie przemian zachodzących w wewnętrznych i zewnętrznych kompleksach antenowych PSII absorbujących światło i inicjujących transport elektronów do centrum reakcji w PSII. Zaburzenia reakcji Hilla w wyniku fotoinhibicji prowadzą do zahamowania transportu elektronów po akceptorowej stronie PSII i uszkodzenia kompleksu utleniającego wodę po donorowej stronie PSII. Reakcją obronną roślin przed fotoinhibicją jest rozproszenie nadmiaru wzbudzonej energii dzięki fotosyntetycznej redukcji O₂ w PSI (reakcja Mehlera) oraz stymulacji niecyklicznego i cyklicznego transportu elektronów. Rozproszenie energii następuje w formie ciepła i fluorescencji [13].

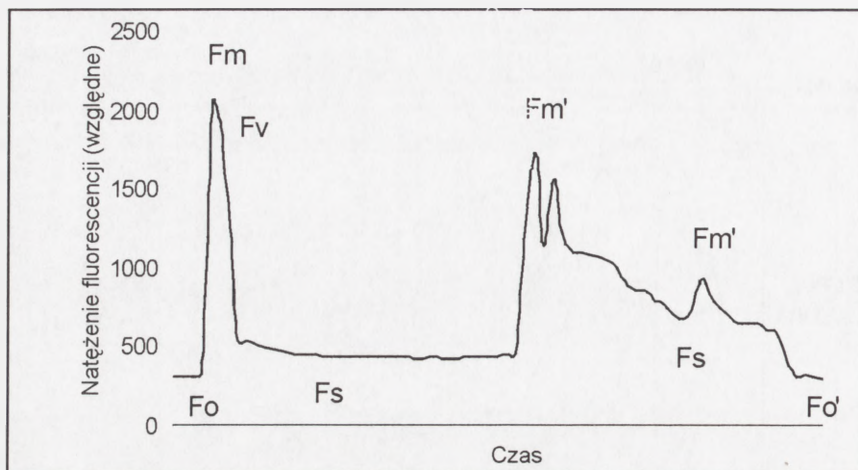
Fluorescencja jest reemisją zaabsorbowanej energii świetlnej przez molekuly chlorofilu w czasie krótszym niż pikosekunda i jest wskaźnikiem natężenia transportu



RYSUNEK 1. Cykl ksantofilowy (wg [11,13], zmienione): A – anteraksantyna, V – wiołaksantyna, Z – zeaksantyna, ¹chl* – singletowy chlorofil w stanie wzbudzonym, ³chl* – tripletowy chlorofil w stanie wzbudzonym, ¹chl – singletowy chlorofil w stanie podstawowym, ¹car – singletowy karoten w stanie podstawowym, ³car* – tripletowy karoten w stanie wzbudzonym, ¹O₂* – singletowy tlen w stanie wzbudzonym, ³O₂* – tripletowy tlen w stanie wzbudzonym, Q – energia cieplna, CPPSII – zbierający światło kompleks chlorofil a-białko występujący w kompleksie rdzeniowym PSII, GSSG (GSH) – utleniona (zredukowana) forma glutationu, NADP (NADPH₂) – utleniona (zredukowana) forma dinukleotydu nikotynamido-adeninowego, ATP-aza – adenozyntrifosfataza, ATP – adenozyntrifosforan, ADP – adenozyndifosforan

elektronów. Dotyczy ona również procesów związanych z rozproszeniem energii w drodze przemian fotochemicznych i niefotochemicznych. Charakterystyka odpowiednich parametrów fluorescencji chlorofilu odzwierciedlających zmiany w jasnej i ciemnej fazie fotosyntezy jest znana jako krzywa Kautsky'ego (rys. 2).

U wielu roślin modulacje aktywności cyklu ksantofilowego pokrywają się z rytmiczną zmiennością czynników zewnętrznych. Rytmika dzienna obrazuje synergizm indukcji świetlnej i deficytu wody, wpływający na syntezę zeaksantyny [56], anteraksantyny, β-karotenu w godzinach dopołudniowych, chlorofilu *a* i *b* i zeaksantyny w południe oraz β-karotenu, luteiny i anteraksantyny po południu [50].



RYSUNEK 2. Krzywa Kautsky'ego dla igieł sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) [Matysiak i Lorenc-Plucińska, dane niepublikowane]: F_0 , F_m , F_v , F_s , F_0' , F_m' , F_v' – parametry fluorescencji chlorofilu *a*

Rytmika sezonowa wskazuje z kolei na intensywną aktywność cyklu ksantofilowego wiosną i latem oraz zminimalizowaną w okresie jesiennym i zimowym (tab. 1). Stymulacja syntezy wiolaksynty, anteraksynty i zeaksynty jest zależna od zmian fotoperiodycznych [11].

2. CZYNNIKI STRESU ABIOTYCZNEGO INDUKUJĄCE ZMIANY CYKLU KSANTOFILOWEGO

2.1. Czynniki fotyczny

Światło o wysokim natężeniu powoduje utratę aktywności fotosyntetycznej części CPPSII, wskutek fotoinaktywacji apoproteiny PSII (D_1D_2) [16, 17, 25]. Aby nie doszło do całkowitej degradacji D_1D_2 , nadmiar pobudzonej energii musi być rozproszony. Tę funkcję realizują odpowiednie struktury PSII, które zachowały zdolność do wyłapywania energii wzbudzonej i przekazania jej w reakcji deepoksydacji na chlorofil oraz karotenoidy i następnie przekształcenia w energię fluorescencji lub ciepła [60]. Rozproszenie nadmiaru pobudzonej energii w cyklu ksantofilowym umożliwia reaktywację PSII poprzez resyntezę D_1D_2 , co pozwala na adaptację aparatów fotosyntetycznych do optymalnego poziomu aktywności, nawet przy nadmiernym oświetleniu [17]. Konsekwencją tego jest jednak wzmożona synteza luteiny, β -karotenu, ϵ -karotenu, zeaksynty, anteraksynty i neoksynty kosztem chlorofilu *a* i *b* [22, 23, 42] oraz aktywacja peroksydazy, dysmutazy ponadtlenowej i katalazy [60]. Zmiany dotyczą również kinetyki fluorescencji chlorofilu *a*, gdzie notuje się wzrost niefotochemicznego wygaszenia (NPQ) [15, 23, 50, 55] oraz

TABELA 1. Wpływ pór roku na aktywność cyklu ksantofilowego: \uparrow wzrost, \downarrow spadek, V_{EP} – aktywność procesu epoksydacji, V_{DEP} – aktywność procesu deepoksydacji, asc – askorbinian, chl – chlorofil (*a*, *b*), car – karotenoidy (α -, β -), lut – luteina, neo – neoksantyna, V – wiolaksantyna, A – anteraksantyna, Z – zeaksantyna, CK – cykl ksantofilowy, F_m' , NPQ, F_v/F_m' , F_v'/F_m' , $\Delta F/F_m'$, Rfd – parametry fluorescencji chlorofilu *a*

Pora roku	Indukowane zmiany	Literatura
Wiosna	$\downarrow F_v/F_m$	[51]
Lato	$\uparrow \downarrow AZ$, $\downarrow \uparrow V$, $A+Z>V$, $\downarrow \uparrow F_v/F_m$	[11]
	$\uparrow asc$, $\uparrow chl a$, $\uparrow chl b$, $\uparrow lut$, $\uparrow V$, $\uparrow \beta car$, $\downarrow neo$, $\downarrow A$, $\downarrow acar$, $\downarrow tokoferol$	[16]
	$\downarrow Rfd$ $\downarrow F_v'/F_m'$, $\downarrow \Delta F/F_m'$, $\downarrow V_{EP}$	[35] [50]
Jesień	$\uparrow asc$, $\uparrow chl a$, $\uparrow chl b$, $\uparrow lut$, $\downarrow V$, $\uparrow \beta car$, $\uparrow neo$, $\uparrow A$, $\downarrow acar$, $\uparrow tokoferol$ $\uparrow F_v/F_m$	[16] [51]
Zima	$\uparrow chl a, b$, $\uparrow AVZ$, $\uparrow lut$, $\uparrow neo$, $\downarrow acar$, $\downarrow F_m'$, $\uparrow NPQ$, $\downarrow F_v/F_m$	[1]
	$\downarrow asc$, $\downarrow chl a$, $\downarrow chl b$, $\downarrow lut$, $\downarrow V$, $\downarrow \beta car$, $\downarrow neo$, $\downarrow acar$, $\uparrow tokoferol$, $\uparrow A$	[16]
	$A+Z>V$, $\downarrow F_v/F_m$ $\downarrow F_v'/F_m'$	[11] [51]

spadek sprawności fotochemicznej PSII (F_v/F_m) [15, 25, 26, 60] i kwantowej wydajności transportu elektronów w PSII (Φ_{PSII}) [22].

Nadmiar promieniowania ultrafioletowego, zwłaszcza UV-B (280–320 nm) i UV-A (320–400 nm) docierającego do powierzchni Ziemi na skutek zmniejszania się zawartości ozonu stratosferycznego powoduje destrukcyjne zmiany w fosfolipidach błon tylakoidów [46]. Promieniowanie UV-B zmienia PSI i PSII przez redukcję zawartości chlorofilu *b*, czego następstwem jest zmniejszenie rozmiarów anten chlorofilowych [54]. UV-A powoduje destrukcję chlorofilu i karotenoidów [5, 37, 46]. UV-A u glonu *Laminaria* stymuluje syntezę zeaksantyny i chlorofilu *c* z jednoczesną redukcją zawartości chlorofilu *a* [12]. Natomiast pod wpływem UV-B następuje zwiększenie syntezy zeaksantyny kosztem chlorofilu zarówno *a*, jak i *c* [12]. Uaktywniony cykl ksantofilowy rekompensuje fotouszkodzenia pigmentów i spadek aktywności fotosyntetycznej. Przyjmuje się, że wzrost zawartości białkowo-barwnikowych receptorów wychytujących UV (flawonoidów) może być wskaźnikiem wpływu czynników stresowych na aktywność aparatu fotosyntetycznego [37].

2.2. Czynniki termiczny

Wpływ stresu termicznego na aparat fotosyntetyczny w aspekcie kinetyki fluorescencji chlorofilu przedstawiono w tabeli 2. Niska temperatura uszkadza aparat

TABELA 2. Wpływ stresu termicznego na kinetykę fluorescencji chlorofilu (F_o , F_m , q_p , q_N , F_v/F_m , F_v'/F_m' , Φ_{PSII} – parametry fluorescencji chlorofilu *a*)

Temperatura	Indukowane zmiany w PSII	Literatura
25–45°C	$F_m \downarrow$, $q_p \downarrow$, $F_v/F_m \downarrow$, $F_v'/F_m' \downarrow$, $\Phi_{PSII} \downarrow$	[39]
42°C	$F_v/F_m \uparrow$, $\Phi_{PSII} \uparrow$	[28]
30–40°C	$q_p \downarrow$	[64]
10–30°C	$q_p \downarrow$, $F_v/F_m \downarrow$, $F_v'/F_m' \downarrow$	[27]
5–25°C	NPQ \uparrow	[1]
5–20°C	$q_p \uparrow$, $q_N \downarrow$, $F_v/F_m \uparrow \downarrow$	[31]
15°C	$F_o \downarrow$, $q_p \uparrow$, $q_N \downarrow$, $F_v/F_m \uparrow$	[14]
4–6°C	$q_N \uparrow$	[3]
2–3°C	$F_o \uparrow$, $F_m \uparrow$, $F_v/F_m \downarrow$	[52]

fotosyntetyczny [3, 19, 28] i prowadzi do fotoinhibicji [1, 27] poprzez degradację kompleksów chlorofilowo-białkowych, powodując zmianę struktury PSII i PSI. Reakcją na powyższy stres jest zróżnicowana intensywność fotooksydacji barwników: β -karoten > ksantofile > chlorofil *a* > chlorofil *b* [19, 21, 64]. Proces ten uważa się za wskaźnik uruchomienia syntezy ksantofili z β -karotenu, przy jednoczesnym rozproszeniu nadmiaru pobudzonej energii w cyklu ksantofilowym [28, 64].

W wysokiej temperaturze obserwuje się fotowygazanie w następstwie degradacji chlorofilu [4, 14, 28, 39]. Jest ono silniejsze w PSI niż w PSII [45]. Większa wrażliwość PSI wynika z braku ochronnej roli cyklu ksantofilowego, którego aktywność w tym fotoukładzie jest znacznie ograniczona. W PSII karotenoidy przejmują nadwyżkę energii i zapobiegają dalszej degradacji chlorofilu [1, 2, 4, 21].

2.3. Deficyt wody

Stres wodny uszkadza aparat fotosyntetyczny [26] przez wzrastającą termostabilność CPPSII [39] i degradację D_1 [17] i tym samym modyfikuje PSII [51]. Obserwowany wówczas wzrost wartości współczynnika niefotochemicznego wygaszenia (q_N) i spadek wartości współczynnika fotochemicznego wygaszenia (q_p), F_v/F_m , fotochemicznej wydajności PSII w warunkach równowagi (F_v'/F_m') i Φ_{PSII} [26, 39, 51] odpowiadają nadmiernej produkcji wolnych rodników i aktywacji enzymatycznych i nieenzymatycznych mechanizmów ochronnych eliminujących aktywne formy tlenu [32].

2.4. Gazowe zanieczyszczenia atmosfery

Scenariusze przyszłych zmian klimatycznych przewidują wzrost stężenia dwutlenku węgla, tlenków azotu (NO_x) i azotanu nadtlenku acetylu (PAN), indukujących

degradację ochronnej warstwy troposferycznej. Następstwem negatywnego oddziaływania gazowych zanieczyszczeń powietrza na zbiorowiska roślinne są odwracalne lub trwałe zmiany produktywności fotosyntetycznej.

Ozon troposferyczny, jeżeli występuje w nadmiarze, stwarza poważne zagrożenie dla aktywności fotosyntetycznej (tab. 3). Przez redukcję pierwszego akceptora elektronów, ubichinonu, następuje zakłócenie transportu elektronów [7]. Nadmiar zgromadzonej energii przyczynia się do asocjacji barwników anteny i inaktywacji CPPSII [38, 48]. Może ona jednak ulec rozproszeniu przez deepoksydację wiołaksantyny do zeaksantyny [7, 32]. Jednocześnie wzrasta zawartość chlorofilu *a* i *b*, β -karotenu, luteiny, neoksantyny, zeaksantyny [7, 32, 38].

Ozon jest silnym utleniaczem błon tylakoidów. Pod wpływem UV ozon szybciej rozpada się na reaktywne formy tlenu, czego konsekwencją są zaniżone wartości parametrów fluorescencji chlorofilu, takie jak: fluorescencja maksymalna (F_m), F_v/F_m i q_p [38, 48, 53]. Ich usuwanie może następować między innymi przez askorbinian czy karotenoidy, które jako elementy cyklu ksantofilowego biorą udział w reakcji deepoksydacji. Na utlenianie szczególnie podatna jest neoksantyna w przeciwieństwie do β -karotenu, który charakteryzuje się dużą odpornością [32]. Fotooksydacji ulegają również kompleksy białkowo-barwnikowe [32]. Efekty szkodliwego działania ozonu są podobne do obserwowanych w starzejących się tkankach [48].

Dwutlenek siarki (SO_2), tlenki azotu (NO_x) i azotan nadtlenu acetylu (PAN) indukują rozpad chlorofilu (tab. 3) powodując widoczne uszkodzenia organów asymilacyjnych. Intensywny przepływ elektronów z PSII do PSI w rezultacie przewagi niecyklicznego transportu elektronów i wzrostu q_N powoduje wzrost gradientu protonów w błonach tylakoidowych. Wzrost zakwaszenia światła tylakoidów hamuje syntezę ATP oraz uaktywnia pH-zależną deepoksydazę odpowiedzialną za syntezę zeaksantyny. Na działanie SO_2 , NO_x , PAN bardziej podatny jest chlorofil *a* i β -karoten niż chlorofil *b* i ksantofile. Sugeruje to, że CPPSII jest szybciej degradowane niż LHCI [67]. Objawem zaburzeń funkcji aparatu fotosyntetycznego są też niskie wartości fluorescencji chlorofilu, zwłaszcza q_p , F_v/F_m , Φ_{PSII} , czy tzw. indeksu vitalności (R_{fd}) [8, 49, 58, 61]. Długotrwały wpływ wymienionych gazów prowadzi do wzrostu zawartości askorbinianu i aktywności katalazy, biorących udział w reakcji deepoksydacji.

2.5. Biogenność podłoża

Pośród 3 biosfer jedynie litosfera wzbogaca własne zanieczyszczenia o zanieczyszczenia atmosferyczne i hydrosferyczne. Podwyższenie poziomu toksycznych makro-, mikro- czy ultraelementów wiąże się z obniżeniem poziomu ważnych dla roślin biogenów w kompleksie glebowym.

Nadmiar azotu przy stresie fitycznym prowadzi do wzrostu poziomu zeaksantyny (tab. 3). Przy dłuższym działaniu stresu obserwowano wzrost zawartości

TABELA 3. Wpływ różnych czynników abiotycznych na aktywność cyklu ksantofilowego i fluorescencję chlorofilu ↑ wzrost, ↓ spadek, chl – chlorofil, V – wiolaksantyna, Z – zeaksantyna, car – karoteny, F_o, F_m, F_v, q_p, q_N, F_v/F_m, F_v'/F_m', Φ_{PSII}, Rfd – parametry fluorescencji chlorofilu a

Czynnik	Poziom barwników				Wartości parametrów fluorescencji chlorofilu								Gatunek roślin	Literatura	
	chl	V	Z	car	F _o	F _m	F _v	q _p	q _N	F _v /F _m	F _v '/F _m '	Φ _{PSII}			Rfd
UV	↓													<i>Nicotiana tabacum</i>	[5]
UVA													↑	<i>Zea mays, Triticum aestivum, Avena sativa, Amaranthus caudatus, Helianthus annuus, Nicotiana tabacum, Portulaca oleracea, Cucurbita ficifolia, Spinacia oleracea</i>	[37]
UVB	↓			↑↓										<i>Picea abies</i>	[46, 54]
O ₃	↑	↓	↑											<i>Cucurbita pepo</i>	[7]
O ₃	↑↓	↓	↑	↑↓										<i>Picea abies</i>	[32]
O ₃	↑↓				↑	↑		↓	↑	↓				<i>Populus deltoides x maximowiczii, P. x euramericana</i>	[38, 53]
O ₃										↓				<i>Triticum aestivum, T. durum</i>	[48]
O ₃						↓				↓				<i>Pinus sylvestris</i>	[49]
SO ₂ , NO ₂	↓					↓		↓	↑	↓			↓	<i>Pinus sylvestris</i>	[49, 57, 58]
SO ₂	↓	↓	↑	↓						↓				<i>Picea abies</i>	[61]
SO ₂			↑						↑				↓	<i>Spinacia oleracea, Pelargonium zonale</i>	[63]
↑N		↑	↓											<i>Spinacia oleracea</i>	[9, 65]
↓N		↓	↑		↑			↓	↑	↓			↓	<i>Heuchera americana, Picea abies, Spinacia oleracea</i>	[9, 52, 59, 65.]
Mn								↓		↓		↓		<i>Betula ermanii, Alnus hirsuta, Ulmus davidiana, Acer mono</i>	[29]
Pb, Ni, Cd, Zn	↓			↓										<i>Secale cereale</i>	[33]
Cd	↓			↓				↑	↓			↓		<i>Brassica napus</i>	[34]
Pb	↓			↓	↑	↓				↓				<i>Pisum sativum</i>	[40]
Cu								↓	↑	↓		↓	↑	<i>Phaseolus coccineus</i>	[41]
Al								↑	↓	↓		↓		<i>Triticum aestivum</i>	[44]

λ -karotenu i β -karotenu, luteiny i neoksantyny [47]. Wpływ niedoboru azotu na aktywność cyklu ksantofilowego wiąże się ze spadkiem zawartości chlorofilu i z udziałem pH-zależnej syntezy anteraksantyny i zeaksantyny w rozproszeniu nadmiaru energii (tab. 3). U roślin z niedoborem N proces ten w sposób ograniczony może zachodzić późnym popołudniem. Zwykle jednak ma miejsce w południe [65].

Dostępność dla roślin biogenów (N, K, P, S, Cl i licznych mikroelementów) wpływa na skład barwników. Niedobór Mg, K, Ca sprzyja oksydacyjnej degradacji białka D_1 , kompleksów chlorofilowo-białkowych PSII [17], np. LHCII [30]. Niedobór S i P obniża poziom chlorofilu do 15%, sprzyja 20–30% fotouszkodzeniom CPPSII, a funkcję akceptora energii świetlnej przejmuje LHCII. Następuje wówczas aktywacja procesu deepoksydacji, połączona z 2-krotnym spadkiem zawartości wio-laksantyny, 9-krotnym wzrostem anteraksantyny i 20-krotnym wzrostem zeaksantyny i rozproszeniem nadmiaru zaabsorbowanej energii w postaci ciepła. Rolę rozpraszacza energii pełni prawdopodobnie również luteina, bowiem jej zawartość zwiększa się wówczas 2-krotnie [66].

Nadmiar Cu, Cd, Pb, Ni, Zn, Fe, Al i Mn zmniejsza zawartość chlorofilu i karotenoidów [33, 34, 40, 44], co obniża możliwość fotochemicznego wykorzystania nadmiaru zaabsorbowanej energii słonecznej (tab. 3). Pod wpływem Cu, Mn, Al, Pb, Cd obserwuje się niskie wartości q_p i F_v/F_m , co świadczyć może o inhibicji PSII [23, 29, 33, 34, 41, 44]. Z kolei obserwowany wzrost q_N pod wpływem Cu, Al, Cd wskazuje na rozproszenie energii w postaci ciepła oraz kumulacji H^+ [29, 33, 34, 40, 41, 44]. Zmiany te wskazują również na zakłócenia w reakcjach deepoksydacji i zminimalizowaniu kwantowej wydajności transportu elektronów w PSII [34, 41, 44]. Niekorzystne działanie Mn i Pb prowadzi również do degradacji białka D_1 [29, 40].

2.6. Herbicydy

Chemiczne środki chwastobójcze stosowane są do całkowitego (herbicydy totalne) lub wybiórczego (herbicydy selektywne) hamowania rozwoju niepożądanych gatunków roślin. Wiele herbicydów typu DCMU, bentazon czy atrazyna, blokuje przepływ elektronów przez PSII. Następstwem pełnej inhibicji PSII jest bliska zeru wartość R_{fd} , świadcząca o zaniku fluorescencji chlorofilu [5, 37].

Herbicydy fotodynamiczne powodują peroksydację lipidów błon tylakoidów i destrukcję barwników fotosyntetycznie czynnych [5, 43]. Wiążąc się z semichinonem blokują transport elektronów z PSII [6, 20, 36, 62].

PODSUMOWANIE

U roślin autotroficznych cykl ksantofilowy pełni istotne funkcje fotoochronne, umożliwiające zachowanie homeostazy w warunkach stresowych. Powstały pod

wpływem czynników stresu abiotycznego nadmiar zaabsorbowanej energii świetlnej zostaje przekazany w reakcji deepoksydacji na alternatywny szlak syntezy utlenionych karotenów. Przemianę wiolaksantyny do anteraksantyny i następnie do zeaksantyny indukuje obniżone pH wewnątrztylakoidalne. Z kolei reakcja odwrotna – epoksydacja wymaga neutralnego pH i prowadzi do zniwelowania potencjalnych uszkodzeń wywołanych przez wolne rodniki w PSII i PSI, wspomagając reorganizację fotosystemów, np. przez resyntezę apoprotein D₁ i D₂. Tak więc aktywacja odpowiednich reakcji cyklu ksantofilowego umożliwia usuwanie uszkodzeń fotosystemów wywołanych przez różnorodne czynniki stresowe, zapobiegając w ten sposób obniżeniu natężenia fotosyntezy.

LITERATURA

- [1] ADAMS WW III, DEMMIG-ADAMS B. The xanthophyll cycle and sustained thermal energy dissipation activity in *Vinca minor* and *Euonymus kiautschovicus* in winter. *Plant Cell Environ* 1995; **18**: 117–127.
- [2] ARVIDSSON PO, CARLSSON M, STEFÁNSSON H, ALBERTSSON PA, AKERLUND HE. Violaxanthin accessibility and temperature dependency for de-epoxidation in spinach thylakoid membranes. *Photosynth Res* 1997; **52**: 39–48.
- [3] BUFFONI M, TESTI MG, PESARESI P, GARLASCHI FM, JENNINGS RC. A study of the relation between CP29 phosphorylation, zeaxanthin content and fluorescence quenching parameters in *Zea mays* leaves. *Physiol Plant* 1998; **102**: 318–324.
- [4] BUKHOV NG, BOUCHER N, CARPENTIER R. Loss of the precise control of photosynthesis and increased yield of non-radiative dissipation of excitation energy after mild heat treatment of barley leaves. *Physiol Plant* 1998; **104**: 563–570.
- [5] BUSCHMANN C, LICHTENTHALER HK. Principles and characteristics of multi-colour fluorescence imaging of plants. *J Plant Physiol* 1998; **152**: 297–314.
- [6] CARTER GA, CIBULA WG, MILLER RL. Narrow-band reflectance imagery compared with thermal imagery for early detection of plant stress. *J Plant Physiol* 1996; **148**: 515–522.
- [7] CIOMPI S, CASTAGNA A, RANIERI A, NALI C, LORENZINI G, SOLDATINI GF. CO₂ assimilation, xanthophyll cycle pigments and PSII efficiency in pumpkin plants as affected by ozone fumigation. *Physiol Plant* 1997; **101**: 881–889.
- [8] DELTORO VI, GIMENO C, CALATAYUD A, BARRENO E. Effects of SO₂ fumigations on photosynthetic CO₂ gas exchange, chlorophyll *a* fluorescence emission and antioxidant enzymes in the lichens *Evernia prunastri* and *Ramalina farinacea*. *Physiol Plant* 1999; **105**: 648–654.
- [9] DEMMIG-ADAMS B, ADAMS WW III. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1992; **43**: 599–626.
- [10] DEMMIG-ADAMS B, ADAMS WW III. Xanthophyll cycle and light stress in nature: uniform response to excess direct sunlight among higher plant species. *Planta* 1996; **198**: 460–470.
- [11] DEMMIG-ADAMS B, ADAMS WW III. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Sci* 1996; **1**: 21–26.
- [12] DÖHLER G. Changes in the pattern of pigments and free amino acids of the macroalga *Laminaria saccharina* (L.) lamour exposed to UV-A and UV-B after addition of ¹⁵N-ammonium. *J Plant Physiol* 1998; **153**: 214–219.
- [13] ESKLING M, ARVIDSSON PO, ÅKERLUND HE. The xanthophyll cycle, its regulation and components. *Physiol Plant* 1997; **100**: 806–816.

- [14] EBRAHIM MKH, VOGG G, OSMAN MNEH, KOMOR E. Photosynthetic performance and adaptation of sugarcane at suboptimal temperatures. *J Plant Physiol* 1998; **153**: 587–592.
- [15] EPRON D. The temperature dependence of photoinhibition in leaves of *Phaseolus vulgaris* (L.) Influence of CO₂ and O₂ concentrations. *Plant Sci* 1997; **124**: 1–8.
- [16] GARCIA-PLAZAOLA JI, ARTETXE U, BECERRIL JM. Diurnal changes in antioxidant and carotenoid composition in the Mediterranean sclerophyll tree *Quercus ilex* (L.) during winter. *Plant Sci* 1999; **143**: 125–133.
- [17] GIARDI MT, MASOJIDEK J, GODDE D. Effects of abiotic stresses on the turnover of the D₁ reaction centre II protein. *Physiol Plant* 1997; **101**: 635–642.
- [18] GILMORE AM. Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiol Plant* 1997; **99**: 197–209.
- [19] GRAY GR, SAVITCH LV, IVANOV AG, HUNER NPA. Photosystem II excitation pressure and development of resistance to photoinhibition. *Plant Physiol* 1996; **110**: 61–71.
- [20] HÄDER DP. Mechanisms of photoreception: energy and signal transducers. [w] Jennings RC, Zucchelli G, Ghetti F, Colombetti G [red] Light as an energy source and information carrier in plant physiology. New York, London: Olenum Press 1996: 185–196.
- [21] HALDIMANN P. How do changes in temperature during growth affect leaf pigment composition and photosynthesis in *Zea mays* genotypes differing in sensitivity to low temperature? *J Exp Bot* 1999; **50**: 543–550.
- [22] HÄRTEL H, GRIMM B. Consequences of chlorophyll deficiency for leaf carotenoid composition in tobacco synthesizing glutamate 1-semialdehyde aminotransferase antisense RNA: dependency on developmental age and growth light. *J Exp Bot* 1998; **49**: 535–546.
- [23] HERDE O, PEÑA-CORTÉS H, FUSS H, WILLMITZER L, FISAHN J. Effects of mechanical wounding, current application and heat treatment on chlorophyll fluorescence and pigment composition in tomato plants. *Physiol Plant* 1999; **105**: 179–184.
- [24] HIPPELI S, ELSTNER EF. Mechanisms of oxygen activation during plant stress: biochemical effects of air pollutants. *J Plant Physiol* 1996; **148**: 249–257.
- [25] HOLLINDERBÄUMER R, EBBERT V, GODDE D. Inhibition of CO₂-fixation and its effect on the activity of photosystem II, on D1-protein synthesis and phosphorylation. *Photosynth Res* 1997; **52**: 105–116.
- [26] JAGTAP V, BHARGOVA S, STREB P, FEIERABEND J. Comparative effect of water, heat and light stresses on photosynthetic reactions in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *J Exp Bot* 1998; **49**: 1715–1721.
- [27] KAO WY, TSAI TT, CHEN WH. Response of photosynthetic gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence of *Miscanthus floridulus* (Labill) Warb. to temperature and irradiance. *J Plant Physiol* 1998; **152**: 407–412.
- [28] KARIM MA, FRACHEBOUD Y, STAMP P. Photosynthetic activity of developing leaves of *Zea mays* is less affected by heat stress than that of developed leaves. *Physiol Plant* 1999; **105**: 685–693.
- [29] KITAO M, LEI TT, KOIKE T. Application of chlorophyll fluorescence to evaluate Mn tolerance of deciduous broad-leaved tree seedlings native to northern Japan. *Tree Physiol* 1998; **18**: 135–140.
- [30] KONOPKA C, HOLLINDERBÄUMER R, EBBERT V, WIETOSKA H, GODDE D. Imbalances of D1 protein turnover during stress induced chlorosis of a declining spruce tree. *J Plant Physiol* 1996; **148**: 324–331.
- [31] KRIVOSHEEVA A, TAO DL, OTTANDER CH, WINGSLE G, DUBE SL, ÖQUIST G. Cold acclimation and photoinhibition of photosynthesis in Scots pine. *Planta* 1996; **200**: 296–305.
- [32] KRONFUß G, POLLE A, TAUSZ M, HAVRANEK WM, WIESER G. Effects of ozone and mild drought stress on gas exchange, antioxidants and chloroplast pigments in current-year needles of young Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.]. *Trees* 1998, **12**: 482–489.

- [33] KRUPA Z, BARANOWSKA M, ORZOŁ D. Can anthocyanins be considered as heavy metal stress indicator in higher plants? *Acta Physiol Plant* 1996; **18**: 147–151.
- [34] LARSSON EH, BORNMAN JF, ASP H. Influence of UV-B radiation and Cd²⁺ on chlorophyll fluorescence, growth and nutrient content in *Brassica napus*. *J Exp Bot* 1998; **49**: 1031–1039.
- [35] LICHTENTHALER HK, RINDERLE U. The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *CRC Cri Rev Anal Chem* 1988; **19**, Suppl. I: 29–85.
- [36] LICHTENTHALER HK, LANG M, SOWINSKA M, HEISEL F, MIEHÉ JA. Detection of vegetation stress via a new high resolution fluorescence imaging system. *J Plant Physiol* 1996; **148**: 599–612.
- [37] LICHTENTHALER KK, SCHWEIGER J. Cell wall bound ferulic acid, the major substance of the blue-green fluorescence emission of plants. *J Plant Physiol* 1998; **152**: 272–282.
- [38] LORENZINI G, GUIDI L, NALI C, SOLDATINI GF. Quenching analysis in poplar clones exposed to ozone. *Tree Physiol* 1999; **19**: 607–612.
- [39] LU C, ZHANG J. Effects of water stress on photosystem II photochemistry and its thermostability in wheat plants. *J Exp Bot* 1999; **50**: 1199–1206.
- [40] ŁUKASZEK M, POSKUTA JW. Development of photosynthetic apparatus and respiration in pea seedlings during greening as influenced by toxic concentration of lead. *Acta Physiol Plant* 1998; **20**: 35–40.
- [41] MAKSYMIEC W, BASZYŃSKI T. The role of Ca²⁺ ions in modulating changes induced in bean plants by an excess of Cu²⁺ ions. Chlorophyll fluorescence measurements. *Physiol Plant* 1999; **105**: 562–568.
- [42] MONTANE MH, TARDY F, KLOPPSTECH K, HAVAUX M. Differential control of xanthophylls and light-induced stress proteins, as opposed to light-harvesting chlorophyll *a/b* proteins, during photosynthetic acclimation of barley leaves to light irradiance. *Plant Physiol* 1998; **118**: 227–235.
- [43] MOSTOWSKA A, GWÓZDŹ EA. Reakcje aparatu fotosyntetycznego na stres oksydacyjny. *Post Biol Kom* 1995; **22**: 43–63.
- [44] MOUSTAKAS M, OUZOUNIDOU G. Increased non-photochemical quenching in leaves of aluminium-stressed wheat plants is due to Al³⁺-induced elemental loss. *Plant Physiol Biochem* 1994; **32**: 527–532.
- [45] PASTENES C, HORTON P. Effect of high temperature on photosynthesis in beans. II. CO₂ assimilation and metabolite contents. *Plant Physiol* 1996; **112**: 1253–1260.
- [46] PUKACKI PM., MODRZYŃSKI J. The influence of ultraviolet-B radiation on the growth, pigment production and chlorophyll fluorescence of Norway spruce seedlings. *Acta Physiol Plant* 1998; **20**: 245–250.
- [47] RAMALHO JC, PONS TL, GROENEVELD HW, NUNES MA. Photosynthetic responses of *Coffea arabica* leaves to a short-term high light exposure in relation to N availability. *Physiol Plant* 1997; **101**: 229–239.
- [48] REICHENAUER TG, GOODMAN BA, KOSTECKI P, SOJA G. Ozone sensitivity in *Triticum durum* and *T. aestivum* with respect to leaf injury, photosynthetic activity and free radical content. *Physiol Plant* 1998; **104**: 681–686.
- [49] SAARINEN T, LISKI J. The effect of industrial air pollution on chlorophyll fluorescence and pigment contents of Scots pine (*Pinus sylvestris*) needles. *Eur J For Path* 1993; **23**: 353–361.
- [50] SCHINDLER CH, LICHTENTHALER HK. Photosynthetic CO₂-assimilation, chlorophyll fluorescence and zeaxanthin accumulation in field grown maple trees in the course of a sunny and a cloudy day. *J Plant Physiol* 1996; **148**: 399–412.
- [51] SCARASCIA-MUGNOZZA G, DE ANGELIS P, MATTEUCCI G, VALENTINI R. Long-term exposure to elevated [CO₂] in a natural *Quercus ilex* L. community: net photosynthesis and photochemical efficiency of PSII at different leaves of water stress. *Plant Cell Environ* 1996; **19**: 643–654.

- [52] SKILLMAN JB, OSMOND CB. Influence of nitrogen supply and growth irradiance on photoinhibition and recovery in *Heuchera americana* (Saxifragaceae). *Physiol Plant* 1998; **103**: 567–573.
- [53] SOLDATINIG F, LORENZINIG G, FILIPPINI F, NALIC, GUIDI L. Photosynthesis of two poplar clones under long-term exposure to ozone. *Physiol Plant* 1998; **104**: 707–712.
- [54] ŠPRTOVÁ M, MAREK MV, NEDBAL L, PRÁŠIL O, KALINA J. Seasonal changes of photosynthetic assimilation of Norway spruce under the impact of enhanced UV-B radiation. *Plant Sci* 1999; **142**: 37–45.
- [55] ŠPUNDA V, ČAJÁNEK M, KALINA J, LACHETOVÁ I, ŠPRTOVÁ M, MAREK MV. Mechanistic differences in utilization of absorbed excitation energy within photosynthetic apparatus of Norway spruce induced by the vertical distribution of photosynthetically active radiation through the tree crown. *Plant Sci* 1998; **133**: 155–165.
- [56] SRIVASTAVA A, ZEIGER E. Guard cell zeaxanthin tracks photosynthetically active radiation and stomatal apertures in *Vicia faba* leaves. *Plant Cell Environ* 1995; **18**: 813–817.
- [57] STRAND M. Photosynthetic activity of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles during winter is affected by exposure to SO₂ and NO₂ during summer. *New Phytol* 1993; **123**: 133–141.
- [58] STRAND M. Persistent effects of low concentrations of SO₂ and NO₂ on photosynthesis in Scots pine (*Pinus sylvestris*) needles. *Physiol Plant* 1995; **95**: 581–590.
- [59] STRAND M. Effect of mineral nutrient content on oxygen exchange and chlorophyll *a* fluorescence in needles of Norway spruce. *Tree Physiol* 1997; **17**: 221–230.
- [60] STREB P, TEL-OR E, FEIERABEND J. Light stress effects and antioxidative protection in two desert plants. *Funct Ecol* 1997; **11**: 416–424.
- [61] TAUSZ M, DE KOK LJ, STULEN I., GRILL D. Physiological responses of Norway spruce trees to elevated CO₂ and SO₂. *J Plant Physiol* 1996; **148**: 362–367.
- [62] THEISEN AF, ROCK BN, ECKERT RT. Detection of changes in steady-state chlorophyll fluorescence in *Pinus strobus* following short-term ozone exposure. *J Plant Physiol* 1994; **144**: 410–419.
- [63] VELJOVIC-JOVANOVIC S, BILGER W, HEBER U. Inhibition of photosynthesis, acidification and stimulation of zeaxanthin formation in leaves by sulfur dioxide and reversal of these effects. *Planta* 1993; **191**: 365–376.
- [64] VENEMA JH, POSTHUMUS F, DE VRIES M, VAN HASSELT PR. Differential response of domestic and wild *Lycopersicon* species to chilling under low light: growth, carbohydrate content, photosynthesis and the xanthophyll cycle. *Physiol Plant* 1999; **105**: 81–88.
- [65] VERHOEVEN AS, DEMMIG-ADAMS B, ADAMS WW III. Enhanced employment of the xanthophyll cycle and thermal energy dissipation in spinach exposed to high light and N stress. *Plant Physiol* 1997; **113**: 817–824.
- [66] WYKOFF DD, DAVIES JP, MELIS A, GROSSMAN AR. The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 1998; **117**: 129–139.
- [67] YOUNG A, BRITTON G. Carotenoids and stress. [w] Alscher RG, Cumming JR [red] Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms. New York: Wiley-Liss Inc. 1990; 87–112.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 31.08.1999 r.

Przyjęto: 06.10.1999 r.

Adres autora: Instytut Dendrologii PAN,
ul. Parkowa 5, 62-035 Kórnik

ROLA BAX I BCL-2 W REGULACJI APOPTOZY KOMÓREK NABŁONKA GRUCZOŁU MLEKOWEGO

ROLE OF BAX AND BCL-2 IN REGULATION OF MAMMARY EPITHELIAL CELLS APOPTOSIS

Tomasz MOTYL*, Barbara GAJKOWSKA**, Tomasz PŁOSZAJ*,
Przemysław WAREŃSKI*, Arkadiusz ORZECZOWSKI*, Wioletta ZIMOWSKA*,
Urszula WOJEWÓDZKA**, Zofia RYNIWICZ***, Anna REKIEL****

* Katedra Fizjologii Zwierząt, Wydział Weterynaryjny SGGW, Warszawa,
** Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej, PAN, Warszawa, *** Instytut
Genetyki i Hodowli Zwierząt, PAN, Jastrzębiec, **** Katedra Szczegółowej
Hodowli Zwierząt, Wydział Zootechniczny SGGW, Brwinów

Streszczenie: Celem niniejszego opracowania jest przedstawienie przeglądu wiadomości dotyczącego konkretnego modelu apoptozy, a mianowicie fizjologicznie występującej śmierci komórek nabłonka gruczołu mlekowego, a w szczególności roli białek z rodziny Bcl-2 w regulacji tego procesu. Pracę tę napisano na podstawie dotychczasowych danych literaturowych oraz wyników własnych badań nad mechanizmami przebudowy gruczołu mlekowego. Bax i Bcl-2 należą do kluczowych regulatorów apoptozy, kontrolujących przepływ jonów (K^+ , H^+ , Cl^- , Ca^{2+}) i reaktywnych form tlenu w komórce, uwalnianie apoptogennych czynników (AIF, cytochromu c) z mitochondriów oraz aktywację egzekutorów apoptozy (kaspaz, DNaz). Apoptoza komórek nabłonka gruczołowego badana zarówno na modelu *in vitro* (linie komórkowe, np. HC11, MCF-7), jak i modelu *in vivo* (np. gruczoł mlekowy kozy w cyklu laktacyjnym oraz lochy w czasie inwolucji) związana jest ze zmianami ekspresji *bax* i *bcl-2* oraz wewnątrzkomórkową redystrybucją ich produktów. Generalnie „czynniki przeżycia”, np. prolaktyna, EGF, zwiększają ekspresję *bcl-2* i hamują ekspresję *bax*, natomiast „czynniki śmierci”, np. auto-/parakrynnie działający TGF- β_1 zwiększa stosunek Bax/Bcl-2 w komórce. TGF- β_1 poza aktywacją transkrypcji stymuluje redystrybucję Bax z cytozolu do błon mitochondrialnych, siateczki śródplazmatycznej i aparatu Golgiego oraz do jądra komórkowego. Zakończenie laktacji związane jest ze spadkiem wydzielania hormonów laktogennych (prolaktyna, hormon wzrostu), co prowadzi do zwiększenia ekspresji lokalnych, wewnątrzgruczołowych inhibitorów wzrostu i induktorów apoptozy (TGF- β_s , FIL, MDGI, mammatatyny) i w następstwie wzrostu ekspresji promotorów apoptozy (Bax, Bcl-xs), aktywacji jej egzekutorów i w konsekwencji do masowej apoptozy komórek nabłonkowych, warunkującej inwolucję gruczołu mlekowego.

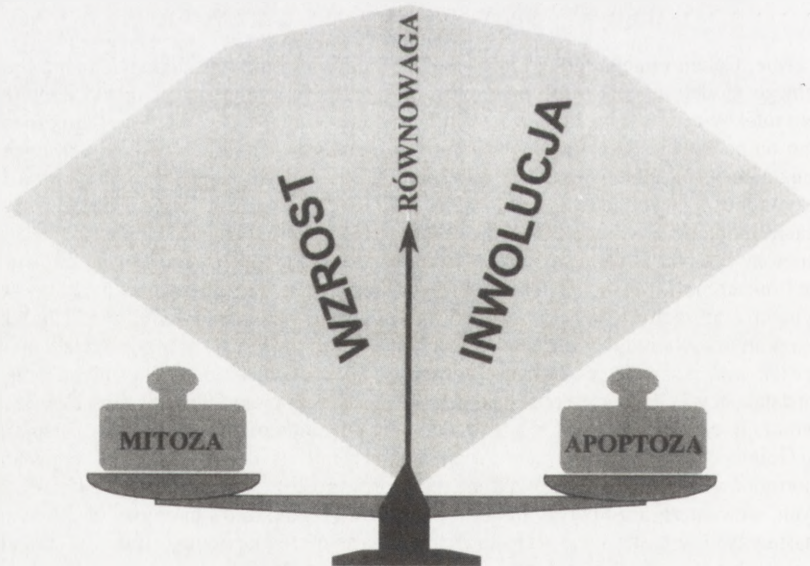
(*Postępy Biologii Komórki* 2000; 27: 31–40)

Słowa kluczowe: apoptoza, Bax, Bcl-2, gruczoł mlekowy.

Summary: The aim of this review is to present a concrete model of apoptosis, namely the physiological death of mammary epithelial cells, and put emphasis on the role of Bcl-2 related proteins in the regulation of this process. The paper is based on the literature and our own observations related to the regulatory mechanisms of mammary gland remodelling. Bax and Bcl-2 belong to the key regulators of apoptosis controlling ion (K^+ , H^+ , Cl^- , Ca^{2+}) and reactive oxygen species fluxes within the cell, releasing apoptogenic factors (AIF, cytochrome c) from mitochondria and activating executors of apoptosis (caspases, DNases). Apoptosis of mammary epithelial cells studied both *in vitro* (cell cultures i.e. HC11 and MCF-7) and *in vivo* (i.e. mammary gland of goat during lactation and involuting mammary gland of sow) is associated with the altered expression of *bax* and *bcl-2* and intracellular redistribution of their products. In general, „survival factors”, i.e. prolactin, EGF increase expression of *bcl-2* and inhibit expression of *bax*, whereas „death factors” i.e. auto-/paracrine functioning TGF- β_1 increase intracellular Bax/Bcl-2 ratio. TGF- β_1 in addition to transcriptional activation stimulates redistribution of Bax protein from cytosol to organellar membranes (mitochondrial, endoplasmic reticulum, Golgi apparatus) and to nucleus. The end of lactation is associated with the drop of endocrine secretion of lactogenic hormones (prolactin, growth hormone), which in turn leads to augmented expression of local, intramammary derived growth inhibitors and inducers of apoptosis (TGF- β_s , FIL, MDGI, mammastatin). Consequently, increased expression of apoptotic promoters (Bax, Bcl-xs) and activation of executors inevitably leads to massive apoptosis of epithelial cells, responsible for involution of mammary gland. (*Advances in Cell Biology* 2000; 27: 31–40)

Key words: apoptosis, Bax, Bcl-2, mammary gland.

Przebudowa gruczołu mlekowego polega na następujących po sobie procesach inwolucji i wzrostu tkanki wydzielniczej, regulowanych przez dynamiczną rów-

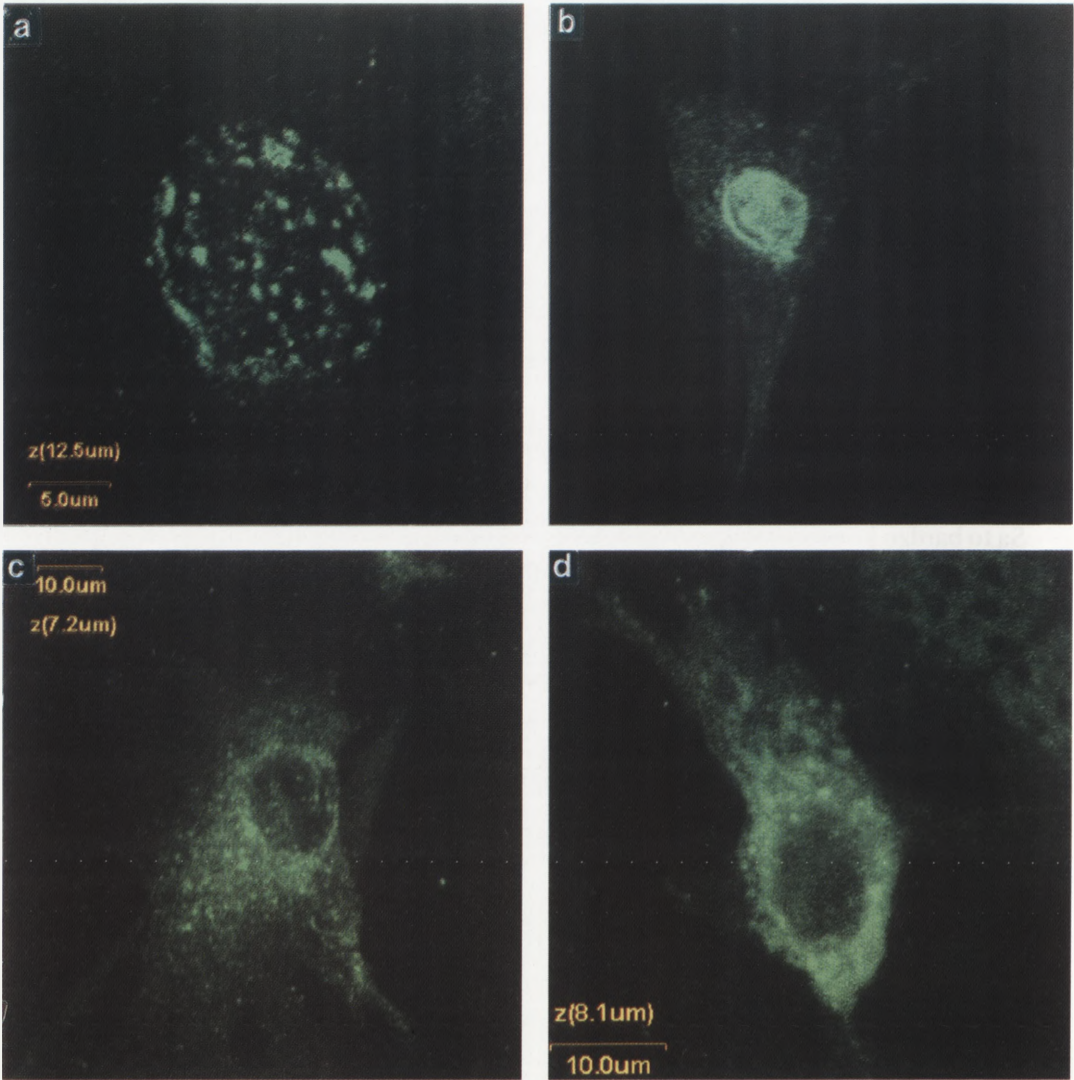


RYSUNEK 1. Dynamiczna równowaga między mitozą a apoptozą jako zjawisko odpowiedzialne za wzrost i inwolucję tkanki gruczołowej w procesie przebudowy gruczołu mlekowego

nowagę między apoptozą i mitozą komórek nabłonka gruczołowego (rys. 1). Inwolucja gruczołu mlekowego polega na degradacji glikoprotein macierzy pozakomórkowej i błony podstawnej, masowej apoptozie komórek nabłonkowych i zastępowaniu ich przez tkankę łączną, co w konsekwencji prowadzi do zaniku większości pęcherzyków wydzielniczych wraz z przewodami mlekowymi. Rolą inwolucji jest przygotowanie narządu do fazy spoczynku lub powtórnego cyklu laktacyjnego.

BIAŁKA Z RODZINY BCL-2: PODZIAŁ, WYSTĘPOWANIE, STRUKTURA, FUNKCJE, MECHANIZM DZIAŁANIA

Apoptoza w przeciwieństwie do martwicy jest czynną śmiercią komórki, wymagającą w swym przebiegu syntezy RNA i białka [40]. Kluczową rolę w regulacji apoptozy w jej fazie decyzyjnej odgrywają białka z rodziny Bcl-2 [1, 27, 43]. Są to bardzo konserwatywne białka, których homologi występują na różnych etapach rozwoju filogenetycznego zarówno u wirusów, nicieni, jak i kręgowców. Cechą charakterystyczną białek rodziny Bcl-2 jest występowanie homologicznych sekwencji: BH1, BH2, BH3, BH4 (*Bcl-2 homology regions*). Domeny te determinują zdolność do dimeryzacji białek należących do tej rodziny ułatwiając formowanie homodimerów, a także interakcje z innymi białkami regulującymi apoptozę, lecz strukturalnie nie spokrewnionymi z Bcl-2 (np. Bag1, Raf-1). Na podstawie występowania poszczególnych domen i wynikających stąd właściwości białek rodzinę Bcl-2 podzielono na 3 podrodziny: podrodzinę Bcl-2 (np. występujące u ssaków: Bcl-2, Bcl-x1, Bcl-xs, Bcl-w, Mcl-1, A1), podrodzinę Bax (Bax, Bak, Bok) oraz podrodzinę BH3, charakteryzującą się występowaniem właśnie tej domeny (np. Bad, Bik, Bid). Białka z podrodziny Bcl-2 (z wyjątkiem Bcl-xs) są inhibitorami apoptozy, natomiast białka z podrodzin: Bax i BH3 są promotorami śmierci. Cechą charakterystyczną większości białek z rodziny Bcl-2 jest występowanie C-terminalnej domeny transbłonowej, która umożliwia ich „zakotwiczenie” w błonach organelli: mitochondrialnych, siateczki śródplazmatycznej, jądrowej i aparatu Golgiego. Usunięcie domen kotwiczących białka w błonach powoduje ograniczenie ich zdolności jako regulatorów śmierci [16, 74]. Udowodniono, że w mysich tymocytach Bcl-2 jest zlokalizowane wyłącznie we frakcji błonowej, Bax w cytozolu, natomiast Bcl-x1 jest obecne w obydwu: cytozolowej i błonowej frakcji komórkowej [18]. Indukcja apoptozy deksametazonem lub promieniowaniem w tymocytach zmienia wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie Bax i Bcl-x1, które przechodzą z formy rozpuszczonej w cytozolu do formy związanej z błoną. Transbłonowe domeny białek bcl-2 mogą również mieć znaczenie inne niż „kotwice” błonowe: między innymi jako podstawowe miejsce dla homodimerycznych interakcji lub miejsca wiązania białek prionowych [28].



RYSUNEK 2. Konfokalny obraz ekspresji *bcl-2* w: a – komórce mysiej białaczki limfatycznej linii L1210, b – szczurzym mioblastie szkieletowej linii L6, c, d – komórkach nabłonka gruczołu mlekowego myszy linii HC11 (c – komórka o mniejszej ekspresji *bcl-2*, d – komórka o większej ekspresji *bcl-2*); Bcl-2 wyznakowano monoklonalnymi przeciwciałami anti-Bcl-2 sprzężonymi z fluoresceiną

Protoonkogen *bcl-2* został po raz pierwszy odkryty w wyniku chromosomalnej translokacji t(14; 18) powszechnie stwierdzanej w nie-Hodgkinowskich chłoniakach [66, 67]. *bcl-2* jest normalnie zlokalizowany na chromosomie 18 q21, jednakże w wyniku translokacji dostaje się on pod wpływ genu IgH na chromosomie 14 q32, co w konsekwencji prowadzi do wzmożenia ekspresji i nadprodukcji białka Bcl-2. Nadekspresja *bcl-2* występuje nie tylko w złośliwych chorobach proliferacyjnych układu krwiotwórczego, ale również w wielu typach złośliwych guzów litych i jest odpowiedzialna za ich oporność na radio- i chemioterapię [55]. Dowiedziano, że w 57% przypadków raka piersi [73] i w 27% raka prostaty [5] występuje nadekspresja *bcl-2*. Wysoką ekspresję *bcl-2* stwierdziliśmy w standardowych liniach komórek białaczkowych: L1210 (rys. 2a), MOLT-4, K562 oraz w stransformowanych liniach: szczurzych mioblastów szkieletowych L6 (rys. 2b) oraz mysich komórkach nabłonka gruczołu mlekowego HC11 (rys. 2c, d). Poziom Bcl-2 w badanych komórkach był różny i zależny od linii komórkowej, cyklu komórkowego, dostępności czynników wzrostowych i troficznych oraz apoptogennych i antyapoptogennych stymulacji [41, 50, 76, 77]. Spośród wszystkich znanych dotychczas białek komórkowych Bcl-2 jest najsilniejszym inhibitorem apoptozy wywołanej przez bardzo różne czynniki, np. promieniowanie jonizujące, hipertermię, deficyt czynników wzrostowych, glikokortykoidy, chemioterapeutyki [16] oraz reaktywne formy tlenu [76].

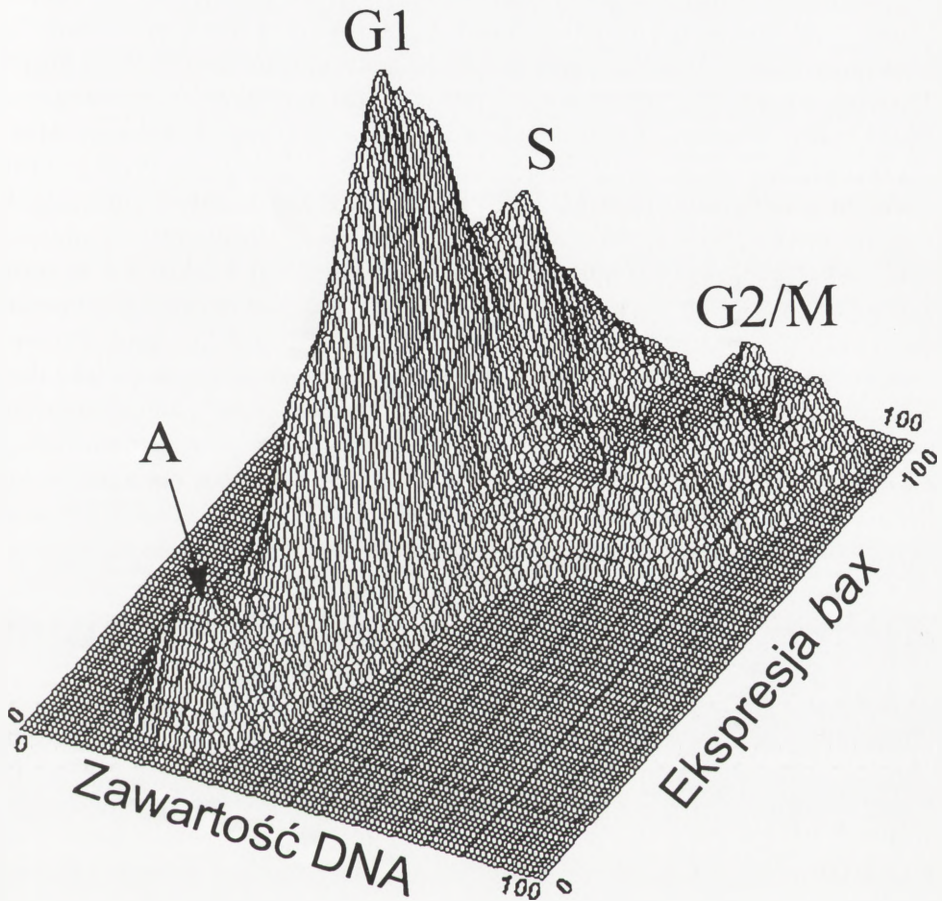
Bax (*Bcl-2 associated X protein*) jest najlepiej opisanym promotorem apoptozy, zależnym od czynnika transkrypcyjnego p53, jakkolwiek w niektórych typach komórek nie zawsze aktywacja genu *p53* indukuje proces apoptozy za pośrednictwem wyżej wymienionego białka [21]. Ludzki gen *bax* zlokalizowany jest na chromosomie 19 q13,3-13,4 [2]. Gen ten ma długość 4500 par zasad oraz złożony jest z 6 egzonów przedzielonych 5 intronami. U człowieka, w wyniku procesu *alternatywnego splicingu* pierwotnego transkrypty powstają aż trzy różne formy dojrzałego białka. Są to: aktywna biologicznie forma Bax α zbudowana ze 192 aminokwasów (o masie cząsteczkowej wynoszącej 21 kDa)[47], mająca hydrofobową domenę C-terminalną, mogącą zakotwiczyć całą cząsteczkę w błonach organelli komórkowych oraz cytozolowe białka Bax β i Bax γ nie mające transmembranowej domeny (rola tych ostatnich nie została jak dotąd poznana). Białko Bax α (Bax) może tworzyć z białkami z rodziny Bcl-2 zarówno homodimery stymulujące apoptozę, jak i heterodimery. Spośród licznych członków rodziny Bcl-2 białko Bax ma wysokie powinowactwo jedynie do czterech antyapoptotycznych białek: Bcl-2 i A1 (z którymi formuje heterodimery hamujące apoptozę) oraz do Bcl-x1 i Mcl-1, z którymi tworzy heterodimery proapoptotyczne. Podobnie jak w przypadku *bcl-2*, najwyższy poziom ekspresji *bax* występuje w komórkach nowotworowych i stransformowanych. Ostatnie nasze badania przeprowadzone na liniach ludzkich komórek nowotworowych: raka sutka MCF-7, glejaka U373MG, raka jajnika PA1 i raka okrężnicy COLO205 z zastosowaniem laserowej cytometrii skaningowej wykazały zależność ekspresji

bax od cyklu komórkowego z najwyższym poziomem Bax w komórkach w fazie G_2/M (rys. 3). Przechodzenie komórki przez kolejne fazy cyklu związane jest także z wewnątrzkomórkową redystrybucją Bax z obszaru cytoplazmatycznego do obszaru jądrowego, co sugeruje udział tego białka w regulacji cyklu komórkowego.

Immunohistochemiczna analiza białek z rodziny Bcl-2 w zdrowych tkankach wykazała szeroką, lecz zróżnicowaną ekspresję *bcl-2*, *bax*, *bcl-x* i *mcl-1* [23, 24, 25, 37]. Stosunkowo wysoki poziom białka Bax występuje w komórkach licznych narządów człowieka, np. wątroby, zewnątrzwydzielniczej części trzustki, jelita cienkiego, mięśni szkieletowych i gładkich, układu nerwowego, nerek, grasicy, szpiku kostnego, węzłów chłonnych, gruczołu krokowego oraz gruczołu mlekowego [37]. Generalnie Bax jest bardziej rozpowszechniony w zdrowych tkankach niż Bcl-2. Ekspresję *bcl-2* wykryto przede wszystkim w komórkach niezróżnicowanych o dużej vitalności, np. prekursorowych szpiku kostnego, nabłonka przewodu pokarmowego, gruczołu mlekowego i gruczołu krokowego [17].

Odpowiedź ze strony białek z rodziny Bcl-2 na sygnały przeżycia i śmierci odbywa się na poziomie zarówno transkrypcyjnym, jak i potranslacyjnym, w tym przez fosforylację oraz proteolityczne rozszczepienie [1]. Istotnym i mało poznanym dotychczas zjawiskiem jest przemieszczanie się białek z rodziny Bcl-2 z cytoplazmy do błon organelli w odpowiedzi na czynnik apoptotyczny [18]. Uważa się, iż przesunięcie Bax z cytozolu do zewnętrznej błony mitochondrialnej w czasie apoptozy odbywa się w ciągu 30 min i wyprzedza w czasie takie symptomy apoptozy, jak obkurczenie komórki i kondensację chromatyny [72].

Pomimo intensywnych badań molekularny mechanizm regulacji apoptozy przez białka z rodziny Bcl-2 jest wciąż mało poznany. Strukturalne podobieństwo białek rodziny Bcl-2 z tworzącą pory domeną błonową toksyny błonicznej sugeruje, że białka te tworzą kanały błonowe regulowane przez sygnały zależne od napięcia i pH [45]. Bax i Bcl-2 tworzą w sztucznych błonach kanały jonowe o różnej selektywności, przewodności, zależności od napięcia i właściwościach prostowniczych [60]. Bax jest bardziej selektywny dla Cl^- , podczas gdy Bcl-2 dla K^+ . Białka z rodziny Bcl-2 mogą również regulować przepływ H^+ oraz Ca^{2+} przez błony wewnątrzkomórkowe [29]. Poznanie struktury trzeciorzędowej Bcl-xl i Bax potwierdziło możliwość ich wbudowywania w błony wewnątrzkomórkowe i tworzenie kanałów jonowych [3]. Uważa się, iż sygnał apoptotyczny powoduje oligomeryzację Bax (występującego w cytozolu w postaci monomerów) i wbudowywanie w błony organelli oligomerów Bax, których struktura czwartorzędowa pozwala na formowanie kanałów jonowych. Agoniści i antagoniści apoptozy z rodziny Bcl-2 mogą wchodzić w skład większych kompleksów białkowych tworzących pory w błonach mitochondrialnych, przepuszczalne dla cząsteczek $\leq 1,5$ kDa [74]. W procesie apoptozy dochodzi prawdopodobnie do włączania Bax, Bcl-xs lub/i innych agonistów apoptozy w te kompleksy i wzrostu przepuszczalności błon mitochondrialnych dla wody, jonów i związków drobnocząsteczkowych, pęcznienia mitochondriów, pęknięcia zew-



RYSUNEK 3. Współzależność pomiędzy cyklem komórkowym a ekspresją *bax* w komórkach ludzkiego raka sutka linii MCF-7. Poziom Bax w komórkach wyznakowanych poliklonalnymi przeciwciałami anti-Bax i wtórnymi przeciwciałami sprzężonymi z fluoresceiną oceniano metodą laserowej cytometrii skaningowej. Zawartość Bax w komórce wzrasta podczas przechodzenia komórki przez kolejne fazy cyklu osiągając najwyższe wartości w fazie G₂/M. A – komórki apoptotyczne w fazie zniszczenia o bardzo niskim poziomie Bax. Cykl komórkowy oceniano na podstawie zawartości DNA w komórce, wybarwionego 7-aminoaktynowychną D

nętrznej błony mitochondrialnej i uwalniania z przestrzeni międzybłonowej czynników indukujących apoptozę: cytochromu c i AIF (*Apoptosis Inducing Factor*)[12]. AIF jest 50 kDa proteazą, która jest niezbędna do proteolitycznego uaktywnienia kaspazy 3 i do późniejszej aktywacji jądrowych endonukleaz w warunkach *in vitro* [27, 74]. W przeciwieństwie do AIF, cytochrom c, który został zidentyfikowany jako czynnik 2 uaktywniający apoptozę (Apaf 2)[33], wymaga cytozolowych białek

zwanych Apaf 1 i Apaf 3 do proteolitycznej aktywacji kaspazy 3 [68, 78]. Odkryto, że Apaf 1 jest homologiem Ced-4, białka regulującego apoptozę u nicienia *Caenorhabditis elegans*. Vaux [68] zaproponował dyskusyjny model aktywacji kaspazy 3 w obecności dATP, cytochromu c (Apaf-2), Apaf-1 i Apaf-3 (niezdefiniowane 45 kDa białko). Zgodnie z tym modelem cytochrom c i Apaf-3 aktywuje Apaf-1, który w obecności dATP rozszczepia prokaspazę-3, umożliwiając jej przekształcenie w formę proteolitycznie aktywnej. Bcl-2 lub Bcl-xl mogą hamować aktywację kaspazy-3 zarówno przez zapobieganie uwalnianiu AIF i cytochromu c z mitochondriów, jak i przez bezpośrednie wiązanie z Apaf-1 (Ced-4). Jak już wcześniej wspomniano, cechy budowy Bcl-xl dowodzą zarówno możliwości kotwiczenia w błonie, jak i ewentualnego sprzężenia z homologami Ced-4 [3]. Spokrewnieni z Bcl-2 antagoniści apoptozy mogą formować kompleksy zawierające Ced-4 i liczne prokaspazy, jak również hamować aktywację kaspaz [7]. Agoniści programowanej śmierci z rodziny Bcl-2 prawdopodobnie rozszczepiają te kompleksy doprowadzając do aktywacji kaspaz, będących egzekutorami apoptozy, uczestniczącymi w rozszczepianiu białek cytozolowych i jądrowych [20, 69] oraz aktywacji DNaz odpowiedzialnych za apoptotyczną fragmentację DNA [8].

APOPTOZA – PODSTAWOWY PROCES ODPOWIEDZIALNY ZA INWOLUCJĘ GRUCZOŁU MLEKOWEGO

Apoptoza jest odpowiedzialna za spadek liczby komórek w czasie inwolucji gruczołu mlekowego po naturalnym odsadzeniu lub zabranii miotu u gryzoni [53, 54] oraz u przeżuwaczy w okresie zasuszenia [52, 70]. Uważa się także, iż postępujący spadek liczby komórek gruczołowych u przeżuwaczy między szczytem laktacji a zasuszeniem jest wynikiem przesunięcia równowagi między mitozą a apoptozą (rys. 1) na korzyść tej ostatniej [70]. W czasie inwolucji gruczołu mlekowego poza nasiloną apoptozą komórek nabłonka wydzielniczego dochodzi do proteolizy substancji międzykomórkowej [61].

Najlepiej dotychczas poznany proces inwolucji gruczołu mlekowego u myszy został przez niektórych badaczy [35, 11] podzielony na dwie fazy: fazę I – trwającą od 1. do 3. dnia po zakończeniu karmienia, zależną od czynników wydzielonych do mleka [31] oraz fazę II – trwającą od 4. do 10. dnia, zależną od obniżenia poziomu hormonów i czynników wzrostowych [35].

Podczas pierwszej fazy inwolucji zaobserwowano 6 kolejno po sobie następujących zjawisk:

- a) spadek aktywności białek Stat5a i Stat5b będących wtórnymi przekaźnikami receptorów prolaktynowych, cytokinowych i czynników wzrostowych [30],
- b) wzrost poziomu ekspresji genów *c-fos* i *jun-d*, a następnie formowanie się z ich produktów białkowych czynnika transkrypcyjnego AP-1 [10],

- c) zwiększenie się w 1. i 2. dniu zaszuszenia ekspresji cytokin: TGF- β 1, - β 2, - β 3, TNF- α i KGF [22],
 - d) podwyższenie poziomu biosyntezy białek Bax, Bcl-xl i Bcl-xs [14, 30],
 - e) wzrost ekspresji zarówno TIMP (tkankowego inhibitora metaloproteinaz), jak i kaspaz zaangażowanych w degradację białek komórkowych i substancji międzykomórkowej [6],
 - f) zwiększenie liczby komórek apoptotycznych w pęcherzykach wydzielniczych.
- W okresie trwania drugiej fazy inwolucji gruczołu mlekowego myszy zaobserwowano 4 kolejno po sobie następujące procesy:
- a) względny spadek liczby komórek apoptotycznych [14],
 - b) względny wzrost ekspresji metaloproteinaz stromelizyny-1 i gelatynazy A [35, 63] w stosunku do TIMP,
 - c) proteolityczną degradację błony podstawnej nabłonka wydzielniczego oraz pozostałych składników substancji międzykomórkowej [35],
 - d) przebudowę płacikowo-pęcherzykowej struktury gruczołu mlekowego [35, 63].

EKSPRESJA I ROZMIESZCZENIE BAX I BCL-2 W KOMÓRKACH NABŁONKA WYDZIELNICZEGO GRUCZOŁU MLEKOWEGO

Dotychczasowe dane dotyczące zmian ekspresji niektórych genów z rodziny *bcl-2* podczas apoptozy komórek nabłonka wydzielniczego gruczołu mlekowego odnoszą się przede wszystkim do myszy. W okresie spoczynku i podczas laktacji transkrypcja genów *bax* i *bcl-x* zachodzi na dość niskim poziomie (białko p53 nie wydaje się mieć wpływu na ekspresję genów z rodziny *bcl-2*)[30, 31, 38]. Znaczący wzrost liczby komórek apoptotycznych w nabłonku wydzielniczym wykazano dopiero w 3. dniu po zakończeniu laktacji (w okresie trwania I etapu inwolucji); jednocześnie stwierdzono w komórkach nabłonka wydzielniczego podwyższony poziom białka Bax, poprzedzony (w 1.–2. dniu) wzrostem poziomu transkrypcji odpowiedniego mRNA [30]. Należy zwrócić uwagę, że główny antagonistą Bax, białko Bcl-2 wydaje się mieć niewielkie znaczenie podczas apoptozy komórek nabłonkowych myszy [51]; rolę jego pełni białko Bcl-xl, podczas gdy Bcl-xs pełni synergistyczną rolę w stosunku do Bax. Wzrost ekspresji genu *bcl-x* zachodzi w drugim dniu po zakończeniu laktacji: zwiększa się wówczas stosunek stężenia białka Bcl-xs do Bcl-xl (w wyniku zjawiska *alternatywnego splicingu* pre-mRNA dla genu *bcl-x* i powstawania większej ilości krótkiej formy mRNA) [14, 30]. Stosunek Bcl-xs:Bcl-xl zwiększa się wówczas do około 1:7, podczas gdy w okresie ciąży i laktacji osiąga wartość 1:40. Wydaje się, że wzrost stężenia białek

Bax i Bcl-xs w stosunku do Bcl-xl stanowiąc może bezpośredni bodziec stymulujący komórki nabłonka wydzielniczego gruczołu mlekowego myszy do masowej apoptozy [14, 30, 54], występującej pod koniec I fazy inwolucji i na początku fazy II: od 3. do 5. dnia po zakończeniu laktacji.

Dotychczas nie wyjaśniono, co jest bezpośrednim sygnałem zmieniającym równowagę pro- i antyapoptotycznych białek z rodziny Bcl-2 i kierującym komórki nabłonka wydzielniczego na drogę masowej apoptozy w procesie inwolucji gruczołu mlekowego. Banes i wsp. [4] twierdzą, iż długotrwały mechaniczny nacisk mleka (zalegającego pęcherzyki wydzielnicze zasuszanego gruczołu mlekowego) na komórki nabłonkowe może stanowić dla nich silny proapoptotyczny sygnał. Główną jednakże przyczyną inwolucji wydaje się być obniżenie syntezy prolaktyny [70], hormonu wzrostu [65], estradiolu i progesteronu, a także wydzielanie przez nabłonek do mleka zatrzymanego w gruczole licznych czynników, oddziałujących zwrotnie [52, 53]:

a) FIL (*Feedback Inhibitor of Lactation*) – hamującego u kóz konstytutywną syntezę α -kazeiny i laktozy oraz obniżającego liczebność komórek nabłonkowych i poziom ekspresji receptora prolaktynowego [71, 48];

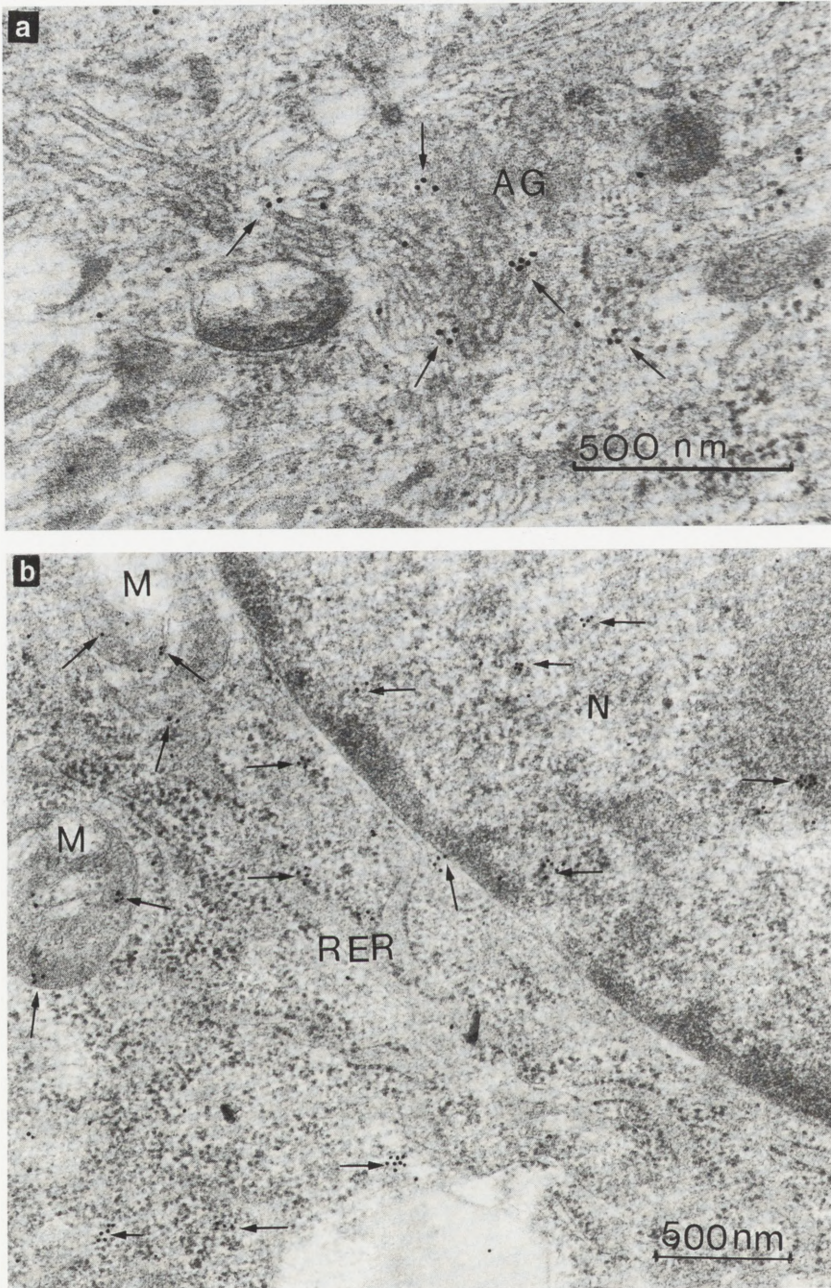
b) TGF- β_1 blokującego *in vitro* wzrost i różnicowanie oraz syntezę kazein w sformowanych komórkach nabłonka wydzielniczego gruczołu mlekowego myszy linii HC11 [39];

c) MDGI – *Mammary Derived Growth Inhibitor* [13], α -laktoalbuminy [64] i mammastatyny [9] – hamujących laktację oraz blokujących rozwój gruczołu.

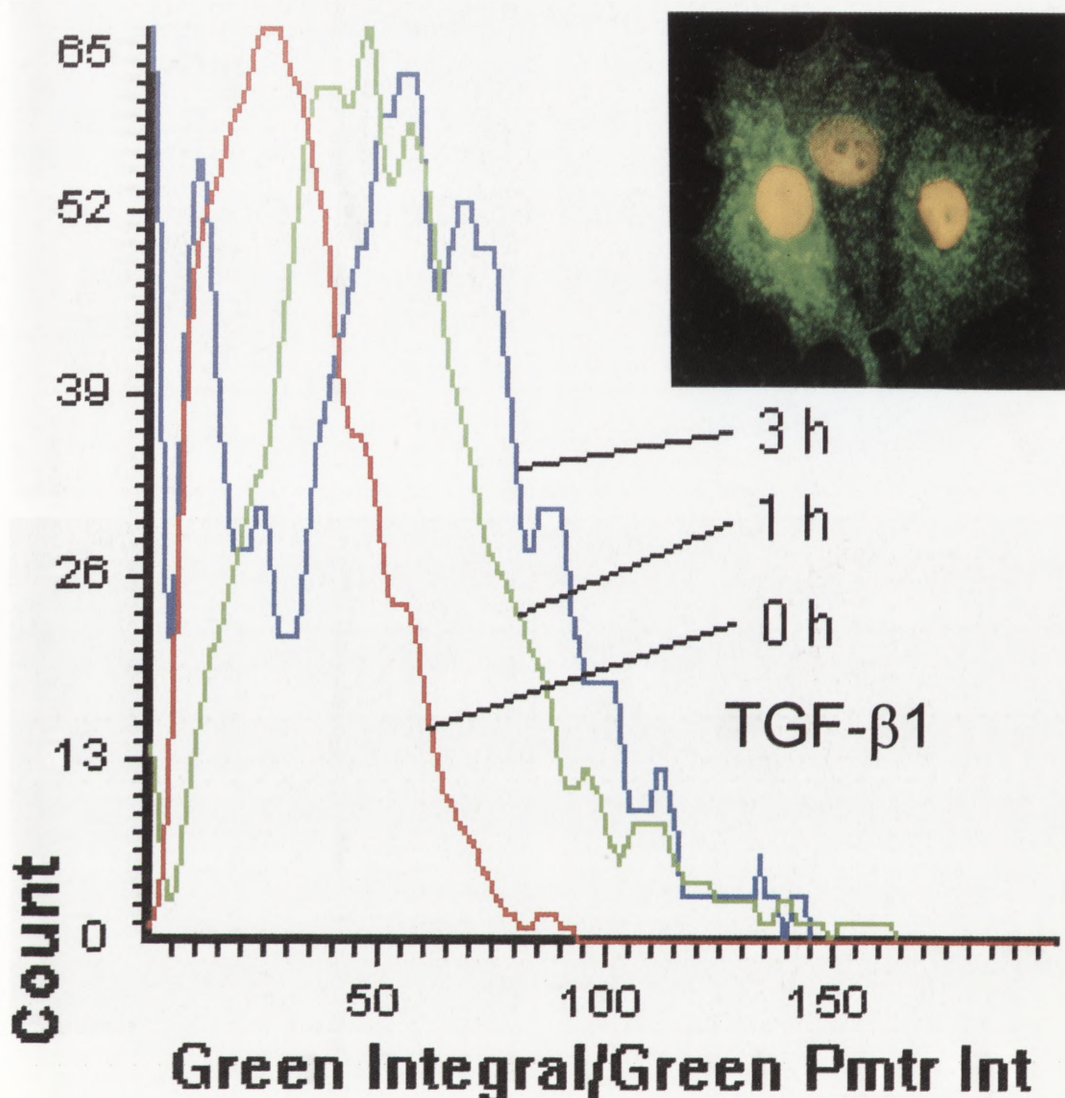
Własne badania [50] wykazały, iż prolaktyna jest nie tylko kluczowym hormonem laktogennym, lecz również antyapoptotycznym. Podanie prolaktyny do kultury komórek nabłonka gruczołu mlekowego myszy linii HC11 hamuje apoptozę wywołaną deficytem EGF. Powyższy efekt prolaktyny związany jest ze wzrostem ekspresji *bcl-2* i obniżeniem ekspresji *bax*. Nie jesteśmy jednak przekonani, czy antyapoptotyczny efekt prolaktyny w komórkach nabłonka wydzielniczego jest bezpośredni, czy też zachodzi pośrednio przez obniżenie ekspresji TGF- β_1 – auto/parakrynnego czynnika hamującego mitozę i apoptotycznego. Wyniki doświadczeń przeprowadzonych na linii HC11 wskazują, że prolaktyna oddziałuje supresyjnie na transkrypcję TGF- β_1 [44]. Efekt ten ma bardzo istotne znaczenie fizjologiczne i może wyjaśniać niski poziom TGF- β_1 mRNA w czasie laktogenezy i galaktopoezy [49], a także wzrost ekspresji TGF- β_1 w końcu laktacji i okresie zasuszania [42]. Z literatury wiadomo, iż TGF- β_1 hamuje auto/parakrynnie syntezę białek mleka oraz odpowiada za hamowanie wzrostu gruczołu mlekowego [36, 57, 62]. Stwierdzono ponadto, że nadekspresja TGF- β_1 u karmiących transgenicznych myszy blokuje różnicowanie się komórek wydzielniczych i syntezę białek mleka [19]. Z drugiej strony zjawisko obniżenia ekspresji TGF- β_1 , β_2 , β_3 podczas laktacji [56] wydaje się być przyczyną odblokowania procesu rozwoju nabłonka pęcherzyków i przewodów mlecznych oraz syntezy β -kazeiny. Własne obserwacje przeprowadzone na komórkach mysiej

białaczki limfatycznej linii L1210 wykazały, że TGF- β_1 poza blokowaniem komórek w fazie G₁ cyklu komórkowego, zwiększa ekspresję *bax* i hamuje ekspresję *bcl-2* prowadząc do apoptozy [41]. Podobny wpływ wywiera TGF- β_1 na komórki nabłonka wydzielniczego gruczołu mlekowego myszy linii HC11, w których stwierdzono wzrost poziomu mRNA Bax, spadek poziomu Bcl-2 oraz indukcję apoptozy [44]. Prolaktyna znacząco modyfikuje ten efekt zmniejszając stymulujący wpływ TGF- β_1 na ekspresję *bax*, znosząc całkowicie jego supresyjny wpływ na ekspresję *bcl-2* oraz ograniczając wysoce istotnie rozmiar apoptozy w badanych kulturach HC11. Na podstawie dotychczasowych danych literaturowych i własnych obserwacji można zaproponować hipotezę, iż wysokie stężenie prolaktyny w krwi docierającej do tkanki gruczołowej w przebiegu laktacji oddziałuje supresyjnie na ekspresję TGF- β_1 i jego receptora. Obniżenie syntezy prolaktyny u schyłku laktacji pozwala na wzrost ekspresji TGF- β_1 i TGF- β_1 -R w komórkach nabłonka wydzielniczego, co z kolei rozpoczyna kaskadę reakcji prowadzących do zahamowania wzrostu komórek, obniżenia syntezy białek mleka i apoptozy. Kluczowy punkt kontrolny w procesie apoptozy indukowanej przez TGF- β_1 stanowią białka z rodziny Bcl-2.

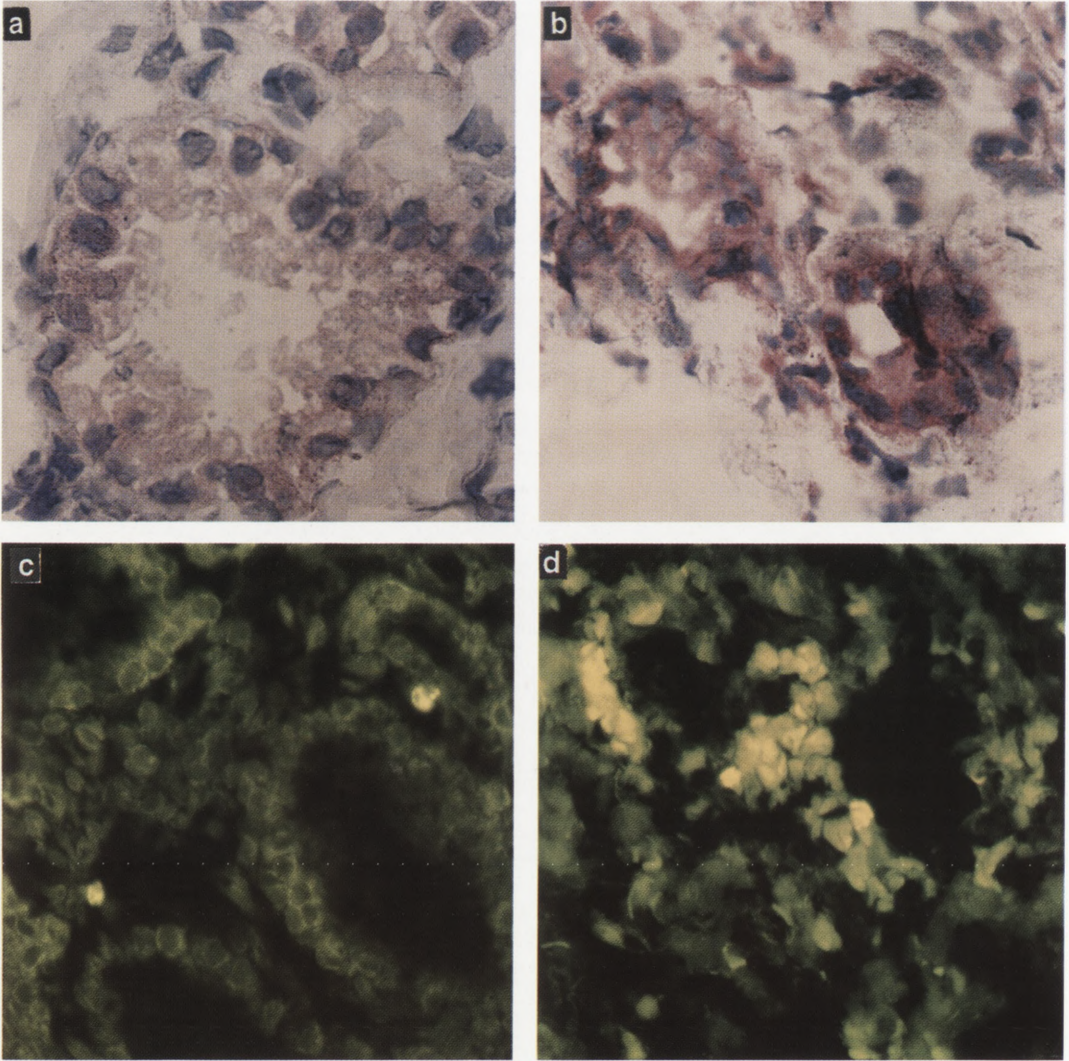
Do najwcześniejszych odpowiedzi komórkowych na sygnał wzbudzany przez TGF- β_1 , poza aktywacją transkrypcji *bax*, należy wewnątrzkomórkowa redystrybucja białka Bax, zachodząca w ciągu minut od podania cytokiny do kultury komórek nabłonka wydzielniczego gruczołu mlekowego. Zastosowanie mikroskopii immunoelektronowej ze znakowaniem Bax przeciwciałami sprzężonymi z koloidalnym złotem pozwoliło na stwierdzenie, iż w nie stymulowanych TGF- β_1 mysich komórkach nabłonka gruczołowego linii HC11 Bax znajduje się przede wszystkim w cytozolu oraz na błonach: komórkowej, siateczki śródplazmatycznej i jądrowej. Już po 15 min od podania TGF- β_1 do hodowli komórek stwierdza się jego przesunięcie do mitochondriów, gdzie lokalizuje się na błonach oraz we wnętrzu organelli. Po 30 min poza wiązaniem Bax z błonami mitochondrialnymi zaobserwowano jego obecność na błonach aparatu Golgiego (rys. 4a), co stanowi nowe, nieopisane dotychczas miejsce wiązania Bax. Po 60 min dochodzi do znaczącego wzrostu koncentracji Bax w cytozolu, na błonach mitochondrialnych, w porach błony jądrowej oraz w heterochromatynie (rys. 4b). Obecność Bax w jądrze komórkowym staje się jeszcze bardziej widoczna po upływie dalszych 60 min. Generalnie obserwacje te są zgodne z poprzednimi, wykonywanymi na innych liniach komórkowych (np. HL-60, Cos-7, L-929, FL5.12) z zastosowaniem innych metod (np. *Western blot*, mikroskopia konfokalna) wykazującymi przesunięcie Bax z cytozolu do organelli podczas stymulacji apoptogennej, wywołanej deksametazonem, promieniowaniem γ czy staurosporyną [18, 72, 75]. Najbardziej interesujący jest wzrost koncentracji Bax w jądrze komórkowym (rys. 4b), jednakże jego losy i fizjologiczne znaczenie w tym miejscu są nieznanne. Już wcześniej stwierdzono obecność białka o masie 31 kDa wykazującego reakcję krzyżową z przeciwciałami anti-Bax w materiale jądrowym pochodzącym ze szczurzej wątroby po uprzedniej ekstrakcji białek ją-



RYSUNEK 4. Lokalizacja Bax określona metodą *post-embedding immuno-gold* w stymulowanych TGF- β_1 mysich komórkach nabłonka gruczołowego linii HC11. Białko Bax wyznakowane zostało 18 nm koloidalnym złotem: a – fragment aparatu Golgiego (AG): cząsteczki złota pojedyncze lub w formie skupisk obecne są na błonach kanałów AG, b – koncentracja cząsteczek złota w postaci skupisk widoczna jest w cytozolu oraz w jądrze komórkowym (N). Wyraźnie znakowane cząsteczkami złota są także błony: mitochondrialne (M), siateczki śródplazmatycznej (RER) oraz błona jądrowa



RYSUNEK 5. Zmiany stosunku Bax obszaru jądrowego (*green integral*) do Bax obszaru cytoplazmatycznego (*green pmtr int.*) w komórkach ludzkiego raka sutka MCF-7 poddanych oddziaływaniu TGF-β₁ (2 ng/ml) w ciągu 3 godzin. Komórki wyznakowano poliklonalnymi przeciwciałami anti-Bax i wtórnymi przeciwciałami sprzężonymi z fluoresceiną oraz 7-aminoaktynowycyną D (barwienie DNA) – zdjęcie w prawym górnym rogu. Intensywność fluorescencji zielonej (Bax) i czerwonej (DNA) oceniano metodą laserowej cytometrii skaningowej

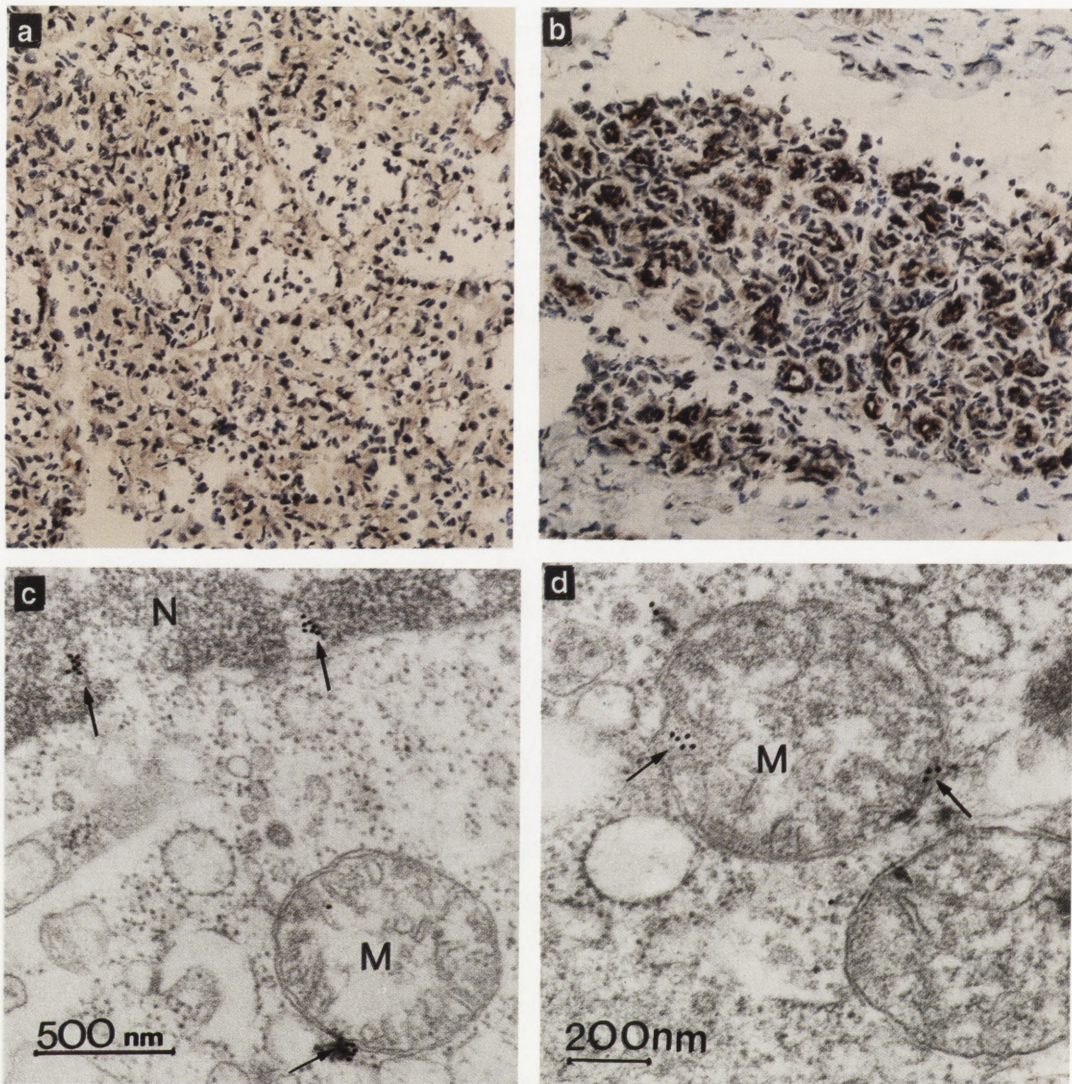


RYSUNEK 6. Porównanie ekspresji *bax* w tkance gruczołu mlekowego kozy we wczesnej laktacji (40. dzień) – a i w okresie zasuszania (270. dzień) – b. Bax widoczny w postaci czerwonych punktów wyznakowany został poliklonalnymi przeciwciałami anti-Bax i biotynylowanymi wtórnymi przeciwciałami sprzężonymi z zasadową fosfatazą. Komórki apoptotyczne wyznakowane metodą TUNEL (żółtozielona fluorescencja DNA) występują pojedynczo w tkance gruczołowej kozy w czasie późnej laktacji (c) i masowo w okresie zasuszania (d) (pow. 600 ×)

drowych, sugerując funkcjonalny związek Bax z chromatyną [26]. Warto zauważyć, iż antagonistą Bax – Bcl-2 również występuje w jądrze komórkowym w powiązaniu z chromosomami w nabłonkowych liniach komórkowych, przy czym jego ekspresja jest zależna od cyklu komórkowego i jest największa w czasie mitozy [34, 46, 58, 59]. Najnowsze badania z zastosowaniem laserowej cytometrii skaningowej potwierdziły wzrost ekspresji *bax* oraz wzrost udziału Bax jądrowego pod wpływem TGF- β_1 w komórkach ludzkiego raka sutka linii MCF-7 (rys. 5). Stwierdzono wzrost anty-Bax fluorescencji w obszarze jądrowym w stosunku do obszaru cytoplazmatycznego wraz z upływem czasu (1 i 3 h) od podania TGF- β_1 do hodowli komórkowej. Warto zauważyć, iż po 3 h pojawia się dodatkowy szczyt komórek o bardzo małej anty-Bax fluorescencji tworzony przez komórki apoptotyczne, znajdujące się w fazie zniszczenia, w której dochodzi do rozpadu białek komórkowych, w tym również Bax i Bcl-2. Już wcześniej zaobserwowaliśmy wysoce istotną ujemną korelację pomiędzy liczbą komórek apoptotycznych a liczbą komórek wykazujących ekspresję *bcl-2* [50, 77], co potwierdza proces degradacji Bcl-2 zachodzący w fazie zniszczenia apoptozy.

Rola Bax i Bcl-2 jako regulatorów apoptozy, a TGF- β_1 jako jej induktora w komórkach nabłonka gruczołu mlekowego została potwierdzona w badaniach *in vivo* na gruczole mlekowym kozy w cyklu laktacyjnym oraz gruczole mlekowym lochy po odsadzeniu prosiąt. W badaniach na modelu kozim [42] stwierdzono, iż wzrostowi ekspresji TGF- β_1 i TGF- β_1 -R u schyłku laktacji (210.–230. dzień) i w okresie zasuszania (260.–280. dzień) towarzyszy podwyższenie poziomu Bax (rys. 6a vs b), CPP-32 (kaspazy 3) oraz zwiększenie liczby komórek apoptotycznych w tkance gruczołowej. Ciekawe, że wzrost ekspresji *bax* i *cyp-32* obserwowany już w końcowej fazie laktacji wyprzedza w czasie wzrost liczby komórek apoptotycznych widoczny wyraźnie dopiero w czasie zasuszania (rys. 6c vs d). Komputerowa analiza obrazu immunohistochemicznego wykazała, iż najwyższy stosunek Bax/Bcl-2 w komórkach gruczołowych występuje w końcowym okresie laktacji, co może być przejawem przygotowania gruczołu mlekowego do inwolucji.

Badania przeprowadzone na modelu gruczołu mlekowego lochy w czasie inwolucji pozwoliły na stwierdzenie, iż ekspresja *bax* nie jest jednakowa w poszczególnych gruczołach u tego samego zwierzęcia i wzrasta wraz ze stopniem zasuszenia gruczołu (rys. 7a vs b). Badania ultrastrukturalne z zastosowaniem mikroskopii immunoelektronowej potwierdziły obecność Bax w cytozolu, na błonach mitochondrialnych, siateczki śródplazmatycznej, w porach błony jądrowej oraz w samym jądrze komórkowym (rys. 7c i d). Stwierdzono także, iż wzrostowi ekspresji *bax* w procesie zasuszania gruczołu towarzyszy wzrost poziomu egzekutora apoptozy – CPP-32. Godnym uwagi jest fakt, iż wzrost liczby widocznych komórek apoptotycznych (wybarwianych metodą TUNEL) jest niewielki w stosunku do ubytku komórek gruczołowych w czasie zasuszania, co wynika prawdopodobnie z natychmiastowej fagocytozy komórek apoptotycznych.



RYSUNEK 7. Ekspresja *bax* w gruczole mlekwym lochy (brązowo zabarwiona tkanka) w zależności od stopnia zasuszenia: a – gruczoł słabo zasuszony, b – gruczoł dobrze zasuszony. Bax został wyznakowany przeciwciałami poliklonalnymi anti-Bax i biotynylowanymi wtórnymi przeciwciałami sprzężonymi z peroksydazą (pow. 200×), c,d – lokalizacja Bax określona metodą *post-embedding immuno-gold* w gruczole mlekwym lochy, białko Bax znakowane 18 nm koloidalnym złotem, c – obecność białka Bax zaznaczona jest strzałkami w porach jądrowych oraz na błonie zewnętrznej mitochondrium, d – skupiska cząsteczek złota wyznaczające lokalizację Bax obecne są na błonie zewnętrznej i wewnętrznej mitochondrium oraz w macierzy mitochondrialnej

Podsumowując, duże zmiany w ekspresji *bax* i *bcl-2* oraz wewnątrzkomórkowym rozmieszczeniu ich produktów, obserwowane na modelach gruczołu mlekowego zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*, wskazują na kluczową rolę białek rodziny Bcl-2 w regulacji apoptozy komórek nabłonka wydzielniczego gruczołu mlekowego, będącej podstawą inwolucji tkanki gruczołowej po zakończeniu laktacji. Czynniki przeżycia, np. prolaktyna i EGF zwiększają ekspresję *bcl-2* i hamują ekspresję *bax*, z kolei czynniki śmierci, np. TGF- β_1 działają odwrotnie zwiększając stosunek Bax/Bcl-2 w komórce. Ciekawą reakcją komórki jest przemieszczanie Bax z obszaru cytoplazmatycznego (obszaru powstawania) do obszaru jądrowego w cyklu komórkowym oraz podczas stymulacji apoptogennej. Fizjologiczne znaczenie tego zjawiska, podobnie jak i cały molekularny mechanizm funkcjonowania białek z rodziny Bcl-2 jest mało poznany i pozostaje wyzwaniem dla dalszych badań.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ALLEN DL, CLUCK MW, AGRAWAL DK. Mechanism controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. *Cell Mol Life Sci* 1998; **54**: 427–445.
- [2] APTE SS, MATTEI MG, OLSEN BR. Mapping of the human *bax* gene to chromosome 19 q13.3-13.4 and isolation of a novel alternatively spliced transcript, Bax delta. *Genomics* 1995; **26**: 592–594.
- [3] ARITOMI M, KUNISHIMA N, INOHARA N, ISHIBASHI Y, OHTA S, MORIKAWA K. Crystal structure of rat Bcl-x1. *J Biol Chem* 1997; **272**: 27886–27892.
- [4] BANES AJ, TSUZAKI M, YAMAMOTO J, FISCHER T, BRIGMAN B, BROWN T, MILLER L. Mechanoreception at the cellular level: the detection, interpretation and diversity of responses to mechanical signals. *Biochem Cell Biol* 1995; **73**: 349–365.
- [5] BAUER JJ, SESTERHENN IA, MOSTOFI FK, MCLEOD DG, SRIVASTAVA S, MOUL JW. Elevated levels of apoptosis regulator proteins p53 and Bcl-2 are independent prognostic biomarkers in surgically treated clinically localized prostate cancer. *J Urol* 1996; **156**: 1511–1516.
- [6] BOUDREAU N, SYMPSON CJ, WERB Z, BISSEL MJ. Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* 1995; **267**: 891–893.
- [7] CHINNAIYAN AM, O'ROURKE K, LANE BR, DIXIT VM. Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science* 1997; **275**: 1122–1126.
- [8] ENARI M, SAKAHIRA H, YOKOYAMA 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.
- [9] ERVIN P, KAMINSKI M, CODY R, WICHA M. Production of mammastatin, a tissue-specific growth inhibitor by normal human mammary epithelial cells. *Science* 1989; **244**: 1585–1587.
- [10] FENG Z, MARTI A, JEHN B, ALTERMATT HJ, CHICAIZA G, JAGGI R. Glucocorticoid and progesterone inhibit involution and programmed cell death in the mouse mammary gland. *J Cell Biol* 1995; **131**: 1095–1103.
- [11] FURTH PA, BAR-PELED U, LI M. Apoptosis and mammary gland involution : reviewing the process. *Apoptosis* 1997; **2**: 19–24.
- [12] GREEN DR AND REED JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; **5381**: 1241–1404.

- [13] GROSSE R, BOEHMER F-D, BINAS B, KURTZ A, SPITZER E, MULLER T, ZSCHIE-SCHE W. Mammary derived growth inhibitor. W: *Cancer treatment and research: genes, oncogenes and hormones*. Springer Verlag, Heidelberg, 1992; 69–94.
- [14] HEERMEIER K, BENEDICT M, LI M, NUNEZ G, FURTH PA, HENNIGHAUSEN L. Bax and Bcl-xs are induced at the onset of mammary gland involution. *Mech Dev* 1996; **56**: 197–207.
- [15] HOCKENBERY DM, NUNEZ G, MILLIMAN C, SCHREIBER RD, KORSMEYER SJ. Bcl-2 protein is topo-graphically restricted in tissue characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 6961–6965.
- [16] HOCKENBERY DM, OLTVAI ZN, YIN X-M, MILLIMAN CL, KORSMEYER SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993; **75**: 241–251.
- [17] HOCKENBERY DM. bcl-2, a novel regulator of cell death. *Bioessays* 1995; **17**(7): 631–638.
- [18] HSU Y-T, WOLTER KG, YOULE RJ. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-x1 during apoptosis. *Biochemistry* 1997; **94**: 3668–3672.
- [19] IHAPPAN C, GEISER AG, KORDONEC, BAGHERI D, HENNINGHANSEN L, ROBERTS AB, SMITH GH AND MERLINO G. Targeting expression of a transforming growth factor- β_1 transgene to the pregnant mammary gland inhibits alveolar development and lactation. *EMBO J* 1993; **12**: 1835–1845.
- [20] KIDD VJ. Proteolytic activities that mediate apoptosis. *Annu Rev Physiol* 1998; **60**: 533–573.
- [21] KNUDSON CM, TUNG KSK, TOURTELLOTTE WG, BROWN GAJ, KORSMEYER SJ. Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* 1995; **270**: 96–99.
- [22] KOJIMA H, FUKUZAWA Y, SATO T, ENARI M, TAMOOKA Y, MATSUZAWA A, OHTA Y, IGUCHI T. Involvement of the TNF- α system and the Fas system in the induction of apoptosis of mouse mammary glands after weaning. *Apoptosis* 1996; **1**: 201–208.
- [23] KRAJEWSKI S, BODRUG S, GASCOYNE R, BEREAN K, KRAJEWSKA M, REED JC. Immunohistochemical analysis of Mcl-1 and Bcl-2 proteins in normal and neoplastic lymph nodes. *Am J Pathol* 1994; **145**(3): 515–25.
- [24] KRAJEWSKI S, KRAJEWSKA M, SHABAIK A, MIYASHITA T, WANG HG, REED JC. Immunohistochemical determination of *in vivo* distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2. *Am J Pathol* 1994; **145**(6): 1323–1336.
- [25] KRAJEWSKI S, KRAJEWSKA M, SHABAIK A, WANG HG, IRIE S, FONG L, REED JC. Immunohistochemical analysis of *in vivo* patterns of Bcl-X expression. *Cancer Res* 1994; **54**(21): 5501–5507.
- [26] KREN BT, TREMBLEY JH, KRAJEWSKI S, BEHRENS TW, REED JC, STEER CJ. Modulation of apoptosis-associated genes *bcl-2*, *bcl-x*, and *bax* during rat liver regeneration. *Cell Growth & Differ* 1996; **7**: 1633–1642.
- [27] KROEMER G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 1997; **3**: 614–619.
- [28] KURSCHNER C, MORGAN JI. Analysis of interaction sites in homo- and heteromeric complexes containing Bcl-2 family members and the cellular prion protein. *Mol Brain Res* 1996; **37**: 249–258.
- [29] LAMM, DUBYAK G, CHEN L, NUNEZ G, MIESFELD RL, DISTELHORST CW. Evidence that Bcl-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca^{2+} fluxes. *Med Sci* 1994; **91**: 6569–6573.
- [30] LI M, HU J, HEERMEIER K, HENNIGHAUSEN L, FURTH PA. Apoptosis and remodelling of mammary gland tissue during involution proceeds through p53 independent pathways. *Cell Growth & Differ* 1996; **7**: 13–20.
- [31] LI M, LIU X, ROBINSON G, BAR-PELED U, WAGNER K-V, YOUNG WS, HENNIGHAUSEN L AND FURTH PA. Mammary-derived signals activate programmed cell death during the first stage of mammary gland involution. *Physiology* 1997; **94**: 3425–3430.

- [32] LIU X, KIM CN, YANG J, JEMMERSON R, WANG X. Induction of apoptotic cell program in cell-free extract: requirement of dATP and cytochrome c. *Cell* 1996a; **86**: 147–157.
- [33] LIU X, ROBINSON GW, HENNIGHAUSEN L. Activation of Stat5a and Stat5b by tyrosine phosphorylation is tightly linked to mammary gland differentiation. *Mol Endocrinol* 1996b; **10**: 1496–1509.
- [34] LU Q-L, HANBY AM, HAJIBAGHERI MAN, GSCHMEISSNER SE, LU P-J, TAYLOR-PAPADIMITRIOU J, KRAJEWSKI S, REED JC, WRIGHT NA. Bcl-2 protein localizes to the chromosomes of mitotic nuclei and is correlated with the cell cycle in cultured epithelial cell lines. *J Cell Sci* 1994; **107**: 363–371.
- [35] LUND LR, ROMER J, DOHY-THOMASSET N, PYKE C, BISSELL MJ, DANO K, WERB Z. Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and dependent pathways. *Development* 1996; **122**: 181–193.
- [36] MAIER R, SCHMID P, COX D, BILBE G AND MCMASTER GK. Localisation of transforming growth factor $-\beta_1$, $-\beta_2$ and $-\beta_3$ gene expression in bovine mammary gland. *Mol Cell Endocrinol* 1991; **82**: 191–198.
- [37] McDONNELL TJ, BEHAM A, SARKISS M, ANDERSEN MM, LO P. Importance of the Bcl-2 family in cell death regulation. *Experientia* 1996; **52**: 1008–1017.
- [38] MERLO GR, CELLA N, HYNES NE. Apoptosis is accompanied by changes in Bcl-2 and Bax expression, induced by loss of attachment, and inhibited by specific extracellular matrix proteins in mammary epithelial cells. *Cell Growth & Differ* 1997; **8**: 251–260.
- [39] MIETH M, BOEHMER FD, BALL R, GRONER B, GROSSE R. Transforming growth factor- β inhibits lactogenic hormone induction of β -casein expression in HC11 mouse mammary epithelial cells. *Growth Factors* 1990; **4(1)**: 9–15.
- [40] MOTYL T. Apoptoza – śmierć warunkująca życie. *Post Biol Kom* 1998; **25**: 313–334.
- [41] MOTYL T, GRZELKOWSKA K, ZIMOWSKA W, SKIERSKI J, WAREŃSKI P, PIOSZAJ T, TRZECIAK L. Expression of bcl-2 and bax in TGF- β_1 -induced apoptosis of L1210 leukemic cells. *Europ J Cell Biol* 1998; **75**: 367–374.
- [42] MOTYL T, WAREŃSKI P, PIOSZAJ T, JANCZEWSKA S, ORZECZOWSKI A, RYNIWICZ Z, SKIERSKI J. Involvement of Bax and Bcl-2 protein in regulation of mammary epithelial cells apoptosis. *BASE* 1998; **2**: 6.
- [43] MOTYL T. Regulation of apoptosis: involvement of Bcl-2-related proteins. *Reprod Nutr Dev* 1999; **39**: 49–59.
- [44] MOTYL T, GAJKOWSKA B, PIOSZAJ T, WAREŃSKI P, SKIERSKI J, ZIMOWSKA W. Expression and subcellular redistribution of Bax during TGF- β_1 -induced programmed cell death of HC11 mouse mammary epithelial cells. *Cell Mol Biol* 1999; w druku.
- [45] MUCHMORE SW, SATTER M, LIANG H, MEADOWS RP, HARLAN JE, YOON HS, NETTESHEIM D, CHANG BS, THOMPSON CB, WANG SL, NG S-CH, FESIK S. X-ray and NMR structure of human Bcl-xl, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 1996; **381**: 335–341.
- [46] NAKANO A, MORIKAWA S, HARADA T. Ubiquitous expression of bcl-2 protein in mitotic nuclei and chromosomes. *Acta Histochem Cytochem* 1998; **6**: 475–483.
- [47] OLTVAI ZN, MILLIMAN CJ, KORSMEYER SJ. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; **74**: 609–619.
- [48] PEAKER M AND WILDE CJ. Feedback control of milk secretion from milk. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1996; **3**: 307–315.
- [49] PLATH A, EINSPANIER R, PETERS F, SINOWATZ F, SCHAMS D. Expression of transforming growth factor alpha and beta-1 messenger RNA in the bovine mammary gland during different stages of development and lactation. *J Endocrinol* 1997; **155**: 501–511.
- [50] PIOSZAJ T, MOTYL T, ORZECZOWSKI A, ZIMOWSKA W, WAREŃSKI P, SKIERSKI J, ZWIERZCHOWSKI L. Antiapoptotic action of prolactin is associated with up-regulation of

- Bcl-2 and down-regulation of Bax in HC11 mouse mammary epithelial cells. *Apoptosis* 1998; **3**: 295–304.
- [51] PULLAN S, WILSON J, METCALFE A, EDWARDS GM, GOBERDHAN N, TILLY J, HICKMAN JA, DIVE C, STREULI CS. Requirement of basement membrane for the suppression of programmed cell death in mammary epithelium. *J Cell Sci* 1996; **109**: 631–642.
- [52] QUARRIE LH, ADDEY CVP, WILDE CJ. Local regulation of mammary apoptosis in the lactating goat. *Biochem Soc Trans* 1994; **22**: 178S.
- [53] QUARRIE LH, ADDEY CVP, WILDE CJ. Apoptosis in lactating and involuting mouse mammary tissue. *Cell and Tissue Res* 1995; **281**: 413–419.
- [54] QUARRIE LH, ADDEY CVP, WILDE CJ. Programmed cell death during mammary tissue involution induced by weaning, litter removal, and milk stasis. *J Cellular Physiol* 1996; **168**: 559–569.
- [55] REED C.J. Mechanisms of Bcl-2 family protein function and dysfunction in health and disease. *Behring Inst Mitt* 1996; **97**: 72–100.
- [56] ROBINSON SD, ROBERTS AB, DANIEL CW. TGF- β suppresses casein synthesis in mouse mammary explants and may play a role in controlling milk levels during pregnancy. *J Cell Biol* 1993; **120**: 245–251.
- [57] ROBINSON SD, SILBERSTEIN GB, ROBERTS AB, DANIEL CW. Regulated expression and growth inhibitory effects of transforming growth factor- β -isoforms in mouse mammary gland development. *Development* 1991; **113**: 867–878.
- [58] SCHANDL CA, LI S, RE GG, FAN W, WILLINGHAM MC. Mitotic chromosomal bcl-2. I. Stable expression throughout the cell cycle and association with isolated chromosomes. *J Histochem Cytochem* 1999; **47**: 139–149.
- [59] SCHANDL CA, LI S, RE GG, FAN W, WILLINGHAM MC. Mitotic chromosomal bcl-2. II. Localization to interphase nuclei. *J Histochem Cytochem* 1999; **47**: 151–158.
- [60] SCHLESINGER PH, GROSS A, YIN X-M, YAMAMOTO K, SAITO M, WAKSMAN G, KORSMEYER SJ. Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic Bax and antiapoptotic Bcl-2. *Proc Natl Acad USA* 1997; **94**: 11357–11362.
- [61] STRANGE R, LI F, STAURER S, BURKHARDT A, FRIIS RR. Apoptotic cell death and tissue remodelling during mouse mammary gland involution. *Development* 1992; **115**: 49–58.
- [62] SUDLOW AW, WILDE CJ, BURGOYNE RD. Transforming growth factor- β_1 inhibits casein secretion from differentiating mammary-gland explants but not from lactating mammary cells. *Biochem J* 1994; **304**: 333–336.
- [63] SYMPSON CJ, TALHOUK RS, BISSELL MJ, WERB Z. The role of metalloproteinases and their inhibitors in regulating mammary epithelial morphology and function *in vivo*. *Perspect Drug Discov Design* 1995; **2**: 401–411.
- [64] THOMPSON MP, FARREL HM, MOHANAM S, LIU S, KIDWELL WR, BANSAL MP, COOK RG, MEDINA D, KOTTS CE, BANO A. Identification of α -lactalbumin as a cell growth inhibitor. *Protoplasma* 1992; **167**: 134–144.
- [65] TRAVERS MT, BARBER MC, TONNER E, QUARRIE LH, WILDE CJ, FLINT DJ. The role of prolactin and growth hormone in the regulation of casein gene expression and mammary cell survival: relationships to milk synthesis and secretion. *Endocrinology* 1996; **137**: 1530–1539.
- [66] TSUJIMOTO Y, COSSMANN J, JAFFE E, CROCE C. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 1985; **228**: 1440–1443.
- [67] TSUJIMOTO Y, CROCE CM. Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci* 1986; **83**: 5214–5218.
- [68] VAUX DL. CED-4 – third horseman of apoptosis. *Cell* 1997; **90**: 389–390.
- [69] VILLA P, KAUFMANN SH, EARNSHAW WC. Caspases and caspase inhibitors. *Trends Biochem Sci* 1997; **22**: 388–393.

- [70] WILDE CJ, ADDEY CVP, FERLING DG. Programmed cell death in bovine mammary tissue during lactation and involution. *Exp Physiol* 1997; **82/5**: 943–953.
- [71] WILDE CJ, CAROLINE VP, PEAKER M. Effects of immunization against an autocrine inhibitor of milk secretion in lactating goats. *J Physiol* 1996; **491**: 465–469.
- [72] WOLTER KG, HSU Y-T, SMITH CL, NECHUSHTAN A, XI X-G, YOULE RJ. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 1997; **139**: 1281–1292.
- [73] YAMAGUCHI A, MAEHARA M, GOI T, KATAYAMA K, HIROSE K, NAKAGAWARA G. Bcl-2 protein expression in breast cancer and its relationship to prognosis. *Int J Oncol* 1997; **10**: 581–584.
- [74] ZAMZAMI N, HIRSCH T, DALLAPORTA B, PETIT PX, KROEMER G. Mitochondrial implication in accidental and programmed cell death: apoptosis and necrosis. *J Bioenerg Biomembr* 1997; **29**: 185–193.
- [75] ZHANG H, HEIM J, MEYHACK B. Redistribution of Bax from cytosol to membranes is induced by apoptotic stimuli and is an early step in the apoptotic pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **251**: 454–459.
- [76] ZIMOWSKA W, MOTYL T, SKIERSKI J, BAŁASIŃSKA B, PŁOSZAJ T, ORZECHOWSKI A, FILIPECKI M. Apoptosis and Bcl-2 protein changes in L1210 leukaemic cells exposed to oxidative stress. *Apoptosis* 1997; **2**: 529–539.
- [77] ZIMOWSKA W, MOTYL T, WAREŃSKI P, SKIERSKI J, PŁOSZAJ T, ORZECHOWSKI A. Apoptosis induced by serum deprivation and apoptogenic factors of cellular origin is dependent on *bcl-2* and *bax* expression in L1210 leukaemic cells. *Polish J Vet Sci* 1999; w druku.
- [78] ZOU H, HENZEL WJ, LIU X, LUTSCHG A, 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: 10.08. 1999 r.

Przyjęto: 30.11. 1999 r.

*Adres autora: Katedra Fizjologii Zwierząt, SGGW,
02-787 Warszawa, ul. Nowoursynowska 166*

EFEKTY CYTOTOKSYCZNE W INFЕКCJI WIRUSEM HIV-1, WYWOŁANE ZA POŚREDNICTWEM GLIKOPROTEINY 120*

GLYCOPROTEIN 120-MEDIATED CYTOPATHIC EFFECTS IN HIV-1 INFECTION

DARIUSZ KMIĘCIAK, WIESŁAW H. TRZECIAK

Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej,
Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego, Poznań

Streszczenie: W pracy przedstawiono sposób infekcji wirusem HIV-1 i rolę glikoproteiny 120 (gp120) w tym procesie. Białko gp120 jest odpowiedzialne za szereg zjawisk wywołanych zakażeniem HIV-1. Przeciwno epitopom gp120 rozwijają się odpowiedzi humoralna i komórkowa. Jednakże, z powodu wysokiego stopnia zmienności tego białka, wywołanego mutacjami, w trakcie trwania infekcji odpowiedzi te stają się nieefektywne. Ponadto, białko gp120, jak wynika z rezultatów licznych badań, powoduje zmniejszenie liczby limfocytów T CD4⁺ krwi obwodowej zarówno zakażonych, jak i niezakażonych. Przyczynia się do tego przez wywołanie i udział w zjawiskach, takich jak: zahamowanie ekspresji receptora CD4 na powierzchni zakażonego limfocyta, tworzenie zespólności, cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał i apoptoza. W połączeniu z innymi czynnikami, procesy te przyczyniają się do rozwinięcia się pełnoobjawowego zespołu nabytego niedoboru odporności (AIDS).
(*Postępy Biologii Komórki* 2000; 27: 53–68)

Słowa kluczowe: HIV-1, gp120, ADCC, syncytia, apoptoza.

Summary: In this article the mode of infection with HIV-1 virus and the role of glycoprotein 120 (gp120) in this process were described. The gp120 is responsible for a number of phenomena resulting from HIV-1 infection. Against the epitopes of gp120 humoral and cellular responses develop. However, because of a high variability of this protein, caused by mutations, in the process of infection these responses become ineffective. Moreover, gp120, as revealed from numerous studies, causes a decrease in the number of peripheral blood CD4⁺ T lymphocytes, both infected and uninfected. This is caused by induction and participation in the processes such as: inhibition of CD4 receptor expression on the surface of infected lymphocyte, formation of syncytia, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and

*Praca finansowana z grantu promotorskiego KBN nr 4 P05A 016 15.

apoptosis. Together with other factors, these processes result in developing of fully symptomatic acquired immunodeficiency syndrome (AIDS).

(*Advances in Cell Biology* 2000; 27: 53–68)

Key words: HIV-1, gp120, ADCC, syncytia, apoptosis.

1. BUDOWA WIRUSA HIV-1

Wirus HIV-1 (*human immunodeficiency virus 1*), wywołujący zespół nabytego niedoboru odporności (*acquired immunodeficiency syndrome* – AIDS), jest zaliczany do rodziny lentiwirusów. Do rodziny tej należą także HIV-2 oraz SIV (*simian immunodeficiency virus*) [25, 28]. Genom HIV-1 stanowią dwie pojedyncze nici RNA, które z dwiema cząsteczkami odwrotnej transkryptazy, integrazą oraz związanymi z RNA białkami p7 i p9 stanowią rdzeń wirusa. Rdzeń wirusa oraz otaczające go warstwy białek p24 i p17 tworzą cylindryczny nukleokapsyd, otoczony błoną pochodzącą z komórki gospodarza, nabytą w trakcie wypączkowania. W błonie tej, oprócz białek komórkowych, znajdują się glikoproteiny wirusowe gp41 i gp120, mające ważne znaczenie w infekcyjności wirusa.

Po wejściu do komórki wirusowe RNA zostaje przepisane na DNA, który następnie przy pomocy enzymu integrazy zostaje wbudowany do jądrowego DNA gospodarza, tworząc tzw. prowirus. Genom wirusa tworzą trzy geny główne, wspólne dla retrowirusów: *gag*, *pol* i *env*. Produkt genu *gag* - p53, jest prekursorem białek kapsydu, p17, p24 oraz p9 i p7. Gen *pol* koduje białka enzymatyczne związane z przekształcaniem wirusowego RNA w DNA i wbudowaniem go do genomu gospodarza: p64 i p51, mające aktywność odwrotnej transkryptazy (p64 wykazuje również aktywność RNazy H); p10 o aktywności proteazy, hydrolizującej pierwotny produkt białkowy genu *gag* oraz p32 o właściwościach integrazy. Produkt białkowy genu *env*, gp160, ulega proteolizie na dwa fragmenty, stanowiące białka otoczki wirusowej: przezbłonowe białko gp41 oraz powierzchniowe białko gp120, związane niekovalencyjnie z gp41.

Genom HIV-1 zawiera także sześć genów, kodujących białka regulacyjne: *vif* (*virion infectivity factor*, p23), *vpr* (*viral protein R*, p15), *tat* (*transactivator*, p15), *rev* (*regulator of expression of virion proteins*, p19), *nef* (*negative regulatory factor*, p27) i *vpu* (*viral protein U*, p16).

Prowirus jest otoczony sekwencjami LTR (*long terminal repeats*). 5'-LTR działa jako promotor, natomiast 3'-LTR wymagany jest do wydajnej poliadenylacji powstających transkryptów. W obrębie promotora zidentyfikowano szereg sekwencji identycznych lub homologicznych do rozpoznawanych przez czynniki transkrypcyjne komórki gospodarza. Rozpoznano m.in. dwa miejsca wiążące dla indukowalnego czynnika transkrypcyjnego NFκB, aktywującego wiele genów biorących udział w

odpowiedzi komórkowej na infekcję czy też uszkodzenie tkanki. Ponadto, w 5'-LTR występują miejsca wiązania czynnika indukowanego poprzez aktywację limfocytów T: NFAT-1, oraz indukowalnego czynnika transkrypcyjnego AP-1. Bezpośrednio przed sekwencją TATA, po stronie 5', znajdują się trzy miejsca wiązania odpowiedzialnego za ekspresję konstytutywną czynnika Sp1. Wydaje się, że właśnie te sekwencje stanowią podstawowy promotor HIV-1, wiążący czynniki transkrypcyjne TFIID i Sp1. Oprócz sekwencji pozytywnie wpływających na transkrypcję prowirusowego DNA, w 5'-LTR występują sekwencje, które są zgodne z sekwencjami wiążącymi czynniki transkrypcyjne USF i LBP. Sądzi się, przynajmniej w odniesieniu do USF, że czynnik ten może oddziaływać jako słaby element regulacji negatywnej [19].

Pomimo występowania w promotorze miejsc rozpoznawanych przez czynniki transkrypcyjne, wiązanie polimerazy RNA jest słabe i poziom ekspresji genów wirusa niski. Transkrypty początkowe, docierające do cytoplazmy, są krótkie (ok. 2 kpz). Kodują one białka regulatorowe: tat, rev i nef. Białka te, szczególnie tat, regulują pozytywnie transkrypcję genów prowirusa, co prowadzi do zwiększenia syntezy wirusowego RNA oraz białek [9]. Gen *tat* podzielony jest na dwa eksony, które łącznie kodują białko zawierające 86 aminokwasów. Jednakże, odcinek o długości 72 aminokwasów, kodowany przez ekson pierwszy, jest wystarczający do uzyskania pełnej aktywności tego białka. Białko tat rozpoznaje krótką sekwencję RNA znajdującą się na końcu 5' powstających transkryptów. Sekwencja ta, zwana TAR (*trans-acting responsive element*), o długości 59 nukleotydów tworzy strukturę typu szypuła-pętla (*stem-loop*). Oddziaływanie białka tat z tą strukturą przyspiesza i zwiększa częstość inicjacji transkrypcji oraz jej stabilność, co zapewnia syntezę transkryptów o pełnej długości.

2. INFEKCJA KOMÓRKI GOSPODARZA

2.1. Receptor CD4 i tropizm HIV-1

Limfocyty T rozpoznają obce antygeny prezentowane w połączeniu z głównym kompleksem zgodności tkankowej (MHC). Przekazywanie sygnału następuje za pomocą receptora głównego – TCR (*T-cell receptor*). Z TCR związane są m.in. cząsteczki: CD2, CD3, CD4 i CD8. Działają one jako cząsteczki pomocnicze, zwiększając interakcję między limfocytym T a komórką prezentującą antygen bądź docelową i uczestniczą w transdukcji sygnału. W zależności od ekspresji receptora pomocniczego wyróżnia się limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺. Limfocyty CD8⁺ rozpoznają antygen w połączeniu z głównym kompleksem zgodności tkankowej klasy pierwszej (MHC-I) i działają głównie jako komórki cytotoksyczne. Natomiast limfocyty CD4⁺

rozpoznają antygen w połączeniu z głównym kompleksem zgodności tkankowej klasy drugiej (MHC-II), funkcjonując przeważnie jako komórki pomocnicze [28].

Receptor CD4, o masie cząsteczkowej 55 kDa, jest glikoproteina należącą do nadrodziny immunoglobulin. Składa się z czterech, przypominających immunoglobuliny, domen zewnątrzkomórkowych, hydrofobowej części przezbłonowej i długiej domeny cytoplazmatycznej, zawierającej trzy reszty seryny, które mogą ulegać fosforylacji. Domena cytoplazmatyczna CD4 może pośredniczyć w transdukcji sygnału w odpowiedzi na antygen, gdyż, jak wykazano, związana jest z kinazą białkową p56^{lck}, która może fosforylować podjednostki receptora CD3 [28].

Do procesu fuzji z komórką gospodarza HIV-1 wykorzystuje przede wszystkim receptor CD4 [10, 27]. Wiele szczepów pierwotnych wirusa zakaża głównie monocyty i makrofagi, chociaż mogą też infekować pierwotne limfocyty T (ale nie stransformowane komórki linii T), dlatego określa się je jako wirusy M-tropowe (monotropowe) [6]. Szczepy wirusa, które preferencyjnie zakażają limfocyty T i dobrze rosną w komórkach linii ustalonych limfocytów T, nazywa się wirusami T-tropowymi [54]. Infekcji dokonują zwykle szczepy M-tropowe, jednakże w przebiegu choroby zostają one zastąpione przez wirusy T-tropowe [54]. Określenie „wirusy M-tropowe” często używane jest zamiennie z określeniem „wirusy nie indukujące tworzenia zespólności” (*non-syncytia inducing*, NSI), ponieważ nie mają one zdolności do tworzenia zespólności *in vitro*, natomiast nazwa: wirusy T-tropowe jest często synonimem wirusów indukujących tworzenie zespólności (*syncytia inducing*, SI) [41]. Tropizm HIV-1 zależy głównie od sekwencji regionu zmiennego V3 gp120 [23].

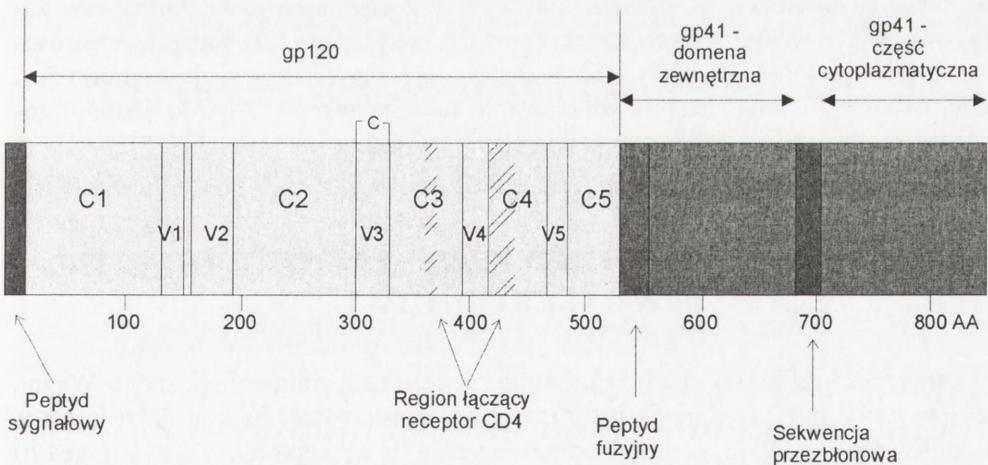
2.2. Koreceptory wirusa HIV-1

Oprócz receptora CD4, do fuzji z błoną komórkową gospodarza i wejścia HIV-1 do komórki, wymagane są tzw. „koreceptory”. Wirusy M-tropowe korzystają z receptora CCR5, dla którego naturalnym ligandem są chemokiny RANTES (*regulated-upon-activation, normal T expressed and secreted*) oraz MIP-1 α i MIP-1 β (*macrophage inflammatory protein*) [7, 11, 12]. Ligandy te hamują infekcję wirusem M-tropowym, ale nie T-tropowym. Wirusy T-tropowe wykorzystują koreceptor CXCR4, inaczej zwany fuzyną lub LESTR (*leukocyte-expressed seven-transmembrane-domain receptor*) [14]. Pozwala on wirusom T-tropowym na wejście do limfocytów CD4 oraz na fuzję i tworzenie syncyotów, natomiast nie mogą z niego skorzystać wirusy M-tropowe [14, 36]. Wykazano, że CXCR4, początkowo zaliczany do receptorów sierocych, wiąże SDF-1 (*stromal cell-derived factor-1*) [3, 36]. Wykryto również podobne strukturalnie koreceptory, jak np. CCR3 (dla którego ligandem jest eotaksyna), wykorzystywany, razem z CCR5, podczas infekcji komórek mikrogleju [20]. Wszystkie one mają charakterystyczną budowę – występuje siedem domen przezbłonowych i sprzężone są z białkiem G [21]. Naturalnymi ligandami dla tych związków są β -chemokiny, związki produkowane i wydzielane przez ko-

mórki układu immunologicznego w odpowiedzi na stan zapalny, tzw. chemoatraktanty, MCP-1 (*monocyte chemotactic protein-1*), MCP-2, MCP-3, eotaksyna (*eotaxin*) oraz wspomniane RANTES, MIP-1 α , i MIP-1 β . β -chemokiny aktywują limfocyty T, bazofile, eozynofile i makrofagi, podczas gdy chemoatraktant limfocytów T, SDF-1, tworzy osobną grupę [42].

2.3. Budowa białka gp120

Spośród białek wirusa HIV-1, gp120 i gp41 wykazują największe zróżnicowanie sekwencji [28]. W gp120 wyróżnić można regiony stałe (C) oraz regiony zmienne (V) (rys. 1). Regiony stałe wykazują identyczność albo prawie całkowitą homologię sekwencji u różnych szczepów wirusa. Należy do nich region C4 odpowiedzialny za wiązanie się z receptorem CD4. Spośród regionów zmiennych, tzn. ulegających częstym mutacjom, które nie wpływają na funkcję gp120, najwięcej uwagi poświęcono regionowi V3. Region V3, czyli trzeci hiperzmienny region gp120, zwany również pętlą V3, tworzą reszty aminokwasowe 307-330. W różnych szczepach wirusa podane liczby mogą się nieznacznie różnić, z powodu przesunięcia i/lub delecji jednego albo kilku aminokwasów. Struktura pętli V3 powstaje wskutek połączenia się mostkiem disiarczkowym wysoce konserwatywnych reszt cysteiny, tworzących pierwszy i ostatni aminokwas regionu V3. Region ten najczęściej podlega mutacjom i różne szczepy wirusa mogą wykazywać nawet 50% różnicy w sekwencji tego obszaru. Jednakże, istnieje krótki odcinek pętli V3 względnie konserwatywny,



RYSUNEK 1. Schemat produktu białkowego genu *env*: – gp160, który ulega proteolizie i tworzą się białka: gp120 oraz gp41; zaznaczono regiony stałe (C) oraz zmienne (V) gp120, miejsce wiązania receptora CD4 oraz mostek disiarczkowy -C-C- pętli V3; innych mostków disiarczkowych nie pokazano; w domenie zewnętrznej gp41 wyróżniono peptyd odpowiadający za fuzję błony HIV-1 z błoną komórkową, AA – reszty aminokwasowe

tw. korona, którą tworzą reszty aminokwasowe od 316 (lub 317) do 324. W jej obrębie, stosunkowo najbardziej konserwatywne są cztery reszty, tworzące sekwencję gly-pro-gly-arg (GPGR) [28].

2.4. Rola gp120 w infekcji wirusem

Wejście HIV-1 do komórki gospodarza wymaga oddziaływania regionu C4 gp120 z receptorem CD4 [10, 27]. Przymuszczalnie powoduje to wyeksponowanie pętli V3, która wchodzi w interakcję z odpowiednim koreceptorem [48, 50]. Jak wspomniano poprzednio, za tropizm wirusa odpowiada głównie sekwencja aminokwasowa pętli V3 [23]. Wykazano, że przeciwciała anti-V3 hamowały wiązanie gp120 z koreceptorem CCR5, nie mając wpływu na wiązanie gp120 z receptorem CD4 [48]. Związanie gp120 do obu receptorów wywołuje zmiany konformacyjne, które prowadzą do wyeksponowania gp41, a zwłaszcza jej regionu N-końcowego, bogatego w reszty aminokwasów hydrofobowych i odpowiedzialnego za fuzję z błoną komórki gospodarza [16]. Mutacje punktowe w obrębie tego obszaru, polegające na zamianach aminokwasów hydrofobowych na polarne, nie mają wpływu na ekspresję gp160 i jego modyfikacje potranslacyjne, ale znacznie obniżają zdolność fuzji z komórkami CD4⁺. Po oddysocjowaniu gp120 od gp41 następuje fuzja błony wirusa z błoną cytoplazmatyczną i infekcja komórki [5, 35, 49]. Wyniki doświadczeń prowadzonych w hodowlach limfocytów T z krwi obwodowej ujawniły, że zakażeniu ulegały nie tylko komórki dzielące się, ale także spoczynkowe [47]. W tych ostatnich następowało przepisanie informacji na DNA, którego obecność wykrywano nawet po dwóch tygodniach hodowli. Jednakże, w przeciwieństwie do limfocytów zaktwowanych, w limfocytach spoczynkowych nie następowała integracja wirusowego DNA z DNA komórki. Tak więc, wydaje się, że aktywacja komórki jest konieczna po to, aby nastąpiło wbudowanie się wirusowego DNA do genomu gospodarza, ekspresja i produkcja infekcyjnych wirusów potomnych [47].

3. ZJAWISKA CYTOTOKSYCZNE, ZALEŻNE OD gp120, W INFEKCJI HIV-1

Infekcja wirusem HIV-1 powoduje pobudzenie układu immunologicznego. Ważną rolę w procesie tym odgrywa gp120. Oprócz podstawowej funkcji, jaką jest pośredniczenie w infekcji wirusem poprzez łączenie się z receptorem CD4 [10], gp120 może wywołać odpowiedź immunologiczną typu humoralnego [26] oraz typu komórkowego [38]. W obu tych typach odpowiedzi ważną rolę odgrywają regiony zmienne gp120, a szczególnie pętla V3 [52, 53]. Pętla V3, wraz z V2, tworzy najbardziej wyeksponowane fragmenty gp120 [34]. Przeciwno epitopom znajdu-

jącym się w regionie V3 wytwarza się duża liczba przeciwciał, a także pojawia się odpowiedź komórkowa. Jednakże z powodu wysokiego tempa mutacji w tym regionie, wytworzone przeciwciała oraz indukowane cytotoksyczne limfocyty CD8 stają się po pewnym czasie nieefektywne, co przyczynia się do postępu choroby, a w końcu do rozwinięcia się pełnoobjawowego zespołu nabytego niedoboru odporności (AIDS).

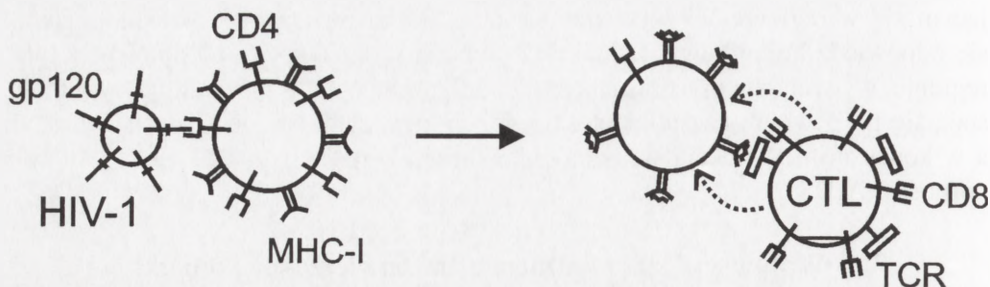
3.1. Wpływ gp120, związanego na powierzchni komórki, na efekt cytotoksyczny

3.1.1. Bezpośredni efekt cytotoksyczny

Cechą charakterystyczną infekcji wirusem HIV-1 jest postępujące zmniejszenie się liczby komórek CD4⁺ krwi obwodowej. Przyjęto, że osoby zakażone wirusem są uznane za chorych na AIDS, kiedy liczba komórek CD4⁺ w ich krwi spada poniżej 200/μl. Za proces ten odpowiedzialne jest szereg zjawisk, w których dużą rolę odgrywa gp120. Wśród nich wymienić należy bezpośredni efekt cytotoksyczny wirusa. Kiedy wirus wychodzi ze stanu latencji i rozpoczyna się produkcja oraz składanie wirionów potomnych, te uwalniane na zewnątrz przez wypączkowanie powodują śmierć komórki. Bezpośredni efekt cytotoksyczny związany jest także z tym, że w siateczce śródplazmatycznej zakażonej komórki dochodzi do interakcji pomiędzy nowo zsyntetyzowanymi cząsteczkami gp160 i receptora CD4 [8]. Obniża to liczbę cząsteczek receptora CD4 na powierzchni komórki, co upośledza jej funkcję [10, 27]. Komórki linii ustalonych T (np. MOLT4), które po zakażeniu HIV-1 i związanych z tym początkowych efektach cytotoksycznych rozwijają stabilne, namnażające się i produkujące wirusa klony, wykazują znaczne obniżenie ilości cząsteczek receptora CD4 na swojej powierzchni [22]. Wydaje się zatem, że na poziomie pojedynczej komórki, za efekt cytotoksyczny odpowiedzialne są kompleksy gp160-CD4, które ulegają nagromadzeniu w siateczce śródplazmatycznej.

3.1.2. Odpowiedź immunologiczna przeciwko komórkom zakażonym HIV-1

Inny mechanizm, odpowiedzialny za obniżenie się liczby zakażonych komórek CD4⁺, związany jest z odpowiedzią immunologiczną organizmu. Duża część przeciwciał neutralizujących, których produkcja wzbudzona jest po infekcji organizmu, skierowana jest przeciwko epitopom gp120, zwłaszcza w obrębie pętli V3 [53], natomiast wydaje się, że tylko niewielka część przeciwciał anti-gp120 neutralizuje miejsce wiążące CD4 [26]. Przeciwciała anti-gp120 wiążą się do epitopów tego białka i wraz z układem dopełniacza wywołują lizę komórek zakażonych. W odpowiedzi komórkowej, limfocyty cytotoksyczne CD8⁺ rozpoznają antygeny wirusowe, w tym pochodzące z gp120, w formie peptydów złożonych z dziewięciu do dziesięciu reszt aminokwasowych, związanych z cząsteczkami białek MHC-I

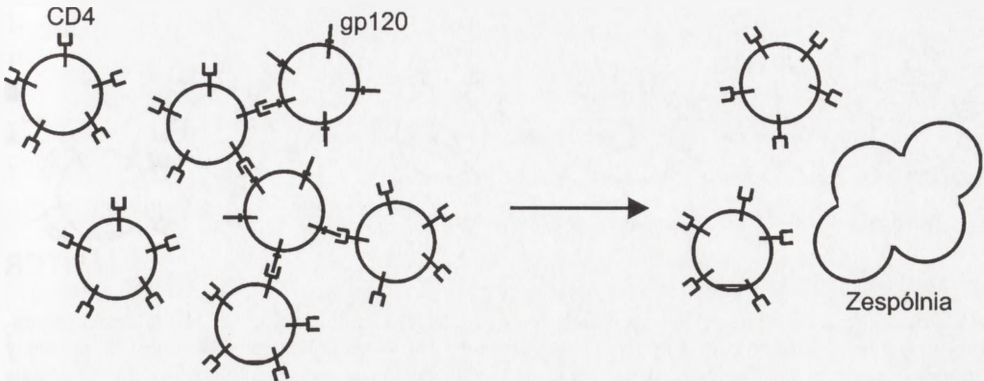


RYSUNEK 2. Wzbudzenie odpowiedzi komórkowej anti-gp120 w infekcji HIV-1: kontakt między gp120 na powierzchni HIV-1 a receptorem CD4 komórki prowadzi do fuzji ich błon i infekcji; w komórce nowo wyprodukowane białka wirusowe, w tym gp120, mogą ulec fragmentacji i wystawieniu na powierzchnię w kontekście głównego układu zgodności tkankowej klasy I (MHC-I); prowadzi to do uaktywnienia specyficznych limfocytów cytotoksycznych CD8⁺, które przez swój receptor (TCR) rozpoznają obce antygeny związane z MHC-I i zabijają zakażoną komórkę

i prezentowanych na powierzchni zakażonej komórki (rys. 2). Rozpoznanie antygeny wirusowego powoduje, że limfocyty cytotoksyczne zabijają komórkę. W przypadku HIV-1 paradoks polega na tym, że układ immunologiczny eliminuje swoją ważną składową, tj. komórki CD4⁺. Zarówno odpowiedź humoralna, jak i komórkowa stają się jednak nieefektywne z powodu wyłonienia się mutantów HIV-1 opornych na te dwa typy odpowiedzi.

3.1.3. Tworzenie zespólni

Kolejny proces, który może być odpowiedzialny za obniżenie się liczby limfocytów CD4⁺ zarówno zakażonych HIV-1, jak i niezakażonych, to tworzenie zespólni. W badaniach *in vitro* zaobserwowano, że po dodaniu do komórek zakażonych HIV-1 niezainfekowanych komórek CD4⁺ następowało zlewianie się obu rodzajów komórek, co prowadziło do tworzenia komórek olbrzymich i wreszcie krótko żyjących zespólni (rys. 3) [44]. Zjawisko to wywołane jest interakcją między gp120 występującą na powierzchni komórek zakażonych a receptorem CD4 głównie komórek niezakażonych, gdyż komórki zakażone mają zmniejszoną liczbę cząsteczek tego receptora [22]. Mechanizm reakcji jest przypuszczalnie taki sam albo prawie identyczny jak podczas fuzji wirusa z błoną komórki gospodarza, co wskazuje, że obok regionu C4 uczestniczy w tym również pętla V3. Jak wykazano, sekwencja aminokwasowa gp120 ma wpływ na to, czy dany szczep HIV-1 indukuje zlewianie się komórek, czy też nie [46]. Stopień ubytku limfocytów CD4⁺ w wyniku tworzenia zespólni *in vivo* jest jednak niejasny, ponieważ badania nad ich tworzeniem przeprowadzono z reguły *in vitro*. Niektóre badania wskazują jednak, że w miarę postępu choroby pojawia się korelacja między gwałtownym spadkiem liczby limfocytów CD4⁺ a pojawieniem się izolatów wirusa zdolnych do tworzenia zespólni [4]. Jak



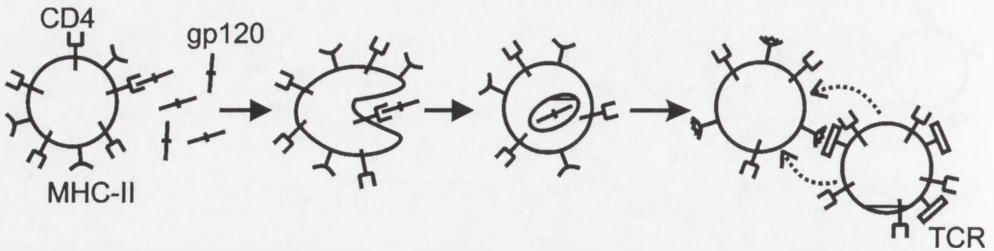
RYSUNEK 3. Schemat tworzenia zespólni: kontakt komórek zainfekowanych HIV-1 o ekspresji powierzchniowej gp120 z komórkami $CD4^+$ niezainfekowanymi prowadzi przez połączenie się gp120 z CD4 do złączenia się obu tych rodzajów komórek i powstania krótko żyjących zespólni

wynika z prac Laurent-Crawford i wsp. [30, 31], jednym z mechanizmów śmierci komórek po fuzji i utworzeniu zespólni może być apoptoza.

3.2. Udział w efekcie cytotoksycznym gp120 uwolnionej z powierzchni komórki

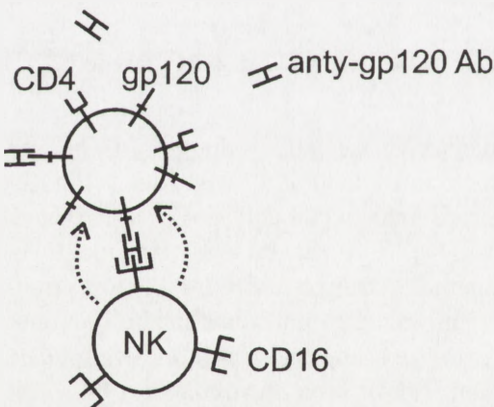
3.2.1. Liza niezainfekowanych komórek $CD4^+$ przez gp120-specyficzne, cytotoksyczne limfocyty $CD4^+$

Kolejne zjawiska, prowadzące do zmniejszenia się puli limfocytów $CD4^+$, są związane z oderwaniem się gp120 z powierzchni HIV-1 i/lub zakażonej komórki [39]. Jak wspomniano, jedynie niewielka część przeciwciał anti-gp120 skierowana jest przeciwko miejscu wiążącemu receptor CD4 [26, 40], zatem wydaje się możliwe, iż krążąca w osoczu i limfie gp120 oddziałuje z receptorami CD4 komórek niezakażonych. Mogłoby to indukować następne procesy obniżające liczbę komórek $CD4^+$ w zakażonym organizmie, a mianowicie: cytotoksyczność komórkową zależną od przeciwciał (ADCC – *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) [32, 37], apoptozę [2] i gp120-zależną lizę niezakażonych komórek $CD4^+$ przez gp120-specyficzne, cytotoksyczne limfocyty $CD4^+$, jako komórki efektorowe (*gp120-dependent lysis of noninfected $CD4^+$ T cells by gp120-specific $CD4^+$ cytolytic T lymphocytes*) [43, 45]. W tym ostatnim przypadku, zaktywowane komórki, prowadzące ekspresję MHC-II i mające na swojej powierzchni receptory CD4, mogą wiązać gp120 pochodzące z osocza, następnie internalizować powstały kompleks, trawić i po związaniu z MHC-II eksponować na zewnątrz peptydy stanowiące fragment gp120, czyniąc się tym samym podatnymi na atak gp120-specyficznych, cytotoksycznych limfocytów $CD4^+$ (rys. 4). Aktywność tych limfocytów wykryto u osób zakażonych.



RYSUNEK 4. Aktywność HIV-1-specyficznych cytotoksycznych limfocytów $CD4^+$: komórki prezentujące antygen, mające na swojej powierzchni receptor $CD4$ wiążą krążące w osoczu $gp120$; powstały kompleks podlega internalizacji, a następnie trawieniu, po czym powstałe fragmenty $gp120$ zostają wystawione na zewnątrz w kontekście głównego kompleksu zgodności tkankowej klasy II (MHC-II); po rozpoznaniu przez receptor (TCR) HIV-1-specyficznych cytotoksycznych limfocytów $CD4^+$, komórka prezentująca antygen ulega lizie

Nie wiadomo jednak, jaki jest udział tego procesu w ogólnym zmniejszeniu ilości komórek $CD4^+$ w trakcie infekcji, albowiem większość aktywności cytotoksycznej anty- $gp160$, zależnej od MHC związana jest z limfocytami T, $CD8^+$, zależnymi od MHC-I [24].



RYSUNEK 5. Zjawisko cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał (ADCC) w infekcji HIV-1: w procesie ADCC bierze udział $gp120$ wystawione na powierzchni zakażonej komórki przeciwciała anty- $gp120$ (anty- $gp120$ Ab) oraz komórki mające na swojej powierzchni receptor $CD16$ (np. NK); przeciwciała anty- $gp120$ wiążą się końcem F_c do $gp120$, a końcem F_c do $CD16$ sieciując w ten sposób oba rodzaje komórek; następnie dochodzi do lizy komórki zakażonej; przypuszczalnie w procesie ADCC lizie ulegają też komórki $CD4^+$ niezakażone przez przyłączenie do receptorów $CD4$ wolnego $gp120$ z osocza

3.2.2. Cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał

W cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* – ADCC) komórkami efektorowymi mogą być: makrofagi, monocyty, niektóre limfocyty T, komórki NK (*natural killers*), neutrofile, eozynofile, a także trombocyty, mające receptory $Fc\gamma$, zwłaszcza typ $Fc\gamma IIIA$ (inaczej $CD16$) [29]. Receptor ten występuje na powierzchni 80–90% komórek NK i wykazuje duże powinowactwo do fragmentów F_c przeciwciał IgG u człowieka, w tym przypadku anty- $gp120$, które stanowią większość przeciwciał u zakażonych osobników [13]. Związanie przez przeciwciała anty- $gp120$, połączone z tym białkiem, z jednej strony komórek $CD4^+$, a z drugiej

komórek CD16⁺, prowadzi do lizy komórek CD4⁺ (rys. 5). Wydaje się prawdopodobne, że na lizę podatne są nie tylko komórki CD4⁺ zainfekowane HIV-1, ale także i te niezainfekowane zarówno zaktywowane, jak i spoczynkowe, które przez przyłączenie wolnej gp120, a następnie przeciwciał anti-gp120, stają się celem dla komórek CD16⁺.

3.2.3. Apoptoza

Krążąca w osoczu gp120 przez związanie się z receptorem CD4 niezainfekowanych komórek T, może nie tylko powodować zaburzenia w ich interakcji z komórkami prezentującymi antygeny w kontekście MHC-II, ale również ich apoptozę. Rola apoptozy w obniżeniu się liczby limfocytów CD4⁺ u pacjentów HIV-1⁺ jest jeszcze niejasna. Szereg doniesień z badań *in vitro* wskazuje jednak, że proces ten może odgrywać ważną rolę w ubytku komórek CD4⁺. Kiedy po związaniu wolnej gp120, a następnie przeciwciał anti-gp120, limfocyty CD4⁺ zostały poddane aktywacji przez receptor komórkowy TCR (*T cell receptor* – TCR), okazało się, że stanowiło to sygnał do programowanej śmierci komórki [2]. Istotną rolę odgrywa tutaj przypuszczalnie odwrócenie sekwencji zdarzeń, ponieważ w warunkach prawidłowych aktywacja limfocyta T, CD4⁺ polega na rozpoznaniu antygeny przez TCR, a następnie zachodzi transdukcja sygnału aktywującego do wnętrza komórki, w czym uczestniczy receptor CD4. W przypadku opisanym powyżej [2], najpierw nastąpiło zaktywowanie drugiego sygnału przez CD4, a potem dopiero aktywacja właściwa przez TCR, co spowodowało apoptozę. W ten sposób apoptozie ulegałyby głównie pula zaktywowanych komórek T, CD4⁺. Warto dodać, że niektóre doniesienia, oparte na eksperymentach wykonanych w podobny sposób, nie potwierdziły występowania apoptozy w odwrotnie stymulowanych limfocytach CD4⁺ [33]. Z innej pracy wynika, że apoptozie ulegają najczęściej komórki CD4⁺ niezakażone, natomiast zakażone jej nie podlegają [15]. O tym, że proces apoptozy następuje po związaniu się gp120 z receptorem CD4, może świadczyć fakt, iż efekt blokujący miało dodanie przeciwciała OKT4A, skierowanego przeciwko regionowi CD4 wiążącemu gp120 [31]. Groux i wsp. [18] donieśli, że wstrzymanie proliferacji komórek oraz apoptoza nastąpiły, gdy do limfocytów CD4⁺, pochodzących od pacjentów seropozytywnych pod względem HIV-1 i nie wykazujących objawów choroby, dodano mitogen PWM (*pokeweed mitogen*) czy też superantygen SEB (*staphylococcal enterotoxin B*), ale nie, gdy stymulantami były superantygen PHA (*phytohemagglutinin*) i przeciwciała anti-CD3. Zatrzymania proliferacji i apoptozy po podaniu PWM i SEB nie zaobserwowano w komórkach pobranych od zdrowych pacjentów. Oprócz tego, dodanie do układu z SEB bądź PWM przeciwciała anti-CD28, blokującego białko powierzchniowe CD28 komórek T, powodowało przywrócenie właściwości proliferacyjnych komórek CD4⁺ pobranych od dawców HIV-1⁺ i wstrzymanie procesu apoptozy. Samo przeciwciała anti-CD28 nie pobudzało podziałów tych komórek. Zatem, w procesie apoptozy może mieć znaczenie sygnał

przekazywany przez CD28. W innym eksperymencie wykazano, że nie tylko SEB i inne superantygenu zależne od MHC-II wywoływały apoptozę limfocytów CD4⁺ pochodzących od bezobjawowych dawców HIV-1⁺, ale induktorem apoptozy był również jonofor wapniowy, jonomycyna (*ionomycin*), który działał nie tylko na limfocyty CD4⁺, ale także CD8⁺ [17]. Natomiast, jak donieśli Wu i wsp. [51], apoptozę komórek CD4⁺ i CD8⁺ zdrowych dawców po stymulacji poliklonalnej (np. mysim przeciwciałem anti-CD3 lub anti-CD4) i zsięgowaniu za pomocą GAMIgG (*goat anti-mouse IgG*) lub inkubacji z mieszaniną: gp120+mysie przeciwciało anti-gp120+GAMIgG wywoływał też kontakt z utrwalonymi autologicznymi bądź allogenicznymi monocytami stymulowanymi wcześniej estrem forbolu – PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*), co mogło być spowodowane wydzielaniem przez monocyty rozpuszczalnych czynników indukujących proces apoptozy. Aktywacja komórek T była niezbędna, albowiem bez tego utrwalone monocyty, traktowane PMA, nie wywoływały procesu apoptozy. Wyniki te doprowadziły do hipotezy, że w trakcie infekcji wirusem HIV-1, kiedy to, zwłaszcza w fazie bezobjawowej, przeważają szczepy M-tropowe, zakażają one monocyty i makrofagi, aktywując je bezpośrednio przez sam akt infekcji albo pośrednio przez indukcję produkcji i wydzielania czynników aktywujących, a to z kolei wzbudzałoby proces apoptozy w limfocytach CD4⁺ ze związanym gp120. Zauważono, że jednym z takich czynników jest ligand Fas wydzielany przez makrofagi w zwiększonej ilości po infekcji HIV-1. Ligand ten, w połączeniu z powierzchniowym białkiem Fas (CD95), indukuje proces apoptozy limfocytów [1].

4. UWAGI KOŃCOWE

Zarówno udział w infekcji wirusem HIV-1, jak i pośredniczenie w efektach cytotoksycznych, a także wywoływanie silnej odpowiedzi immunologicznej, powodują, że białko gp120 pozostaje w sferze intensywnych badań mających na celu zrozumienie mechanizmów infekcji. Rola gp120 oraz gp41 w procesie wejścia wirusa do komórki została ostatnio dość dobrze poznana. Inaczej sprawa ma się ze zjawiskami cytotoksycznymi, opisanymi w artykule. Część z nich, np. tworzenie syncytiów, obserwuje się przeważnie w eksperymentach *in vitro*, mało jest danych na temat znaczenia tych zjawisk *in vivo*, podczas infekcji. Zdania są również podzielone co do interpretacji zjawisk, w których bierze udział gp120. Część badaczy uważa, że procesy, takie jak ADCC, mogą być korzystne dla organizmu, gdyż prowadzą do lizy zakażonych komórek, jednakże istnieje możliwość, że w procesie tym zmniejszy się również, przez fakt przyłączenia wolnej gp120 z osocza, pula komórek CD4⁺ niezakażonych. Ponadto, ukazały się doniesienia w różny sposób określające rolę gp120 w procesie apoptozy. Zatem bardzo ważne jest dokładne

wyjaśnienie roli tego białka w efektach cytotoksycznych spowodowanych infekcją wirusem HIV-1, tym bardziej że gp120, w różnej postaci, próbuje się wykorzystać do szczepienia przeciwko HIV-1 oraz w terapii AIDS. Niektóre problemy, które wiążą się z próbami immunizacji za pomocą gp120, zostaną opisane w następnym artykule.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BADLEY AD, McELHINNY JA, LEIBSON PJ, LYNCH DH, ALDERSON MR, PAYA CV. Upregulation of Fas ligand expression by human immunodeficiency virus in human macrophages mediates apoptosis of uninfected T lymphocytes. *J Virol* 1996; **70**: 199–206.
- [2] BANDA NK, BERNIER J, KURAHARA DK, KURRLE R, HAIGWOOD N, SEKALY R-P, FINKEL TH. Crosslinking CD4 by human immunodeficiency virus gp120 primes T cells for activation-induced apoptosis. *J Exp Med* 1992; **176**: 1099–1106.
- [3] BLEUL CC, FARZAN M, CHOE H, PAROLIN C, CLARK-LEWIS I, SODROSKI J, SPRINGER TA. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 1996; **382**: 829–832.
- [4] BOZZETTE SA, McCUTCHAN JA, SPECTOR SA, WRIGHT B, RICHMAN DD. A cross-sectional comparison of persons with syncytium- and non-syncytium-inducing human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1993; **168**: 1374–1379.
- [5] CHAN DC, FASS D, BERGER JM, KIM PS. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 1997; **89**: 263–273.
- [6] CHENG-MAYER C, SETO D, TATENO M, LEVY JA. Biologic features of HIV-1 that correlate with virulence in the host. *Science* 1988; **240**: 80–82.
- [7] COCCHI F, DeVICO AL, GARZINO-DEMO A, ARYA SK, GALLO RC, LUSSO P. Identification of RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8⁺ cells. *Science* 1995; **270**: 1811–1815.
- [8] CRISE B, BUONOCORE L, ROSE JK. CD4 is retained in the endoplasmic reticulum by the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein precursor. *J Virol* 1990; **64**: 5585–5593.
- [9] CULLEN BR. Regulation of HIV-1 gene expression. *FASEB J* 1991; **5**: 2361–2368.
- [10] DALGLEISH AG, BEVERLY PCL, CLAPHAM PR, CRAWFORD DH, GREAVES MF, WEISS RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 1984; **312**: 763–767.
- [11] DENG H, LIU R, ELLMEIER W, CHOE S, UNUTMAZ D, BURKHART M, DI MARZIO P, MARMON S, SUTTON RE, HILL CM, DAVIS CB, PEIPER SC, SHALL TJ, LITTMAN DR, LANDAU NR. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996; **381**: 661–666.
- [12] DRAGIC T, LITWIN V, ALLAWAY GP, MARTIN SR, HUANG Y, NAGASHIMA KA, CAYANAN C, MADDON PJ, KOUP RA, MOORE JP, PAXTON WA. HIV-1 entry into CD4⁺ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 1996; **381**: 667–673.
- [13] EVANS LA, THOMSON-HONNEBIER G, STEIMER K, PAOLETTI E, PERKUS ME, HOLLANDER H, LEVY JA. Antibody-dependent cellular cytotoxicity is directed against both the gp120 and gp41 envelope proteins of HIV. *AIDS* 1989; **3**: 273–276.
- [14] FENG Y, BRODER CC, KENNEDY PE, BERGER EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996; **272**: 872–877.

- [15] FINKEL TH, TUDOR-WILLIAMS G, BANDA NK, COTTON MF, CUIRIEL T, MONKS C, BABA TW, RUPRECHT RM, KUPFER A. Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. *Nature Med* 1995; **1**: 129–134.
- [16] FREED EO, MYERS DJ, RISSER R. Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 4650–4654.
- [17] GOUGEON M-L, GARCIA S, HEENEY J, TSCHOPP R, LECOEUR H, GUETARD D, RAME V, DAUGUET C, MONTAGNIER L. Programmed cell death in AIDS-related HIV and SIV infections. *AIDS Res and Hum Retrovir* 1993; **9**: 553–563.
- [18] GROUX H, TORPIER G, MONTÉ D, MOUTON Y, CAPRON A, AMEISEN JC. Activation-induced death by apoptosis in CD4⁺ T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals. *J Exp Med* 1992; **175**: 331–340.
- [19] HASELTINE W. Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1. *FASEB J* 1991; **5**: 2349–2360.
- [20] HE J, CHEN Y, FARZAN M, CHOE H, OHAGEN A, GARTNER S, BUSCIGLIO J, YANG X, HOFMANN W, NEWMAN W, MACKAU CR, SODROSKI J, GABUZDA D. CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia. *Nature* 1997; **385**: 645–649.
- [21] HORUK R. Molecular properties of the chemokine receptor family. *TiPS* 1994; **15**: 159–165.
- [22] HOXIE JA, ALPERS JD, RACKOWSKI JL, HUEBNER K, HAGGARTY BS, CEDARBAUM AJ, REED JC. Alterations in T4 (CD4) protein and mRNA synthesis in cells infected with HIV. *Science* 1986; **234**: 1123–1127.
- [23] HWANG SS, BOYLE TJ, LYERLY K, CULLEN BR. Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science* 1991; **253**: 71–74.
- [24] JOHNSON RP, WALKER BD. Cytotoxic T lymphocytes in human immunodeficiency virus infection: responses to structural proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994; **189**: 35–63.
- [25] JUSZCZYK J, GŁADYSZ A. AIDS. Epidemiologia, patogeneza, klinika, leczenie, zapobieganie, poradnictwo. Wyd. I, Wrocław: Volumed 1992.
- [26] KINNEY TE, WEBER JN, McCLURE J, CLAPHAM PR, SINGHAL MC, SHRIVER MK, WEISS RA. Neutralizing monoclonal antibodies to the AIDS virus. *AIDS* 1988; **2**: 25–29.
- [27] KLATZMANN D, CHAMPAGNE E, CHAMARET S, GRUEST J, GUETARD D, HERCEND T, GLUCKMAN JC, MONTAGNIER L. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 1984; **312**: 767–768.
- [28] KUBY J. T-cell receptor oraz The immune system in AIDS. [w] Kuby J [red] Immunology. II ed., 1994, WH Freeman and Company, New York.
- [29] LASEK W. Cytotoksyczność komórkowa naturalna i zależna od przeciwciał. [w] Jakóbsiak M [red] Immunologia Wyd. II, Warszawa: PWN 1996: 308–326.
- [30] LAURENT-CRAWFORD AG, COCCIA E, KRUST B, HOVANESSIAN AG. Membrane-expressed HIV envelope glycoprotein heterodimer is a powerful inducer of cell death in uninfected CD4⁺ target cells. *Res Virol* 1995; **146**: 5–17.
- [31] LAURENT-CRAWFORD AG, KRUST B, RIVIÈRE Y, DESGRANCES C, MULLER S, PAUL KIENY M, DAUGUET C, HOVANESSIAN AG. Membrane expression of HIV envelope glycoproteins triggers apoptosis in CD4 cells. *AIDS Res Hum Retrovir* 1993; **9**: 761–773.
- [32] LYERLY HK, MATTHEWS TJ, LANGLOIS AJ, BOLOGNESI DP, WEINHOLD KJ. Human T-cell lymphotropic virus IIIB glycoprotein (gp120) bound to CD4 determinants on normal lymphocytes and expressed by infected cells as a target for immune attack. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 4601–4605.
- [33] MARTIN SJ, MATEAR PM, VYAKARMAM A. HIV-1 infection of human CD4⁺ T cell *in vitro*. Differential induction of apoptosis in these cells. *J Immunol* 1994; **152**: 330–342.

- [34] MOORE J, SATTENTAU Q, WYATT R, SODROSKI J. Probing the structure of the human immunodeficiency virus surface glycoprotein gp120 with a panel of monoclonal antibodies. *J Virol* 1994; **68**: 469–484.
- [35] MOORE JP, McKEATING JA, WEISS RA, SATTENTAU QJ. Dissociation of gp120 from HIV-1 virions induced by soluble CD4. *Science* 1990; **250**: 1139–1142.
- [36] OBERLIN E, AMARA A, BACHELERIE F, BESSIA C, VIRELIZIER J-L, ARENZANA-SEISDEDOS F, SCHWARTZ O, HEARD J-M, CLARK-LEWIS I, LEGLER DF, LOETSCHER M, BAGGIOLINI M, MOSER B. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 1996; **382**: 833–835.
- [37] POSNER MR, ELBOIM HS, CANNON T, CAVACINI L, HIDEHIMA T. Functional activity of an HIV-1 neutralizing IgG human monoclonal antibody: ADCC and complement-mediated lysis. *AIDS Res Hum Retrovir* 1992; **8**: 553–558.
- [38] RINALDO C, HUANG X-L, FAN Z, DING M, BELTZ L, LOGAR A, PANICALI D, MAZZARA G, LIEBMAN J, COTTRIL M, GUPTA P. High levels of anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) memory cytotoxic T-lymphocyte activity and low viral load are associated with lack of disease in HIV-1 infected long term nonprogressors. *J Virol* 1995; **69**: 5838–5842.
- [39] SCHNEIDER J, KAADEN O, COPELAND TD, OROSZLAN S, HUUSMANN G. Shedding and interspecies type seo-reactivity of the envelope glycopolyptide gp120 of the human immunodeficiency virus. *J Gen Virol* 1986; **67**: 2533–2538.
- [40] SCHNITTMAN S, LANE HC, ROTH J, BURROWS A, FOLKS T, KEHRI J, KOENIG S, BERMAN P, FAUCI A. Characterization of gp120 binding of CD4 and an assay that measures ability of sera to inhibit this binding. *J Immunol* 1988; **141**: 4181–4186.
- [41] SCHUITEMAKER H, KOOT M, KOOSTRA NA, DERCKSEN MW, de GOEDE RE, van STEENWIJK RP, LANGE JM, SCHATTEKERK JM, MIEDEMA F, TERSMETTE M. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a virus population shift from monocytotropic to T-cell-tropic virus population. *J Virol* 1992; **66**: 1354–1360.
- [42] SHIROZUM, NAKANOT, INAZAWA J, TASHIRO K, TADA H, SHINOHARA T, HANJO T. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) gene. *Genomics* 1995; **28**: 495–500.
- [43] SILICIANO RF, LAWTON T, KNALL C, KARR RC, BERMAN P, GREGORY T, REINHERZ EL. Analysis of host-virus interactions in AIDS with anti-gp120 human T cell clones: effect of HIV sequence variation and a mechanism for CD4⁺ cell depletion. *Cell* 1988; **54**: 561–575.
- [44] SODROSKI J, GOH WC, ROSEN C, CAMPBELL K, HASELTINE WA. Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity. *Nature* 1986; **322**: 470–474.
- [45] STANHOPE PE, CLEMENTS ML, SILICIANO RF. Human CD4⁺ cytolytic T lymphocyte responses to a human immunodeficiency virus type 1 gp120 subunit vaccine. *J Infect Dis* 1993; **168**: 92–100.
- [46] STEVENSON M, HAGGERTY S, LAMONICA C, MANN AM, MEIER C, WASIAK A. Cloning and characterization of human immunodeficiency virus type 1 variants diminished in the ability to induce syncytium-independent cytolysis. *J Virol* 1990; **64**: 3792–3803.
- [47] STEVENSON M, STANWICK TL, DEMPSEY MP, LAMONICA CA. HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration. *EMBO J* 1990; **9**: 1551–1560.
- [48] TRKOLA A, DRAGIC T, ARTHOS J, BINLEY JM, OLSON WC, ALLAWAY GP, CHENG-MAYER C, ROBINSON J, MADDON PJ, MOORE JP. CD4-dependent antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* 1996; **384**: 184–187.
- [49] WEISSENHORN W, DESSEN A, HARRISON SC, SKEHEL JJ, WILEY DC. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* 1997; **387**: 426–430.

- [50] WU L, GERARD NP, WYATT R, CHOE H, PAROLIN C, RUFFING N, BORSETTI A, CARDOSO AA, DESJARDIN E, NEWMAN W, GERARD C, SODROSKI J. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* 1996; **384**: 179–183.
- [51] WU MX, DALEY JF, RASMUSSEN RA, SCHLOSSMAN SF. Monocytes are required to prime peripheral blood T cells to undergo apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 1525–1529.
- [52] WYATT RM, THALI M, TILLEY S, PINTER A, POSNER M, HO D, ROBINSON J, SODROSKI J. Relationship of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 third variable loop to a component of the CD4 binding site in the fourth conserved region. *J Virol* 1992; **66**: 6997–7004.
- [53] VOGEL T, KURTH R, NORLEY S. The majority of neutralizing Abs in HIV-1 infected patients recognize linear V3 loop sequences. *J Immunol* 1994; **153**: 1895–1904.
- [54] ZHU T, MO H, WANG N, NAM DS, CAO Y, KOUP RA, HO DD. Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection. *Science* 1993; **261**: 1179–1181.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 17.05.1999 r.

Przyjęto: 06.10.1999 r.

Adres autora: ul. Świącickiego 6, 60-781 Poznań

WYKORZYSTANIE PRODUKTU BIAŁKOWEGO GENU *env*, gp160, DO IMMUNIZACJI PRZECIWKO WIRUSOWI HIV-1*

APPLICATION OF PROTEIN PRODUCT OF THE *env* GENE,
gp160, IN THE IMMUNIZATION AGAINST HIV-1 VIRUS

DARIUSZ KMIĘCIAK, WIESŁAW H. TRZECIAK

Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej,
Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego, Poznań

Streszczenie: Celem pracy jest przedstawienie prób immunizacji przeciwko HIV-1 za pomocą produktów białkowych genu *env*. Nowo opracowane techniki pozwoliły na zastąpienie konwencjonalnych metod szczepienia, które w przypadku wysoce zmiennego wirusa HIV-1 okazują się nieskuteczne i poszukiwanie alternatywnych rozwiązań, takich jak: immunizacja za pomocą rekombinowanych wirusów jako wektorów czy też „nagim” DNA. Wyniki tych badań są obiecujące i wskazują drogę do rozwiązania problemu. Jednakże, z powodu wysokiej zmienności HIV-1, zmienności haplotypowej w populacji ludzkiej oraz ciągle niedostatecznej znajomości interakcji gospodarz-patogen, wydaje się, że skonstruowanie uniwersalnej szczepionki anty-HIV-1, nieprędko, jeśli w ogóle, nastąpi.

(*Postępy Biologii Komórki* 2000; 27: 68–79)

Słowa kluczowe: HIV-1, *env*, gp160, gp120, wirus krowianki, immunizacja.

Summary: The aim of this article is to present the attempts of immunization against HIV-1 with the use of protein products of the *env* gene. Newly elaborated techniques allowed replacing traditional vaccination methods, ineffective in case of highly variable HIV-1 virus and investigating alternative solutions such as: immunization with the use of recombinant viruses as vectors or „naked” DNA. The results of these studies are promising and indicate the way to solve this problem. However, because of high variability of HIV-1, haplotype variability in human population and still insufficient knowledge on host:pathogen interaction, it seems that effective, universal vaccine against HIV-1 will not, if ever, be constructed soon.

(*Advances in Cell Biology* 2000; 26: 68–79)

Key words: HIV-1, *env*, gp160, gp120, vaccinia, immunization.

*Praca finansowana z grantu promotorskiego KBN nr 4 P05A 016 15.

1. WSTĘP

Próby ograniczenia infekcji wirusem HIV-1 zmierzają w dwóch kierunkach. Jednym z nich jest chemioterapia za pomocą inhibitorów odwrotnej transkryptazy: azydodotymidyny (*3'-azido-3'-deoxythymidine* – AZT), dideoksyctozyny (*dideoxycytosine* – ddC), dideoksyinozyny (*dideoxyinosine* – ddI) [14, 21], czy też newirapiny (*nevirapine* – lek nienukleozydowy, który po związaniu się blisko centrum katalitycznego transkryptazy, blokuje jej aktywność, niekompetycyjnie w stosunku do matrycy i nukleotydów) [10]. Stosuje się także inhibitory proteazy: saquinawir (Hoffman-La Roche), indinawir (Merck), ritonawir (Abbott) i inne. W próbach klinicznych leki te są stosowane oddzielnie albo w kombinacjach. Obniżają one znacznie poziom wirusa we krwi. Podnosi się też liczba limfocytów CD4⁺, jednakże nie zmniejszają one ilości wirusa w innych tkankach, m.in. w węzłach chłonnych, będących jego rezerwuarem [14, 21]. W krótkim czasie powstają również warianty wirusa odporne na chemioterapię. Ponadto, leki te wykazują działania uboczne.

Drugi kierunek badań skupia się na próbach stworzenia skutecznej szczepionki anti-HIV-1, która wzbudzałaby dwa typy odpowiedzi immunologicznej: humoralną i komórkową. Próbuje się to osiągnąć:

(1) przez zastosowanie oczyszczonych białek wirusa bądź immunogennych peptydów będących częścią sekwencji wirusa i

(2) użycie wektorów ekspresyjnych zawierających gen(y) HIV-1.

Natomiast użycie jako szczepionki żywego, osłabionego wirusa, nawet zawierającego mutacje w obrębie sekwencji kluczowych dla replikacji, związane jest z niebezpieczeństwem powrotu do pełnej wirulencji, a poza tym szczepionka taka chroniłaby tylko przed wirusem tego samego lub bardzo bliskiego genetycznie szczepu.

2. IMMUNIZACJA ZA POMOCĄ OCZYSZCZONEGO gp120 ORAZ PEPTYDÓW STANOWIĄCYCH FRAGMENT TEGO BIAŁKA

Clerici i wsp. [5] zastosowali rekombinowaną glikoproteinę 160 (rgp160 – *recombinant gp160*) – otrzymaną z komórek owadzych w hodowli po ich uprzedniej infekcji bakulowirusem mającym wklonowany gen *env*, do immunizacji ochotników seronegatywnych pod względem HIV-1. Udało się w ten sposób pobudzić i wzmocnić funkcję pomocniczych limfocytów T (T_H) mierzoną stopniem proliferacji komórek i produkcją interleukiny-2 (IL-2). Ponadto, stwierdzono, że aktywność anti-HIV-1 komórek T_H była ponad sto razy wyższa u wielokrotnie immunizowanych ochotników

niż u bezobjawowych pacjentów HIV-1-pozytywnych. Podobne eksperymenty z użyciem rgp160, podawanym łącznie z adjuwantem bezobjawowym pacjentom HIV-1⁺ wykazały znaczne zwiększenie aktywności *env*-specyficznych limfocytów CD4⁺ i CD8⁺ [15]. Szczepionka ta okazała się więc immunogenna, gdyż wzmacniała odpowiedź *env*-specyficznych limfocytów cytotoksycznych. Jednakże istnieje ryzyko, że rgp160 może wzbudzić też odpowiedź immunologiczną w postaci przeciwciał wzmacniających infekcyjność wirusa [23]. Tak więc, pojawiły się próby wzbudzenia odpowiedzi immunologicznej za pomocą peptydów zawierających wyłącznie determinanty antygenowe. Takahashi i wsp. [27] inkubowali komórki śledziony myszy BALB/c z peptydem 18IIIB (sekwencja RIQRGPGRAFVTIGK z pętli V3 białka gp120), następnie napromieniowali je i podawali myszom o takim samym haplocyocie. Po 3–4 tygodniach izolowali z nich komórki śledziony, restymulowali *in vitro*, a następnie sprawdzali aktywność limfocytów CD8⁺ w teście cytotoksyczności (pomiar stopnia wrażliwości komórek docelowych, wystawiających obcy antygen w kontekście głównego kompleksu zgodności tkankowej klasy I {MHC-I}, na liżę prowadzoną przez limfocyty cytotoksyczne, o takim samym haplocyocie i rozpoznające obcy antygen), w którym komórkami docelowymi były fibroblasty myszy BALB/c, inkubowane z peptydem 18IIIB lub też transfekowane plazmidem zawierającym gen *env*, a więc wykazujące ekspresję tego genu. Wykazano w ten sposób, że immunizacja za pomocą napromieniowanych komórek z przyłączonym peptydem jest efektywna. Napromieniowanie w tym przypadku prawdopodobnie zwiększa akumulację komórek w śledzionie immunizowanej myszy, przyczyniając się do lepszej prezentacji immunogenego peptydu, również w ten sposób, że napromieniowane, a więc uszkodzone komórki, oprócz prezentowania antygeny, mogłyby być łatwiej fagocytowane przez inne komórki prezentujące antygen.

Jak się wydaje, indukcja limfocytów cytotoksycznych często wymaga współudziału limfocytów T_H, produkujących odpowiednie limfokiny. Zatem, połączono syntetyczne peptydy stanowiące fragment gp160 i stymulujące proliferację limfocytów T_H oraz wydzielanie cytokin z peptydem 18IIIB, stymulującym limfocyty cytotoksyczne. Podano je myszom i po dwóch tygodniach wyizolowano komórki śledziony, restymulowano i użyto jako komórki efektorowe w teście cytotoksyczności, w którym komórkami docelowymi były fibroblasty myszy BALB/c 3T3, o tym samym kompleksie zgodności tkankowej, wykazujące ekspresję gp160. Ponadto, aby wykazać, że jest to aktywność limfocytów cytotoksycznych CD8⁺, a nie CD4⁺, wykonano test cytotoksyczności, w którym komórkami docelowymi były inkubowane z peptydem 18IIIB fibroblasty myszy BALB/c 3T3, mające MHC-I, ale bez ekspresji MHC-II. Stwierdzono, że połączone peptydy były znacznie bardziej wydajne w indukcji *env*-specyficznych limfocytów cytotoksycznych niż sam peptyd 18IIIB [25].

Immunizacja peptydami, stanowiącymi dominanty antygenowe gp160, może być korzystniejsza niż immunizacja kompletnym gp160, gdyż: (1) jak wspomniano wcześ-

niej, białko o pełnej długości może pobudzić produkcję niekorzystnych przeciwciał [23] i (2) wyizolowane białko może mieć zupełnie inną strukturę trzecio- i czwartorzędową, zatem wyprodukowane przeciwciała nie będą rozpoznawały natywnej struktury białka.

Dlatego immunizacja za pomocą oligomerycznego, niezdenaturowanego białka gp160, bardziej przypominającego natywną formę, pobudza tworzenie frakcji przeciwciał przeciwko epitopom konformacyjnym gp120 i gp41, natomiast może zmniejszyć produkcję przeciwciał przeciwko liniowym epitopom tego białka, mniej skutecznym w neutralizacji natywnej formy gp160 [7]. Reszty oligosacharydowe spełniają rolę ochronną przed rozpoznaniem przez układ immunologiczny, zatem, jak się wydaje, odpowiedź w postaci przeciwciał neutralizujących jest jeszcze efektywniejsza, jeżeli do szczepienia użyje się natywnej, oligomerycznej formy gp120, pozbawionej wybranych miejsc glikozylacji [20]. Oprócz tego, odpowiedź humoralna może być ograniczona do homologicznego szczepu HIV-1, nie mając żadnego albo mając niewielki wpływ na inne szczepy. Salmon-Céron i wsp. [24] podawali rgp160 ochotnikom HIV-1-negatywnym, łącznie z peptydem stanowiącym sekwencję pętli V3 z izolatu MN wirusa HIV-1. Po kilku miesiącach badali aktywność przeciwciał neutralizujących oraz *env*-specyficznych limfocytów cytotoksycznych. Okazało się, że te ostatnie zostały słabo wyindukowane, natomiast uzyskano wysoki poziom przeciwciał neutralizujących, ograniczonych jednak do homologicznego szczepu wirusa.

3. ZASTOSOWANIE ZREKOMBINOWANEGO WIRUSA KROWIANKI ZAWIERAJĄCEGO GEN *env*

Użycie do immunizacji zrekombinowanego wirusa krowianki (*vaccinia virus*), zawierającego gen(y) HIV-1, stanowi przykład drugiego toru badań, w których próbuje się wykorzystać ten wirus jako wektor ekspresyjny. Po podaniu zwierzętom doświadczalnym i/lub ochotnikom odpowiednio przygotowanego wektora, oczekuje się, że zrekombinowany gen ulegnie ekspresji, a następnie wyindukuje trwałą odpowiedź immunologiczną chroniącą przed skutkami infekcji.

O ekspresji genu *env* HIV-1 w systemie wirusa krowianki doniesiono już w 1986 r. [4, 12]. Równie wcześniej zaczęto wykorzystywać ten wirus do prób immunizacji przeciwko HIV-1. Cooney i wsp. [6] wykazali, że szczepienie ochotników seronegatywnych pod względem HIV-1 żywym, zrekombinowanym wirusem krowianki zawierającym gen *env* HIV-1 jest bezpieczne i dobrze tolerowane. Jednakże, znacznie lepsza odpowiedź rozwinęła się u tych osobników, którzy wcześniej nie byli szczepieni wirusem krowianki przeciwko ospie. Z tego też względu Hammond i wsp. [11] użyli do badań osoby nie mające wcześniej styczności z tym wirusem

i seronegatywne pod względem HIV-1. Podano im szczepionkę w postaci zre-kombinowanego wirusa krowianki, zawierającego gen *env* HIV-1 szczepu LAI. Dwa miesiące później, w celu wzmocnienia odpowiedzi immunologicznej, szczepiono ich dodatkowo używając oczyszczonego białka rgp160. Zgodnie z założeniami pracy, udało się wzbudzić aktywność anty-gp160 limfocytów cytotoksycznych CD8⁺ (za pomocą zrekombinowanego wirusa krowianki) oraz limfocytów cytotoksycznych CD4⁺ (za pomocą rgp160). Podobnie jak w innych pracach [26], aktywność wykazano w stosunku do tego samego szczepu HIV-1, z którego pochodził gen *env* używany do immunizacji, chociaż inne szczepy też były podatne na lizę, ale w mniejszym stopniu, głównie za pośrednictwem limfocytów cytotoksycznych CD8⁺. Ponadto, określono restrykcję haplotypową wyizolowanych klonów limfocytów cytotoksycznych CD4⁺ i CD8⁺ badając stopień lizy komórek docelowych, wykazujących ekspresję genu *env* i dopasowanych pod względem jednego allelu HLA-I i HLA-II w stosunku do limfocytów cytotoksycznych (w przypadku człowieka, często zamiast skrótów MHC-I i MHC-II, używa się na określenie głównego układu zgodności tkankowej terminu: *human leukocyte antigen*, w skrócie HLA). Dalszym krokiem było scharakteryzowanie specyficzności epitopowej klonów limfocytów cytotoksycznych CD8⁺ i CD4⁺ o aktywności anty-HIV-1, otrzymanych od szczepionych ochotników [13]. W tym celu autologiczne komórki docelowe zostały zainfekowane wirusami krowianki zawierającymi geny *env* charakteryzujące się seryjnymi delecjami, a w celu dokładniejszego poznania – inkubowane z krótkimi peptydami pochodzącymi z tych regionów, które jak można wnioskować z seryjnych delecji genu *env*, dawały największą lizę. Jak się okazało, rozpoznawane były epitopy w obrębie genu *env*, charakterystyczne dla kilku typów HLA-I i HLA-II. Co ciekawe jednak, odpowiedź większości klonów limfocytów CD8⁺ rozwinęła się przeciwko wysoce konserwatywnemu regionowi białka gp120 (aminokwasy 38 do 47) prezentowanemu w kontekście HLA-A3.1 [13]. Wyniki te są zachęcające, gdyż rozpoznawany region jest wysoce konserwatywny u różnych szczepów wirusa HIV-1, z drugiej jednak strony specyficzność epitopowa limfocytów cytotoksycznych CD8⁺ jest głównie zdeterminowana przez haplotyp dawcy, zatem nie wiadomo, czy osobnicy posiadający inny allel niż HLA-A3, również będą silnie rozpoznawać ten region białka.

Mimo że zrekombinowany wirus krowianki jest bezpieczny po podaniu ochotnikom w celu wzbudzenia odpowiedzi immunologicznej anty-HIV-1, w niektórych eksperymentach stosuje się zrekombinowany wirus ospy ptasiej (*canarypox*), zawierający gen *env* HIV-1 [8]. Wirus ten, choć infekuje komórki ssacze, to jednak nie podlega w nich replikacji, a więc jego cykl życiowy nie jest w nich ukończony. Ważne jednak jest to, że po infekcji, część genów, tzw. wczesnych, ulega ekspresji i jeśli gen-wstawka (w tym przypadku *env*) znajduje się także pod kontrolą promotora dla genów wczesnych, to również powstanie jego produkt białkowy. W ten sposób u części immunizowanych ochotników, seronegatywnych pod względem HIV-1,

udało się wzbudzić aktywność HIV-1-specyficznych limfocytów cytotoksycznych CD8⁺. Co więcej, również u tych, którzy wcześniej byli szczepieni wirusem krowianki przeciwko ospie.

4. IMMUNIZACJA Z UŻYCIEM DNA PLAZMIDOWEGO

Stosowanie zrekombinowanego wirusa krowianki, jak również i innych wirusów (polio, adenowirus) wydaje się być bezpieczne i efektywne. Niektórzy badacze jednak zaczęli szczepić zwierzęta doświadczalne za pomocą bezpośredniej inokulacji plazmidowego DNA (domięśniowo, dootrzewnowo lub dożylnie), zawierającego obcy gen, którego ekspresja znajduje się pod kontrolą silnego promotora, np. z cytomegalowirusa (*cytomegalovirus* – CMV). Po pobraniu przez komórki, obcy gen ulega ekspresji, a zatem może wywoływać odpowiedź immunologiczną. Co ważne, immunizacja za pomocą DNA naśladuje naturalną infekcję, gdyż białko/a wirusowe są produkowane w „zainfekowanej” komórce.

Dane z badań *in vitro* wskazują, że aby nastąpiła wydajna ekspresja genu *env* HIV-1, potrzebna jest koekspresja genu *rev* [18]. Omawiany powyżej system wirusa krowianki stanowił wyjątek, ponieważ wirus ten ma własne sekwencje promotorowe i własny aparat transkrypcyjny, a więc gen *env* ulegał wydajnej ekspresji bez „pomocy” *rev*. W innych układach jednak stosuje się koekspresję genu *rev*. Okuda i wsp. [19] użyli plazmidu ekspresyjnego z promotorem CMV do wstawienia regionu cDNA HIV-1 obejmującego zarówno gen *env*, jak i segmenty genu *rev*. Następnie podawali plazmidowe DNA, dwukrotnie w odstępie dwutygodniowym, myszom, królikom i makakom. W niektórych przypadkach dodawali do mieszaniny inokulacyjnej dodatkowy plazmid zawierający tylko gen *rev*, żeby wzmocnić dodatkowo ekspresję *env*. Po miesiącu od ostatniej immunizacji pobierali oni komórki do testu cytotoksyczności oraz surowicę do testu neutralizującego. W tym ostatnim chodziło o sprawdzenie, czy wytworzyły się przeciwciała anti-gp160, zdolne do blokowania infekcji wirusem HIV-1 *in vitro*. Wyniki tych badań wskazują, że szczepienie za pomocą tej techniki jest w stanie wzbudzić silną odpowiedź immunologiczną w postaci przeciwciał oraz limfocytów cytotoksycznych CD8⁺. Boyer i wsp. [2] użyli dwóch plazmidów, jednego zawierającego geny *env+rev* (ze szczepu wirusa MN), i drugiego: *gag+pol* (ze szczepu IIIB), do immunizacji szympanów, po której infekowano je wirusem HIV-1 szczepu SF2. Immunizowane szympany, chociaż początkowo HIV-pozytywne, nie wykazywały potem oznak zakażenia w postaci wysokiej wirerii. W ich surowicy metodą RT-PCR nie stwierdzono obecności wirusowego RNA. Natomiast kontrola, czyli szympan nieimmunizowany, stał się HIV-pozytywny dwa tygodnie po podaniu wirusa i pozostawał w tym stanie przez 48 tygodni. U immunizowanych szympanów wykryto aktywność limfocytów cyto-

toksycznych anty-env i anty-gag/pol; wykryto też przeciwciała anty-gp160. Dane te wskazują, że możliwa jest ochrona przed infekcją po immunizacji za pomocą plazmidowego DNA i to nawet wtedy, gdy HIV-1 użyty do infekcji należy do innego szczepu. W tym przypadku jednak wirusy HIV-1 MN i IIIB, z których sekwencji skonstruowano plazmidy, jak i SF2, użyty do infekcji, należą do tej samej grupy B, a więc są blisko spokrewnione genetycznie.

Ochronę przeciw infekcji wirusem HIV-1, trwającą do roku po ostatniej immunizacji, osiągnięto także u szympanów, którym kilkakrotnie podano w formie aerozolu do nosa, szczepionkę w postaci zrekombinowanego adenowirusa zawierającego gen *env* izolata MN oraz domięśniowo białko gp120 izolata SF2 w adjuwancie. Efektywność szczepienia sprawdzono poprzez infekcję wirusem HIV-1-SF2, 52 i 98 tygodni po pierwszej immunizacji [17]. Jednakże, w przypadku szympanów immunizowanych „nagim” DNA, które następnie zostały kontrolnie infekowane HIV-1-SF2, pojawiły się głosy krytyki, że szczep SF2, jako laboratoryjny, a więc łatwy do neutralizacji, nie nadaje się do tego typu eksperymentów, ponieważ dość łatwo można otrzymać pozytywne rezultaty, które z kolei mogą wzbudzać zbyt daleko idące nadzieje [3].

Na zakończenie tego rozdziału warto wspomnieć, choć nie dotyczy to wprawdzie genu *env*, o nowej koncepcji ograniczenia infekcji wirusem HIV-1, przez wykorzystanie białka Casp3 (*caspase-3*), uczestniczącego w apoptozie komórek. Białko to występuje w komórce w postaci nieaktywnego zymogenu. Sygnał apoptotyczny uruchamia kaskadę reakcji, podczas której następuje proteolityczne cięcie zymogenu do formy aktywnej Casp3. Następnie, forma ta, przez proteolizę inhibitora deoksyrybonukleazy, aktywuje ją, co prowadzi do apoptozy. Jednocześnie, aktywna forma Casp3 dokonuje proteolizy kolejnych cząsteczek swojego zymogenu, co wielokrotnie wzmacnia sygnał. Vocero-Akbani i wsp. [28] wymienili proteolityczne miejsca cięcia w białku Casp3 i zamienili je na sekwencje rozpoznawane przez proteazę HIV-1 (miejsca cięcia p17-p24 gag oraz p7-p1). Po podaniu komórkom zakażonym HIV-1, następowała w nich aktywacja białka Casp3 i apoptoza. W komórkach niezakażonych zmodyfikowane białko Casp3 pozostawało w formie zymogenu.

5. PERSPEKTYWY SKONSTRUOWANIA EFEKTYWNEJ SZCZEPIONKI ANTY-HIV-1

W chemioterapii wirusa HIV-1, a także w wytworzeniu możliwie najbardziej skutecznej szczepionki konieczna jest znajomość mechanizmów prowadzących do załamania się układu obronnego organizmu w trakcie infekcji i utraty limfocytów CD4⁺ i CD8⁺. Ważne są np. dane na temat kinetyki zmian w repertuarze limfocytów u zakażonych osób, u których AIDS rozwija się szybko lub powoli (10 lat i dłużej

od momentu zakażenia). U tych ostatnich wykryto np. wysoki poziom odpowiedzi komórkowej w postaci limfocytów cytotoksycznych CD8⁺ i ich prekursorów, specyficznych dla epitopów HIV-1: env, gag i pol [22]. Goulder i wsp. [9] badali wybrane osoby HIV-1-pozytywne, pozostające przez długi czas w fazie bezobjawowej. Przez cały ten okres (ok. 10–12 lat od momentu zakażenia) wykrywali oni silną odpowiedź komórkową, skierowaną głównie przeciwko epitopowi KRWIIMGLNK (aminokwasy: 263-272) produktu genu *gag*, prezentowanemu w kontekście HLA-B27. Przejściu do fazy objawowej choroby towarzyszyło pojawienie się wirusów zawierających mutację (K/R – lizyna/arginina) w obrębie tego epitopu, w pozycji drugiej, a więc pozycji odpowiedzialnej za zakotwiczenie w cząsteczce HLA. Również aktywność limfocytów cytotoksycznych znacznie zmalała. Nie wiadomo dokładnie, czy mutacja ta pojawiała się wcześniej, ale była selektywnie eliminowana, czy też pojawiła się później, gdy nastąpiło wyczerpanie się układu immunologicznego. Możliwe jeszcze jest, że nagromadzenie się mutacji w innych regionach genu *gag* doprowadziło w końcu do wyłonienia się stabilnej mutacji K/R w tym epitopie. Inny sposób selekcji w kierunku zmutowanych wirusów, wymykających się spod kontroli układu immunologicznego, opisany został w pracy Borrow i wsp. [1]. Mianowicie, krótko po infekcji wytworzyła się silna odpowiedź komórkowa limfocytów CD8⁺ przeciwko epitopowi produktu genu *env* (aminokwasy: 30-38) prezentowanemu w kontekście HLA-B44. Silna presja układu immunologicznego doprowadziła w ciągu kilkudziesięciu dni do wyselekcjonowania mutantów wirusa w tym regionie, natomiast mutacje w innych obszarach genu *env* były znacznie rzadsze. Zatem limfocyty cytotoksyczne, specyficzne dla tego regionu, nie były już efektywne i wkrótce, z powodu braku silnej odpowiedzi przeciwko innym epitopom wirusa, nastąpiło szybkie wejście w fazę objawową choroby, mimo że wraz z selekcją mutantów pojawiła się słaba odpowiedź komórkowa skierowana przeciwko epitopom produktów genów *gag*, *pol*, *nef*, a także innemu epitopowi *env*. Być może, za szybkie wejście w fazę symptomatyczną odpowiedzialny jest również efekt antagonisty, tzn. env-specyficzne limfocyty skierowane przeciwko epitopowi 30-38, mogły rozpoznawać nie tylko ten epitop, ale także zmutowane, o ile wykazywałyby one podobieństwo do wersji pierwotnej. Jednakże w tym ostatnim przypadku zamiast ich aktywacji, dochodziłoby do częściowego albo całkowitego zahamowania aktywności limfocytów i to nie tylko w stosunku do komórek zainfekowanych zmutowaną wersją wirusa, ale również i wersją pierwotną.

Wydaje się, że stworzenie efektywnej szczepionki anty-HIV-1 powinno polegać na wzbudzeniu silnej odpowiedzi humoralnej i komórkowej, skierowanej przeciwko wielu współdominującym epitopom wirusowym tak, że ewentualna mutacja w jednym z nich nie spowoduje natychmiastowego wyłonienia się mutantu, wymykającego się spod kontroli układu immunologicznego. W poszukiwaniu odpowiednich epitopów w białku wirusowym trzeba oczywiście brać pod uwagę występowanie regionów zmiennych i stałych oraz rozważyć, które domeny w regionach stałych

są najbardziej konserwatywne w różnych szczepach wirusa. Wreszcie, poszukiwania odpowiednich epitopów należy wiązać z haplotypami człowieka, starając się dobrać takie sekwencje, które są efektywnie prezentowane z kilkoma haplotypami albo i haplotypem, który występuje najliczniej w danej populacji [16].

PIŚMIENNICTWO

- [1] BORROW P, LEWICKI H, WEI X, HORWITZ MS, PEFFER N, MEYERS H, NELSON JA, EDOUARD GAIRIN J, HAHN BH, OLDSTONE MBA, SHAW GM. Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nature Med* 1997; **3**: 205–211.
- [2] BOYER JD, UGEN KE, WANG B, AGADJANYAN M, GILBERT L, BAGARAZZI ML, CHATTERGOON M, FROST P, JAVADIAN A, WILLIAMS WV, REFAELI Y, CICCARELLI RB, MCCALLUS D, CONEY L, WEINER DB. Protection of chimpanzees from high-dose heterologous challenge by DNA vaccination. *Nature Med* 1997; **3**: 526–532.
- [3] BURTON DR, MOORE JP. Why do we not have an HIV vaccine and how can we make one? *Nature Med Vaccine Suppl* 1998; **4**: 495–498.
- [4] CHAKRABARTI S, ROBERT-GUROFF M, WONG-STAAAL F, GALLO RC, MOSS B. Expression of the HTLV-III envelope gene by a recombinant vaccinia virus. *Nature* 1986; **320**: 535–537.
- [5] CLERICI M, TACKET CO, VIA CS, LUCEY DR, MULUK SC, ZAJAC RA, BOSWELL RN, BERZOFKY JA, SHEARER GM. Immunization with subunit human immunodeficiency virus vaccine generates stronger T helper cell immunity than natural infection. *Eur J Immunol* 1991; **21**: 1345–1349.
- [6] COONEY EL, COLLIER AC, GREENBERG PD, COOMBS RW, ZARLING J, ARDITTI DE, HOFFMAN MC, HU S-L, COREY L. Safety of and immunological response to a recombinant vaccinia virus vaccine expressing HIV envelope glycoprotein. *Lancet* 1991; **337**: 567–572.
- [7] EARL PL, BRODER CC, LONG D, LEE SA, PETERSON J, CHAKRABARTI S, DOMS RW, MOSS B. Native oligomeric human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein elicits diverse monoclonal antibody reactivities. *J Virol* 1994; **68**: 3015–3026.
- [8] EGAN MA, PAVLAT WA, TARTAGLIA J, PAOLETTI E, WEINHOLD KJ, CLEMENTS ML, SILICIANO RF. Induction of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific cytolytic T lymphocyte responses in seronegative adults by a nonreplicating, host-range-restricted canarypox vector (ALVAC) carrying the HIV-1_{MN} env gene. *J Inf Dis* 1995; **171**: 1623–1627.
- [9] GOULDER PJR, PHILLIPS RE, COLBERT RA, McADAM S, OGG G, NOVAK MA, GIANGRADE P., LUZZI G, MORGAN B, EDWARDS A, McMICHAEL AJ, ROWLAND-JONES S. Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nature Med* 1997; **3**: 212–217.
- [10] GROB PM, CAO Y, MUCHMORE E, HO DD, NORRIS S, PAV JW, SHIH C-K, ADAMS J. Prophylaxis against HIV-1 infection in chimpanzees by nevirapine, a nonnucleoside inhibitor of reverse transcriptase. *Nature Med* 1997; **3**: 665–670.
- [11] HAMMOND SA, BOLLINGER RC, STANHOPE PE, QUINN TC, SCHWARTZ D, CLEMENTS ML, SILICIANO RF. Comparative clonal analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific CD4⁺ and CD8⁺ cytolytic T lymphocytes isolated from seronegative humans immunized with candidate HIV-1 vaccines. *J Exp Med* 1992; **176**: 1531–1542.

- [12] HU S-L, KOSOWSKI SG, DALRYMPLE JM. Expression of AIDS virus envelope gene in recombinant vaccinia viruses. *Nature* 1986; **320**: 537–540.
- [13] JOHNSON RP, HAMMOND SA, TROCHA A, SILICIANO RF, WALKER BD. Epitope specificity of MHC restricted cytotoxic T lymphocytes induced by candidate HIV-1 vaccine. *AIDS Res Hum Retrovir* 1994; **10(Suppl 2)**: S73–S75.
- [14] JUSZCZYK J, GŁADYSZ A. AIDS. Epidemiologia, patogeneza, klinika, leczenie, zapobieganie, poradnictwo. Wyd. I, 1992. Volumed Wrocław.
- [15] KUNDU SK, KATZENSTEIN D, MOSES LE, MERIGAN TC. Enhancement of human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4⁺ and CD8⁺ cytotoxic T-lymphocyte activities in HIV-infected asymptomatic patients given recombinant gp160 vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 11204–11208.
- [16] LAUMBACHER B, WANK R. Recruiting HLA to fight HIV. *Nature Med Vaccine Suppl* 1998; **4**: 505.
- [17] LUBECK MD, NATUK R, MYAGKIKH M, KALYAN N, ALDRICH K, SINANGIL F, ALIPANAH S, MURTHY SCS, CHANDA PK, NIGIDA SM Jr, MARKHAM PD, ZOLLA-PAZNER S, STEIMER K, WADE M, REITZ MS Jr, ARTHUR LO, MIZUTANI S, DAVIS A, HUNG PP, GALLO RC, EICHBERG J, ROBERT-GUROFF M. Long-term protection of chimpanzees against high-dose HIV-1 challenge induced by immunization. *Nature Med* 1997; **3**: 651–658.
- [18] MALIM MH, HAUBER J, FENRICK R, CULLEN BR. Immunodeficiency virus rev transactivator modulates the expression of the viral regulatory genes. *Nature* 1988; **335**: 181–183.
- [19] OKUDA K, BUKAWA H, HAMAJIMA K, KAWAMOTO S, SEKIGAWA K-I, YAMADA Y, TANAKA S-I, ISHII N, AOKI I, NAKAMURA M, YAMAMOTO H, CULLEN BR, FUKUSHIMA J. Induction of potent humoral and cell-mediated immune responses following direct injection of DNA encoding the HIV type 1 env and rev gene products. *AIDS Res Hum Retrovir* 1995; **11**: 933–943.
- [20] REITTER JN, MEANS RE, DESROSIERS RC. A role for carbohydrates in immune evasion in AIDS. *Nature Med* 1998; **4**: 679–684.
- [21] RICHMAN DD. HIV therapeutics. *Science* 1996; **272**: 1886–1887.
- [22] RINALDO C, HUANG X-L, FAN Z, DING M, BELTZ L, LOGAR A, PANICALI D, MAZZARA G, LIEBMAN J, COTTRIL M, GUPTA P. High levels of anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) memory cytotoxic T-lymphocyte activity and low viral load are associated with lack of disease in HIV-1 infected long term nonprogressors. *J Virol* 1995; **69**: 5838–5842.
- [23] ROBINSON WE Jr, KAWAMURA T, GORNY MK, LAKE D, XU J-Y, MATSUMOTO Y, SUGANO T, MASUHO Y, MITCHELL WM, HERSH E, ZOLLA-PAZNER S. Human monoclonal antibodies to the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmembrane glycoprotein gp41 enhance HIV-1 infection *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 3185–3189.
- [24] SALMON-CÉRON D, EXCLER J-L, SICARD D, BLANCHE P, FINKIELSTZJEN L, GLUCKMAN J-C, AUTRAN B, MATTHEWS TJ, MEIGNIER B, KIENY M-P, VALENTIN C, GONNET P, DIAZ I, SALOMON H, PIALOUX G, GONZALES-CANALI G, PLOTKIN S, THE AGIS GROUP AND L'AGENCE NATIONALE DE RECHERCHE SUR LE SIDA. Safety and immunogenicity of a recombinant HIV-1 type glycoprotein 160 boosted by a V3 synthetic peptide in HIV-negative volunteers. *AIDS Res Hum Retrovir* 1995; **11**: 1479–1486.
- [25] SHIRAI M, PENDLETON CD, AHLERS J, TAKESHITA T, NEWMAN M, BERZOFSKY JA. Helper-cytotoxic T lymphocyte (CTL) determinant linkage required for priming of anti-HIV CD8⁺ CTL *in vivo* with peptide vaccine constructs. *J Immunol* 1994; **152**: 549–556.
- [26] TAKAHASHI H, MERLI S, PUTNEY SD, HOUGHTEN R, MOSS B, GERMAIN RN, BERZOFSKY JA. A simple amino acid interchange yields reciprocal CTL specificities for HIV-1 gp160. *Science* 1989; **246**: 118–121.

- [27] TAKAHASHI H, NAKAGAWA Y, YOKOMURO K, BERZOFSKY JA. Induction of CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes by immunization with syngeneic irradiated HIV-1 envelope derived peptide-pulsed dendritic cells. *Int Immunol* 1993; 5: 849–857.
- [28] VOCERO-AKBANI AM, VANDER HEYDEN N, LISSY NA, RATNER L, DOWDY SF. Killing HIV-infected cells by transduction with an HIV protease-activated caspase-3 protein. *Nature Med* 1999; 5: 29–33.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 17.05.1999 r.

Przyjęto: 20.10.1999 r.

Adres autora: ul. Świącickiego 6, 60-781 Poznań

ROLA HOMOCYSTEINY W PROCESIE ROZWOJU ZMIAN MIAŻDŻYCOWYCH NA POZIOMIE KOMÓRKOWYM

ROLE OF HOMOCYSTEINE IN PROGRESS OF ATHEROSCLEROSIS ON CELLULAR LEVEL

AGNIESZKA BRZEZIŃSKA, MAŁGORZATA BALIŃSKA

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN, Warszawa

Streszczenie: Homocysteina, aminokwas siarkowy nie wchodzący w skład białek, jest nielipidowym czynnikiem w patogenezie miażdżycy. Opisano metabolizm homocysteiny i procesy stymulujące podwyższanie jej poziomu w surowicy krwi. Stan ten wpływa w sposób bezpośredni lub pośredni na patogenezę miażdżycy. W wyniku podwyższonego stężenia homocysteiny następują zaburzenia procesów metylacji białek, lipidów i DNA, zmiany w ekspresji niektórych genów oraz w uwalnianiu EDRF. Pośredni udział homocysteiny w generowaniu zmian miażdżycowych polega na wytwarzaniu wolnych rodników, które prowadzą do uszkodzeń komórek śródbłonna, zwiększenia proliferacji mięśni gładkich naczyń krwionośnych i zmian strukturalnych elementów substancji zewnątrzkomórkowej. Wszystkie te procesy przyczyniają się do powstawania płytek miażdżycowych, przerostu mięśniówki i zwężenia światła naczyń oraz zmian w procesach krzepnięcia krwi, co przyczynia się do postępu procesów miażdżycowych.

(Postępy Biologii Komórki 2000; 27: 81–96)

Słowa kluczowe: Homocysteina, miażdżycy, śródbłonek, krzepliwość, metylacje, tlenek azotu.

Summary: Homocysteine, a sulphur-containing non-structural protein aminoacid is a non-lipid factor in the pathogenesis of arteriosclerosis. The metabolism of homocysteine and the processes responsible for the high serum level of this aminoacid are described. The pathogenesis of arteriosclerosis depends directly or indirectly on high serum levels of homocysteine, which generate disorders in proteins, DNA and lipid methylation, changes the expression of some genes and secretion of EDRF. Indirect effects of homocysteine mostly involve the generation of free radicals causing endothelium injury, proliferation of vascular smooth muscle cells and structural changes in the extracellular matrix. All these changes result in the generation of arteriosclerosis plates, hyperproliferation of vascular myocytes and changes in vasodilator and arteriotrombosis activities, which cause the progression of arteriosclerosis.

(Advances in Cell Biology 2000; 27: 81–96)

Keywords: Homocysteine, arteriosclerosis, endothelium, arteriotrombosis, methylation.

WSTĘP

Pod koniec lat siedemdziesiątych pojawiły się pierwsze doniesienia na temat korelacji między podwyższonym stężeniem homocysteiny w surowicy krwi a występowaniem choroby niedokrwiennej mięśnia sercowego. W wyniku badań statystycznych z zastosowaniem wielu testów korelacyjnych uznano homocysteinę za niezależny, nielipidowy czynnik ryzyka rozwoju miażdżycy [20, 41, 73]. Obserwacje te zaczęły budzić zrozumiałe zainteresowanie i stały się przedmiotem nowych obserwacji zarówno klinicznych, jak i na poziomie metabolizmu komórkowego i molekularnym. Mechanizm komórkowy tego procesu nie został jeszcze do końca poznany, a obserwowane klinicznie zmiany są wypadkową wielu niezwykle skomplikowanych, powiązanych wzajemnie procesów. Wiele wyników na ten temat było przedstawionych w piśmiennictwie monograficznym o charakterze opisu klinicznego [50, 61], jednak brak jest usystematyzowanych danych opisujących ten proces na poziomie molekularnym.

REGULACJA METABOLIZMU HOMOCYSTEINY

Homocysteina jest aminokwasem siarkowym nie wchodzącym w skład struktury białek, ale pełniącym ważną rolę w metabolizmie komórki. W organizmie ssaków ulega procesom metylacji (do metioniny) i transsulfuracji (do β -cystationiny). Powstająca metionina bierze udział w syntezie białek, w wielu reakcjach transmetylacji (w tym metylacji DNA), w tworzeniu poliamin – sperminy i spermidyny. Metylację homocysteiny, jak się uważa, katalizują dwa różne enzymy: MFMT (transmetylaza metylotetrahydrofolian:homocysteina) i BHMT (transmetylaza betaina:homocysteina). Enzym MFMT jako kofaktora wymaga cyjanokobalaminy (wit. B₁₂), a grupy metylowe w tej reakcji pochodzą z metylotetrahydrofolianu, związku powstającego w reakcji katalizowanej przez MTHFR (reduktaza metylenotetrahydrofolianu). Dla enzymu BHMT donorem grupy metylowej jest betaina (powstająca w wyniku przemian cholin). MFMT jest enzymem obecnym we wszystkich tkankach ssaków, a BHMT występuje przede wszystkim w wątrobie i nerkach. W reakcji transsulfuracji homocysteina jest nieodwracalnie katabolizowana przez enzym CBS (syntaza β -cystationiny), który w obecności fosforanu pirydoksalu (wit. B₆) prowadzi syntezę cystationiny, przekształcaną następnie do cysteiny, tauryny, glutationu (rys. 1).

Trzy wyżej wymienione enzymy odpowiadają za utrzymanie właściwego stężenia homocysteiny w komórce. Ich aktywność jest regulowana przez wewnątrzkomórkowe

których wchłanianie tych związków jest upośledzone, jak również u kobiet w ciąży lub stosujących doustne środki antykoncepcyjne, u palaczy i alkoholików, a także u osób leczonych środkami przeciwdrgawkowymi [14]. Opisano obniżone wchłanianie folianów przy infekcji *Helicobacter pylori*, która powoduje podwyższenie pH soku żołądkowego [54]. Deficyt folianów ma wiele patologicznych konsekwencji. Obok zwiększonego ryzyka chorób krążenia, niedobór może być przyczyną powstawania anemii megaloblastycznej, częstszych uszkodzeń układu nerwowego rozwijającego się płodu (ang. *neural tube defects*), zaburzeń neuropsychiatrycznych, znacznego wzrostu zachorowań na nowotwory [15]. Inną przyczyną zwiększającą wewnątrzkomórkowe stężenie homocysteiny jest terapia ze stosowaniem antyfolianów, np. MTX, w leczeniu nowotworów, chorób reumatoidalnych i łuszczycy [10]. W tym wypadku zaburzenia metabolizmu są związane ze zmniejszeniem się puli zredukowanych folianów.

Opisane procesy prowadzą do wzrostu stężenia homocysteiny w komórce i jej zwiększonego transportu do krwi [72]. Usuwanie homocysteiny z osocza zachodzi w nerkach, głównie w szlaku transsulfuracji [34]. U osób z wadami nerek lub po hemodializie obserwuje się często podwyższony poziom homocysteiny [37]. Stężenie homocysteiny w surowicy może osiągać stężenie do 15 $\mu\text{mol/l}$, co jest uważane za poziom prawidłowy. W stanach patologicznych, nazywanych hiperhomocysteinemią, wyróżnia się łagodne podwyższenie poziomu homocysteiny (16–30 $\mu\text{mol/l}$), umiarkowane (31–100 $\mu\text{mol/l}$) i ciężkie (powyżej 100 $\mu\text{mol/l}$) [50].

METABOLICZNE EFEKTY PODWYŻSZONEGO STĘŻENIA HOMOCYSTEINY W KOMÓRCIE A PATOLOGIA MIAŻDŻYCY

Podwyższone stężenie homocysteiny, nawet uważane za łagodną hiperhomocysteinemię, może prowadzić do zaburzeń wielu procesów metabolicznych, między innymi związanych z przemianami lipidów. Zaobserwowano, że u osób z hiperhomocysteinemią może zachodzić pozytywna korelacja między podwyższonym stężeniem homocysteiny a poziomem cholesterolu w surowicy krwi. W doświadczeniach *in vitro* komórki wątrobiaka inkubowane z homocysteiną produkują i wydzielają zwiększoną ilość cholesterolu oraz apolipoproteiny B 100, a także mają podwyższoną aktywność reduktazy HMG-CoA [62]. Zwiększenie stężenia lipidów pod wpływem homocysteiny może już powodować miażdżycowe zmiany patologiczne. Szczególnie dotyczy to zestryfikowanych form lipidów. Metylacja LDL obniża jego przyłączanie do receptorów na makrofagach [27] zapobiegając w ten sposób inicjowaniu procesów oksydacji LDL [2]. Występujące przy hiperhomocysteinemii upośledzenie procesów metylacji sprzyja powstawaniu utlenionych form LDL, które są efektywniej po-

chłanianie przez makrofagi, osiadające następnie pod śródbłonkiem i tworzące płytki miażdżycowe w naczyniach [71]. Reakcje metylacji są również częścią procesu naprawy uszkodzeń wynikających ze spontanicznych deaminacji i izomeryzacji podatnych na te reakcje miejsc białkowych. Zaburzenia metylacji powodują gromadzenie się tak uszkodzonych białek w błonach erytrocytów ludzi, u których wady nerek powodują podwyższone stężenie homocysteiny [66].

Nagromadzenie się homocysteiny nasila również niekorzystny proces, w którym jest ona błędnie aktywowana przez syntazę metionilo-tRNA, tworząc homocysteinylo-AMP. Przekształcenie homocysteinylo-AMP do tiolaktonu zapobiega niepożądanym inkorporacji tego związku podczas syntezy łańcucha polipeptydowego. Nadmiar tiolaktonu homocysteiny pojawiający się przy hiperhomocysteinemii jest odpowiedzialny za posttranslacyjne modyfikacje białek poprzez acylację grup lizylowych w łańcuchu polipeptydowym, co zmienia strukturę białek i zaburza ich funkcjonowanie [36]. Reaktywność tiolaktonu względem białek jest uważana za kolejną przyczynę patologii wywoływanych przez podwyższony poziom homocysteiny np. może powodować dysplazję różnych komórek, zwiększoną produkcję elementów keratynowych, nasilenie agregacji płytek krwi [56]. Ponadto wolne grupy aminowe LDL ulegają procesom tiolowania, co powoduje zwiększone pobieranie tych cząstek przez makrofagi i odkładanie lipidów w płytkach miażdżycowych. W ścianach naczyń, gdzie osiadają makrofagi, tiolakton jest uwalniany z LDL wywołując oksydację cholesterolu i nienasyconych lipidów, uszkodzenia miejscowe oraz agregację płytek, wzmożone uwalnianie czynników krzepnięcia, miohyperplazję, odkładanie siarczanów glikozoaminoglikanów, a także poważne w skutkach włóknienie i wapnienie płytek miażdżycowych [55].

W patologii miażdżycy następują zmiany powodujące uszkodzenia śródbłonka, nadmierną krzepliwość krwi i proliferację mięśniówki naczyń oraz zmiany w substancji zewnątrzkomórkowej. Z badań ostatnich lat wynika, że podwyższony poziom homocysteiny ma istotny udział w tych procesach.

Toksyczne działanie homocysteiny na śródbłonek

Śródbłonek naczyniowy, pod wpływem czynników powstających podczas krzepnięcia krwi i hormonów tkankowych, takich jak: acetylcholina, histamina, bradykinina, a także w odpowiedzi na ciśnienie przepływającej krwi, uwalnia substancję nazywaną EDRF (ang. *endothelium derived relaxing factors*), tlenek azotu (NO) pełniący ważną rolę w regulacji homeostazy i relaksacji naczyń. Wydaje się, że toksyczny wpływ homocysteiny na funkcjonowanie śródbłonka może wywoływać początkowe fazy rozwoju miażdżycy [58]. Inkubacja *in vitro* komórek śródbłonka z homocysteiną prowadzi do zmniejszenia żywotności i odrywania się komórek od podłoża [13] oraz stymuluje adhezję granulocytów obojętnochłonnych i niszczenie przez nie warstwy komórek śródbłonka [12]. W organizmie uszkodzenie komórek

śródbłonka powoduje adhezję płytek krwi do odsłoniętego kolagenu ścian naczyń stwarzające warunki do powstawania skrzepów, a także stymuluje produkcję cytokin i czynników wzrostowych (np. PDGF), które oddziałują na otaczające je miocyty zwiększając ich proliferację.

Efekt homocysteiny przypisywany jest przede wszystkim stresowi oksydacyjnemu związanemu z reaktywnością grup tiolowych tego aminokwasu [5, 35], które w obecności jonów żelaza i miedzi generują wolne rodniki, takie jak: rodniki tlenowe i rodniki homocysteinowe. Uważa się to za przyczynę uszkodzeń w komórkach, gdyż antyoksydanty, np. katalaza, zmniejszają cytotoksyczność homocysteiny [16]. Stres oksydacyjny powoduje obniżenie poziomu glutationu w komórce, oksydację lipidów, uszkodzenia błon i struktury DNA, a także aktywację proteaz, nukleaz i kinaz białkowych [25]. Wysoki poziom utlenionych form lipidów jest skorelowany ze zmniejszoną przeżywalnością komórek śródbłonka [86]. Wiadomo, że utlenione cząsteczki LDL niszczą błony i organella komórkowe, hamują syntezę prostacyclin [77], aktywują kaspazy i sfingomielinazy [28], a także powodują, że komórki śródbłonka stają się wrażliwe na apoptotyczne sygnały receptora Fas [70]. Utlenione cząsteczki LDL są łatwiej pobierane przez makrofagi, które następnie osiadają pod śródbłonkiem uszkadzając strukturę naczynia [71], a dodatkowym czynnikiem wzmagającym ten proces jest większa liczba receptorów dla LDL na oksydacyjnie zmodyfikowanych makrofagach [23]. Prowadzi to do gromadzenia cholesterolu w ścianach naczyń i powstawania płytek miażdżycowych. Z kolei oksydacyjne modyfikacje białek mogą powodować zmiany ich struktury przestrzennej, podatność na proteolizę, a także wpływać na ich posttranslacyjne przemiany [3]. Nadtlenek wodoru, przez zwiększenie napływu jonów wapnia do komórki, stwarza też sygnał indukujący syntezę czynnika aktywującego płytki, co stymuluje adhezję neutrofilii do powierzchni śródbłonka [63].

Wolne rodniki wpływają też na zmianę stężenia tlenu azotu uwalnianego przez śródbłonek. Efektywne funkcjonowanie tlenu azotu odbywa się przy udziale peroksydazy glutationu (GPx), która zapobiega jego inaktywacji redukując utlenione lipidy. Homocysteina uszkadza enzymy antyoksydacyjne, a głównie właśnie wewnątrzkomórkową izoformę GPx, zmniejszając w ten sposób biologiczną dostępność tlenu azotu, mimo że jego produkcja mierzona poziomem mRNA i białka enzymu NOS nie zmienia się [81].

W komórkach śródbłonka opisano także uszkodzenia struktury DNA w wyniku działania wolnych rodników generowanych przez homocysteinę. Obserwowany wzrost aktywności polimerazy poli-ADPrybozy, który jest stymulowany przez uszkodzenia syntezy jednej z nici DNA, prowadzi do wyczerpania puli NAD^+ i śmierci komórki [4, 78]. Dodatkowo, oprócz indukcji zaburzeń w strukturze DNA, homocysteina bezpośrednio wywiera hamujący wpływ na syntezę kwasów nukleinowych, powodując niekorzystną dystrybucję grup metylowych dla kofaktorów syntezy nukleotydów. Obniżenie syntezy DNA i zahamowanie podziałów komór-

kowych jest selektywnym działaniem homocysteiny na komórki śródbłonka (w odróżnieniu od odmiennego wpływu na komórki mięśni gładkich naczyń). W śródbłonku obserwuje się wzrost aktywności syntazy SAH, której nagromadzony produkt – SAH jest inhibitorem transmetylacji. Zaindukowana przez homocysteinę hypometylacja jest związana z obniżeniem posttranslacyjnej metylacji białka p21^{ras} i zmniejszeniem jego powinowactwa do błony komórkowej [44]. Przypuszcza się, że ten proces jest odpowiedzialny za spadek aktywowania MAP kinaz uczestniczących w regulacji podziałów komórkowych, co w efekcie zatrzymuje komórki śródbłonka w fazie G1 cyklu komórkowego [87].

Ostatnio rozpoczęto też prace nad molekularnym działaniem homocysteiny na ekspresję niektórych genów. Wykryto jej wpływ na indukcję *in vitro* ekspresji białka GRP78 [65, 40] i sekwencji homologicznej z kompleksem regulującym translację mRNA – EF-1 delta [9]. Podobne zjawisko obserwuje się *in vivo*, gdy hiperhomocysteinemia jest wywołana przez defekt genu CBS [9, 65]. Gen *GRP78* koduje białko opiekuńcze łączące się z siateczką endoplazmatyczną i ułatwiające przechodzenie do niej białek, gdzie są postranslacyjnie modyfikowane i kierowane do innych organelli. Uważa się, że akumulacja w siateczce endoplazmatycznej uszkodzonych białek jest spowodowana indukcją *GRP78* wywoływanej specyficznie przez homocysteinę. Tym mechanizmem można więc tłumaczyć wpływ homocysteiny na selektywną inhibicję ekspresji powierzchniowej niektórych białek, takich jak trombomodulina lub sekrecji czynnika von Willebranda [45, 46]. Aktywacja wymienionych genów w połączeniu z redukcją ekspresji GPx i czynnika B wzmacniającego komórki NK (ang. *natural killer-enhancing factor B*) wskazuje na rolę homocysteiny we wzmacnianiu cytotoksycznej odpowiedzi komórek na stres oksydacyjny [65]. Inne geny, dla których opisano regulację przez homocysteinę, to gen kodujący enzym o aktywności dehydrogenazy metylenotetrahydrofolianowej i cyklohydrolazy metenylo-tetrahydrofolianu, który bierze udział w metabolizmie homocysteiny poprzez szlak remetylacji, gen *ATF-4* (ang. *activating transcription factor*), gen *RTP* [40]. Wyizolowano również gen *RIT42* (ang. *reduced in tumor*), który w komórkach śródbłonka jest indukowany przez homocysteinę, a którego wprowadzenie do komórek nowotworowych powoduje zahamowanie ich proliferacji [43].

Wpływ homocysteiny na procesy krzepliwości krwi

Jednym z efektów w patologii miażdżycy jest również nieprawidłowy przebieg procesów krzepnięcia krwi, powodujący powstawanie zatorów w naczyniach. Prawidłowy śródbłonek ma system mechanizmów antykoagulacyjnych i regulujących fibrynoлизę. Homocysteina hamuje niektóre z tych funkcji śródbłonka. Jednym z ważniejszych systemów zapobiegających koagulacji jest aktywacja kaskady procesów z udziałem enzymu, tzw. białka C, w której kofaktorami jest trombina oraz

trombomodulina powstająca w śródbłonku. Wykazano, że homocysteina, redukując mostki dwusiarczkowe trombomoduliny, zmniejsza jej udział w pośredniczeniu aktywacji białka C [33]. Pod wpływem homocysteiny ulega uszkodzeniu również sekrecja i zakotwiczenie trombomoduliny na powierzchni komórek śródbłonka [46]. Innym mechanizmem antykoagulacyjnym jest oddziaływanie antytrombiny III z heparyno-podobnymi proteoglikanami obecnymi na powierzchni śródbłonka, powodujące inhibicję czynników krzepliwości, takich jak czynnik Xa, VIIa. Wysokie stężenie homocysteiny zmniejsza poziom antytrombiny III związanej na powierzchni komórek [59]. W śródbłonku odbywa się synteza prostacyklin i tlenu azotu, które są związkami obniżającymi agregację płytek. Stwierdzono, że w hodowlach komórkowych homocysteina i SAH inhibują syntezę prostacyklin [88], a przez generację wolnych rodników inaktywują tlenek azotu [81]. Homocysteina, przez inhibicję aktywności śródbłonkowej ADP-azy, zwiększa stężenie ADP – nukleotydu mającego wpływ na agregację płytek krwi [30] oraz powoduje wzrost aktywności prokoagulacyjnego czynnika TF (ang. *tissue factor*) [22].

Komórki śródbłonka wpływają na utrzymanie prawidłowego przepływu krwi również przez regulację procesów fibrylizy. Poziom plazminy – czynnika zapobiegającego procesom fibrynyacji – jest regulowany przez syntetyzowany w śródbłonku tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA) oraz inhibitor aktywatora plazminogenu (PAI-1). Działanie homocysteiny jest związane ze zmniejszeniem aktywacji plazminogenu. Dzieje się to przez zahamowanie łączenia t-PA do aneksyny II, będącej receptorem warunkującym działanie czynników fibrynolitycznych [24], jak również przez zwiększenie inkorporacji Lp(a) do ściany naczyń [32]. Wysokie stężenie Lp(a) inhibuje fibrylizę, gdyż obniża łączenie aneksyny z plazminogenem [24, 18] i stymuluje komórki śródbłonka do uwalniania inhibitora aktywatora plazminogenu PAI-1 [31].

Wpływ homocysteiny na miocyty naczyń

Komórki miocytów ścian naczyń podlegają w odpowiedzi na miażdżycogenne działanie homocysteiny procesom biochemicznym odmiennym niż komórki śródbłonka. Homocysteina stymuluje proliferację miocytów prowadząc do patologicznego zgrubienia ścian i zwężenia światła naczyń krwionośnych [7]. Nie wiadomo jednak, czy przeważa bezpośredni wpływ homocysteiny, czy pośredni – poprzez inne typy komórek. Jak już wspomniano, uszkodzenie śródbłonka powoduje agregację w miejscach uszkodzeń płytek krwi i uwalnianie przez nie PDGF, który jest czynnikiem mitogennym dla miocytów. Homocysteina dodatkowo zwiększa działanie PDGF prawdopodobnie przez uszkodzenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych [60]. Stres oksydacyjny wywołany bezpośrednim działaniem homocysteiny powoduje także aktywację czynnika transkrypcyjnego NFκB i ekspresję indukowalnej izoformy syntazy tlenu azotu (iNOS). Zwiększenie wytwarzania tlenu azotu przy-

czynia się dodatkowo do powstania odczynu zapalnego, który charakteryzuje wczesne procesy miażdżycowe [89].

Określenie roli homocysteiny jako agonisty receptorów NMDA w układzie nerwowym [39, 64] przyczyniło się do rozpoczęcia badań na innych typach komórek nad mitogennym wpływem tego aminokwasu przez mechanizm receptorowy. Wyniki tych poszukiwań wykazały, że homocysteina aktywuje czynnik receptorowo-podobny, co powoduje zwiększone wytwarzanie diacyloglicerolu i indukcję kinazy białkowej C. Obserwuje się również zwielokrotnioną transkrypcję *c-fos* i *c-myc*, której zahamowanie przez inhibitory receptora NMDA ogranicza tempo proliferacji [11]. Zaproponowano hipotezę o zależnej od MAP kinaz transdukcji sygnałów, gdyż w miocytach z zaindukowaną przez homocysteinę transkrypcją *c-fos* następuje aktywacja ERK2 [6]. Poza tym opisano wzrost poziomu mRNA cyklin A i D1 [79] oraz podwyższony poziom kinaz cyklino-zależnych [21, 49], które regulują, jak wiadomo, wchodzenie w fazę S cyklu komórkowego i rozpoczynanie mitozy. Uważa się więc, że być może w błonie komórkowej lub w cytoplazmie są receptory dla homocysteiny, których stymulacja prowadzi do powstania kaskady przekaźników sygnałów z powierzchni komórki do jądra i w rezultacie wzrost syntezy DNA.

Wpływ homocysteiny na substancję zewnątrzkomórkową

Substancja zewnątrzkomórkowa, tworząca otoczenie dla komórek ścian naczyń, jest złożona głównie z białkowych elementów, takich jak kolagen i elastyna, które nadają naczyniom elastyczność i sprężystość. Stres oksydacyjny w naczyniach krwionośnych powoduje wzrost stężenia cytokin, które stymulują aktywność elastaz, co prowadzi do ubytku włókien elastynowych bez zmian w ilości włókien kolagenowych. Takie zaburzenia w strukturze przyczyniają się do stwierdzanych zmian naczyniowych w procesach miażdżycowych [26]. Wykazano ponadto, że homocysteina działa także w sposób bezpośredni, indukując w naczyniach krwionośnych nasilenie procesów elastynolizy przez uaktywnienie proteaz serynowych [38] i zastępowanie komponentów elastycznych składnikami włóknistymi [69]. Komórki miocytów hodowane w obecności homocysteiny szybciej się namnażają i produkują zwiększoną ilość kolagenu [51, 80]. Jednocześnie od dawna wiadomo, że w hiperhomocysteinemii występują zmiany strukturalne włókien kolagenowych polegające na redukowaniu połączeń sieciujących, co powoduje destabilizację włókien [48, 53]. Wiązania sieciujące w kolagenie i elastynie są inicjowane przez oksydazę lizylową. Przy niedoborze wit. B₆ stwierdzono zmniejszenie aktywności oksydazy lizylowej obniżające ilość reszt lizynowych w elastynie, co zaburza sieciowanie i powstawanie fibrylli [57]. Niedobór tej witaminy – kofaktora CBS – sugerowałby wpływ homocysteiny na ten proces. Jednak homocysteina w fizjologicznych stężeniach *in vitro* nie hamuje oksydazy lizylowej [53]. Wykazano natomiast, że tiolakton homocysteiny jest nieodwracalnym inhibitorem tego enzymu, a więc

akumulacja tego związku, a nie samej homocysteiny, może być przyczyną zmniejszonego powstawania włókien, a tym samym zmian w substancji międzykomórkowej [47].

Ostatnio stwierdzono, że zwiększenie stężenia międzykomórkowej cząsteczki adhezyjnej ICAM-1 (ang. *intercellular adhesion molecule*) wpływa na adhezję i migrację leukocytów przez warstwę komórek śródbłonka, co jest uważane za krytyczny moment w inicjacji i postępie procesów miażdżycowych. Wydaje się, że wysoki poziom homocysteiny, trójglicerydów, cholesterolu, t-PA ma wpływ na zwiększenie się liczby cząsteczek adhezyjnych ICAM-1, co zwiększa ryzyko miażdżycy i zawału serca [68].

WSPÓLDZIAŁANIE HOMOCYSTEINY Z TLENKIEM AZOTU A PROCESY MIAŻDŻYCOWE

Tlenek azotu, nazywany czynnikiem relaksacyjnym (EDRF), syntetyzowany jest przez obecną w śródbłonku syntazę NO (eNOS) w odpowiedzi na ciśnienie wywołwane przepływem krwi, co jest sygnałem do rozkurczu mięśni gładkich i rozszerzenia naczyń. Szereg warunków związanych z ryzykiem rozwoju miażdżycy, m.in. podwyższone stężenie homocysteiny we krwi, powoduje upośledzenie wydzielania EDRF. Z kolei wiadomo, że grupy tiolowe w obecności tlenu azotu tworzą S-nitrozotiole. Są to związki o postulowanym działaniu przeciwskrzepowym i powodującym rozszerzenie naczyń krwionośnych, a więc przypisuje im się rolę w łagodzeniu uszkodzeń wywołanych przez homocysteinę [83]. S-nitrozotiole – mając stosunkowo większą stabilność i brak reaktywności względem rodników tlenowych – służą jako donory NO po rozpadzie wiązania S-N uwalnia się ponownie tlenek azotu [1]. Związek ten uczestniczy w reakcjach nitrozytacji miejsc nukleofilowych aminokwasów i białek regulując ich funkcjonowanie [74]. S-nitrozyłacja t-PA stymuluje procesy antykoagulacyjne i rozszerzanie się naczyń [76]. Podobnie czynnik XIII – transglutaminaza katalizująca sieciowanie monomerów fibryny podczas koagulacji – jest inhibowany po S-nitrozyłacji [8]. S-nitrozo-proteiny powodują również supresję proliferacji mięśni gładkich naczyń krwionośnych [17]. W reakcjach nitrozytacji najbardziej reaktywne są tiole. Nitrozyłacja homocysteiny prowadzi do powstania S-nitrozohomocysteiny, która nie stymuluje powstawania nadtlenu wodoru i nie przechodzi konwersji do tiolaktonu, nie powoduje więc dysfunkcji komórek [75]. Prawidłowy śródbłonek moduluje więc niekorzystny wpływ homocysteiny dzięki produkcji EDRF i nitrozyłacji. Natomiast toksyczny wpływ homocysteiny może wynikać z pogorszenia tworzenia S-nitrozohomocysteiny ze względu na brak równowagi między produkcją EDRF przez uszkodzony śródbłonek a podwyższonym poziomem homocysteiny we krwi [75].

Stymulacja produkcji tlenu azotu może służyć jako mechanizm detoksyfikacji przy hiperhomocysteinemii. W obecności agonisty tlenu azotu, bradykininy, homocysteina powoduje podwyższenie poziomu S-nitrozopochodnych, czemu towarzyszy większa aktywność syntazy tlenu azotu i transkrypcja genu *NOS3* [82]. Wydaje się więc, że homocysteina w obecności tlenu azotu może mieć pozytywny wpływ antymiażdżycowy, o ile jej stężenie nie przekroczy poziomu, przy którym efekt korzystny będzie niweczony przez ujemne działanie homocysteiny.

UWAGI KOŃCOWE

Z przedstawionych danych widać, że mechanizm działania homocysteiny w procesie powstawania zmian miażdżycowych jest wielostronny ze względu na jej wpływ na różnorodne procesy komórkowe. Stężenie homocysteiny w surowicy jest odwrotnie proporcjonalne do poziomu folianów. Zapobieganie hiperhomocysteinemii w surowicy krwi polega zatem na dostarczaniu głównie folianów, wit. B₁₂ i B₆ – związków, które biorą udział w utylizacji homocysteiny [52]. Istnieje wiele opisanych terapii, w których stosowanie kwasu foliowego (5–10 mg dziennie) i witamin z grupy B powoduje znaczne obniżenie stężenia homocysteiny [37, 67]. Podobny efekt powoduje również podanie metioniny czy nawet betainy, a związki te mogą być podawane osobom z upośledzonym wchłanianiem folianów [91]. W pewnych szczególnych przypadkach, np. ścisłych diet wegetariańskich, może nastąpić niedobór wit. B₁₂, co odgrywa istotną rolę w potencjalnej patologii miażdżycy ludzi stosujących te diety.

LITERATURA

- [1] ARNELLE DR, STAMLER JR. NO⁺, NO and NO⁻ donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. *Arch Biochem Biophys* 1995; **318**: 279–285.
- [2] AVIRAM M, ROSENBLAT M. Macrophage-mediated oxidation of extracellular low density lipoprotein requires an initial binding of the lipoprotein to its receptor. *J Lipid Res* 1994; **35**: 385–398.
- [3] BLAZQUEZ M, FOMINAYA JM, HOFSTEENGE J. Oxidation of sulfhydryl groups of ribonuclease inhibitor in epithelial cells is sufficient for its intracellular degradation. *J Biol Chem* 1996; **271**: 18638–18642.
- [4] BLUNDELL G, JONES BG, ROSEF A, TUDBALL N. Homocysteine mediated endothelial cell toxicity and its amelioration. *Atherosclerosis* 1996; **122**: 163–172.
- [5] BLUNDELL G, ROSE FA, TUDBALL N. Homocysteine induced endothelial cell toxicity and its protection. *Biochem Soc Trans* 1994; **22**: 341S.

- [6] BROWN JC, ROSENQUIST TH, MONAGHAN DT. ERK2 activation by homocysteine in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **251**: 669–676.
- [7] CAMPBELL JH, CAMPBELL GR. The cell biology of atherosclerosis – new developments. *Aust NZJ Med* 1997; **27**: 497–500.
- [8] CATANI MV, BERNASSOLA F, ROSSI A, MELINO G. Inhibition of clotting factor XIII activity by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **249**: 275–278.
- [9] CHACKO G, LING Q, HAJJAR KA. Induction of acute translational response genes by homocysteine. Elongation factors-1alpha, -beta, and -delta. *J Biol Chem* 1998; **273**: 19840–19846.
- [10] CRONSTEIN BN. Molecular therapeutics. Methotrexate and its mechanism of action. *Arthritis Rheum* 1996; **39**: 1951–1960.
- [11] DALTON M, GADSON PF JR, WRENN RW, ROSENQUIST TH. Homocysteine signal cascade: production of phospholipids, activation of protein kinase C, and the induction of c-fos and c-myc in smooth muscle cells. *FASEB J* 1997; **11**: 703–711.
- [12] DUDMAN NP, TEMPLE SE, GUO XW, FU W, PERRY MA. Homocysteine enhances neutrophil-endothelial interactions in both cultured human cells and rats *in vivo*. *Circ Res* 1999; **84**: 409–416.
- [13] DUDMAN NP, HICKS C, WANG J, WILCKEN DE. Human arterial endothelial cell detachment *in vitro*: its promotion by homocysteine and cysteine. *Atherosclerosis* 1991; **91**: 77–83.
- [14] DUELL PB, MALINOW MR. Homocyst(e)ine: an important risk factor for atherosclerotic vascular disease. *Curr Opin Lipidol* 1997; **8**: 28–34.
- [15] DURAND P, PROST M, BLACHE D. Folate deficiencies and cardiovascular pathologies. *Clin Chem Lab Med* 1998; **36**: 419–429.
- [16] EMSLEY AM, JEREMY JY, GOMES GN, ANGELINI GD, PLANE F. Investigation of the inhibitory effects of homocysteine and copper on nitric oxide-mediated relaxation of rat isolated aorta. *Br J Pharmacol* 1999; **126**: 1034–1040.
- [17] EWING JF, YOUNG DV, JANERO DR, GARVEY DS., GRINNELL TA. Nitrosylated bovine serum albumin derivatives as pharmacologically active nitric oxide congeners. *J Pharm Exp Ther* 1997; **283**: 947–954.
- [18] EZRATTY A, SIMON DI, LOSCALZO J. Lipoprotein(a) binds to human platelets and attenuates plasminogen binding and activation. *Biochemistry* 1993; **32**: 4628–4633.
- [19] FINKELSTEIN JD, KYLE WE, MARTIN JL, PICK AM. Activation of cystathionine synthase by adenosylmethionine and adenosylethionine. *Biochem Biophys Res Commun* 1975; **66**: 81–87.
- [20] FOLSOM AR, NIETO FJ, MCGOVERN PG, TSAI MY, MALINOW MR, ECKFELDT JH, HESS DL, DAVIS CE. Prospective study of coronary heart disease incidence in relation to fasting total homocysteine, related genetic polymorphisms, and B vitamins: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation* 1998; **98**: 204–210.
- [21] FRITZER-SZEKERES M, BLÖM HJ, BOERS GH, SZEKERES T, LUBEC B. Growth promotion by homocysteine but not by homocysteic acid: a role for excessive growth in homocystinuria or proliferation in hyperhomocysteinemia? *Biochim Biophys Acta* 1998; **1407**: 1–6.
- [22] FRYER RH, WILSON BD, GUBLER DB, FITZGERALD LA, RODGERS GM. Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells. *Arterioscler Thromb* 1993; **13**: 1327–1333.
- [23] FUHRMAN B, JUDITH O, KEIDAR S, BEN-YAISH L, KAPLAN M, AVIRAM M. Increased uptake of LDL by oxidized macrophages is the result of an initial enhanced LDL receptor activity and of a further progressive oxidation of LDL. *Free Radic Biol Med* 1997; **23**: 34–46.
- [24] HAJJAR KA, JACOVINA AT. Modulation of annexin II by homocysteine: implications for atherothrombosis. *J Invest Med* 1998; **46**: 364–369.

- [25] HALLIWELL B. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis* 1993; **23 Suppl 1**:118–126.
- [26] HALLORAN BG, DAVIS VA, MCMANUS BM, LYNCH TG, BAXTER BT. Localization of aortic disease is associated with intrinsic differences in aortic structure. *J Surg Res* 1995; **59**: 17–22
- [27] HAN KH, TANGIRALA RK, GREEN SR, QUEHENBERGER O. Chemokine receptor CCR2 expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated chemotaxis in human monocytes. A regulatory role for plasma LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; **18**: 1983–1991.
- [28] HARADA-SHIBAM, KINOSHITA M, KAMIDO H, SHIMOKADO K. Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis in cultured human umbilical vein endothelial cells by common and unique mechanisms. *J Biol Chem* 1998; **273**: 9681–9687.
- [29] HARMON DL, WOODSIDE JV, YARNELL JW, MCMASTER D, YOUNG IS, MCCRUM EE, GEY KF, WHITEHEAD AS, EVANS AE. The common thermolabile variant of methylene tetrahydrofolate reductase is a major determinant of mild hyperhomocysteinaemia. *Q J Med* 1996; **89**: 571–577
- [30] HARPEL P.C, ZHANG X, BORTH W. Homocysteine and homeostasis: predisposing to thrombosis. *J Nutr* 1996; **126(4Suppl)**:1285S–89S.
- [31] HARPEL PC, BORTH W. Identification of mechanisms that may modulate the role of lipoprotein(a) in thrombosis and atherogenesis. *Ann Epidemiol* 1992; **2**:413–417.
- [32] HARPEL PC, CHANG VT, BORTH W. Homocysteine and other sulfhydryl compounds enhance the binding of lipoprotein(a) to fibrin: a potential biochemical link between thrombosis, atherogenesis, and sulfhydryl compound metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 10193–10197.
- [33] HAYASHI T, HONDA G, SUZUKI K. An atherogenic stimulus homocysteine inhibits cofactor activity of thrombomodulin and enhances thrombomodulin expression in human umbilical vein endothelial cells. *Blood* 1992; **79**: 2930–2936.
- [34] HOUSE JD, BROSNAN ME, BROSNAN JT. Renal uptake and excretion of homocysteine in rats with acute hyperhomocysteinemia. *Kidney Int* 1998; **54**:1601–1607.
- [35] HULTBERG B, ANDERSSON A, ISAKSSON A. Protein binding of homocysteine and other thiols in HeLa cell cultures after addition of homocysteine and copper ions. *Clin Chim Acta* 1998; **269**: 175–184.
- [36] JAKUBOWSKI H. Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures. Possible mechanism for pathological consequences of elevated homocysteine levels. *J Biol Chem* 1997; **272**: 1935–1942.
- [37] JANSSEN MJ, VAN DEN BERG M, STEHOUWER CD, BOERS GH. Hyperhomocysteinaemia: a role in the accelerated atherogenesis of chronic renal failure? *Neth J Med* 1995; **46**: 244–251.
- [38] JOURDHEUIL-RAHMANI D, ROLLAND PH, ROSSETE, BRANCHEREAU A, GARCON D. Homocysteine induces synthesis of a serine elastase in arterial smooth muscle cells from multi-organ donors. *Cardiovasc Res* 1997; **34**: 597–602.
- [39] KIM WK, PAE YS. Involvement of N-methyl-d-aspartate receptor and free radical in homocysteine-mediated toxicity on rat cerebellar granule cells in culture. *Neurosci Lett* 1996; **216**: 117–120.
- [40] KOKAME K., KATO H, MIYATA T. Homocysteine-respondent genes in vascular endothelial cells identified by differential display analysis. GRP78/BiP and novel genes. *J Biol Chem* 1996; **271**: 29659–29665.
- [41] KONECKY N, MALINOW MR, TUNICK PA, FREEDBERG RS, ROSENZWEIG BP, KATZ ES, HESS DL, UPSON B, LEUNG B, PEREZ J, KRONZON I. Correlation between plasma homocyst(e)ine and aortic atherosclerosis. *Am Heart J* 1997; **133**: 534–540.

- [42] KUTZBACH C, STOKSTAD EL. Mammalian methylenetetrahydrofolate reductase. Partial purification, properties, and inhibition by S-adenosylmethionine. *Biochim Biophys Acta* 1971; **250**: 459–477.
- [43] KURDISTANI SK, ARIZTI P, REIMER CL, SUGRUE MM, AARONSON SA, LEE SW. Inhibition of tumor cell growth by RTP/rit42 and its responsiveness to p53 and DNA damage. *Cancer Res* 1998; **58**: 4439–4444.
- [44] LEE ME, WANG H. Homocysteine and hypomethylation. A novel link to vascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 1999; **9**: 49–54.
- [45] LENTZ SR, SADLER JE. Homocysteine inhibits von Willebrand factor processing and secretion by preventing transport from the endoplasmic reticulum. *Blood* 1993; **81**: 683–689.
- [46] LENTZ SR, SADLER JE. Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine. *J Clin Invest* 1991; **88**: 1906–1914.
- [47] LIU G, NELLAIAPPAN K, KAGAN HM. Irreversible inhibition of lysyl oxidase by homocysteine thiolactone and its selenium and oxygen analogues. Implications for homocystinuria. *J Biol Chem* 1997; **272**: 32370–32377.
- [48] LUBEC B, FANG-KIRCHER S, LUBEC T, BLOM HJ, BOERS GH. Evidence for McKusicks hypothesis of deficient collagen cross-linking in patients with homocystinuria. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1315**: 159–162.
- [49] LUBEC B, LABUDOVA O, HOEGER H, MUEHL A, FANG-KIRCHER S, MARX M, MOSGOELLER W, GIALAMAS J. Homocysteine increases cyclin-dependent kinase in aortic rat tissue. *Circulation* 1996; **94**: 2620–2625.
- [50] MAGOTT M. Homocysteina nielipidowym czynnikiem patogenezy miażdżycy. *Post Hig Med Dośw* 1998; **52**: 259–267.
- [51] MAJORS A, EHRHART LA, PEZACKA EH. Homocysteine as a risk factor for vascular disease. Enhanced collagen production and accumulation by smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; **17**: 2074–2081.
- [52] MALINOW MR. Homocyst(e)ine, vitamins and genetic interactions in vascular disease. *Can J Cardiol* 1999; **15 Suppl B**: 31B–34B.
- [53] MASSE PG, COLOMBO VE, GERBER F, HOWELL DS, WEISER H. Morphological abnormalities in vitamin B6 deficient tarsometatarsal chick cartilage. *Scanning Microsc* 1990; **4**: 667–673.
- [54] MARKLE HV. Coronary artery disease associated with *Helicobacter pylori* infection is at least partially due to inadequate folate status. *Med Hypotheses* 1997; **49**: 289–292.
- [55] McCULLY KS. Chemical pathology of homocysteine. I. Atherogenesis. *Ann Clin Lab Sci* 1993; **23**: 477–493.
- [56] McCULLY KS, VEZERIDIS MP. Histopathological effects of homocysteine thiolactone on epithelial and stromal tissues. *Exp Mol Pathol* 1989; **51**: 159–170.
- [57] MYERS BA, DUBICK MA, REYNOLDS RD, RUCKER RB. Effect of vitamin B-6 (pyridoxine) deficiency on lung elastin cross-linking in perinatal and weanling rat pups. *Biochem J* 1985; **229**: 153–160.
- [58] NAPPO F, DE ROSA N, MARFELLA R, DE LUCIA D, INGROSSO D, PERNA AF, FARZATI B, GIUGLIANO D. Impairment of endothelial functions by acute hyperhomocysteinemia and reversal by antioxidant vitamins. *JAMA* 1999; **281**: 2113–2118.
- [59] NISHINAGAM, OZAWA T, SHIMADA K. Homocysteine, a thrombogenic agent, suppresses anticoagulant heparan sulfate expression in cultured porcine aortic endothelial cells. *J Clin Invest* 1993; **92**: 1381–1386.
- [60] NISHIO E, WATANABE Y. Homocysteine as a modulator of platelet-derived growth factor action in vascular smooth muscle cells: a possible role for hydrogen peroxide. *Br J Pharmacol* 1997; **122**: 269–274.
- [61] NOWAKOWSKI P, WOCIAL B, BERENT H, GURBA H. Homocysteina jako czynnik ryzyka zmian naczyniowych. *Pol Arch Med Wewn* 1997; **97**: 281–286.

- [62] O K, LYNN EG, CHUNG YH, SIOW YL, MAN RY, CHOY PC. Homocysteine stimulates the production and secretion of cholesterol in hepatic cells. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1393**: 317–324.
- [63] OKAYAMA N, COE L, OSHIMA T, ITOH M, ALEXANDER JS. Intracellular mechanisms of hydrogen peroxide-mediated neutrophil adherence to cultured human endothelial cells. *Microvasc Res* 1999; **57**: 63–74.
- [64] OLNEY JW, PRICE MT, SALLES KS, LABRUYERE J, RYERSON R, MAHAN K, FRIERDICH G, SAMSON L. L-homocysteic acid: an endogenous excitotoxic ligand of the NMDA receptor. *Brain Res Bull* 1987; **19**: 597–602.
- [65] OUTINEN PA, SOOD SK, LIAW PC, SARGE KD, MAEDA N, HIRSH J, RIBAU J, PODOR TJ, WEITZ JI, AUSTIN RC. Characterization of the stress-inducing effects of homocysteine. *Biochem J* 1998; **332**: 213–221.
- [66] PERNA AF, DE SANTO NG, INGROSSO D. Adverse effects of hyperhomocysteinemia and their management by folic acid. *Miner Electrolyte Metab* 1997; **23**: 174–178.
- [67] REFSUM H, UELAND PM, NYGARD O, VOLLSET SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 1998; **49**: 31–62.
- [68] RIDKER PM, HENNEKENS CH, ROITMAN-JOHNSON B, STAMPFER MJ, ALLEN J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet* 1998; **351**: 88–92.
- [69] ROLLAND PH, FRIGGI A, BARLATIER A, PIQUET P, LATRILLE V, FAYE MM, GUILLOU J, CHARPIOT P, BODARD H, GHIRINGHELLI O. Hyperhomocysteinemia-induced vascular damage in the minipig. Captopril-hydrochlorothiazide combination prevents elastic alterations. *Circulation* 1995; **91**: 1161–1174.
- [70] SATA M, WALSH K. Oxidized LDL activates fas-mediated endothelial cell apoptosis. *J Clin Invest* 1998; **102**: 1682–1689.
- [71] SAVION N, ZAVARO O, KOTEV-EMETH S. Oxidation decreases low density lipoprotein association with the subendothelium extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **245**: 497–501.
- [72] SELHUB J, MILLER JW. The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. *Am J Clin Nutr* 1992; **55**: 131–138.
- [73] SEMAN LJ, McNAMARA JR, SCHAEFER EJ. Lipoprotein(a), homocysteine, and remnant-like particles: emerging risk factors. *Curr Opin Cardiol* 1999; **14**: 186–191.
- [74] SIMON DI, MULLINS ME, JIA L, GASTON B, SINGEL DJ, STAMLER JS. Polynitrosylated proteins: characterization, bioactivity, and functional consequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 4736–4741.
- [75] STAMLER JS, OSBORNE JA, JARAKI O, RABBANI LE, MULLINS M, SINGEL D, LOSCALZO J. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest* 1993; **91**: 308–318.
- [76] STAMLER JS, SIMON DI, JARAKI O, OSBORNE JA, FRANCIS S, MULLINS M, SINGEL D, LOSCALZO J. S-nitrosylation of tissue-type plasminogen activator confers vasodilatory and antiplatelet properties on the enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 8087–8091.
- [77] THORIN E, HAMILTON CA, DOMINICZAK MH, REID JL. Chronic exposure of cultured bovine endothelial cells to oxidized LDL abolishes prostacyclin release. *Arterioscler Thromb* 1994; **14**: 453–459.
- [78] THIES RL, AUTOR AP. Reactive oxygen injury to cultured pulmonary artery endothelial cells: mediation by poly(ADP-ribose) polymerase activation causing NAD depletion and altered energy balance. *Arch Biochem Biophys* 1991; **286**: 353–363.
- [79] TSAI JC, PERRELLA MA, YOSHIZUMI M, HSIEH CM, HABER E, SCHLEGEL R, LEE ME. Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 6369–6373.

- [80] TYAGI SC. Homocysteine redox receptor and regulation of extracellular matrix components in vascular cells. *Am J Physiol* 1998; **274**: C396–405.
- [81] UPCHURCH GR JR., WELCH GN, FABIAN AJ, FREEDMAN JE, JOHNSON JL, KEANEY JF, LOSCALZO J. Homocysteine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1997; **272**: 17012–17017.
- [82] UPCHURCH GR JR, WELCH GN, FABIAN AJ, PIGAZZI A, KEANEY JF JR, LOSCALZO J. Stimulation of endothelial nitric oxide production by homocyst(e)ine. *Atherosclerosis* 1997; **132**: 177–185.
- [83] UPCHURCH GR JR, WELCH GN, LOSCALZO J. Homocysteine, EDRF, and endothelial function. *J Nutr* 1996; **126(4 Suppl)**: 1290S–4S.
- [84] VAN DER MOLEN EF, HIIPAKKA MJ, VAN LITH-ZANDERS H, BOERS GH, VAN DEN HEUVEL LP, MONNENS LA, BLOM HJ. Homocysteine metabolism in endothelial cells of a patient homozygous for cystathionine beta-synthase (CS) deficiency. *Thromb Haemost* 1997; **78**: 827–833.
- [85] VERHOEFF BJ, TRIP MD, PRINS MH, KASTELEIN JJ, REITSMA PH. The effect of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation on levels of homocysteine, folate, vitamin B12 and on the risk of premature atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1998; **141**: 161–166.
- [86] VOUTILAINEN S, MORROW JD, ROBERTS LJ 2ND, ALFTHAN G, ALHO H, NYSSONEN K, SALONEN JT. Enhanced *in vivo* lipid peroxidation at elevated plasma total homocysteine levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; **19**: 1263–1266.
- [87] WANG H, YOSHIZUMI M, LAI K, TSAI JC, PERRELLA MA, HABER E, LEE ME. Inhibition of growth and p21ras methylation in vascular endothelial cells by homocysteine but not cysteine. *J Biol Chem* 1997; **272**: 25380–25385.
- [88] WANG J, DUDMAN NP, WILCKEN DE. Effects of homocysteine and related compounds on prostacyclin production by cultured human vascular endothelial cells. *Thromb Haemost* 1993; **70**: 1047–1052.
- [89] WELCH GN, UPCHURCH GR JR, FARIVAR RS, PIGAZZI A, VU K, BRECHER P, KEANEY JF JR, LOSCALZO J. Homocysteine-induced nitric oxide production in vascular smooth-muscle cells by NF-kappa B-dependent transcriptional activation of Nos2. *Proc Assoc Am Phys* 1998; **110**: 22–31.
- [90] WILCKEN DE. Novel risk factors for vascular disease: the homocysteine hypothesis of cardiovascular disease. *J Cardiovasc Risk* 1998; **5**: 217–221.
- [91] WILCKEN DE, WILCKEN B. B vitamins and homocysteine in cardiovascular disease and aging. *Ann NY Acad Sci* 1998; **854**: 361–370.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 21.10.1999 r.

Przyjęto: 28.10.1999 r.

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

O PRZYCZYNACH ZMIENNOŚCI PLANU BUDOWY KWIATU

MECHANISMS OF PATTERNING IN FLOWERS

BEATA ZAGÓRSKA-MAREK

Instytut Botaniki, Uniwersytet Wrocławski, Wrocław

Profesorowi Zygmuntowi Hejnowiczowi

W podziękowaniu za głoszenie pochwały radości badania.

Streszczenie: Zmiany podstawowego planu budowy kwiatu to zmiany osiowe oznaczające utratę dotychczasowej lub nabycie nowej tożsamości przez zawiązki kolejnych okółków albo też zmiany obwodowe zmieniające symetrię i krotność kwiatu. W pracy dokonano przeglądu najnowszych osiągnięć genetyki molekularnej wskazujących na istnienie w merystemach kwiatowych interaktywnych systemów sterujących rozmieszczeniem i tożsamością organów kwiatowych. Podkreślono znaczenie mutacji genów homeotycznych, zmieniających fenotypowe cechy kwiatu, które po ustabilizowaniu się w populacjach w wyniku selekcyjnej presji środowiska dały początek różnym liniom rozwojowym roślin okrytozalążkowych i przyczyniły się do wzrostu różnorodności kwiatowej morfologii.

(Postępy Biologii Komórki 2000; 27: 97–109)

Słowa kluczowe: Morfogenezę kwiatu, geny homeotyczne, zmienność merystyczna, symetria, tożsamość organów kwiatowych.

Summary: New developments in molecular genetics, explaining over the past decade the changes in floral organ identity and distribution, are presented and discussed. Specific mutations of homeotic genes changing flower phenotype are described as factors leading to the outstanding diversity of floral patterns present in Angiosperms. Special attention is paid to the systems interacting with each other as well as acting independently. Aspects of meristic variation are underlined as important for the development of different floral symmetry in evolutionary lines of Monocots and Eudicots.

(Advances in Cell Biology 2000; 27: 97–109)

Key words: Flower morphogenesis, homeotic genes, meristic variation, symmetry, floral organ identity.

Motto:

*Obiecało się dziewczynie
W pięciolistnym bzie kwitnące
W czterolistnej koniczynie
Na rosami srebrnej łące*

Maryla Wolska "Szczęście"

WPROWADZENIE

Morfologia, a w szczególności organografia kwiatu jako struktury konserwatywnej, jest podstawą diagnostyki taksonomicznej w systematyce roślin okrytozalążkowych od czasów Linneusza. Stabilność cech budowy kwiatu w obrębie danego taksonu stała się dla systematyków niemal dogmatem. Wynika ona ze ścisłego, ewolucyjnie wykształconego dopasowania tej budowy do pełnionej funkcji rozmnażania generatywnego z zastosowaniem charakterystycznego dla tego taksonu wzorca rozmnażania. Wzorec ten jest związany głównie, choć nie tylko (apomiksja), z biologią zapylania, na co wskazują takie tendencje ewolucyjne w kwiecie, jak: zmiana symetrii z promienistej na grzbiecistą, redukcja elementów przez ich zrastanie itp. Wszelka niestabilność budowy kwiatu mogłaby nieść ryzyko niepowodzenia w przekazywaniu genów kolejnym pokoleniom.

Stabilność w obrębie taksonów niższego rzędu, a zarazem znaczna różnorodność budowy kwiatu wśród całej grupy roślin okrytozalążkowych rodzi pytanie o mechanizmy ewolucyjnych przemian prowadzących do tej różnorodności. Dlaczego i jak zmieniała się krotność i symetria kwiatu? Dlaczego niektóre kwiaty mają pełny okwiat, a inne pojedynczy? Dlaczego jedne kwiaty są doskonałe, a inne jednopłciowe? W ciągu ostatnich lat wiele nowych informacji na temat filogenezy kwiatu – struktury, która zapewniła największy w historii życia na Ziemi sukces ewolucyjny roślinom okrytozalążkowym, przyniosły badania genetyki molekularnej. Jesteśmy w chwili obecnej świadkami bodaj największej rewolucji w poznawaniu i rozumieniu genetycznych mechanizmów rządzących procesami morfogenetycznymi u roślin.

W KWIECIE DZIAŁA SYSTEM OKREŚLAJĄCY TOŻSAMOŚĆ ZAWIĄZKÓW ORGANÓW KWIATOWYCH

Badania mutantów kwiatowych genów homeotycznych u rzodkiewnika (*Arabidopsis*) i wyżlinu (*Antirrhinum*) wskazały na istnienie trzech klas genów A, B i C, których współdziałanie decyduje o tożsamości zawiązków organów kwiatowych produkowanych przez merystem generatywny [2, 3]. Aktywność ich zmienia się podczas tworzenia się kolejnych okółków kwiatu doskonałego w sposób, który

zapewnia prawidłową sekwencję tych okółków i określoną, a zarazem różną pomiędzy kolejnymi okółkami, tożsamość elementów każdego z nich. Pierwszy poziom w kwiecie to domena aktywności genów klasy A – z okółka tego powstają działki kielicha. Drugi poziom, w którym aktywne są zarówno geny z klasy A, jak i B, to okółek płatków korony. Na poziomie trzecim nie ma już aktywności genów A, pojawiają się natomiast produkty aktywności genów klasy C i wciąż jeszcze aktywne są geny B – tu tworzą się pręciki. Na ostatnim poziomie zostają wyłączone geny klasy B, aktywność genów C zapewnia tworzącym się najwyżej w kwiecie zawiązkom tożsamość słupkowie. Domeny aktywności genów homeotycznych wszystkich trzech klas jak widać zachodzą na siebie wzdłuż osi kwiatu. Prawidłowe działanie systemu polega na precyzyjnym, regulowanym w czasie i przestrzeni włączaniu i wyłączaniu tych genów.

Elegancja powyższej propozycji polega na tym, że można funkcjonowaniem systemu ABC objaśnić ogromną liczbę ciekawych i spotykanych w różnych rodzinach odstępstw od typowego planu budowy kwiatu. Pozwala badać pochodzenie i przynależność struktur w kwiatach o nietypowym fenotypie, takich jak np. plewki i łuszczyki w kwiecie traw (łuszczyki są odpowiednikiem płatków korony), a także, dla przykładu, zrozumieć przemianę, jaka zaszła na drodze udomowiania kukurydzy, polegającą na zmianie płci kwiatów (mutacja *silky 1*) w terminalnych kwiatostanach osi bocznych dzikiego jej przodka – teosinte.

Jednym z najważniejszych dla filogenezy osiągnięć jest to, że w wyniku badań genetyki molekularnej potwierdzone zostały poglądy o liściowym pochodzeniu organów kwiatowych: potrójne mutanty genów homeotycznych systemu ABC, określających tożsamość tych organów, tworzą zamiast płatków, pręcików i słupków struktury liściopodobne. Rewersja – zjawisko polegające na spontanicznym powrocie merytemu generatywnego do tworzenia liści w miejscu organów kwiatowych, opisane dla *Impatiens balsamina* i *Anagallis arvensis* [1], spotykane również niekiedy u *Trifolium pratense* (obserwacje własne) są zapewne efektem unieczynnienia tych genów. Możliwość wpisania zjawiska reiteracji części programu rozwojowego w strategię życiową rośliny, prowadzącą do podniesienia skuteczności jej propagacji w środowisku, została niedawno udokumentowana dla egzotycznego gatunku *Nymphaea prolifera*, w którego kwiatach produkowane są nowe, służące rozmnażaniu pączki [18].

Fenotypy mutantów kwiatowych genów homeotycznych pokazują zjawisko nazwane przez Coena i Meyerowitza [9] wojną okółków (*the war of the whorls*). Efekt homeotyczny polegający na pojawieniu się prawidłowego organu w niewłaściwym dlań położeniu w roślinie objawia się w tych mutantach wkraczaniem na teren danego okółka kwiatowego obcych dla niego struktur: płatków lub słupków na teren pręcików lub pręcików na teren słupkowie.

U *Arabidopsis* przy braku aktywności genów A (mutant *apetala 1*, *apetala 2*) funkcja genów klasy C pojawia się na poziomie wszystkich czterech okółków kwia-

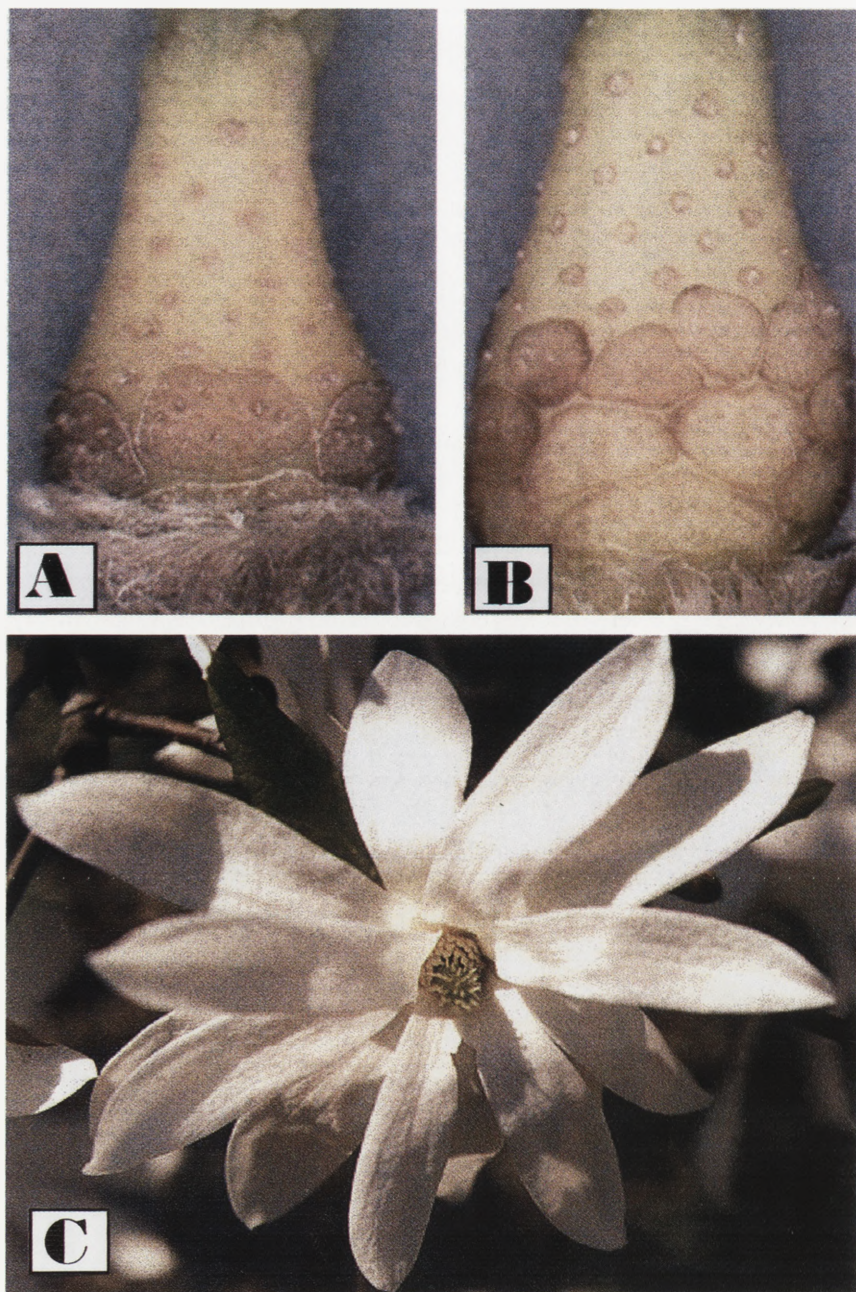
towych. Daje to efekt fenotypowy kwiatu pozbawionego okwiatu, ze słupkami na poziomie działek kielicha i pręcikami na poziomie płatków korony. Kwiat taki obupłciowy, z dwoma okółkami pręcików składa się wyłącznie z organów generatywnych. Przypomina **bezokwiatowe, obupłciowe kwiaty** w rodzinach *Piperaceae* i *Ceratophyllaceae* uznane obecnie za jedne z najpierwotniejszych. Brak aktywności B (mutant *apetala3* lub *pistillata*) oznacza, że w wyniku mutacji powstaje **jednopłciowy kwiat żeński** zawierający jedynie słupki. W tym wypadku słupki pojawiają się już na poziomie pręcików, a więc efekt fenotypowy polega znów, jak poprzednio, na zwiększeniu liczby okółków, w których występują organy o identycznej tożsamości. Szczególny efekt mnożenia okółków obserwuje się w przypadku braku aktywności C, w trzecim typie mutantu homeotycznego u *Arabidopsis*, jakim jest *agamous*. Tutaj, komplementarnie do sytuacji opisanej w przypadku mutantu *apetala 1*, brak aktywności C oznacza pojawienie się aktywności A we wszystkich okółkach. Kwiat traci swą funkcję generatywną: składa się wyłącznie z elementów okwiatu: płatków i działek kielicha. Ma charakter **kwiatu pełnego**, bowiem wraz z mutacją genów klasy C następuje utrata zdeterminowanego charakteru wzrostu wierzchołka kwiatowego. Program tworzenia kolejnych okółków, przy nieograniczonym wzroście merystemu, podlega kilkakrotnej reiteracji. Odpowiednikami wyżej wymienionych genów tożsamości organów kwiatowych u *Antirrhinum* są odpowiednio w klasie A – gen *squamosa*, w B – *deficiens*, *globosa* oraz w C – *plena*.

Scharakteryzowane wyżej fenotypy pojedynczych mutantów homeotycznych genów kwiatowych systemu ABC nie wyczerpują wszystkich możliwości odstępstw od typowego planu budowy kwiatu. Istnieje bowiem szereg interesujących mutacji podwójnych, a ponadto granice domen, w których ekspresjonowane są geny poszczególnych klas, mogą ulegać osiowym przesunięciom. Przesunięcie akropetalne granicy domeny, w której obecne są produkty genów klasy B, i rozciągnięcie się jej na czwarty okółek powoduje powstanie fenotypu *superman*. W kwiecie takim zamiast słupków pojawia się terminalnie dodatkowy okółek pręcików!

Należy na koniec zauważyć, że znaleziono ostatnio roślinę, której kwiaty łamią „boski porządek” nadany przez system ABC, bowiem słupki znajdują się tu w trzecim, a pręciki w czwartym, czyli ostatnim, okółku. Jest to *Lacandonia schismatica* (*Triuridales*). Kwiat ten, o odwróconej polarności osi generatywnej, jest w chwili obecnej analizowany przez genetyków [19] jako niezwykle atrakcyjny dla dalszego poznania mechanizmów rządzących zmiennością kwiatowej morfologii. Sprawdzana jest hipoteza o nieciągłości domeny, w której ekspresjonowane są geny klasy B i przesunięciu jej apikalnego segmentu na obszar okółka czwartego.

Wojna okółków tłumaczy następujące zmiany planu budowy kwiatu doskonałego:

- mnożenie wzdłuż osi okółków organów kwiatowych o tej samej tożsamości (*apetala 1*, *apetala 3*, *agamous*)
- utratę pewnych typów tożsamości:
 - redukcja okwiatu (*apetala 1*, *apetala 3*),



RYSUNEK 1. *Magnolia stellata* – petalodia powoduje zwiokrotnienie trójkrotnego zazwyczaj okwiatu: A – pęd generatywny kwiatu normalnego po przekwitnieniu, blizny po opadłych płatkach ułożonych w trzech trójkrotnych okółkach są znacznie większe od blizn po opadłych pręcikach; B – pęd kwiatu, w którym wystąpiła petalodia; osiowe przeniesienie tożsamości płatkowej na teren pręcikowia spowodowało rozwój płatków (większe blizny) ze spiralnie ułożonych niedoszłych pręcików; C – kwiat pełny tworzący się w wyniku petalodii staje się bardziej efektowny

– tworzą się one w okółkach. Oznacza to znów, że system określający wzór rozmieszczenia zawiązków działa niezależnie od systemu określającego ich tożsamość.

U *Antirrhinum* genami sterującymi przemianą układu spiralnego (kwiatostanowego) w okółkowy (kwiatowy) są geny *floricaula* i *squamosa* określające tożsamość kwiatową merystemu [4]. Wierzchołki mutantów tych genów nie rozpoczynają tworzenia kwiatu w odpowiednim plastochronie przez formowanie okółków, lecz kontynuują tworzenie zawiązków w układzie spiralnym. Geny te są związane nie tyle z tożsamością organów kwiatowych, ile z tożsamością całego merystemu. Zmiana tożsamości wierzchołka pociąga jednak w tym wypadku za sobą i zmianę tożsamości organów, i zmianę ich rozmieszczenia. Wiemy skądinąd, że zarówno generatywny, jak i wegetatywny wierzchołek może w pewnych wypadkach zmieniać system rozmieszczenia inicjowanych przez siebie zawiązków **bez zmiany ich tożsamości**, a więc w sposób prawdopodobnie niezależny od systemu określającego tę tożsamość. Zjawisko to spotykamy w obrębie słupkowiec w kwiecie magnolii drzewiastej (*Magnolia acuminata*) oraz w wegetatywnych pędach szpilkowych [20, 21]. W obu tych wypadkach jeden wzór spiralny zmienia się w inny, również spiralny. Przyczynia się to do znacznego powiększenia różnorodności istniejących wzorów rozmieszczenia zawiązków w merystemie, choć zakres możliwych zmian zdaje się być pod ścisłą kontrolą genetyczną [23].

Powyższe przykłady dowodzą, że istnieje wielka łatwość w ontogenetycznym przechodzeniu jednego systemu rozmieszczenia organów w drugi: okółkowego w spiralny, spiralnego w inny spiralny, jak w kwiecie magnolii, a także spiralnego w okółkowy jak przy przejściu merystemu kwiatostanowego w kwiatowy u wyzłinu. Nie wydaje się w tym świetle słuszny pogląd o filogenetycznej pierwotności układu spiralnego, zwłaszcza wobec powszechności ulistnienia okółkowego w pędach wegetatywnych nagozalążkowych (*Cupressaceae*, *Wollemia nobilis*).

O genach uruchamiających zdarzenia prowadzące do zmiany ułożenia zawiązków inicjowanych przez merystem niewiele wiadomo. Jeszcze mniej wiemy o następujących po ich ekspresji procesach. Można domniemywać, że geny te działają za pośrednictwem innych genów, odpowiedzialnych za ekspresję genu kodującego białko rozluźniające strukturę ściany komórkowej – ekspansynę. Lokalne podanie ekspansyny pomiędzy zawiązki na merystemie powoduje inicjację nowego zawiązka w miejscu nieprzewidzianym regułami realizowanego aktualnie wzoru rozmieszczenia organów, a w następstwie zmianę tego wzoru [13]. Udowodniono, że ekspresja genu *LeExp18* kodującego ekspansynę określa miejsce inicjacji kolejnego zawiązka na merystemie przed pojawieniem się jakichkolwiek zmian histologicznych w tym miejscu [16].

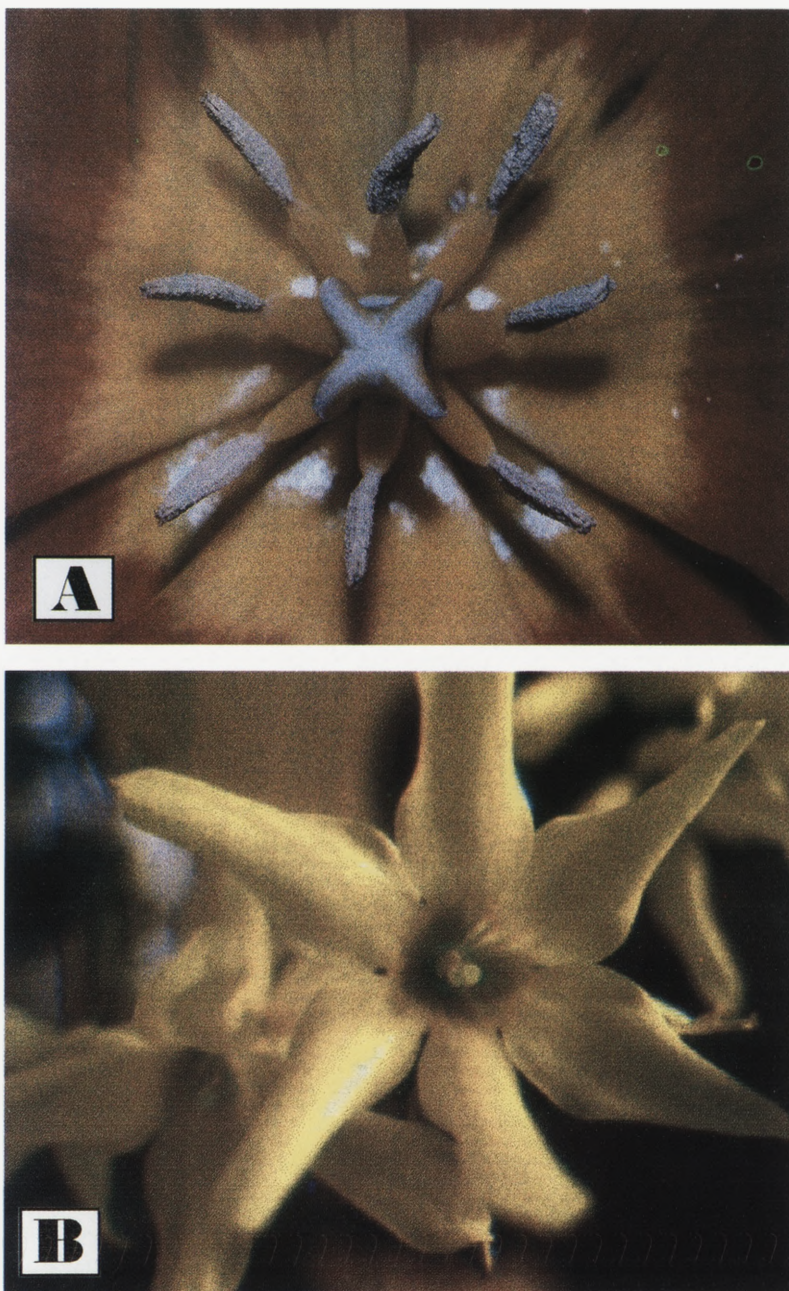
Fakty te wciąż jednak nie dają odpowiedzi na to, co ostatecznie określa miejsce ekspresji ekspansyny i inicjacji zawiązka w nowym położeniu. Pewne światło na to rzucają wyniki badań modelowych nad transformacjami wzorów rozmieszczenia zawiązków w symulacjach komputerowych [10, 11, 12, 22]. Przyczyną może być

pojawienie się dostępnej dla nowego zawiązka przestrzeni na wierzchołku w wyniku zmiany stosunku wielkości zawiązków do wielkości powierzchni organogenicznej merystemu. Z badań tych wynika, że zarówno akumulacja zmian stopniowych, zachodzących kierunkowo w sposób ciągły, jak i zmiana skokowa w sektorze obwodu wierzchołka mogą spowodować zmianę systemu rozmieszczania zawiązków. Tłumaczy to zarówno osiowe przejścia między systemem spiralnym i okółkowym, zachodzące w obie strony, jak to widzimy na przykładach magnolii (okwiat-pręcikowie) lub wyżłinu (oś kwiatostanu – kwiat terminalny), jak i obwodową, tj. jednopoziomową zmianę rozmieszczenia lub liczby elementów o tej samej tożsamości (zmiana krotności kwiatu).

LICZBA ORGANÓW W DANYM OKÓŁKU, A WIĘC KROTNOŚĆ I SYMETRIA KWIATU MOŻE BYĆ ZMIENNA W OBREBIE TEGO SAMEGO TAKSONU

Czy roślina potrafi „liczyć” liczbę zawiązków o tej samej tożsamości, tj. znajdujących się na obwodzie merystemu w tym samym okółku, a jeśli tak, to jaki system określa ich liczbę i czy może ona być zmienna? Odpowiedź na to pytanie można dać na podstawie wyżej przedstawionych rozważań o sposobach rozmieszczania organów kwiatowych.

Od liczby organów w danym okółku zależy ważna dla taksonomii cecha planu budowy kwiatu, jaką jest jego symetria i krotność. Wiadomo, że rośliny jednoliścienne różnią się pod tym względem od dwuliściennych. Kwiat tych pierwszych jest trójkrotny, a tych drugich cztero- lub pięciokrotny. Jak doszło w ewolucji do powstania tak zdecydowanej różnicy? W wyniku odbywającej się obecnie rewolucji w ustalaniu filogenetycznych powiązań na podstawie syntezy danych molekularnych z danymi o mikro- i makromorfologicznych cechach budowy roślin, wyodrębniono z dwuliściennych pierwotną grupę mającą szereg cech wspólnych z jednoliściennymi. Należy do nich między innymi *Magnolia*, która, będąc dotąd zaliczana do dwuliściennych, ma z reguły okwiat trójkrotny. U wielu przedstawicieli tzw. *Eudicotyledones*, czyli dwuliściennych właściwych, spotykamy przykłady merystycznej zmienności budowy kwiatu: u forsycji (*Forsythia*), powojnika (*Clematis*) czy bzu lilaka (*Syringa*) kwiaty typowe są czterokrotne, ale na tym samym krzewie można spotkać kwiatki trój-, pięcio-, a nawet sześciokrotne (rys. 2B). U niezapominajki (*Myosotis*) lub pierwiosnka (*Primula*), o typowo pięciokrotnym kwiecie, zdarzają się kwiatki cztero- lub sześciokrotne. U piżmaczka (*Adoxa*) krotność kwiatu jest związana z jego pozycją w kwiatostanie, cztery boczne kwiatki są pięciokrotne, natomiast szczytowy kwiatek jest czterokrotny. Nawet u jednoliściennych można spotkać odstępstwa od obowiązującej tam trójkrotności – u rdestnicy (*Potamogeton*)



RYSUNEK 2. Przykłady merystycznej zmienności w kwiatach okrytozalążkowych: A – *Tulipa* – nietypowa dla tego przedstawiciela jednoliściennych, czterokrotna symetria kwiatu jest widoczna na poziomie wszystkich okółków: okwiatu, pręcików i słupków (fot. I. Kaszen); B – *Forsythia* – na tym samym krzewie oprócz typowych kwiatów czterokrotnych (u dołu) spotkać można regularne kwiaty pięcio- i sześciokrotne

kwiaty są z reguły czterokrotne, zaś u narcyzów (*Narcissus*) zdarzają się bardzo rzadko kwiaty pięciokrotne, a u tulipanów (*Tulipa*) równie rzadko, czterokrotne (rys. 2A). Od czego zależy częstotliwość pojawiania się takich zmian? Jakie mechanizmy mogły zmieniać w ewolucji krotność kwiatu i ją stabilizować do poziomu cechy o znaczeniu diagnostycznym w taksonomii? Nie na wszystkie pytania można już dziś odpowiedzieć jednak pewnych interesujących informacji, jak uprzednio, dostarczają wyniki badań genetyki molekularnej.

U *Arabidopsis* w normalnym kwiecie słupki występują w najwyższym, czwartym okółku w liczbie dwóch. W mutantach *apetala 3* słupki tworzące się w trzecim okółku rozwijają się z zawiązków rozmieszczonych według schematu przecikowego. Ich liczba jest liczbą 6, a więc taką, jaka jest przypisana w normalnym kwiecie przecikom. Wydawać by się mogło, że tożsamość słupkowa zostaje nadana zawiązkom, których liczba i rozmieszczenie zostały określone przez inny system, działający niezależnie od obecności produktów genów klasy B. Niekiedy jednak w mutantach *apetala 3* i *pistillata* obserwuje się redukcję liczby zawiązków trzeciego okółka, co mogłoby jednak świadczyć o związkach tych dwóch systemów i o udziale genów klasy B w regulacji liczby zawiązków w okółku trzecim. Interaktywnymi genami mającymi wpływ na liczbę zawiązków w trzecim i czwartym okółku są *superman* i *fon 1* (*floral organ number 1*) [14].

Jedną z mutacji, której skutkiem jest zwiększenie wielkości merystemu, zarówno wegetatywnego jak i generatywnego, a co za tym idzie liczby produkowanych przezeń zawiązków, jest mutacja słabego allelu genu *clavata*. Mutacja silniejszych alleli może prowadzić do fascjacji lub nawet niekontrolowanej proliferacji komórek merystemu. Gen ten zdaje się kontrolować właściwe dla organu tempo podziałów komórkowych [5, 6, 14].

System wpływający na krotność kwiatu może mieć związek z systemem kontroli symetrii kwiatu. U *Antirrhinum* rozwijające się z pachwinowych wierzchołków kwiaty mają symetrię grzbiecistą. O rozwoju tej symetrii decyduje między innymi gen *cycloidea* ekspresjonowany w doosiowej części obwodu zawiązka kwiatowego tworzonego przez wierzchołek kwiatostanowy jako pachwinowy merystem boczny [7, 8, 15]. Mutacja tego genu powoduje u mutantu rozwój z zawiązka kwiatowego pelorycznego kwiatu o symetrii promienistej, który, co ciekawe, ma zwiększoną liczbę elementów okwiatu. Jest sześciokrotny, podczas gdy kwiaty o fenotypie dzikim są pięciokrotne.

Podobne efekty polegające na zwiększeniu krotności jak w przypadku kwiatów pelorycznych u wyżlinu przynosi mutacja *perianthia* u *Arabidopsis*. Kwiaty o fenotypie dzikim są czterokrotne, zaś mutanty mają kwiat pięciokrotny [17].

Można domniemywać, że w regulacji liczby zawiązków organów rozmieszczanych na obwodzie merystemu mogą mieć swój udział geny dokonujące podziału pierwotnej pierścieniowej fałdy (w przypadku okółków) lub listwy (w przypadku układu spiralnego) na dyskretne, oddzielone od siebie wyraźnie zawiązki. U mutantów *floricaula*

brak takiej indywidualizacji zawiązków powoduje tworzenie na pędzie ciągłej podwójnej listwy zbiegającej spiralnie wzdłuż jego osi [4]. Z obserwacji moich wynika, że liczba przegród w tarczach znamienia w kwiecie maku (*Papaver*), odpowiadająca liczbie ścian wielokomorowej zalążni, zależy wprawdzie od wielkości tej tarczki, jednakże zakresy zmian tej wielkości w poszczególnych, sąsiadujących ze sobą klasach, wyodrębnionych na podstawie liczby przegród – wyraźnie zachodzą na siebie. Jest niezmiernie ciekawe, jak zapada decyzja o tym, na ile komór podzielić zalążnię u maku – czy ważniejsza jest wielkość elementu wzoru, czy powierzchni, na której wzór powstaje?

U wielu roślin na jednym kwitającym obficie osobniku można spotkać wiele odstępstw od typowego planu budowy kwiatu. Częstotliwość zmian merystycznych może być różna w zależności od gatunku lub nawet osobnika. Wstępne badania przeprowadzone przez nas nad *Clematis vitalba* wskazują, że w pnącach pochodzących z różnych lokalizacji częstotliwość występowania kwiatów cztero-, pięciokrotnych, a także osobliwych kwiatów o charakterze pośrednim, mających jeden płatek wyraźnie większy i rozdwojony na szczycie, jest niejednakowa. Może to wynikać zarówno z odmienności genetycznej osobników – genetów, różniących się skłonnością do tworzenia, np. w wyniku transpozycji, mutantów w populacji rametów, którymi są merystemy kwiatowe, jak i z odmienności siedlisk wiążącej się, być może, ze zróżnicowanym nasileniem działania czynników mutagennych. Z obserwacji dalszych wynika jeszcze, że tworzące się płatki u *Clematis* są typowo zaopatrywane przez trzy wiązkiaskularne, a płatki rozdwojające się powstają z większych zawiązków i znajduje się w nich większa liczba wiązek (4–5). Rodzi się pytanie o stan zaopatrzeniaaskularnego rozwijającego się zawiązka kwiatowego. Czy jego ewentualna asymetria może mieć wpływ na wielkość powstających zawiązków okwiatu? W pędzie głównym liczba wiązek ma charakterystyczny układ: 6 większych i międzyległe ułożonych 6 mniejszych wiązek. W szypułkach kwiatowych jednak małe wiązki podlegają znacznej, mniejszej lub większej redukcji. Badania te są aktualnie w toku.

ZAKOŃCZENIE

Z przeprowadzonego wyżej przeglądu wynika jednoznacznie, że merystemy kwiatowe dysponują bogatym arsenałem genetycznych możliwości zmiany podstawowego planu budowy kwiatu. Te same efekty mogą być najprawdopodobniej uzyskiwane różnymi metodami. Wszelkie zmiany obowiązującego planu pojawiały się zapewne w populacjach jako wyniki mutacji. Niektóre z nich okazywały się korzystne i stabilizowały się przez selekcję dając początek nowym liniom rozwojowym roślin

kwiatowych. Dało to w ostateczności takie bogactwo form kwiatów, jakie możemy dzisiaj podziwiać.

LITERATURA

- [1] BATTEY NH, LYNDON RF. Reversion of flowering. *Bot Review* 1990; **56**: 162–189.
- [2] BOWMAN JL, SMYTH DR, MEYEROWITZ EM. Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development* 1991; **112**: 1–20.
- [3] CARPENTER R, COEN ES. Floral homeotic mutations produced by transposon mutagenesis in *Antirrhinum majus*. *Genes and Development* 1990; **4**: 1483–1493.
- [4] CARPENTER R, COPSEY L, VINCENT C, DOYLE S, MAGRATH R, COEN ES. Control of flower development and phyllotaxy by meristem identity genes in *Antirrhinum*. *Plant Cell* 1995; **7**: 2001–2011.
- [5] CLARK SE, RUNNING MP, MEYEROWITZ EM. *Clavata 1*, a regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis*. *Development* 1993; **119**: 397–418.
- [6] CLARK SE, RUNNING MP, MEYEROWITZ EM. *Clavata 3* is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as *clavata 1*. *Development* 1995; **121**: 2057–2067.
- [7] CLARK JI, CARPENTER R, LUO D, COEN ES. Regulation of *cycloidea*, a gene controlling floral asymmetry in *Antirrhinum majus*. 1999; XVI International Botanical Congress. Saint Louis. Abstract No.4162.
- [8] COEN ES. The Art of Genes. How Organisms Make Themselves. Oxford University Press. New York. 1999.
- [9] COEN ES, MEYEROWITZ EM. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 1991; **353**: 31–37.
- [10] DOUADY S, COUDER Y. Phyllotaxis as a self-organizing iterative process. I. The spiral modes resulting from time periodic iterations. *J Theor Biol* 1996a; **178**: 255–274.
- [11] DOUADY S, COUDER Y. Phyllotaxis as a self-organizing iterative process. II. The spontaneous formation of a periodicity and the coexistence of spiral and whorled patterns. *J Theor Biol* 1996b; **178**: 275–294.
- [12] DOUADY S, COUDER Y. Phyllotaxis as a self-organizing iterative process. III. The simulation of transient regimes in ontogeny. *J Theor Biol* 1996c; **178**: 295–312.
- [13] FLEMING AJ, MCQUEEN-MASON S, MANDEL T, KUHLEMEIER C. Induction of leaf primordia by the cell wall protein, expansin. *Science* 1997; **276**: 1415–1418.
- [14] HOWELL SH. Molecular Genetics of Plant Development. Cambridge University Press. New York. 1998.
- [15] LUO D, CARPENTER R, VINCENT C, COPSEY L, COEN ES. Origin of floral asymmetry in *Antirrhinum*. *Nature* 1996; **383**: 794–799.
- [16] REINHARDT D, WITTEW F, MANDEL T, KUHLEMEIER C. Localized upregulation of a new expansin gene predicts the site of leaf formation in the tomato meristem. *The Plant Cell* 1998;
- [17] RUNNING MP, MEYEROWITZ EM. Mutations in the *perianthia* gene of *Arabidopsis* specifically alter floral organ number and initiation pattern. *Development* 1996; **122**: 1261–1269.
- [18] RUTISHAUSER R. Combining plant morphology and molecular development genetics. 1999. XVI International Botanical Congress. Saint Louis. Abstract No. 6068.

- [19] VERGARA F, FERRÁNDIZ C, MEYEROWITZ EM, ALVAREZ-BUYLLA ER. Molecular basis and evolution of the inside-out flower of *Lacandonia schismatica*. 1999. XVI International Botanical Congress. Saint Louis. Abstract No. 2936.
- [20] ZAGÓRSKA-MAREK B. Phyllotactic patterns and transitions in *Abies balsamea*. *Canad J Bot* 1985; **63**: 1844–1854.
- [21] ZAGÓRSKA-MAREK B. Phyllotaxic diversity in *Magnolia* flowers. *Acta Soc Bot Pol* 1994; **63**: 117–137.
- [22] ZAGÓRSKA-MAREK B. Meristems and their patterns in plants. W: *La Formation des Motifs en Biologie, Dynamique, Infographie (Pattern Formation in Biology, Dynamics and Computer Graphics)* 1997; Institut des Hautes Etudes Scientifiques (IHES) Bures sur Yvette, Paris, (w druku).
- [23] ZAGÓRSKA-MAREK B. Fingerprinting of floral phyllotaxis in *Magnolia* trees. 1999. XVI International Botanical Congress. Saint Louis. Abstract No.3265.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 18.11.1999 r.

Przyjęto: 18.11.1999 r.

Adres autora: ul. Kanonia 6/8, 50-328 Wrocław

e-mail: beata@biol.uni.wroc.pl

RÓŻNORODNE ASPEKTY DZIAŁANIA KINAZ BIAŁKOWYCH W APOPTOZIE*

VARIOUS ASPECTS OF PROTEIN KINASES ACTION IN APOPTOSIS

AGNIESZKA LACHOWICZ*, ELŻBIETA REBAS*, LUDMIŁA ŻYLIŃSKA**,
LILLA LACHOWICZ**

*Instytut Endokrynologii Akademii Medycznej, ** Zakład Biochemii Instytutu Fizjologii i Biochemii Akademii Medycznej Łódź

Streszczenie: Apoptoza jest złożonym procesem wymagającym harmonijnego działania wielu zewnątrzkomórkowych i wewnątrzkomórkowych czynników. Wiadomo, że niektóre bodźce wewnątrzkomórkowe mogące brać udział w inicjacji procesu apoptozy kontrolują także procesy proliferacji i różnicowania komórek. Z danych eksperymentalnych wynika, że między innymi kinazy białkowe również włączane są w drogi sygnalizacyjne kontrolujące apoptozę. Od dawna bowiem znany jest fakt, że stan ufosforylowania białek odgrywa znaczącą rolę w tym procesie. Choć zaangażowanie kinaz w ten proces nie podlega wątpliwości, ich rola pozostaje nadal niejasna. Wykazano, że mogą one brać udział w procesach zarówno zapoczątkowywania, jak i hamowania apoptozy. Niejednorodność materiału biologicznego oraz modeli badawczych programowanej śmierci komórki z jednej strony ukazuje wielokierunkowość działania kinaz, lecz równocześnie nie pozwala na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków co do ich kierunku działania. Na postawienie jakiegokolwiek hipotezy jest za wcześnie; zatem praca ta ukazując przegląd najważniejszych danych eksperymentalnych dotyczących tego zagadnienia, potwierdza wielokierunkowość i złożoność działania kinaz białkowych w programowanej śmierci komórki.
(*Postępy Biologii Komórki 2000; 27: 111–124*)

Słowa kluczowe: kinazy białkowe Ser/Thr, białkowe kinazy tyrozynowe, apoptoza.

Summary: Apoptosis is a complex process requiring collaboration of several intracellular and extracellular factors. It is known that some intracellular agents controlling cell proliferation and differentiation could modulate apoptosis. Among others, the protein kinases could be involved in control of apoptosis, because it is well known that protein phosphorylation plays important role in this process. Although it is clear that protein kinases may take part in apoptosis but still their role is not obvious. So far there are

*Praca finansowana z Grantu KBN Nr 4PO5DC04114.

the data showing that protein kinases could be engaged either in stimulation or inhibition of this process. However, experimental procedures and biological materials used in the studies concerning apoptosis are various, thus it is hard to clearly explain the role of protein kinases. It is too early for setting up any hypothesis, so our paper showing the latest data concerning this problem, shows also complicate way of action of protein kinases in programmed cell death.

(Advances in Cell Biology 2000; 27: 111–124)

Keywords: protein kinases Ser/Thr, apoptosis.

WSTĘP

Apoptoza jest procesem aktywnie regulowanym zarówno przez indukcję odpowiednich genów, jak i aktywację specyficznych białek. Opisano wiele czynników zewnętrz- i wewnątrzkomórkowych, które inicjują lub kontrolują ten proces [1,21,50,52]. Ponieważ jednak bodziec zewnętrzny jest tylko częścią informacji wpływającej na decyzję samozagłady czy przeżycia komórki, jest oczywiste, że taki bodziec nie może być jedynym decydującym czynnikiem [48]. Różnorodność zewnętrznych sygnałów, które mogą kontrolować apoptozę, oznacza, że wiele układów sygnalizacyjnych może uczestniczyć w tym procesie [45]. Natomiast bodźce wewnątrzkomórkowe indukujące apoptozę są często odpowiedzialne również za proliferację czy różnicowanie komórek. W tej perspektywie fosforylacja białek i związane z nią kinazy wydają się być najbardziej wspólnym mechanizmem komórkowym prawie dla wszystkich zjawisk zachodzących w komórce. Klasyczne metody badania procesu apoptozy prowadzone były na nienaruszonych komórkach, lecz wykazano, że w komórkach pozbawionych jąder również zachodzi proces apoptozy. Wynika stąd, że pewne składniki występujące w cytoplazmie mogą odgrywać dominującą rolę w tym zjawisku [53,65]. Do grupy tych związków należą dobrze już poznane białka Bcl oraz rodzina enzymów zwanych kaspazami [45]. Wspomniane powyżej kinazy białkowe są następnymi enzymami, które z wysokim prawdopodobieństwem mogą uczestniczyć w procesie programowanej śmierci komórki. Należą do nich m.in. różne rodzaje kinaz tyrozynowych i serynowo-treoninowych. Niektóre z nich stanowią integralną część receptora, inne przenoszą sygnał z receptora jako odpowiedź postreceptorową, w efekcie regulując aktywność czynników transkrypcyjnych. Pojawiają się natomiast kontrowersje, czy działanie kinaz białkowych polega na aktywacji czy inhibicji procesu apoptozy. Wydaje się zatem słuszne prześledzenie danych opisujących udział różnych kinaz w procesie programowanej śmierci komórki.

KINAZY TYROZYNOWE

W świetle ostatnich doniesień literaturowych enzymy z rodziny kinaz tyrozynowych wydają się być jednym z istotnych ogniw w procesie apoptozy. Kinazy

tyrozynowe (PTK, ang: *protein tyrosine kinases*) mogą stanowić integralną część receptorów czynników wzrostu, takich jak: EGF (*epidermal growth factor*) czy FGF (*fibroblast growth factor*). Enzymy te ulegają aktywacji po połączeniu ligandu z receptorem, są więc bezpośrednio zaangażowane w procesy proliferacji komórek. Pełne zrozumienie roli kinaz tyrozynowych w apoptozie jest utrudnione ze względu na różnorodne, a czasem sprzeczne informacje o efektach ich działania. I tak, w ostrej białaczce limfoblastycznej, jak również w napromieniowanych prekursorach ludzkich limfocytów B zaobserwowano zwiększoną aktywność PTK towarzyszącą apoptozie [2,36]. Zastosowanie specyficznych inhibitorów PTK – herbimycyny A i genisteiny wyraźnie hamowało ten proces [29]. Aktywację kinaz tyrozynowych stwierdzono w limfocytach T, również wtedy gdy apoptoza była wywołana entero-rotoksyną gronkowcową [38]. Tym niemniej niektórzy autorzy sugerują, że zwiększona aktywność PTK jest wstępnym, obligatoryjnym etapem programowanej śmierci komórki, nie podając jednak jednoznacznego wyjaśnienia jej roli [4,10,67]. Jednakże fosforylacja tyrozyny nie zawsze towarzyszy początkowi apoptozy. Przeciwnie, okazało się, że w liniach komórkowych HL60 i MO7e zahamowanie aktywności kinazy tyrozynowej indukowało ten proces [2]. W mięśniu sercowym poddanym niedokrwieniu, genisteina hamując aktywność PTK prowadziła do apoptozy [3,24]. Podobny efekt uzyskali Wang i wsp. [64] stosując selektywne inhibitory kinazy tyrozynowej (herbimycynę A i genisteinę) w zdrowych miocytach. Lei i wsp. [31] uważają, że inhibitory te obniżając aktywność MAP-kinazy mogą hamować działanie wewnątrzkomórkowej domeny receptora EGF (czynnika wzrostu naskórka) i w ten sposób zapoczątkowują apoptozę. Zupełnie innaczej rolę kinazy tyrozynowej widzą Sweeney i wsp. [57]. W swoich badaniach wykazali, że lipopolisacharydy ochraniały przed apoptozą polimorficzne leukocyty. Zaobserwowali też, że genisteina znosiła protekcyjne działanie lipopolisacharydów. Zgodnie z ich sugestią właśnie fosforylacja tyrozyny jest wstępnym etapem uruchamiania mechanizmów ochronnych przed programowaną śmiercią komórki w leukocytach. Reasumując, kinazy tyrozynowe mogą, w zależności od rodzaju komórek, zarówno hamować jak i stymulować apoptozę. Wydaje się jednak, że to zagadnienie jest bardziej skomplikowane, ponieważ stwierdzono, że fosfatazy tyrozynowe, enzymy defosforylujące uprzednio ufosforylowany przez PTK substrat, mogą także pośrednio uczestniczyć w modyfikacji procesu samozagłady komórek. Podanie inhibitora fosfatazy tyrozynowej – tlenku fenylarsenu – powodowało w ludzkich eozynofilach i neutrofilach wzrost fosforylacji tyrozyny i inhibicję apoptozy. Efekt ten ulegał odwróceniu po podaniu inhibitorów PTK [41,69]. Natomiast inny inhibitor fosfatazy tyrozynowej, bisoksowanadyl, w linii komórkowej limfocytów stymulował apoptozę [41]. Powyższe informacje, nie wykluczając udziału kinaz tyrozynowych w apoptozie, nie określają jednak jednoznacznie ich działania w tym procesie. Mimo że w piśmiennictwie obecne są liczne dowody przemawiające za działaniem kinaz tyrozynowych zarówno jako aktywatorów, jak i inhibitorów programowanej śmierci

komórki, żaden z autorów prac nie wysuwa wyraźnej hipotezy mogącej przesądzić o kierunku ich działania.

KINAZY BIAŁKOWE C

W badaniach nad apoptozą zwrócono uwagę na wielofunkcyjną rodzinę serynowo-treoninowych kinaz białkowych – (PKC ang: *protein kinases C*). Enzymy te zależne od fosfolipidów i jonów Ca^{2+} wymagają do pełnego działania diacyloglicerolu lub częściej stosowanych syntetycznych aktywatorów – estrów forbolu (np. TPA). Dotychczas opisano 12 izoenzymów kinazy C różniących się poziomem ekspresji, rozmieszczeniem tkankowym i komórkowym, wrażliwością na estry forbolu i Ca^{2+} i podatnością na mechanizmy regulacyjne oraz specyfikę substratów [13,40].

Kinaza białkowa C uczestniczy m.in. w kontroli procesów wydzielania, regulacji komunikacji międzykomórkowej, ekspresji genów i wielu innych procesach. Równie wielka jest liczba receptorów, których aktywność zależy od fosforylacji katalizowanej przez PKC. Udział rodziny kinaz białkowych zależnych od fosfolipidów w tak wielu funkcjach komórki i ich działanie modulatorowe wobec innych układów sygnalizacyjnych spowodowały wzrost szczególnego zainteresowania rolą tych enzymów w procesie apoptozy.

Podobnie jak w przypadku rodziny kinaz tyrozynowych doniesienia dotyczące roli PKC w apoptozie są kontrowersyjne [32]. Wykazano bowiem, że np. aktywacja PKC hamuje apoptozę [10,26,37,49,59]. Równocześnie stwierdzono, że inhibicja aktywności tego enzymu także powodowała zahamowanie tego procesu [56]. Natomiast Grant i wsp. [20] zaobserwowali, że zastosowanie bryostatyny, selektywnego aktywatora PKC, wywoływało zwiększoną fragmentację dojrzałego DNA.

Najwcześniejsze badania wykazały wzrost aktywności PKC β w procesie apoptozy w komórkach szpiczaka [13]. Natomiast w linii komórkowej HL60, nie mającej tej izoformy, nie dochodziło do apoptozy po stosowaniu estrów forbolu. Jednakże po odtworzeniu ekspresji PKC β (pod wpływem witaminy D) komórki odzyskiwały zdolność do różnicowania się i apoptozy [35]. Knox i wsp. [28] sugerują, że w komórkach nabłonka płaskiego poziom ekspresji PKC β jest skorelowany z poziomem białek Bcl2, co nasuwa sugestię, że mechanizm działania PKC β może być prawdopodobnie związany z białkami Bcl2.

Nie tylko izoenzym β wykazuje zdolności indukowania programowanej śmierci komórki, również forma PKC σ zdaje się mieć podobne działanie. W komórkach linii U937 PKC σ była aktywowana pod wpływem napromieniowania, stosowania TNF α lub przeciwciał anti-Fas, a więc czynników wywołujących apoptozę [17]. Jest interesujące, że izoforma ta zdaje się nie ulegać aktywacji po stosowaniu kła-

sycznych lipidowych aktywatorów (jak np. DAG), ale aktywuje ją proteaza CPP32, a więc jedna z kaspaz [17]. Rola PKC σ w programowanej śmierci komórki polegać ma prawdopodobnie na odłączaniu błony jądrowej i utrzymaniu jej w formie rozpuszczalnej, co ułatwia jej degradację proteolityczną [13].

Z kolei PKC α i PKC ζ są izoenzymami, których aktywacja powoduje zahamowanie apoptozy i zwiększoną przeżywalność komórek [13,28]. W przebiegu apoptozy w komórkach U937 stwierdzono zmniejszoną ekspresję PKC ζ [46], a całkowita utrata tej izoformy (przez transfekcję antysensownym oligonukleotydem) prowokowała apoptozę [32]. Lee i wsp. [30] wykazali, że ceramidy dezaktywują PKC α i hamują autofosforylację tej izoformy. Wynika stąd, że różne izoformy kinazy C w procesie apoptozy mogą funkcjonować zarówno jako potencjalne aktywatory lub inhibitory tego procesu, a w ocenie kierunku ich działania należy uwzględnić rodzaj komórki, jej stan aktywacji i fazę cyklu [18,70]. Przemawiają za tym badania Iwaty i wsp. [25], którzy zaobserwowali, że w niedojrzałych tymocytach glikokortykoidy wybiórczo aktywują niezależną od Ca^{2+} aktywność kinazy C, ale zjawisko to nie występowało w dojrzałych komórkach. Pozostaje jednak nadal niejasne, dlaczego aktywacja PKC w jednym rodzaju komórek hamuje, a w drugim nasila proces apoptozy. Sprzeczności takie mogą być pozorne, gdyż decydującą rolę w obserwacjach mogą odgrywać np. stosowane w doświadczeniach substraty specyficzne dla różnych izoform, czy lokalne rozmieszczenie poszczególnych izoenzymów w badanym materiale. Przyczyna może też tkwić częściowo w fakcie używania jako aktywatora PKC estru forbolu (TPA) – (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate). W przeciwieństwie do fizjologicznego aktywatora, jakim jest DAG, TPA jest czynnikiem stabilnym, stymulującym PKC w sposób trwały. Należy także pamiętać o zdolności TPA do aktywacji w różnym stopniu poszczególnych izoenzymów PKC [40,51], co może dawać kontrowersyjne wyniki. Zaobserwowano między innymi, że w izolowanych dojrzałych tymocytach i komórkach prostaty zastosowanie TPA indukowało śmierć komórki [13,47]. Natomiast inne badania prowadzone na dojrzałych tymocytach wykazały, że stosowanie TPA zapobiega fragmentacji DNA [383]. Należy sobie również postawić pytanie, które z obserwowanych pod wpływem TPA zjawisk jest spowodowane aktywacją PKC, a które z nich mogą być wywołane samymi estrami forbolu.

INNE KINAZY BIAŁKOWE

Omówione powyżej kinazy białkowe nie są jedynymi, których udział wykazano w procesie apoptozy. Najwięcej informacji w literaturze dotyczy właśnie tych kinaz, co wynika z faktu, że są one w sposób naturalny wiązane od dawna z procesami proliferacji. Tym niemniej, w literaturze przedmiotu pojawia się znacząca ilość

doniesień wskazujących na udział innych kinaz białkowych w apoptozie. Podobnie jak w przypadku omawianych powyżej kinaz, ich rola również jest niejednoznaczna.

Wykazano między innymi, że kinaza białkowa A – zależna od cAMP (PKA), enzym regulujący wiele procesów metabolicznych, także uczestniczy w regulacji programowanej śmierci komórki. Stwierdzono, że aktywacja PKA winkrystyną (lekiem używanym w terapii antynowotworowej) wywołuje fosforylację białek Bcl2, a w następstwie apoptozę w liniach komórkowych MCF-7 i MDA-MB-231. Ta droga wywoływania apoptozy prawdopodobnie różni się od typowej, zależnej od białka p53, które pojawia się w najwcześniejszym etapie tego procesu [54]. W złośliwych glejakach u ludzi aktywacja PKA typu I wywołuje różnicowanie komórek, hamuje proliferację i prowadzi do apoptozy [6]. W linii komórkowej raka nerki PKA typu I stymuluje apoptozę; stwierdzono także, że transfekcja antysensownymi oligonukleotydami PKA tej linii hamowała ten proces [7].

Obok przykładów aktywującego działania PKA w programowanej śmierci komórki, w literaturze można równocześnie znaleźć wiele dobrze udokumentowanych doniesień o hamującym wpływie tego enzymu w tym procesie. Wykazano, że zastosowanie specyficznego inhibitora PKA – izochinolinylu (H-89) wyraźnie nasila proces apoptozy. Inhibitor ten wywołuje śmierć neuronów jądra wielkokomórkowego (*nucleus magnacellulare*) u kurcząt [71]. W ludzkich neutrofilach aktywacja PKA typu I opóźnia apoptozę. Proces ten wiązany jest z prawdopodobnie hamującym działaniem PKA na kaspazę 3 [44]. Odmienne model ochrony przed apoptozą przez kinazę A zaproponowali Tanaka i wsp. [58]. Zgodnie z ich hipotezą, kinaza A regulując przepuszczalność kanałów wapniowych stymuluje kaskadę MAP-kinazy, która może ochraniać przed apoptozą.

Przykładem interakcji kinaz i wtórnych przekaźników w procesie programowanej śmierci komórki jest działanie kinazy sfingozyny. Enzym ten wraz z cAMP hamował ten proces w komórkach okostnowych [34]. Kinaza sfingozyny zapoczątkowuje obszerną listę innych kinaz regulujących przebieg apoptozy. Należą tu kinazy: kazeinowa, lekkiego łańcucha miozyny i kinaza zależna od cGMP, które w komórkach nerwowych *Drosophila* inicjowały apoptozę przez indukcję niescharakteryzowanego dotychczas białka, określanego jako czynnik H-7 [39]. Z kolei hamowanie aktywności kinazy IP_3 wywołane jej specyficznym inhibitorem, LY-29400, powodowało śmierć ludzkich neuronów [12]. Trudno rozstrzygnąć, czy zjawisko to wywołane jest działaniem bezpośrednim kinazy IP_3 , czy raczej produktu jej fosforylacji, a więc 1,3,4,5-tetrafosforanu inozytolu (IP_4). Wykazano bowiem, że IP_4 aktywuje nową kinazę białkową, nazwaną kinazą B (PKB). Stwierdzono ponadto, że ekspresja aktywowanych alleli kinazy B hamuje apoptozę w linii komórkowej nabłonka. [8].

Dobrze znana i powszechnie występująca kinaza zależna od wapnia i kalmoduliny, typu II (CaM-kinaza II) okazała się być stymulatorem apoptozy w komórkach pier-

wotnej hodowli hepatocytów. Zahamowanie jej aktywności przeciwdziało apoptozie podobnie do hamowania aktywności kaspaz [16].

W ostatnim czasie zidentyfikowano kilka białek określanych mianem DAP (ang. *death associated protein*), których ekspresja indukowana γ -interferonem, związana jest z apoptozą komórki [9]. Jednym z tych białek, nazwanych DAP-2, okazała się być zależna od kalmoduliny serynowo-treoninowa kinaza białkowa [14]. Kinaza DAP-2 jest powszechnie występującym białkiem związanym z cytoszkieletem komórki. Ma to o tyle duże znaczenie, że zmiany w organizacji mikrofilamentów aktywny – być może także zależne od DAP-2 – poprzedzają z reguły kondensację chromatyny i następującą dalej fragmentację DNA. Istotną rolę w aktywacji DAP-2 pełni domena wiążąca kalmodulinę, bowiem pozbawiony tego fragmentu enzym wykazywał dużą aktywność intensyfikującą śmierć komórek. Apoptyczne działanie kinazy DAP-2 potwierdzono używając w komórkach HeLa katalitycznie nieaktywnego mutanta. W obecności γ -interferonu, czynnika stymulującego apoptozę, zaobserwowano zwiększoną przeżywalność komórek [9].

Innymi, bardzo interesującymi w aspekcie proliferacji i apoptozy, kinazami, są kinazy zależne od cyklin (CDK), a zwłaszcza ich typy 2, 4 i 6. Cykliny są białkami związanymi z cyklem komórkowym, pojawiającymi się w komórce tylko okresowo i w zależności od fazy cyklu, w której znajduje się komórka. Kinazy zależne od cyklin są podjednostką katalityczną kompleksów wieloenzymatycznych obecnych w jądrze komórkowym. Razem z cyklinami i inhibitorami cyklin kinazy te biorą udział w procesie przechodzenia komórki przez kolejne fazy cyklu komórkowego [42]. Zatrzymanie komórki w fazie G1-S (*cell arrest*), charakterystyczne między innymi dla mechanizmu działania białka p-53, obserwuje się także przy zahamowaniu aktywności CDK2 i CDK4 [5]. Zjawisku temu towarzyszą następnie zmiany morfologiczne komórki, jakie obserwuje się w apoptozie [55,66]. Obserwacje, dotyczące związku między spadkiem aktywności CDK a następującą apoptozą w różnych liniach komórkowych, publikowane są przez wielu autorów. Sugerują oni ponadto, że tą drogą wywołana programowana śmierć komórki jest niezależna od typowej drogi związanej z białkiem p-53 [55,66,68]. Prawdopodobnie dzieje się tak również w przypadku apoptozy wywołanej kwasem retinowym w linii komórkowej Hep38 (guza typu hepatoma). Związek ten nie powodując zmian w stężeniu cyklin lub białek Bcl, jednocześnie znamienne obniża aktywność CDK2 i ekspresję CDK4 [23].

Natomiast Park i wsp. [43] uważają, że wzrost aktywności CDK4 i CDK6 (ale nie CDK2 i CDK3) osłania komórki dojrzałych neuronów układu współczulnego przed apoptozą wywołaną promieniowaniem UV, czyli znanym czynnikiem uszkadzającym DNA. Z drugiej jednak strony przytoczyć należy wyniki badań Courtney i Coffrey'a [11], którzy używając różnicujących się, a nie dojrzałych neuronów, a także odmiennego czynnika apoptotycznego – cytarabiny stwierdzili, że nie aktywacja, lecz zahamowanie aktywności kinaz CDK4 i CDK6 jest mechanizmem

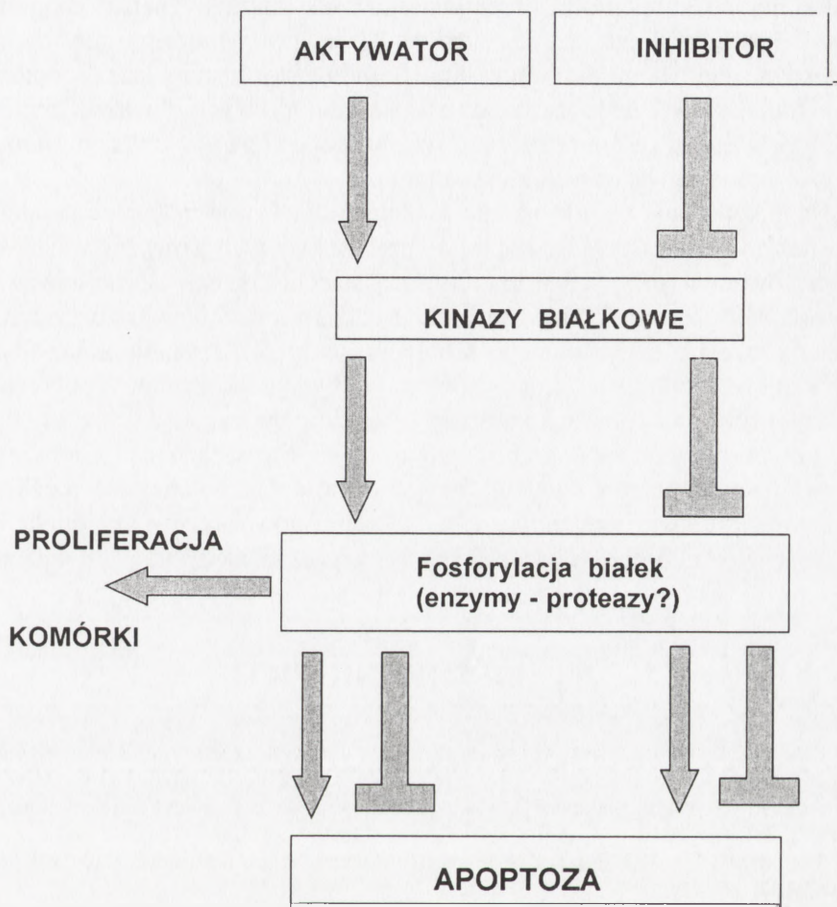
ochronnym przed apoptozą. W komórkach linii PC12 (linia komórkowa guza z komórek chromochłonnych nadnercz szczura) zaobserwowano, że wzmożona ekspresja CDK4 powodowała, że komórki te były bardziej podatne na apoptozę w porównaniu z komórkami macierzystymi [15].

Ostatnio mnożą się doniesienia dotyczące udziału w programowanej śmierci komórek takich kinaz, których rola nie jest nadal w pełni poznana i w związku z tym są one rzadziej opisywane. Jako przykład służyć może aktywacja kinazy c-Jun wywołana stresem oksydacyjnym, która inicjuje apoptozę w liniach komórkowych komórek mięśniowych i komórek mięśnia sercowego [33,61].

Stymulacja kinazy odpowiedzi zewnątrzkomórkowej (ERK) zapobiega zwięźszeniu ekspresji jednego z białek Bcl2, MCL1 [60]. Natomiast nieznan jest jak dotąd mechanizm działania MEK kinazy, stwierdzono natomiast, że jej inhibitor, 21-amino-3'-metoksyflawon, wywołuje apoptozę w komórkach linii komórkowej U937 [63], co przemawia za jej ochronnym działaniem w tym procesie.

PODSUMOWANIE

Przegląd piśmiennictwa cytowany w pracy w pełni potwierdza fakt zaangażowania kinaz i fosfataz w procesie apoptozy. Wątpliwości pojawiają się, kiedy rozważa się problem, jaka jest rola tych enzymów w tym procesie. Istnieje bowiem równie dużo doniesień przemawiających za tym, że mogą być tak inicjatorami, jak i inhibitorami apoptozy (rys. 1). W związku z tym wydaje się logiczne postawienie pytania, co może leżeć u podstaw tak różnych obserwacji. Hipotezy można mnożyć. Na pewno nie bez wpływu na uzyskiwane wyniki pozostaje fakt, że dotychczasowe eksperymenty prowadzone były na bardzo różnorodnym materiale. Znajdują się tu zarówno pierwotne hodowle komórkowe, jak i linie komórkowe, komórki pozbawione jąder i komórki nienaruszone, a więc materiał biologiczny bardzo niejednorodny fizjologicznie. Jednocześnie oczywiste jest, że decyzja dotycząca wyboru; proliferacja czy śmierć komórki nie zależy jedynie od rodzaju bodźca, jaki otrzymuje komórka, ale może przede wszystkim od rodzaju komórki, stadium ontogenezy czy fazy jej cyklu. Innym problemem, który może rzutować na kierunek działania kinaz, jest zastosowanie w badaniach mniej lub bardziej specyficznych aktywatorów i inhibitorów poszczególnych enzymów. Nie należy wykluczyć możliwości, że te modulatory działania kinaz mogą same wpływać na proces apoptozy, podobnie jak wspomniano w odniesieniu do TPA. Podobny problem powstaje w badaniach nad izoenzymami kinazy C; zastosowanie dwóch różnych substratów dla jednego enzymu może wywoływać dwa różne efekty. W obecnym stanie wiedzy trudno jest jednoznacznie określić, czy wielokierunkowość działania kinaz w apoptozie



RYSUNEK 1. Hipotetyczne działanie aktywatorów i inhibitorów kinaz białkowych w apoptozie: →

← pobudzenie,
 T hamowanie

istnieje naprawdę, czy jest to jedynie zjawisko pozorne, zależne w większym stopniu od naszych możliwości technicznych.

Drugim, bardzo istotnym, problemem do rozwiązania pozostaje wyjaśnienie ewentualnego „punktu uchwytu” działania kinaz/fosfataz w procesie apoptozy. Czy rola ich dotyczy tylko katalizowania rozpoczętego wcześniej procesu apoptozy (co obserwujemy czasem jako aktywację samego procesu), czy raczej zmiana stanu ufosforylowania białek może w następstwie modyfikować ekspresję genów programujących apoptozę. Doświadczenia z ekstraktami komórek pozbawionych jąder wykazały niezbicie, że białka występujące w cytoplazmie (kinazy/fosfatazy?) są

zdolne inicjować apoptozę, przed jakimkolwiek innym sygnałem apoptotycznym. Trudno jest jednak przyjąć, że w przypadku apoptozy możemy mieć do czynienia z prostym schematem: aktywacja kinaz – indukcja lub stymulacja apoptozy. Zdaje się bardziej prawdopodobne, że dwoistość komórkowych efektów działania kinaz przemawia raczej za hipotezą, że to właśnie one mogą być układem modulującym decyzję komórki: proliferacja czy apoptoza.

Na zakończenie tego krótkiego przeglądu warto podkreślić, że działanie kinaz i fosfataz towarzyszących apoptozie, przedstawionych powyżej wiąże się ściśle z powstawaniem różnych fosfoprotein. Dalsza identyfikacja fosfoprotein związanych z apoptozą oraz wyjaśnienie ich funkcji nabiera szczególnego znaczenia dla rozwiązania nadal niewyjaśnionego problemu: jak przez działanie kinaz fosforylacja białek może modulować proces apoptozy. Wydaje się zatem, że określenie specyficznej roli kinaz oraz ich substratów będzie pomocne w uzyskaniu odpowiedzi na wyżej postawione pytania, choć wymaga to jeszcze wielu badań. Głębsze poznanie indywidualnych etapów działania tych enzymów daje nadzieję na możliwość zaplanowania strategii terapeutycznej w leczeniu nowotworów czy infekcji wirusowych, a więc chorób, wobec których współczesna medycyna jest bezradna.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BARTOSZ G. Rola reaktywnych form tlenu w apoptozie. *Post Bioch* 1998; **44**: 22–31.
- [2] BERGAMASHI G, ROSTI V, DANOVA M, POUCHIO L, LUCOTTI C, CAZZOLA M. Inhibitors of tyrosine phosphorylation induce apoptosis in human leukemic cell lines. *Leukemia* 1993; **7**: 2012–2018.
- [3] BROMME HJ, HOLTZ J. Apoptosis in the heart: when and why? *Mol Cell Bioch* 1996; **163/164**: 261–275.
- [4] BURKHART AL, BRUNSWICK M, BOLEN JB, MOND JJ. Anti-immunoglobulin stimulation of B lymphocytes activates src-related protein-tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 7410–7414.
- [5] CHAPMAN JR, TAZAKI H, MALLOUH C, KONNO S. Brefeldin A-induced apoptosis in prostatic cancer DU-145 cells: a possible p53-independent death pathway. *BJU Int* 1999; **83**(6): 703–708.
- [6] CHEN TC, HINTON DR, ZIDOVETZKI R, HOFMAN FM. Up-regulation of cAMP/PKA pathways inhibits proliferation, induces differentiation, and leads to apoptosis in malignant gliomas. *Lab Invest* 1998; **78**(2): 165–174.
- [7] CIARDIELLO F, CAPUTO R, BIANCO R, DAMIANO V, BIANCO AR, AGRAWAL S, MENDELSONN J, TORTORA G. Cooperative inhibition of renal cancer growth by anti-epidermal growth factor receptor antibody and protein kinase A antisense oligonucleotides. *J Natl Cancer Inst* 1998; **90**: 1087–1094.
- [8] COFFER PJ, JIN J, WOODGETT JR. Protein kinase B (cAkt) is a multifunctional mediator of a phosphatidylinositol-3 kinase activation. *Biochem J* 1998; **335**: 1–13.
- [9] COHEN O, FEINSTEIN E, KIMICHI A. DAP-kinase is a Ca²⁺/calmodulin dependent, cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity. *EMBO J* 1997; **16**: 998–1008.

- [10] COULDWELL WT, HINTON DR, LAW RE. Protein kinase C and growth regulation in malignant gliomas. *Neurosurgery* 1994; **35**: 1184–1186.
- [11] COURTNEY MJ, COFFEY ET. The mechanism of Ara-C-induced apoptosis of differentiating cerebellar granule neurons. *Eur J Neurosci* 1999; **11**(3): 1073–1084.
- [12] CROWDER RJ, FREEMAN RS. Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor-dependent sympathetic neurons. *J Neurosci* 1998; **18**: 2933–2943.
- [13] DEACON EM, PONGRACZ J, GRIFFITHS G, LORD JM. Isoenzymes of protein kinase C: differential involvement in apoptosis and pathogenesis. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1997; **50**: 124–131.
- [14] DEISS LP., FEINSTEIN E, BERISI H, COHEN O, KIMICHI A. Identification of a novel serine/threonine kinase and a novel 15kDa protein as a potential mediators of the gamma interferon-induced cell death. *Genes Dev* 1995; **9**: 5–30.
- [15] DOBASHI Y, SHOJI M, KONDO E, AKIYAMA T, KAMEYA T. CDK4, a possible critical regulator of apoptosis in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **253**(3): 609–613.
- [16] FLEDMARK KE, SERRES MM, LARSEN NL, YASHIMOTO T, AUNE T, DOSKELAND SO. Sensitive detection of apoptogenic toxins in suspension culture of rat and salmon hepatocytes. *Toxicol* 1998; **36**: 1101–1114.
- [17] GHAYUR T, HUGUNIN M, TALANIAN RV, RATNOFSKY S, QUINLAN C, EMOTO Y. Proteolytic activation of protein kinase C sigma by an ICE-like protease induces characteristic changes of apoptosis. *J Exp Med* 1996; **184**: 2399–2404.
- [18] GLAZER RJ. Protein kinase C as a target for cancer therapy. *Antisense Nucleic Acid Drug* 1997; **7**: 235–238.
- [19] GJERTSEN BT, DOSKELAND SO. Protein phosphorylation in apoptosis. *Bioch Biophys Acta* 1995; **1269**: 187–199.
- [20] GRANT S, JARVIS W, SWEDLER P, TURNER A, TAYLOR R, WALLACE H, LIN PS, PETTIT G, GEWIRTZ D. Potentiation of the activity of 1-beta-Darabinofuranosylcytosine by the protein kinase C activator bryostatin 1 in HL-60 cells: association with enhanced fragmentation of mature DNA. *Cancer Res* 1992; **52**: 6270–6278.
- [21] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Molekularne mechanizmy apoptozy indukowanej poprzez aktywację błonowych receptorów z nadrodziny TNF-R. *Post Bioch* 1998; **44**: 8–21.
- [22] HAN Y, CADAY CG, UMEZAWA K, NANADA A. Preferential inhibition of glioblastoma cells with wild-type epidermal growth factor receptors by a novel tyrosine kinase inhibitor ethyl-2,5-dihydroxycinnamate. *Oncol Res* 1997; **9**: 581–587.
- [23] HSU SL, CHEN MC, CHOU YH, HWANG GY, YIN SC. Induction of p21 (CIP1/Waf1) and activation of p34 (cdc2) involved in retinoic acid-induced apoptosis in human hepatoma Hep3B cells. *Exp Cell Res* 1999; **248**(1): 87–96.
- [24] IMAGAWA JI, BAXTOR GF, YELLON DM. Genistein, a tyrosine kinase inhibitor, blocks the second window of protection 48 h after ischemic preconditioning in the rabbit. *J Mol Cell Cardiol* 1997; **29**: 1885–1893.
- [25] IWATA M, ISEKI R, SATO K, TOZAWA Y, OHOKA Y. Involvement of protein kinase C-epsilon in glucocorticoid-induced apoptosis in thymocytes. *Int Immunol* 1994; **6**: 431–438.
- [26] KANTER P, LEISTER K, TOMEI L, WARREN P, WENNER C. Epidermal growth factor and tumor promoters prevent DNA fragmentation by different mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; **118**: 13399–13402.
- [27] KIZAKI H, TADAKUMA T, ODAKA C, MURAMATSU J, ISHIMURA Y. Activation of a suicide process of thymocytes through DNA fragmentation by calcium ionophores. *J Immunol* 1989; **143**: 1790–1794.
- [28] KNOX KA, JOHNSON GD, GORDON J. A study of protein kinase C isoenzyme distribution in relation to Bcl-2 expression of epithelial cells *in vivo*. *Exp Cell Res* 1993; **207**: 68–73.

- [29] LAVIN MF, WATTERS D, SONG Q. Role of protein kinase activity in apoptosis. *Experientia* 1996; **52**: 979–994.
- [30] LEE JY, HANNUN YA, OBEID LM. Ceramide inactivates cellular protein kinase c-alpha. *J Biol Chem* 1996; **271**: 13169–13174.
- [31] LEI W, MAYOTTE JE, LEVITT ML. EGF-dependent and independent programmed cell death pathways in NCI-H596 nonsmall cell lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **28**: 939–945.
- [32] LESZCZYNSKI D. The role of protein kinase C in regulation of apoptosis: a brief overview of the controversy. *Cancer J* 1996; **9**: 308–313.
- [33] LIEBERMANN DA. Normal development, oncogenesis and programmed cell death. *Oncogene* 1998; **17**: 1184–1194.
- [34] MACHWATE M, RODAN SB, RODAN GA, HERADO S. Sphingosine kinase mediated cAMP suppression of apoptosis in periosteal cells. *Mol Pharmacol* 1998; **54**: 70–77.
- [35] MACFARLANE DE, MANZEL L. Activation of beta-isoenzyme of protein kinase C is necessary and sufficient for phorbol ester-induced differentiation of HL60 promyelocytes. *J Biol Chem* 1994; **269**: 4327–4331.
- [36] MANABE A, YI T, KUMAGAI M, CAMPANA D. Use of stroma-supported cultures of leukemic cells to assess antileukemic drugs. I. Cytotoxicity of interferon alpha in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1993; **7**: 1990–1995
- [37] McCONKEY D, HARTZELL P, JONDAL M, ORRENIUS S. Inhibition of DNA fragmentation in thymocytes and isolated thymocyte nuclei by agents that stimulate protein kinase C. *J Biol Chem* 1998; **264**: 11246–11254.
- [38] MIGITA K, EGUCHI K, KAWABE Y, NAGATAKIS. Tyrosine phosphorylation participates in peripheral T-cell activation and programmed cell death *in vivo*. *Immunol* 1995; **85**: 550–555.
- [39] NAGANO M, SUZUKI H, VI-TEI K, SATO S, MIYAKE T, MIYAKE Y. H-7-induced apoptosis in the cells of *Drosophila* neuronal cell line through affecting unidentified H-7 sensitive substances. *Neurosci Res* 1998; **31**(2): 113–121.
- [40] NISHIZUKA Y. Protein kinase C and lipid signalling for sustained cellular responses. *FASEB J* 1995; **9**: 484–496.
- [41] ORRENIUS S. Apoptosis: molecular mechanism and implications for human disease. *J Int Med* 1995; **237**: 529–536.
- [42] PARK DS, LEVINE B, FERRARI G, GREENE LA. Cyclin dependent kinase inhibitors and dominant negative cyclin dependent kinase 4 and 6 promote survival of NGF-deprived sympathetic neurons. *J Neurosci* 1997; **17**(23): 8975–8983.
- [43] PARK DS, MORRIS EJ, PADMANABHAN J, SHELANSKI ML, GELLER HM, GREENE LA. Cyclin-dependent kinases participate in death of neurons evoked by DNA-damaging agents. *J Cell Biol* 1998; **143**(2): 457–467.
- [44] PARVATHEMANI LK, BUESCHER ES, CHACON-CRUZ E, BEEBE SJ. Type I cAMP-dependent protein kinase delays apoptosis in human neutrophils at a site upstream of caspase-3. *J Biol Chem* 1998; **273**: 6736–6743.
- [45] PETER ME, HENFELDER AE, HENGARTNER MO. Advances in apoptosis research. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **99**: 12736–12737.
- [46] PONGRACZ CT, TUFFLEY W, JOHNSON GD, DEACON EH, BURNETT D, STOCKLEY RA, LORD JM. Changes in protein kinase C isoenzyme expression associated with apoptosis in U937 myelomonocytic cells. *Exp Cell Res* 1995; **218**: 430–438.
- [47] POWELL CT, BRITTIS NJ, STEC D, HUNG H, HERTON WD, FAIR WC. Persistent membrane translocation of protein kinase C alpha during 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced apoptosis of LNCaP human prostate cancer cells. *Cell Growth Diff* 1996; **7**: 419–428.
- [48] RICHTER CH, SCHWEITZER M, COSSARIZZA A, FRANCESCHI C. Control of apoptosis by the cellular ATP level. *FEBS Lett* 1996; **378**: 107–110.

- [49] RODRIGUEZ-TARDUCHY G, LOPEZ-RIVAS A. Phorbol esters inhibit apoptosis in IL-2-dependent T lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **198**: 367–372.
- [50] ROLIŃSKI J. Apoptoza w układzie odpornościowym, rola Fas, bcl-2 i interleukiny 2. *Post Biol Kom* 1997; **24**: 561–574.
- [51] RYVES WJ, EVANS AT, OLIVER AR, PARKER PJ, EVANS FJ. Activation of the PKC isotypes alpha, beta1, gamma, and eta by phorbol esters of different biological activities. *FEBS Lett* 1991; **288**: 5–9.
- [52] SIKORA E. Cykl komórkowy i apoptoza: śmierć starej komórki. *Post Bioch* 1996; **42**: 108–112.
- [53] SMYTH MJ, TRAPANI JA. Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. *Immunol Today* 1995; **16**: 202–206.
- [54] SRIVASTAVA RK, SRIVASTAVA AR, KORSMEYERS SJ, NESTEROVA M, CHO-CHUNG YS, LANGO DL. Involvement of microtubules in the regulation of bcl-2 phosphorylation and apoptosis through cAMP dependent protein kinase. *Mol Cell Biol* 1998; **18**(6): 3509–3517.
- [55] SUN J, QIAN Y, CHEN Z, MARFURT J, HAMILTON AD, SEBTI SM. The geranyltransferase I inhibitor GGTI-298 induces hypophosphorylation of retinoblastoma and partner switching of cyclin-dependent kinase inhibitors. A potential mechanism for GGTI-298 antitumor activity. *J Biol Chem* 1999; **274**(11): 6930–6934.
- [56] SUN Y, POMMIER Y, COLBURN N. Acquisition of a growth-inhibitory response to phorbol ester involves DNA damage. *Cancer Res* 1992; **52**: 1907–1915.
- [57] SWEENEY JF, NGUYEN PK, WORMANN GM, HANSHAW DB. Lipopolisaccharide protects polymorphonuclear leukocytes from apoptosis via tyrosine phosphorylation-dependent signal transduction pathways. *J Surg Res* 1998; **14**: 64–72.
- [58] TANAKA J, KOSHIMURA K, MURAKAMI Y, SOHMIYE M, KANEIKARA N, KATO Y. Neuronal protection from apoptosis by adenylate cyclase-activating polipeptid. *Reg Peptid* 1997; **72**(1): 1–8.
- [59] TOMEI L, KANTER P, WENNER C. Inhibition of radiation-induced apoptosis in tumor promoters. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **198**: 324–331.
- [60] TOWNSEND KJ, TRUSKY JL, TRAMPAN MA, EASTMAN A, CRAIG RW. Expression of antiapoptotic MCL 1 gene product is regulated by a mitogen activated protein kinase – mediated pathway triggered through microtubule disruption and protein kinase C. *Oncogene* 1998; **17**: 1223–1234.
- [61] TURNER NA, XIA F, AZHAR G, ZHANG X, LIU L, WEI JY. Oxidative stress induces DNA fragmentation and caspase activation of the c-Jun NH2-terminal kinase pathway in H9c2 cardiac muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 1998; **30**: 1789–1801.
- [62] UCKUN FM, TUEL-AHLGREN L, SONG CW, WADDICK K, MYERS DE, KIRIHARA J, LEDBETTER JA, SCHIEVEN GL. Ionizing radiation stimulates unidentified tyrosine-specific protein kinases in human B-lymphocyte precursors, triggering apoptosis and clonogenic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 9005–9009.
- [63] WANG S, GUO CY, CASTILLO A, DENT P, GRANT S. Effects of bryostatin on taxol-induced apoptosis and cytotoxicity in human leukemia cells (U937). *Biochem Pharmacol* 1998; **56**(5): 635–644.
- [64] WANG Y, HUANG S, SAH VP, ROSS J, BROWN JH, HAN J, CHIEN KR. Cardiac muscle hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen activated protein kinase family. *J Biol Chem* 1998; **273**: 2161–2168.
- [65] WATERHOUSE NJ, FINUCANE DM, GREEN DR, ELCE JS, KUMAR S, ALNEMRI ES, LITWACK G, KHANNA K, LAVIN MF, WATTERS DJ. Calpain activation is upstream of caspases in radiation-induced apoptosis. *Cell Death Diff* 1998; **12**: 1051–1061.

- [66] WOLF JK, KIM TE, FIGHMASTER D, BODURKA D, GERSHENSON DM, MILLS G, WHARTON JT. Growth suppression of human ovarian cancer cell lines by the introduction of a p16 gene via a recombinant adenovirus. *Gynecol Oncol* 1999; **73**(1): 27–34.
- [67] YAO R, COOPER GM. Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* 1995; **267**: 2003–2005.
- [68] YOO YD, PARK JK, LEE KH, KIM CS, SHIN SW, KIM YH, KIM JS. CDK4 down-regulation induced by paclitaxel is associated with G1 arrest in gastric cancer cells. *Clin Cancer Res* 1999; **4**(12): 3063–3068.
- [69] YOUSEFI S, GREEN DR, BLASER K, SIMON HU. Protein-tyrosine phosphorylation regulates apoptosis in human eosinophils and neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 10868–10872.
- [70] ZHANG W, LAW RE, HINTON DR, COULDWELL WT. Inhibition of human malignant glioma cell motility and invasion *in vitro* by hypericin, a potent protein kinase C inhibitor. *Cancer Lett* 1997; **25**: 31–38.
- [71] ZIRPEL L, LIPPE WR, RUBELEW. Activity-dependent regulation of $[Ca^{2+}]$ in avian cochlear nucleus neurons – roles of PKA, PKC and relation to cell death. *J Neurophysiol* 1998; **79**(5): 2288–2302.

Redaktor prowadzący – Marcin Zabel

Otrzymano: 20.09.1999 r.

Przyjęto: 17.11.1999 r.

Adres autora: 91-425 Łódź, ul. Sterlinga 3

RODZINA PEPTYDÓW Z DOMENĄ KONICZYNO-PODOBNĄ

FAMILY OF TREFOIL PEPTIDES

MACIEJ ŁAZARCZYK, TOMASZ GRZELA

Zakład Histologii i Embriologii, Instytut Biostruktury, Akademia Medyczna w
Warszawie

Streszczenie: Peptydy z domeną koniczyno-podobną występują głównie w przewodzie pokarmowym. Interakcje tych peptydów z resztami cukrowymi glikoprotein przez tworzenie wiązań krzyżowych umożliwiają utrzymywanie prawidłowej architektury śluzu. Odgrywają w ten sposób istotną rolę w tworzeniu bariery chroniącej błonę śluzową. Peptydy z domeną koniczyno-podobną stymulując migrację komórek nabłonka do miejsc uszkodzenia uczestniczą również w regeneracji ubytków powstałych w błonie śluzowej. Związek peptydów z domeną koniczyno-podobną z nowotworami jest nadal niejasny. W przewodzie pokarmowym najprawdopodobniej są one jednym z czynników chroniących przed rozwojem nowotworu. Jednak w raku płacikowym gruczołu sutkowego wysoki poziom tych peptydów wydaje się sprzyjać rozwojowi nowotworu. Możliwe, że wpływając na migrację komórek nowotworowych niektóre peptydy z domeną koniczyno-podobną umożliwiają powstawanie przerzutów i progresję nowotworów.

(*Postępy Biologii Komórki* 2000; 27: 125–136)

Słowa kluczowe: domena koniczyno-podobna, błona śluzowa, regeneracja, nowotwory przewodu pokarmowego.

Summary: The trefoil family of peptides is mainly associated with gastrointestinal tract. These peptides protect the mucous layer. The protective role of trefoil peptides is explained by their interaction with carbohydrates attached to mucin glycoproteins and by maintenance of the mucus structure. Trefoil peptides influence migration of epithelial cells and thus contribute to regeneration of the mucous layer. A correlation between trefoil peptides and oncogenesis remains unclear. In the gastrointestinal tract, trefoil peptides are considered to be one of more important factors protecting them against cancer. However, in lobular breast cancer, trefoil peptides may facilitate the tumor development. Possibly, a migration of neoplastic cells, influenced by trefoil peptides is responsible for metastases and tumor progression.

(*Advances in Cell Biology* 2000; 27: 125–136)

Key words: trefoil domain, mucous membrane, regeneration, gastrointestinal tract, cancer.

WSTĘP

W ostatnich latach zidentyfikowano nową rodzinę peptydów, TFF (*trefoil factor family*), zawierających w swej strukturze co najmniej jedną charakterystyczną domenę koniczyno-podobną (z ang. *trefoil domain*). Peptydy te występują głównie w przewodzie pokarmowym (tab. 1) [4, 9, 37]. Przedstawicielami rodziny są: pS2 (nowa nazwa, proponowana celem ujednoczenia nomenklatury – TFF1), SP (z ang. *spasmolytic polypeptide*; proponowana nazwa – TFF2) oraz ITF (z ang. *intestinal trefoil factor*; proponowana nazwa – TFF3). Nowe nazewnictwo TFF nie zostało dotychczas zaakceptowane przez wszystkie zespoły zajmujące się tą problematyką, stąd też autorzy przytaczają nadal stosowane, tradycyjne nazwy tych peptydów.

Uważa się, że TFF pełnią funkcję protekcyjną w stosunku do błony śluzowej. Zapobiegają jej uszkodzeniu przez czynniki drażniące, a także uczestniczą w re-

generacji powstałych ubytków [22, 25, 28]. Stymulują migrację komórek nabłonka błony śluzowej oraz niektórych linii nowotworowych *in vitro* [23, 28]. Mogą wykazywać działanie spazmolityczne [15]. Wydaje się, że przynajmniej niektóre z peptydów z domeną koniczyno-podobną są również inhibitorami nowotworzenia w przewodzie pokarmowym [4, 22].

TABELA 1. Peptydy z domeną koniczyno-podobną [4, 9, 37]

Białko	Miejsce występowania
SP	żołądek, dwunastnica
pS2	żołądek, dwunastnica, gruczoł sutkowy
ITF	jelito cienkie, jelito grube

Zaobserwowano, że nowotwory gruczołu sutkowego, wykazujące wysoki poziom ekspresji receptorów estrogenowych, produkują znaczące ilości tych peptydów [26, 36]. Jednak znaczenie tego zjawiska nie zostało dotychczas wyjaśnione.

BUDOWA PEPTYDÓW Z DOMENĄ KONICZYNO-PODOBNA

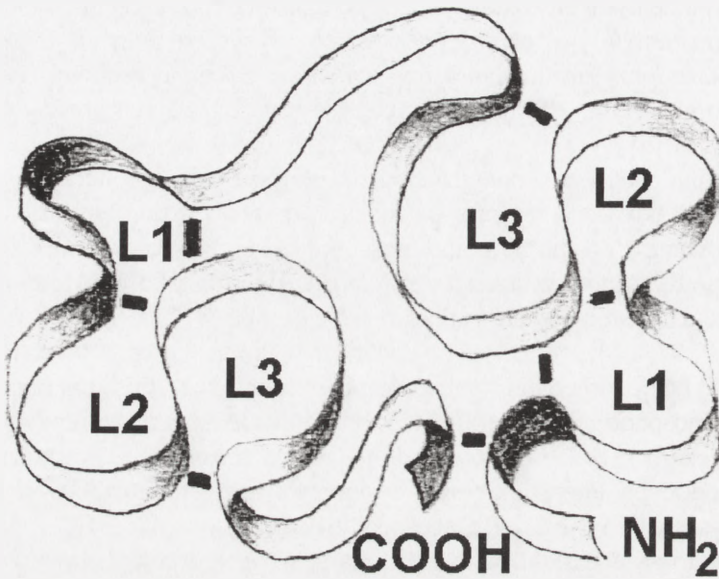
Dotychczas poznane ludzkie peptydy z domeną koniczyno-podobną są kodowane przez geny znajdujące się w chromosomie 21, w regionie q22.3. Gen kodujący hSP zawiera cztery eksony, w tym dwa niezależnie kodujące dwie domeny koniczyno-podobne [10]. Geny kodujące hpS2 i hITF zawierają po trzy eksony, z czego po jednym kodującym domenę koniczyno-podobną [10, 17]. Analiza regionu promotorowego genów kodujących zarówno ludzkie, jak i szczurze peptydy z domeną koniczyno-podobną wykazała obecność sekwencji TATA box [2].

Najlepiej poznanym przedstawicielem rodziny TFF jest czynnik PSP (z ang. *pancreatic spasmolytic polypeptide*). Został on odkryty w jednej z frakcji, otrzymanych podczas oczyszczania insuliny świńskiej. Schemat budowy domeny koniczyno-podobnej białka PSP jest charakterystyczny dla innych przedstawicieli tej rodziny (rys. 1) [9].

PSP jest zbudowany z jednego łańcucha polipeptydowego, złożonego ze 106 aminokwasów. Określone regiony łańcucha tworzą dwie domeny koniczyno-podobne, zbudowane z 38 lub 39 aminokwasów [9, 34]. Każda z domen zbudowana jest z trzech pętli, utrzymywanych przez 3 mostki dwusiarczkowe. Mostki tworzone są przez 6 reszt cysteinowych, połączonych ze sobą w konfiguracji: 1 z 5, 2 z 4, 3 z 6 [4, 9, 31, 34]. PSP zawiera dodatkowy, siódmy mostek dwusiarczkowy, znajdujący się poza domenami koniczyno-podobnymi. Niektóre inne peptydy z domeną koniczyno-podobną zawierają nieparzystą liczbę reszt cysteinowych, np. pS2 i ITF – po siedem [3]. Sześć z nich odpowiada za formowanie struktury domeny koniczyno-podobnej. Pozostała reszta cysteinowa może reagować z wolną grupą sulfhydrylową cysteiny drugiej cząsteczki, tworząc dimer [3, 24].

Pomiędzy drugą a trzecią pętlą PSP znajduje się kieszonka, utworzona przez konserwatywną sekwencję aminokwasów. Uważa się, że może ona oddziaływać z oligosacharydami lub fragmentami polisacharydów glikoprotein [9]. PSP mógłby więc wywierać stabilizujący wpływ na śluz przez wiązanie krzyżowe glikoprotein. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że PSP ma zdolność do dimeryzacji. Forma dimeryczna utrzymywana jest przez dwa wiązania wodorowe oraz przez interakcje między hydrofobowymi regionami monomerów [9]. Gdyby proces ten zachodził także *in vivo*, to powstały dimer PSP/PSP, zawierający cztery kieszonki wiążące sacharydy, mógłby znacznie skuteczniej pełnić funkcję stabilizującą śluz [9]. W przypadku pS2 stwierdzono, że jego dimer, efektywniej niż monomer, stymuluje regenerację błony śluzowej, uszkodzonej przez działanie indometacyny [24]. Możliwe, że efekt ten zależy od efektywniejszej stabilizacji śluzu przez dimer niż przez monomer. Warstwa śluzu stabilizowanego przez pS2, chroniąc błonę śluzową przed dalszym działaniem czynników uszkodzających, mogłaby ułatwiać jej regenerację. Sugerowany jest też mechanizm związany ze stabilniejszym łączeniem się dimeru niż monomeru z hipotetycznym receptorem dla pS2 [24]. W tym przypadku udział pS2 w regeneracji uszkodzonej błony śluzowej może być związany z jego wpływem na migrację komórek nabłonka.

Miejsce działania peptydów z domeną koniczyno-podobną, tj. przewód pokarmowy, wiąże się z ich narażeniem na działanie enzymów trawiennych. Zwarta struktura cząsteczek zapewnia im jednak oporność na trawienie przez proteazy [4, 38]. Potencjalnie najbardziej podatny na działanie chymotrypsyny fragment PSP obejmuje reszty aminokwasowe 99-102 (-Met-Ser-Val-Glu-). Sekwencja ta położona jest między domenami koniczyno-podobnymi, co uniemożliwia jej oddziaływanie z centrum aktywnym enzymu [9].



RYSUNEK 1. Schemat budowy PSP: — mostek dwusiarczkowy; L1, L2, L3 pętle domen koniczyno-podobnych

ROLA PEPTYDÓW TFF W PROKSYMALNEJ CZĘŚCI PRZEWODU POKARMOWEGO

Badania nad rolą peptydów z domeną koniczyno-podobną prowadzono na myszach *knock-out*, tj. z zablokowaną ekspresją genu dla jednego z tych białek – pS2 [22]. Zwierzęta te (homozygoty *knock-out* – mpS2^{-/-} i heterozygoty – mpS2^{+/-}) pod względem wyglądu i zachowania nie wykazywały istotnych różnic w porównaniu ze szczepem dzikim (mpS2^{+/+}). Nie stwierdzono także różnic w budowie histologicznej większości narządów, z wyjątkiem żołądka i jelita cienkiego myszy mpS2^{-/-} (tab. 2). U zwierząt 3-tygodniowych stwierdzono w żołądku podwojenie grubości błony śluzowej, a u zwierząt 5-miesięcznych (100% osobników) także liczne zmiany o typie gruczolaka. Zaobserwowano również: pogłębienie doteczek żołądkowych, znaczne zmniejszenie ilości śluzu, hiperplazję komórek błony śluzowej, 10-krotny wzrost wskaźnika mitotycznego, zaburzenia różnicowania komórek, a u 30% osobników wielogniskowe (2 do 5 ognisk) zmiany o typie raka śródnamionkowego (*carcinoma intraepitheliale*). W jelicie cienkim zwierząt mpS2^{-/-} stwierdzono natomiast obfite nacieki zapalne w znacznie pogrubionej blaszce właściwej błony śluzowej [22].

TABELA 2. Wpływ ekspresji mpS2 na błonę śluzową żołądka [22]

Miejsce działania	mpS2 ^{+/+} i mpS2 ^{+/-}	mpS2 ^{-/-}
Nabłonek	brak zmian	hiperplazja, dysplazja
Dołki żołądkowe	brak zmian	pogłębienie
Produkcja śluzu	brak zmian	znacznie obniżona
Wskaźnik mitotyczny	brak zmian	10-krotnie wyższy
Zmiany nowotworowe	brak zmian	gruczolaki, <i>carcinoma in situ</i>

Mechanizm hamującego działania mpS2 na rozwój nowotworu nie jest w pełni poznany. Być może, przez wpływ na ilość i strukturę śluzu [22], mpS2 może pośrednio chronić nabłonek przed działaniem karcinogenów. Ponadto mpS2 hamuje proliferację oraz stymuluje różnicowanie się komórek [8, 22].

W badaniach dotyczących białek hSP (ludzki odpowiednik PSP) i pS2 wykazano, że są one produkowane przez komórki doteczek żołądkowych i komórki dystalnych części gruczołów Brünnera. Wysoką ekspresję pS2 i hSP wykryto również w ogniskach metaplastacji żołądkowej, obserwowanej wokół owrzodzenia błony śluzowej dwunastnicy oraz w komórkach związanych z ogniskami metaplastycznymi, tzw. UACL (*Ulcer Associated Cell Lineage*) [12, 18, 28, 41]. Badając wpływ hSP oraz rITF (*rat-ITF*) na błonę śluzową żołądka szczura, poddaną działaniu etanolu lub niesteroidowych leków przeciwzapalnych stwierdzono, że doustne podanie hSP albo rITF zmniejsza uszkadzający wpływ substancji na błonę śluzową żołądka [1].

Komórki gruczołów Brünnera oraz komórki tworzące UACL, oprócz peptydów z domeną koniczyno-podobną, wytwarzają także naskórkowy czynnik wzrostu (z ang. *epidermal growth factor* – EGF) [21]. Pobudza on proliferację komórek nabłonkowych w jelicie, przez co może ułatwiać gojenie owrzodzeń [19, 20, 21, 35]. Wykazując stymulujące działanie EGF na ekspresję pS2 postulowano, że wpływ tej cytokiny na regenerację błony śluzowej może, przynajmniej częściowo, zależeć również od czynników z grupy TFF [29]. Dotychczas nie udało się jednak wykryć na komórkach UACL receptorów dla EGF [39].

Uważa się, że wpływ wielu cytokin i czynników wzrostu, m.in. interleukin – IL1, IL2, interferonu (IFN- γ), transformującego czynnika wzrostu (TGF- α) oraz EGF, na regenerację błony śluzowej zależy od udziału TGF- β . Mechanizm działania peptydów z domeną koniczyno-podobną prawdopodobnie jest od niego niezależny. Działanie TFF może mieć natomiast charakter dopełniający w stosunku do czynników zależnych od TGF- β . Uważa się, że peptydy te działają na powierzchnię luminalną komórek nabłonka, podczas gdy czynniki zależne od TGF- β – na ich powierzchnię podstawno-boczną [5, 24].

Związek czynników pS2 i hSP z procesami chorobowymi w przewodzie pokarmowym nie jest ograniczony jedynie do choroby wrzodowej żołądka czy dwunastnicy. Grupy komórek analogiczne do UACL i wytwarzające duże ilości pS2 i hSP stwierdzono również w przewlekłym zapaleniu trzustki, a także w zapaleniach pęcherzyka żółciowego, jajowodu i pęcherza moczowego [40].

ROLA PEPTYDÓW TFF W DYSTALNEJ CZĘŚCI PRZEWODU POKARMOWEGO

W przeciwieństwie do hSP i pS2, aktywnych głównie w górnym odcinku przewodu pokarmowego, w jego dystalnej części istotną rolę odgrywa zwłaszcza ITF [36, 37]. Aby lepiej poznać fizjologiczne znaczenie tego czynnika, wyhodowano myszy z zablokowaną ekspresją genu kodującego ITF (homozygoty $ITF^{-/-}$ i heterozygoty $ITF^{+/-}$) [25].

Nabłonek okrężnicy zwierząt $ITF^{-/-}$ nie wykazywał różnic w porównaniu ze szczepem dzikim, a komórki kubkowe wydzielały prawidłową ilość śluzu. Nie zaobserwowano istotnych zmian fenotypowych ani u homozygot $ITF^{-/-}$, ani u zwierząt $ITF^{+/-}$. Mimo prawidłowej budowy błony śluzowej jelit, stosując metodę znakowania komórek bromodeoksyurydyną stwierdzono zaburzenia migracji enterocytów na powierzchnię błony śluzowej u zwierząt $ITF^{-/-}$ i heterozygot $ITF^{+/-}$ [25]. Upośledzoną migrację komórek w miejsce uszkodzenia potwierdzono również w badaniach *in vitro* [5]. Podobnego defektu nie obserwowano u zwierząt szczepu dzikiego ($ITF^{+/+}$) [25].

Znaczne różnice w stosunku do szczepu dzikiego wykazano w odpowiedzi na środki drażniące (sól sodową siarczanu dekstranu). U zwierząt $ITF^{-/-}$ w 50% przypadków obserwowano znaczny ubytek masy ciała, krwawe biegunki i śmierć. U szczepów dzikich występował mniejszy ubytek masy ciała, a śmiertelność wynosiła około 5%. Badania histologiczne okrężnicy zwierząt $ITF^{-/-}$ wykazały liczne nadżerki, znaczne zmiany zapalne i ropnie. Dotyczyły one głównie okrężnicy zstępującej, okrężnicy esowatej i odbytnicy. Zmian o takim nasileniu nie obserwowano u zwierząt szczepu dzikiego. Podanie homozygotom $ITF^{-/-}$ rekombinowanego ITF powodowało nasilenie migracji komórek i powrót błony śluzowej do stanu prawidłowego [25]. Może to potwierdzać przypuszczenie, że zaburzenia regeneracji błony śluzowej były wtórne do deficytu ITF.

MECHANIZM DZIAŁANIA PEPTYDÓW TFF

Uważa się, że mechanizm ochronnego działania peptydów zawierających domenę koniczyno-podobną polega na modyfikowaniu właściwości fizyko-chemicznych śluzu. W ten sposób uczestniczą one w tworzeniu bariery, chroniącej błonę śluzową przed działaniem czynników uszkadzających i potencjalnych karcinogenów [24]. Istnieją jednak liczne dane, sugerujące czynny udział TFF w procesach regeneracji uszkodzeń błony śluzowej [28, 34]. Stwierdzono m.in., że peptydy te wywierają wpływ na migrację komórek nabłonka [23, 28].

Badania prowadzono na szczurzych liniach komórkowych IEC-6 i IEC-17 (*intestinal epithelial cell lines*). Stosując metodę *wound assay* wykazano wpływ hSP i hITF na migrację komórek i regenerację nabłonka *in vitro* [5, 27, 32]. Zaobserwowano, że hSP czterokrotnie wzmacniał migrację komórek do miejsca uszkodzenia. Stymulujący wpływ na migrację wykazywały również oczyszczone glikoproteiny mucynowe. Migracja komórek hodowanych w obecności zarówno hSP, jak i glikoprotein mucynowych była 6 do 15 razy większa w porównaniu z kontrolą. Podobne wyniki otrzymano w doświadczeniach z hITF [5]. Stężenia peptydów TFF, jak i glikoprotein mucynowych, zastosowanych w doświadczeniach były porównywalne ze stężeniami fizjologicznymi.

Molekularne podłoże mechanizmu działania peptydów z domeną koniczyno-podobną na migrację komórek pozostaje niejasne. Ostatnio zidentyfikowano w jelicie cienkim glikoproteinę o masie 50 kDa, która przypuszczalnie jest receptorem dla ITF [33].

Stwierdzono, że ITF hamuje aktywność kinaz ERK1 oraz ERK2 w linii komórkowej IEC-6. Nie zaobserwowano jednak zmiany poziomu ekspresji tych białek pod wpływem ITF, a jedynie obniżony poziom ufosforylowania ich reszt tyrozynowych. Zmniejszając aktywność wyżej wymienionych kinaz ITF może hamować proliferację komórek nabłonka. Sugeruje się, że inaktywujący efekt działania ITF na kinazy ERK1 i ERK2 jest zależny od fosfataz tyrozynowych [16].

Analizując efekty działania ITF na wywodzącą się z raka okrężnicy linię komórkową HT29 stwierdzono, że powoduje on m.in. szybką fosforylację β -katenin, γ -katenin i receptora dla EGF [7, 23]. Nie zaobserwowano fosforylacji α -katenin ani E-kadheryn [23]. Ponadto zanotowano znaczny spadek ekspresji E-kadheryn, α -katenin, β -katenin oraz białka APC (*Adematous Polyposis Coli*). W tej samej linii komórkowej stwierdzono także indukcję apoptozy pod wpływem ITF [7].

Wiadomo, że kompleks E-kadheryna/kateniny jest jednym z głównych czynników, odpowiedzialnych za zależną od Ca^{2+} adhezję międzykomórkową. E-kadheryna tworzy przez domenę zewnątrzkomórkową homodimer z cząsteczką zlokalizowaną na innej komórce, natomiast jej domena wewnątrzkomórkowa tworzy kompleks z β - i γ -kateninami. Kompleks ten łączy się z cytoskieletem komórki za pośred-

nictwem α -katenin [6, 7]. ITF, a być może i inne peptydy TFF, zaburzając funkcję kompleksu, mogłyby zmniejszać siłę wzajemnego przylegania komórek. W ten sposób ułatwiałyby ich migrację [6, 7, 23]. Mechanizm ten mógłby być także odpowiedzialny za zdolność komórek nowotworowych do naciekania i tworzenia przerzutów.

β -kateniny, niezależnie od tworzenia kompleksu z E-kadherynami, są wewnątrzkomórkowymi przekaźnikami sygnałów związanymi m.in. z receptorem dla EGF, APC, onkogenem *c-erbB2* oraz niektórymi czynnikami transkrypcyjnymi [6]. W związku z tym, ITF destabilizując kompleks E-kadheryna/kateniny może potencjalnie wywierać daleko większy wpływ na komórki nabłonka, niż wynikałoby to z osłabienia adhezji międzykomórkowej.

ROLA PEPTYDÓW TFF W PROCESIE NOWOTWORZENIA POZA PRZEWODEM POKARMOWYM

Pierwszy peptyd z domeną koniczyno-podobną (pS2) odkryto w trakcie badań nad nowotworami gruczołu sutkowego. Podjęto zatem próbę ustalenia jego związku z procesem nowotworzenia. Stwierdzono, że pS2 występuje w 68% nowotworów gruczołu sutkowego [13], ale jego obecność można wykryć w wielu innych nowotworach, m.in.: żołądka, trzustki, okrężnicy, macicy, jajnika, pęcherza moczowego i gruczołu krokowego [14]. W przypadku nowotworów gruczołu sutkowego stwierdzono, że w odróżnieniu od raka przewodowego, wysoką ekspresję pS2 wykazuje przede wszystkim rak płacikowy tego narządu [30].

Płacikowy rak gruczołu sutkowego ma charakter rozsiany, naciekający i tworzy tarczowate otoczki wokół nie zmienionych przewodów. Nowotwór ten często daje przerzuty, zwłaszcza do żołądka, macicy i mózgu. W narządach tych stwierdzono fizjologicznie wysoki poziom ekspresji peptydów TFF (w przypadku mózgu – do tychczas tylko u gryzoni) [36]. Mogłoby to sugerować, że przy powstawaniu przerzutów peptydy te być może pełnią funkcję czynników chemotaktycznych.

W przeciwieństwie do przewodu pokarmowego, ekspresja hpS2 w gruczole sutkowym pozostaje pod kontrolą estrogenów, a komórki raka płacikowego wykazują wysoki poziom ekspresji receptorów estrogenowych. Możliwe, że przez zwiększanie produkcji hpS2 wywierają one wpływ na migrację komórek nowotworowych i zdolność do tworzenia przerzutów [26, 30, 36]. Istnienie takiej zależności mogłoby tłumaczyć stymulujący wpływ estrogenów na progresję niektórych nowotworów gruczołu sutkowego.

Wykazanie związku estrogenów z peptydami TFF może mieć również potencjalne znaczenie kliniczne. Zaobserwowano dodatnią korelację między wysokim poziomem

hpS2 a efektem leczniczym po zastosowaniu środków antyestrogenowych (np. Tamoxifen). Wprawdzie prognozowanie skuteczności terapii na tej podstawie nie było bardziej miarodajne niż na podstawie określania poziomu ekspresji receptorów estrogenowych, okazało się jednak użyteczne w grupie kobiet, u których na komórkach nowotworowych stwierdzono pośredni poziom tych receptorów. Wysoki poziom hpS2 u pacjentek z tej grupy wyraźnie zwiększał szansę powodzenia leczenia preparatami antyestrogenowymi [36].

Podobne wyniki uzyskano w odniesieniu do hITF. Stwierdzono, że peptyd ten również występuje w nowotworach gruczołu sutkowego, a jego ekspresja pozostaje pod kontrolą estrogenów. Tak jak w przypadku hpS2, zaobserwowano dodatnią korelację między wysokim poziomem hITF a efektem leczniczym po zastosowaniu preparatów antyestrogenowych [26]. W przeciwieństwie do hpS2 i hITF, w nowotworach gruczołu sutkowego nie wykryto obecności hSP [30].

Ostatnio stwierdzono, że wysoki poziom ekspresji receptorów estrogenowych oraz peptydów TFF (ITF i pS2) wykazują również nowotwory śluzowe skóry [11]. Być może należałoby rozważyć zastosowanie preparatów antyestrogenowych także w przypadku tych nowotworów. Jednak dokładny mechanizm działania i związek tych peptydów z receptorami estrogenowymi wciąż pozostaje nieznany.

PODSUMOWANIE

Zastosowanie rodziny peptydów z domeną koniczyno-podobną stwarza, ze względu na ich ochronne i regeneracyjne działanie na błonę śluzową żołądka i dwunastnicy, obiecujące perspektywy dla skutecznego leczenia choroby wrzodowej. Odkrycie szlaków przekazywania sygnału przez receptory dla TFF stwarza nowe możliwości badania mechanizmów adhezji, ruchu komórek nabłonkowych, a także tworzenia przerzutów przez komórki nowotworowe. Dokładne poznanie ich roli w procesach nowotworzenia w obrębie przewodu pokarmowego, jak też w biologii nowotworów zależnych od wpływu estrogenów może mieć znaczenie diagnostyczne, a być może i terapeutyczne.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BABYATSKY MW, DE BEAUMONT M, THIM L, PODOLSKY DK. Oral trefoil peptides protect against ethanol- and indomethacin-induced gastric injury in rats. *Gastroenterology* 1996; **110**: 632–635.
- [2] BECK S, SOMMER P, SILVA E, DOS S, BLIN N, GOTT P. Hepatocyte nuclear factor (Winged Helix Domain) activates trefoil factor gene TFF1 through a binding motif adjacent to the TATA box. *DNA Cell Biol* 1999; **18**: 157–164.

- [3] CHADWICK MP, WESTLEY BR, MAY FE. Homodimerization and hetero-oligomerization of the single domain trefoil protein pNR-2/pS2 through cysteine 58. *Biochem J* 1997; **327**: 117–123.
- [4] CHINERY R, COFFEY RJ. Trefoil peptides: Less clandestine in the intestine. *Science* 1996; **274**: 204–206.
- [5] DIGNASS A, LYNCH-DEVANEY K, KINDON H, THIM L, PODOLSKY DK. Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor β – independent pathway. *J Clin Invest* 1994; **94**: 376–384.
- [6] EFSTATHIOU JA, LIU D, WHEELER JM, KIM HC, BECK NE, ILYAS M, KARAYIAN-NAKIS AJ, MORTENSEN NJ, KMIOT W, PLAYFORD RJ, PIGNATELLI M, BODMER WF. Mutated epithelial cadherin is associated with increased tumorigenicity and loss of adhesion and of responsiveness to the motogenic trefoil factor 2 in colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 2316–2321.
- [7] EFSTATHIOU JA, NODA M, ROWAN A, DIXON C, CHINERY R, JAWHARI A, HATTORI T, WRIGHT NA, BODMER WF, PIGNATELLI M. Intestinal trefoil factor controls the expression of the adenomatous polyposis coli-catenin and the E-cadherin-catenin complexes in human colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 3122–3127.
- [8] FEATHERSTONE C. Soothing the troubled gut with trefoil factors. *Lancet* 1997; **349**: 706–708.
- [9] GAJHEDE M, PETERSEN TN, HENRIKSEN A, PETERSEN JFW, DAUTER Z, WILSON KS, THIM L. Pancreatic spasmolytic polypeptide: first three-dimensional structure of a member of the mammalian trefoil family of peptides. *Curr Biol* 1993; **1**: 253–262.
- [10] GOTT P, BECK S, MACHADO JC, CARNEIRO F, SHMITT H, BLIN N. Human trefoil peptides: Genomic structure in 21q22.3 and coordinated expression. *Eur J Hum Genet* 1996; **4**: 308–315.
- [11] HANBY AM, MCKEE P, JEFFERY M, GRAYSON W, DUBLIN E, POULSOM R, MAGUIRE B. Primary mucinous carcinomas of the skin express TFF1, TFF3, oestrogen receptor and progesterone receptors. *Am J Surg Pathol* 1998; **22**: 1125–1131.
- [12] HANBY AM, POULSOM R, ELIA G, SINGH S, LONGCROFT JM, WRIGHT NA. The expression of the trefoil peptides pS2 and human spasmolytic polypeptide (hSP) in gastric metaplasia of the proximal duodenum: implications for the nature of gastric metaplasia. *J Pathol* 1993; **169**: 355–360.
- [13] HENRY JA, BENNET MK, PIGGOTT NH, LEVETT DL, MAY F, WESTLEY B. Expression of pNR-2/pS2 proteins in diverse epithelial tumours. *Brit J Cancer* 1991; **64**: 677–682.
- [14] HENRY JA, PIGGOTT NH, MALLICK UK, NICHOLSON S, FARNDON JR, WESTLEY BR, MAY FE. pNR-2/pS2 immunohistochemical staining in breast cancer: correlation with prognostic factors and endocrine response. *Brit J Cancer* 1991; **63**: 615–622.
- [15] JORGENSEN KD, DIAMANT B, JORGENSEN KH, THIM L. Pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP): III. Pharmacology of a new porcine pancreatic polypeptide with spasmolytic and gastric acid secretion inhibitory effects. *Regul Peptides* 1982; **3**: 231–243.
- [16] KANAI M, MULLEN C, PODOLSKY DK. Intestinal trefoil factor induces inactivation of extracellular signal-regulated protein kinase in intestinal epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 178–182.
- [17] KAYADEMIR T, SILVA E, DOS S, PUSCH C, BECK S, MACHADO JC, GOTT P. A novel 25bp tandem repeat within the human trefoil peptide gene TFF2 in 21q22.3: polymorphism and mammalian evolution. *Eur J Hum Genet* 1998; **6**: 121–128.
- [18] KHULUSI S, HANBY AM, MARRERO JM, PATEL P, MENDALL MA, BADVE S, POULSOM R, ELIA G, WRIGHT NA, NORTHFIELD TC. Expression of trefoil peptides pS2 and human spasmolytic polypeptide in gastric metaplasia at the margin of duodenal ulcers. *Gut* 1995; **37**: 205–209.

- [19] KONTUREK JW, HENGST K, KONTUREK SJ, DOMSCHKE W. Epidermal growth factor in gastric ulcer healing by nocloprost, a stable prostaglandin E2 derivative. *Scand J Gastroentero* 1997; **32**: 980–984.
- [20] KONTUREK PC, BRZOZOWSKI T, KONTUREK SJ, ERNST H, DROZDOWICZ D, PAJDO R, HAHN EG. Expression of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha during ulcer healing. Time sequence study. *Scand J Gastroentero* 1997; **32**: 6–15.
- [21] KONTUREK PC, KONTUREK SJ, BRZOZOWSKI T, ERNST H. Epidermal growth factor and transforming growth factor alpha: role in protection and healing of gastric mucosal lesions. *Eur J Gastroen Hepat* 1995; **7**: 933–937.
- [22] LEFEBVRE O, CHENARD MP, MASSON R, LINARES J, DIERICH A, LeMEUR M, WENDLING C, TOMASETTO C, CHAMBON P, RIO MC. Gastric mucosa abnormalities and tumorigenesis in mice lacking the pS2 trefoil protein. *Science* 1996; **274**: 259–262.
- [23] LIU D, el-HARIRY I, KARAYIANNAKIS AJ, WILDING J, CHINERY R, KMIOT W, McCREA PD, GULLICK WJ, PIGNATELLI M. Phosphorylation of β -catenin and epidermal growth factor receptor by intestinal trefoil factor. *Lab Invest* 1997; **77**: 557–563.
- [24] MARCHBANK T, WESTLEY BR, MAY FE, CALNAN DP, PLAYFORD RJ. Dimerization of human pS2 (TFF1) plays a key role in its protective/healing effects. *J Pathol* 1998; **185**: 153–158.
- [25] MASHIMO H, WU D-C, PODOLSKY DK, FISHMAN MC. Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science* 1996; **274**: 262–265.
- [26] MAY FE, WESTLEY BR. Expression of human intestinal trefoil factor in malignant cells and its regulation by oestrogen in breast cancer cells. *J Pathol* 1997; **182**: 404–413.
- [27] McCORMACK SA, VIAR MJ, JOHNSON LR. Migration of IEC-6 cells: a model for mucosal healing. *Am J Physiol* 1992; **263**: G 426–435.
- [28] MODLIN IM, POULSOM R. Trefoil peptides: mitogens, motogens or mirages? *J Clin Gastroenterol* 1997; **25** suppl 1: 94–100.
- [29] NUNEZ AM, BERRY M, IMLER JL, CHAMBON P. The 5' flanking region of the pS2 gene contains a complex enhancer region responsive to oestrogens, epidermal growth factor, tumor promoter (TPA), the c-Ha-ras oncoprotein and the c-jun protein. *EMBO J* 1989; **8**: 823–829.
- [30] POULSOM R, HANBY AM, LALANI EN, HAUSER F, HOFFMAN W, STAMP GW. Intestinal trefoil factor (TFF-3) and pS2 but not spasmodic polypeptide mRNAs are coexpressed in normal, hiperplastic and neoplastic human breast epithelium. *J Pathol* 1997; **183**: 30–38.
- [31] SANDS BE, PODOLSKY DK. The trefoil peptide family. *Annu Rev Physiol* 1996; **58**: 253–273.
- [32] SATO Y, RIFKIN DB. Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of latent transforming growth factor-beta 1-like molecule by plasmin during co-culture. *J Cell Biol* 1989; **109**: 309–315.
- [33] TAN XD, HSUEH W, CHANG H, WEI KR, GONZALES-CRUSSI F. Characterization of a putative receptor for intestinal trefoil factor in rat small intestine: identification by *in situ* binding and ligand blotting. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **237**: 673–677.
- [34] THIM L. Trefoil peptides: from structure to function. *Cell Mol Life Sci* 1997; **53**: 888–903.
- [35] WALKER-SMITH JA, PHILLIPS AD, WALFORD N, GREGORY H, FITZGERALD JD, MacCULLAGH K, WRIGHT NA. Intravenous epidermal growth factor/urogastrone increases small-intestinal cell proliferation in congenital microvillous atrophy. *Lancet* 1985; **2**: 1239–1240.
- [36] WESTLEY BR, MAY FEB. Trefoil proteins: their role in normal and malignant cells. *J Pathol* 1997; **183**: 4–7.
- [37] WILLIAMS GR, WRIGHT NA. Trefoil factor family domain peptides. *Virchows Arch* 1997; **431**: 299–304.
- [38] WRIGHT NA, HOFFMANN W, OTTO WR, RIO MC, THIM L. Rolling in the clover: trefoil factor family (TFF)-domain peptides, cell migration and cancer. *FEBS Lett* 1997; **408**: 121–123.

- [39] WRIGHT NA, POULSOM R, STAMP G, van NOORDEN S, SARRAF C, ELIA G, AHNEN D, JEFFERY R, LONGCROFT J, PIKE C. Trefoil peptide gene expression in gastrointestinal epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1993; **104**: 12–20.
- [40] WRIGHT NA, POULSOM R, STAMP GW, HALL PA, JEFFERY RE, LONGCROFT JM, RIO MC, TOMASETTO C, CHAMBON P. Epidermal growth factor (EGF/URO) induces expression of regulatory peptides in damaged human gastrointestinal tissues. *J Pathol* 1990; **162**: 279–284.
- [41] WRIGHT NA. Aspects of the biology of regeneration and repair in the human gastrointestinal tract. *Philos T Roy Soc B* 1998; **353**: 925–933.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 02.06.1999 r.

Przyjęto: 22.11.1999 r.

Adres autora: ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa

e-mail: tgrzela@ib.amwaw.edu.pl

STRUKTURA I WŁAŚCIWOŚCI FUNKCJONALNE FOTOSYSTEMU I

THE STRUCTURE AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF PHOTOSYSTEM I

GRZEGORZ JACKOWSKI

Zakład Fizjologii Roślin Uniwersytetu im. A. Mickiewicza, Poznań

Streszczenie: W ramach „podziału pracy” między czterema kompleksami funkcjonalnymi błony tylakoidowej współuczestniczącymi w realizacji fazy jasnej fotosyntezy fotosystem I (PS I) pełni rolę oksydoreduktazy plastocyanina:ferredoksyna (w reakcji przebiegającej już poza obrębem PSI ferredoksyna redukuje następnie NADP^+ do NADPH). Kooperując z kompleksem cytochromowym b6/f PSI przeprowadza ponadto cykliczny transport elektronów. Fragment struktury PS I bezpośrednio zaangażowany w fotosyntetyczny transport elektronów wraz z grupą białek pełniących najprawdopodobniej funkcje strukturalne tworzy podjednostkę określaną jako rdzeń PS I. Energia niezbędna do realizacji procesów transportu elektronów jest dostarczana do rdzenia PS I jako energia wzbudzenia elektronowego przez zespół wewnętrznych oraz peryferycznych anten energetycznych. W ostatnich latach dokonał się zasadniczy postęp w rozszyfrowywaniu organizacji strukturalnej rdzenia; dla jednego z gatunków cyjanobakterii niektóre szczegóły struktury poznano z rozdzielczością wyższą niż 0,14 nm. Pewien postęp zanotowano także w badaniach struktury i funkcji peryferycznych anten energetycznych (LHC I). W opracowaniu niniejszym dokonano przeglądu aktualnego stanu wiedzy na temat struktury holokompleksu PS I z uwzględnieniem implikacji funkcjonalnych.

(Postępy Biologii Komórki 2000; 27: 137–150)

Słowa kluczowe: PS I, LHC I, LHC II, błona tylakoidowa gran, błona tylakoidowa stromy, rdzeń, heterodimer Psa A/Psa B.

Summary: The photosynthetic light reactions are effective due to cooperation of four functional complexes of thylakoid membrane. Within the framework of this cooperation PS I mediates light-driven electron transport from plastocyanin to ferredoxin which then reduces NADP^+ to NADPH. The second function of PS I is mediating cyclic electron flow in cooperation with cytochrome b6/f complex. PS I domain directly engaged in electron transport along with a group of proteins performing structural role comprise a PS I core. The energy necessary for electron-transporting events is harvested and transferred to PS I core and its photochemical reaction center by the set of inner and peripheral antennae. It is the matter of last few years that the fundamental progress regarding structural organization of PS I core has been

achieved (some details of *Synechocystis* sp. PS I core structure were imaged at a resolution better than 0,14 nm); considerable progress has been reached concerning LHC I structure and functions as well. The goal of the review is to present a current awareness in the area of PS I holocomplex structural organization including functional aspects.

(*Advances in Cell Biology* 2000; 27: 137–150)

Key words: PS I, LHC I, LHC II, grana lamellae, stroma lamellae, core, Psa A/Psa B heterodimer

WSTĘP

Fotosystem I (PS I) jest supramolekularnym kompleksem barwnikowo-białkowym błony tylakoidowej katalizującym liniowy transport elektronów od penetrującej światło tylakoidu plastocyjaniny do ferredoksyny, rozpuszczalnego białka stromy chloroplastowej. Wysoce endoergiczny ($\Delta G^0 = 77 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$) proces przenoszenia elektronów na trasie plastocyjanina: ferredoksyna jest napędzany przez energię świetlną [40]. Ostatecznym zadaniem liniowego transportu elektronów jest dostarczenie siły redukcyjnej (NADPH) wykorzystywanej w reakcjach ciemniowych fotosyntezy oraz wielu innych, ważnych procesach metabolicznych. PS I przeprowadza także, w kooperacji z kompleksem cytochromowy b6/f, cykliczny transport elektronów, którego funkcjonowanie współkształtuje siłę protonomotoryczną napędzającą syntezę ATP.

Trzy białka, Psa A-C, zasocjowane z grupami prostetycznymi pełniącymi funkcje przenośników elektronów tworzą – wraz z kilkunastoma dodatkowymi białkami – fragment PS I określany jako rdzeń [4,5]. Energia niezbędna do redukcji ferredoksyny i NADP^+ jest dostarczana do rdzenia w formie energii wzbudzenia elektronowego transportowanej przez system wewnętrznych i peryferycznych anten energetycznych. Wewnętrzne anteny energetyczne są zarazem integralnymi elementami struktury rdzenia PS I, ponieważ tworzą je cząsteczki chlorofilu *a* i β -karotenu zasocjowane z a białkami Psa A/Psa B – tymi samymi, które wiążą większość przenośników elektronów w PS I. Z kolei peryferyczne anteny energetyczne, określane jako LHC I, zawierają chlorofil *a*, chlorofil *b* oraz cząsteczki kilku ksantofili, a stanowią element struktury PS I zlokalizowany w obrębie holokompleksu wyraźnie dystalnie w stosunku do rdzenia.

W ciągu ostatnich kilku lat w bardzo istotny sposób wzrosła wiedza o organizacji strukturalnej i funkcjonowaniu rdzenia PS I. Jednym z największych dokonań w tym zakresie wydaje się opracowanie metodami krystalografii rentgenowskiej modelu struktury rdzenia PS I cyjanobakterii *Synechococcus elongatus* o zdolności rozdzielczej 0,4 nm [31] i uszczegółowienie tego modelu do poziomu rozdzielczości poniżej 0,14 nm za pomocą mikroskopu sił atomowych [9]. W latach 1996–1997 ukazało się kilka doskonałych anglojęzycznych opracowań przeglądowych dotyczących struktury i własności funkcjonalnych rdzenia PS I [4,11, 40], ale postęp,

jaki w tym samym czasie dokonał się w zakresie badań nad LHC I, nie znalazł odzwierciedlenia we wspomnianych opracowaniach. Literatura w języku polskim jest z kolei całkowicie pozbawiona opracowań monograficznych poświęconych PS I, jakkolwiek informacje o tym kompleksie można znaleźć w publikacjach przeglądowych dotyczących kompleksów anten energetycznych [20] i molekularnej budowy błony tylakoidowej [17]. Celem niniejszego opracowania jest zarysowanie stanu wiedzy w obszarze organizacji strukturalnej i właściwości funkcjonalnych PS I z uwzględnieniem postępu, jaki dokonał się w badaniach nad LHC I.

ORGANIZACJA STRUKTURALNA I WŁASNOŚCI FUNKCJONALNE RDZENIA PS I

Sekwencję reakcji liniowego transportu elektronów zachodzącego w obrębie rdzenia PS I zapoczątkowuje utlenienie P700 – fotochemicznie aktywnego specjalnego dimeru cząsteczek chlorofilu *a* – z wykorzystaniem innej, monomerycznej cząsteczki chlorofilu *a* (A_0) jako pierwotnego akceptora elektronów. Powstanie pary $P700^+ A_0^-$ (1,5 ps) oznacza osiągnięcie przez PS I stanu określanego jako rozdział ładunku (*charge separation*), a stan ten jest stabilizowany przez szybkie (35 ps) przeniesienie elektronów z A_0^- na należący do chinonów przenośnik A_1 [4]. Stabilizacja rozdziału ładunku jest niezbędna dla utlenienia zredukowanej plastocyaniny – elektrony pochodzące ze zredukowanej plastocyaniny uzupełniają dziury w $P700^+$. Interakcja zredukowanej plastocyaniny z P700 obejmuje fazę szybką (12–14 μ s) oraz wolną (200 μ s) [14]. Niektórzy badacze interpretują to intrygujące zjawisko jako odzwierciedlenie istnienia dwóch pul cząsteczek plastocyaniny, a mianowicie:

1) puli cząsteczek „pływających” w świetle tylakoidu blisko miejsca zakotwiczenia P700 w błonie tylakoidowej (interakcja tych cząsteczek z $P700^+$ decydowałaby o istnieniu szybkiej składowej kinetyki redukcji $P700^+$),

2) puli cząsteczek docierających do $P700^+$ z dalszej odległości (wolna składowa kinetyki redukcji $P700^+$).

Taka interpretacja pozostaje jednak w sprzeczności z postulowanym przez Albertssona [1] modelem domenowym organizacji systemu błon tylakoidowych, w myśl którego $P700^+$ oddziałuje tylko z plastocyaniną pozostającą w jego najbliższym sąsiedztwie. W ciągu 200 ps elektrony z A_1^- są przejmowane przez pierwsze z serii trzech centrów żelazo-siarkowych (4Fe-4S), określanych jako F_x . Droga przeniesienia elektronów przez dwa pozostałe centra, F_A i F_B , nie została jednoznacznie poznana, tzn. nie wiadomo, w jakiej kolejności przenośniki te transportują elektrony. Elektrony przeniesione przez F_A i F_B przejmują centrum żelazowo-siarkowe (2Fe-2S) związane z ferredoksyną, białkiem operującym w stromie chloroplastu, nie zaliczanym już do składników PS I. Zredukowana ferredoksyna stanowi substrat

dla redukcji NADP^+ do NADPH ; tę przebiegającą w stromie reakcję katalizuje reduktaza ferredoksyna: NADP^+ (FNR).

Już w latach osiemdziesiątych udowodniono, że P700 oraz przenośniki A_0 , A_1 i F_x są związane z heterodimerem białek PsaA/PsaB [12]. Na podstawie długości sklonowanych sekwencji kodujących masy cząsteczkowe PsaA i PsaB szacuje się na 82–84 kDa, jakkolwiek podczas elektroforezy denaturującej wspomniane białka migrują tak, jakby ich masa cząsteczkowa wynosiła 65–70 kDa [22,39]. Badania rentgenostrukturalne pozwoliły na ustalenie, że każde z białek heterodimeru zawiera 11 transmembranowych α -helis, dwie helisy zanurzone powierzchniowo w dwuwarstwie lipidowej błony tylakoidowej oraz krótkie, hydrofilne pętle penetrujące światło tylakoidu lub stromę [31]. Miejsce ligacji P700 pozostaje niezidentyfikowane, jednak uważa się za wysoce prawdopodobne, że centrum fotochemiczne PS I jest związane przez dwie reszty histydyny pochodzące z transmembranowych α -helis (jedna reszta histydynowa ma należeć do PsaA , druga do PsaB [4]). Sądzi się, że także A_0 jest wiązany przez aminokwasy należące do transmembranowych α -helis PsaA/PsaB , ale dokładne miejsce wiązania wciąż pozostaje w sferze hipotez. F_x jest zasocjowane z heterodimerem PsaA/PsaB przez domenę uformowaną w przestrzeni przez dwie dwunastoaminokwasowe sekwencje należące do hydrofilnych pętli PsaA i PsaB . Wydaje się, że F_x oddziałuje z czterema resztami cysteinowymi wspomnianych sekwencji [44]. Również F_A i F_B oddziałują bezpośrednio z resztami cysteinowymi, jednak reszty te stanowią element struktury innego białka PS I – PsaC (8–9 kDa) [25, 36]. W odróżnieniu od PsaA/PsaB białko PsaC nie zawiera odcinków hydrofobowych, uważa się, że jest zlokalizowane w stromie pozostając związane peryferycznie z błoną tylakoidową [49].

Inaczej niż w przypadku liniowego transportu elektronów, szlak cykliczny ich wędrówki nie został dotąd jednoznacznie ustalony, wiadomo natomiast na pewno, że ważnym jego elementem jest przechwycenie części elektronów ze zredukowanej ferredoksyny przez kompleks cytochromowy b_6/f , transportujący je z powrotem w kierunku ferredoksyny przez plastocyjaninę i PS I. Odcinek plastocyjanina : PS I przebiega prawdopodobnie tak samo, jak to ma miejsce w trakcie liniowego transportu elektronów. Wielu badaczy sądzi, że cykliczna wędrówka elektronów wokół PS I jest mechanizmem pozwalającym utrzymać wysoki gradient protonów w poprzek błony tylakoidowej w warunkach zagrożenia fotoinhibicją, co jest okolicznością sprzyjającą rozproszeniu nadmiaru energii wzbudzenia elektronowego przez dezaktywację termiczną [16].

Poza białkami Psa A-C wiążącymi przenośniki bezpośrednio zaangażowane w liniowy transport elektronów w skład rdzenia PS I wchodzi jeszcze 11 (u cyjanobakterii 8) innych białek [4, 22, 40], określanych jako Psa D-Psa N (u cyjanobakterii nie stwierdzono obecności Psa G, H i N). Niektórym spośród tych białek przypisuje się pewne funkcje strukturalne, funkcja innych pozostaje nieznaną. Tabela 1 pre-

TABELA 1. Zestawienie nazewnictwa, lokalizacji i funkcji białek rdzenia PS I

Białko rdzenia PSI	Gen kodujący	Lokalizacja	Funkcja
Psa A, Psa B	<i>Psa A, Psa B</i>	Integralne białko błony tylakoidowej	Wewnętrzna antena energetyczna, rozdział ładunku i jego stabilizacja, fotoprotekcja(?), transport elektronów od P700 do F _x
Psa C	<i>Psa C</i>	Peryferyczne białko błony tylakoidowej (związane z błoną od strony stromy)	Transport elektronów od F _x do ferredoksyny
Psa D	<i>Psa D</i>	Peryferyczne białko błony tylakoidowej (związane z błoną od strony stromy)	Wiązanie ferredoksyny i Psa C
Psa E	<i>Psa E</i>	Peryferyczne białko błony tylakoidowej (związane z błoną od strony stromy)	Wiązanie ferredoksyny, FNR, Psa C i Psa D, udział w cyklicznym transporcie elektronów
Psa F	<i>Psa F</i>	Integralne białko błony tylakoidowej	Wiązanie plastocyaniny, oddziaływanie z Psa J, wiązanie LHC I (?)
Psa G	<i>Psa G</i>	Integralne białko błony tylakoidowej	Wiązanie LHC I (?)
Psa H	<i>Psa H</i>	Peryferyczne białko błony tylakoidowej (związane z błoną od strony stromy)	Wiązanie LHC I (?)
Psa I	<i>Psa I</i>	Integralne białko błony tylakoidowej	Oddziaływanie z Psa L
Psa J	<i>Psa J</i>	Integralne białko błony tylakoidowej	Oddziaływanie z Psa F
Psa K	<i>Psa K</i>	Integralne białko błony tylakoidowej	Nieznana
Psa L	<i>Psa L</i>	Integralne białko błony tylakoidowej	Trimeryzacja PS I (tylko u cyjanobakterii, u glonów i roślin wyższych funkcja nieznana)
Psa M	<i>Psa M</i>	Integralne białko błony tylakoidowej	Udział w cyklicznym transporcie elektronów
Psa N	<i>Psa N</i>	Peryferyczne białko błony tylakoidowej (związane z błoną od strony światła tylakoidu)	Nieznana

zentyje aktualny stan poglądów na funkcje białek Psa A-N oraz ich lokalizację wewnątrz chloroplastu.

Energia niezbędna do transportu elektronów po akceptorowej stronie PS I jest dostarczana do P700 jako energia wzbudzenia elektronowego przez wewnętrzne oraz peryferyczne anteny energetyczne. Antenami wewnętrznymi są kompleksy barwnikowo-białkowe, jakie z chlorofilem *a* oraz β -karotenem tworzy heterodimer Psa A/Psa B oraz, być może, Psa F. Dane spektroskopowe i biochemiczne wskazują, że Psa A i Psa B wiążą razem 97 cząsteczek chlorofilu *a* [8] oraz 10–20 cząsteczek

β -karotenu [11, 40], jednak na sporządzonym z rozdzielczością 0,4 nm modelu rdzenia PS I *Synechococcus elongatus* zidentyfikowano pozycje tylko 71 cząsteczek barwników, wyłącznie chlorofilu *a* [31]. Autorzy modelu przypuszczają, że pozostałe cząsteczki chlorofilu *a* oraz cała pula β -karotenu są zlokalizowane w części rdzenia charakteryzującej się mało uporządkowaną strukturą, nie pozwalającą się analizować na aktualnie osiągalnym poziomie zdolności rozdzielczej badań krystalograficznych. Niektórzy badacze sądzą, że niewielką ilość chlorofilu *a* może także wiązać pojedynczą transmembranową α -helisą białko Psa F cyjanobakterii [4]. Chlorofil *a* związany z heterodimerem Psa A/Psa B i (być może) białkiem Psa F pełni, jak się sądzi, wyłącznie funkcje antenowe. Część tych cząsteczek ma maksimum absorpcji przesunięte nietypowo daleko w stronę czerwieni (710–740 nm). Niektórzy autorzy wyrażali przed kilkoma laty pogląd, że mogą one odgrywać specjalną rolę w procesie przenoszenia energii wzbudzenia elektronowego [46], ale analiza widma czynnościowego fotooksydacji P700 nie pozwoliła na wykrycie żadnych różnic wydajności przenoszenia energii w kierunku P700 między chlorofilami absorbującymi w przedziale 710–740 nm a „normalnymi” cząsteczkami chlorofilu *a* wewnętrznych anten PS I [43]. Ostatnio Koehne i Trissl [30] zasugerowali, że cząsteczki chlorofilu o maksimum absorpcji przesuniętym powyżej 700 nm funkcjonują jako element zwiększający „przekrój optyczny” PS I u cyjanobakterii bytujących w wodzie w gęstych skupieniach (np. *Spirulina platensis*). Do komórek takich cyjanobakterii dociera światło wzbogacone na skutek filtracji spektralnej w długości przekraczające 700 nm. β -karoten zasocjowany z Psa A/Psa B realizuje więcej zadań niż chlorofil *a*, udowodniono, że poza zbieraniem światła jest zaangażowany w fotoprotekcję, zmiatanie tlenu singletowego oraz stabilizację struktury PS I [10].

W przypadku cyjanobakterii rdzeń PS I jest pojęciem tożsamym z pojęciem „holokompleks PS I”, ponieważ u organizmów tych PS I, w odróżnieniu od glonów i roślin wyższych, nie ma peryferycznych anten energetycznych. Rdzeń PS I cyjanobakterii przyjmuje *in situ* organizację trimeryczną, na co zgodnie wskazują wyniki badań elektronomikroskopowych [2] i rentgenostrukturalnych [31, 42]. Pojedynczy monomer (9×13 nm) składa się z domeny „katalitycznej” i niewielkiej domeny „łączącej”, która spaja monomery w strukturę trimeryczną. Nieobecność trimerycznych cząstek PS I u mutantów *Synechocystis* sp. pozbawionych Psa I i Psa L wskazuje, że właśnie te białka stanowią domenę „łączącą” [4]. Trimeryczna cząstka rdzenia PS I cyjanobakterii ma kształt dyskooidalny; część zwrócona w stronę stromy zawiera wyraźne zagłębienie z tkwiącymi w nim cząsteczkami Psa D i Psa E [31]. Topologia rdzenia PS I glonów i roślin wyższych jest poznana gorzej niż u cyjanobakterii, wydaje się jednak rzeczą pewną, że roślinne cząstki PS I przyjmują *in vivo* formę monomeryczną. Ostatnio [26, 27] opublikowano wyniki badań elektronomikroskopowych nad preparatami wzbogaconymi w błony tylakoidowe gran szpinaku, w których PS I zidentyfikowano techniką *immunogold*. Ustalono, że monomer PS I szpinaku jest nieco większy (10×16 nm) niż monomer PS I cyjanobakterii;

różnica ta może być po prostu odzwierciedleniem faktu, że w opisywanych badaniach [26, 27] obserwowano cząstki PS I zawierające poza rdzeniem także pierścieni peryferycznych anten energetycznych (LHC I), nieobecny u cyjanobakterii.

ORGANIZACJA STRUKTURALNA I WŁAŚCIWOŚCI FUNKCJONALNE PERYFERYCZNYCH ANTEN ENERGETYCZNYCH PS I (LHC I)

Przez wiele lat sądzono, że PS I roślin wyższych i glonów nie ma specyficznych peryferycznych anten energetycznych, współpracując, podobnie jak PS II, z LHCII. Dopiero w kilkanaście lat po odkryciu LHCII opisano peryferyczną antenę PS I, nazwaną LHC I [15]. Fakt, że na odkrycie LHC I trzeba było czekać tak długo, wynikał z dwóch podstawowych okoliczności:

1) LHC I jest strukturą nadzwyczaj labilną i często dysocjuje na komponentę barwnikową i polipeptydową już podczas preparatyki PS I,

2) nawet najczystsze preparaty PS I zawierają duże ilości LHC II (będzie o tym mowa w dalszej części niniejszego podrozdziału).

Już na wczesnych etapach badań nad LHC I opanowano umiejętność jego frakcjonowania na dwa subkompleksy, anteny energetyczne nazwane LHC I-730 i LHC I-680, sedymentujące w toku ultrawierowania LHC I w gradiencie gęstości sacharozy z niejednakową, choć bardzo podobną szybkością [33]. Nazwy: LHC I-730 i LHC I-680 nawiązują do wyrażonej w nm długości fali, na którą przypada niskotemperaturowe (77 K) maksimum emisji fluorescencji subkompleksów. LHC I-680 można rozdzielać za pomocą łagodnie denaturujących technik elektroforetycznych na dwie frakcje, nazwane LHC I-680A i LHC I-680B [29]. W skład poszczególnych subkompleksów wchodzi następujące polipeptydy: LHC I-730 – Lhca 1 i Lhca 4; LHC I-680A – Lhca 3; LHC I-680B – Lhca 2 [29]. Masę cząsteczkową polipeptydów Lhca 1-4 ustalono jak dotąd dla zaledwie kilku gatunków roślinnych, w tym jęczmienia [29], szpinaku [45] i goździka [Sokołowska i Jackowski, dane niepublikowane]; najczęściej podawane liczby to, odpowiednio, 21, 23, 25 i 22 kDa. Lhca 1-4 są kodowane przez geny, odpowiednio, *Lhca 1-4* [23] należące do super-rodziny Lhc, do której należą też geny kodujące polipeptydy peryferycznych anten energetycznych PS II (Lhcb 1-6), ELIP, psbS oraz niedawno odkryte geny ulegające wzmocnionej ekspresji w warunkach kontaktu aparatu fotosyntetycznego ze światłem o wysokim natężeniu [21]. Wszystkie geny należące do wspomnianej super-rodziny cechuje pewien stopień homologii, w przypadku niektórych par bardzo wysoki. Homologia dotyczy także struktury produktów białkowych *Lhc*. Z wcześniejszych badań rentgenostrukturalnych prowadzonych na polipeptydach kilku rodzin niespokrewnionych z Lhc jasno wynika, że polipeptydy

określonych rodzin przyjmują konformację identyczną, jeśli stopień podobieństwa ich sekwencji aminokwasowej jest odpowiednio wysoki. Oznacza to, że polipeptydy super-rodziny Lhc powinny mieć tę samą strukturę drugorzędową i trzeciorzędową. Kilka lat temu poznano z atomową dokładnością strukturę drugo- i trzeciorzędową jednego z polipeptydów Lhc – Lhcb 1 (zdolność rozdzielcza mapy atomowej – 0,34 nm) [32]. Przyjmuje się, że struktura ta jest taka sama dla wszystkich pozostałych Lhc. Pojedyncza cząsteczka Lhcb 1 – a zatem i innych Lhcb oraz Lhca – przenika błonę tylakoidową trzema α -helikalnymi odcinkami oznaczonymi jako B, C i A. Ustalono, że α -helisy B i A są nachylone pod kątem 30° względem normalnej do płaszczyzny błony tylakoidowej i pozostają ze sobą w kontakcie dzięki oddziaływaniom dwóch par Arg - Glu. Odcinki Lhcb 1 nie będące transmembranowymi α -helisami mają charakter hydrofilny i penetrują strömę lub światło tylakoidu w taki sposób, że N-koniec jest zanurzony w strömie, a C-koniec w świetle tylakoidu [32]. Daleko idące podobieństwo czy wręcz identyczność struktury drugo- i trzeciorzędowej Lhca i Lhcb nie musi oznaczać identyczności garnituru barwników zasocjowanych z tymi polipeptydami – wśród Lhcb różnice dotyczą ilościowego składu obu chlorofili i ksantofili, jak również stosunku stechiometrycznego barwniki:białko [13]. Wiedza na temat kompozycji barwników wiążących się z Lhca jest dość skąpa, a nieliczne dane przytaczane przez poszczególnych autorów pozostają ze sobą w sprzeczności, np. stosunek ilościowy chlorofil *a*/chlorofil *b* dla LHC I-680 mieści się w przedziale 1,4–3,1, a dla LHC I-730 w przedziale 2,3–3,2 [13]. Opierając się na danych pośrednich zasugerowano [34], że pojedynczy monomer Lhca może wiązać 10 cząsteczek chlorofilu *a*, 4 chlorofilu *b*, 2 β -karotenu, 2 luteiny i 1 wiolaksantyny. Używając monospecyficzných przeciwciał w preparatach LHC I wykryto także neoksantynę [35], nie można było jednak określić jej relacji ilościowych wobec innych barwników i części polipeptydowej.

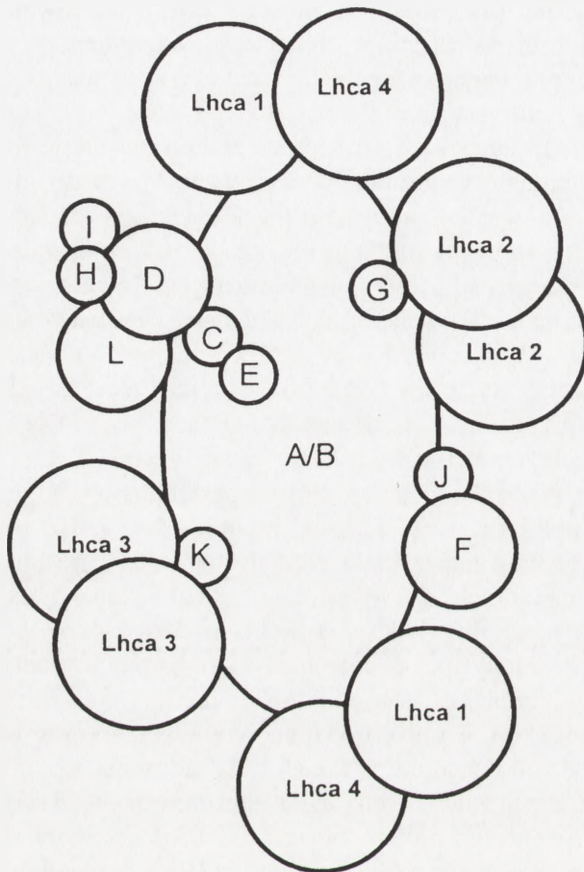
Przedmiotem żywego zainteresowania szeregu laboratoriów jest kwestia stanu oligomerycznego LHC I-680 i LHC I-730. Jeszcze kilka lat temu dominował pogląd, że podobieństwo struktury pierwszorzędowej Lhca i Lhcb determinuje nie tylko podobieństwo struktur wyższego rzędu tych grup polipeptydów, ale także stanu oligomerycznego subkompleksów LHC I i LHC II *in vivo* -cząstka LHC I miałyby w myśl tych poglądów charakter trimeryczny, taki bowiem stan cechuje LHC II *in vivo* [32]. Wyniki badań kilku ostatnich lat faworyzują jednak koncepcję dimerycznej organizacji subkompleksów LHC I. Najbardziej przekonujące są w tym kontekście prace nad rekonstrukcją LHC I *in vitro* w mieszaninie zawierającej oczyszczone Lhca 1, 4 oraz wszystkie barwniki błon tylakoidowych. W warunkach sprzyjających rekonstrukcji dochodzi do uformowania cząstek nieodróżnialnych spektroskopowo (widma dichroizmu kołowego, niskotemperaturowe widma emisji i wzbudzenia fluorescencji) od natywnego LHC I-730, zawierające obydwa obecne w mieszaninie białka – Lhca 1 i 4. Rekonstruowane cząstki sedimentują w trakcie ultrawirowania w gradiencie gęstości sacharozy z prędkością, jakiej należałoby się

spodziewać po strukturze dimerycznej [41]. Również natywne LHC I zachowują się – w trakcie elektroforezy – raczej jak cząstki o charakterze dimerycznym, a nie trimerycznym [7]. Nieco mniej przekonującym, choć bardzo często cytowanym potwierdzeniem idei dimerycznej natury subkompleksów LHC I są wyniki prac nad sondowaniem organizacji strukturalnej PS I za pomocą techniki sieciowania (*cross-linking*) [22]. Analiza immunologiczna produktów sieciowania PSI pozwoliła na identyfikację polipeptydów, które zostały sprzęgnięte przez czynnik sieciujący (*cross-linker*), a więc sąsiadujące ze sobą w strukturze PS I. Ustalono, że czynnik sieciujący najwydajniej sprzęgał pary, a nie trójki białek Lhca, np. Lhca 1 i 4. Oznacza to, zdaniem autorów, że zidentyfikowane immunologicznie białka tworzą *in vivo* pary, tzn. struktury dimeryczne. Wnioski te nie są jednak w pełni przekonujące, ponieważ identyfikacja białek sprzęgniętych przez czynnik sieciujący nie jest jednoznaczna, a wśród produktów sprzęgania stwierdzono, powstające co prawda z niewielką wydajnością, także trimery, np. Lhca 1 + 2 + 3 czy Lhca 3₃.

Wydaje się, że istotny postęp w ustalaniu organizacji strukturalnej – w tym stanu oligomerycznego – subkompleksów LHC I mogą przynieść badania z zastosowaniem niedenaturującego ogniskowania izoelektrycznego, techniki, która udowodniła swoją przydatność w badaniach nad organizacją strukturalną anten energetycznych PS II [18, 19]. Wstępne doświadczenia [Sokołowska i Jackowski, dane niepublikowane] sugerują, że modyfikując dotychczas stosowane warianty tej techniki można rozdzielać subkompleksy LHC I bardziej precyzyjnie niż to było możliwe do tej pory poddając LHC I ultrawirowaniu w gradiencie gęstości sacharozy (LHC I-730 i LHC I-680 sedymentują w takich doświadczeniach z tak podobną prędkością, że ich preparaty są zawsze sobą nawzajem zanieczyszczone). Rysunek 1 przedstawia model organizacji strukturalnej cząstki PS I uważany za najbardziej prawdopodobny w świetle dostępnych do połowy 1999 r. wyników badań nad układem przestrzennym i stechiometrią poszczególnych podjednostek rdzenia i peryferycznych anten energetycznych.

Niezależnie od tego, czy przyszłe badania jednoznacznie potwierdzą di- czy trimeryczną naturę subkompleksów LHC I *in vivo*, dziś już wiadomo, że oligomeryczna forma LHC I kształtuje się po ok. kilku godzinach od momentu rozpoczęcia zazieleniania się siewek. LHC I pochodzący z siewek reprezentujących wcześniejsze fazy zazieleniania się zachowuje się podczas elektroforezy jak struktura monomeryczna [17].

Liczni badacze starali się ustalić pochodzenie wierzchołków emisji fluorescencji przy 680 i 730 nm w stosownych subkompleksach LHC I. Szereg interesujących danych na ten temat uzyskano przez frakcjonowanie PS I za pomocą perfuzyjnej chromatografii anionowej na kilka frakcji zawierających różne kombinacje Lhca 1-4 oraz analizy niskotemperaturowych widm emisji i wzbudzenia emisji fluorescencji tych frakcji [45]. Dowiedziono w ten sposób, że fluorescencję z maksimum przy 680 nm emitują cząsteczki chromoforów związane zarówno z Lhca 2, jak



RYSUNEK 1. Schemat organizacji strukturalnej PSI glonów i roślin wyższych (wg [22], zmienione), na rysunku nie zaznaczono podjednostek PsaM i PsaN

ka na widmie emisyjnym w kierunku 720 nm (maksimum emisji rdzenia PS I). Mimo, wydawałoby się, przekonujących przesłanek dla przyjęcia poglądu o roli chromoforów związanych z Lhca 4 jako źródła emisji fluorescencji 730 nm, nie wszyscy badacze pogląd ten przyjmują. W ostatnich miesiącach opublikowano wyniki doświadczeń [28] polegających na analizie widm fluorescencji całych liści kilku mutantów jęczmienia niezdolnych do akumulacji normalnych ilości Lhca 1 i/lub Lhca 4 w związku z obniżoną zdolnością do syntezy chlorofilu *b*. Zasugerowano, że fluorescencję z maksimum przy 730 nm emitują chromofory Lhca 1, podczas gdy cząsteczki chromoforów Lhca 4 miałyby być tożsame z chromoforami odpowiedzialnymi za niedawno odkryte maksimum emisji fluorescencji PS I przy 742 nm [6, 37]. Co ciekawe, autorzy opisywanych eksperymentów zauważyli, że osła-

i Lhca 3, natomiast wyłącznym źródłem emisji 730 nm są cząsteczki zasocjowane z Lhca 4. Stwierdzono ponadto, że chromofory związane z Lhca 2 i Lhca 3 i emitujące fluorescencję przy 680 nm są preferencyjnie wzbudzone przez pulę cząsteczek chlorofilu *a* i karotenoidów, zaś chromofory związane z Lhca 4 emitują fluorescencję 730 nm będąc preferencyjnie wzbudzone przez chlorofil *a*. Usadowienie chromoforów odpowiedzialnych za emisję 730 nm na Lhca 4 potwierdzają także wyniki analizy spektroskopowej liści serii mutantów *Arabidopsis thaliana*, u których w zróżnicowanym stopniu ograniczono ekspresję *Lhca 4* używając technologii antysensownej [50]. Stopień inhibicji akumulacji *Lhca 4* u mutantów bardzo dobrze korelował z osłabianiem emisji fluorescencji przy 730 nm i przemieszczaniem się długofalowego wierzchoł-

bienie – nawet bardzo znaczne – akumulacji Lhca 4 nie powoduje destabilizacji Lhca 1, co oznacza, że składniki LHC I–730 mogą gromadzić się w błonach tylakoidowych niezależnie od siebie. Wniosek ten znajduje potwierdzenie w fakcie istnienia wielu innych naturalnych mutantów jęczmienia, należących do serii chlorina f2, które akumulują normalne, tzn. charakterystyczne dla szczepu dzikiego, ilości Lhca 1 mimo całkowitego braku immunologicznie identyfikowalnego Lhca 4 [3]. Lhca 4 wydaje się najbardziej wśród białek Lhca wrażliwy na destabilizujący wpływ deficytu chlorofilu *b*. Wskazuje na to fakt, że wśród około dwudziestu przebadanych przez Bossmanna i wsp. [3] mutantów serii chlorina f2, chlorina a i chlorina b aż 9 miało drastycznie obniżony poziom Lhca 4, podczas gdy Lhca 1-3 u większości mutantów gromadziły się w normalnych ilościach, pozostając stabilne mimo braku chlorofilu *b*.

LHC I funkcjonuje wyłącznie jako peryferyczna antena energetyczna PS I. Zastosowanie technik femtosekundowej spektroskopii absorpcyjnej pozwoliło na wykazanie, że czas transferu energii wzbudzenia elektronowego między indywidualnymi cząsteczkami chlorofilu LHC I wynosi 200–400 fs [39] jest więc bardzo podobny do analogicznego czasu oznaczanego dla cząsteczek chlorofilu LHC II [38].

HETEROGENICZNOŚĆ STRUKTURALNA PS I

Od bez mała dziesięciu lat wiadomo, że PS I jest strukturą heterogeniczną. Cząstki PS I są zróżnicowane zarówno co do wielkości zespołu anten energetycznych, jak i rozmieszczenia w obrębie systemu błon tylakoidowych [24]. W błonach tylakoidowych stromy znajdują się cząstki tzw. PS I β (65% populacji cząstek PS I), a w błonach tylakoidowych gran cząstki PS I α (35% populacji). Zdecydowana większość cząstek PS I α jest zlokalizowana w błonach brzegów gran, a niewielkie ilości PS I α znaleziono także w błonach zespolonych gran. Ustalono, że wielkość zespołu anten energetycznych PS I α przekracza o 40% analogiczną wartość dla PS I β . Różnica dotyczy peryferycznych anten i polega na tym, że cząstki PS I α pozostają stale związane (niezależnie od LHC I) z trzema trimerami LHC II, podczas gdy pojedyncza cząstka PS I β wiąże najprawdopodobniej tylko jeden trimer LHC II [24]. Udowodniono, że PS I β ma pełny zestaw Lhca (po dwie cząsteczki Lhca 1-4 w przeliczeniu na pojedynczą cząstkę PS I), natomiast PS I α związana jest z dwukrotnie mniejszą ilością kopii Lhca 4, zaś Lhca 1 nie zawiera ich wcale. Mimo posiadania zredukowanej populacji cząsteczek Lhca 1 i 4 cząstki PS I α charakteryzują się większym zespołem anten energetycznych niż PS I β , ponieważ pozostają zasocjowane z trzykrotnie większą ilością trimerów LHC II [24]. Wielkość zespołu anten energetycznych dla PS I α i PS I β szacuje się odpowiednio na 280–290

cząsteczek chlorofilu *a + b*/ P700 i 200 cząsteczek chlorofilu *a + b*/ P700 [47, 48]. W błonach tylakoidowych stromy stwierdza się obecność cząstek PS I γ , całkowicie pozbawionych peryferycznych anten energetycznych. Sądzi się, że są to wczesne stadia biogenezy PS I [24].

PS I α współpracuje z PS II α i kompleksem cytochromowym b6/f w zakresie liniowego transportu elektronów, natomiast PS I β najprawdopodobniej jest zaangażowany wyłącznie w cykliczną wędrówkę elektronów [1].

LITERATURA

- [1] ALBERTSSON P-A. The structure and function of the chloroplast photosynthetic membrane – a model for the domain organization. *Photosynth Res* 1995; **46**: 141–149.
- [2] BOEKEMA EJ, BOONSTRA AF, DEKKER JP, ROGNER M. Electron microscopic structural analysis of photosystem I, photosystem II, and the cytochrome b6/f complex from green plants and cyanobacteria. *J Bioenerg Biomembr* 1994; **26**: 17–29.
- [3] BOSSMANN B, KNOETZEL J, JANSSON S. Screening of *chlorina* mutants of barley (*Hordeum vulgare* L.) with antibodies against light-harvesting proteins of PS I and PS II: absence of specific antenna proteins. *Photosynth Res* 1995; **52**: 127–136.
- [4] CHITNIS PR. Photosystem I. *Plant Physiol* 1996; **111**: 661–669.
- [5] CHITNIS PR, XU Q, CHITNIS VP, NECHUSHTAI R. Function and organization of photosystem I polypeptides. *Photosynth Res* 1995; **44**: 23–40.
- [6] CROCE R, ZUCHELLI G, GARLASCHI FM, BASSI R, JENNINGS RC. Excited state equilibrium in photosystem I – light harvesting I complex: P700 is almost isoenergetic with its antenna. *Biochemistry* 1996; **35**: 8572–8579.
- [7] DREYFUSS BW, THORNER JP. Organization and assembly of the light-harvesting complex of photosystem I and its assembly during plastid development. *Plant Physiol* 1994; **106**: 841–848.
- [8] FLEMMING C. Charakterisierung des Antennensystems von monomeren und trimeren Photosystem I komplexen. Tezy dok. Technische Universität Berlin 1996.
- [9] FOTIADIS D, MULLER DJ, TSIOTSIS G, HASLER L, TITTMANN P, MINI T, JENO P, GROSS H, ENGEL A. Surface analysis of the photosystem I complex by electron and atomic force microscopy. *J Mol Biol* 1998; **283**: 83–94.
- [10] FRANK H, COGDELL RJ. Carotenoids in photosynthesis. *Photochem Photobiol* 1996; **63**: 257–264.
- [11] FROMME P. Structure and function of photosystem I. *Curr Opin Str Biol* 1996; **6**: 473–484.
- [12] GOLBECK JH, PARRETT KG, MEHARI T, JONES KL, BRAND JJ. Isolation of the intact photosystem I reaction center core containing P700 and iron-sulfur center F $_x$. *FEBS Lett* 1988; **240**: 9–14.
- [13] GREEN BR, DURNFORD DG. The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1996; **47**: 685–714.
- [14] HAEHNEL W, JANSEN T, GAUSE K, KLOSGEN RB, STAHL B, MICHEL D, HUVERMANN B, KARAS M, HERRMANN R. Electron transfer from plastocyanin to photosystem I. *EMBO J* 1994; **13**: 1028–1038.
- [15] HAWORTH P, WATSON JL, ARNTZEN CJ. The detection, isolation and characterization of a light-harvesting complex specifically associated with photosystem I. *Biochim Biophys Acta* 1983; **724**: 151–158.

- [16] HAVAUX M. Photoacoustic measurement of cyclic electron flow around photosystem I in leaves adapted to light-state 1 and 2. *Plant Cell Physiol* 1992; **33**: 799–803.
- [17] JACKOWSKI G. Molekularna budowa błony tylakoidowej. *Post Biol Kom* 1997; **24**: 469–490.
- [18] JACKOWSKI G, JANSSON S. Characterization of photosystem II antenna complexes separated by non-denaturing isoelectric focusing. *Z Naturforschung* 1998; **53c**: 841–848.
- [19] JACKOWSKI G, PRZYMUSIŃSKI R. The resolution and biochemical characterization of subcomplexes of the main light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein complex of photosystem II (LHCII). *Photosynth Res* 1995; **43**: 41–48.
- [20] JACKOWSKI G, SCHNEIDER J. Kompleksy anten energetycznych tylakoidów. *Post Biol Kom* 1990; **17**: 289–299.
- [21] JANSSON S. A guide to the identification of the *Lhc* genes and their relatives in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Sci* 1999; **4**: 236–240.
- [22] JANSSON S, ANDERSEN B, SCHELLER HV. Nearest neighbour analysis of higher plant photosystem I holocomplex. *Plant Physiol* 1996; **112**: 409–420.
- [23] JANSSON S, PICHERSKY E, BASSI R, GREEN BR, IKEUCHI M, MELIS A, SIMPSON DJ, SPANGFORT M, STAEHELIN LA, THORNBER JP. A nomenclature for the genes encoding the chlorophyll *alb*-binding proteins of higher plants. *Plant Mol Biol Rep* 1992; **10**: 242–253.
- [24] JANSSON S, STEFANSSON H, NYSTROM U, GUSTAFFSON P, ALBERTSSON P-A. Photosystem I and II antenna proteins in the different thylakoid domains. *Biochim Biophys Acta* 1997; **1320**: 297–309.
- [25] JUNG Y-S, YU L, GOLBECK JH. Reconstitution of iron-sulfur center F_B results in complete restoration of $NADP^+$ photoreduction in Hg-treated photosystem I complexes from *Synechococcus* sp. PCC 6301. *Photosynth Res* 1995; **46**: 249–255.
- [26] KITMITTO A, HOLZENBURG A, FORD RC. Two-dimensional crystals of photosystem I in higher plant grana margins. *J Biol Chem* 1997; **272**: 19497–19501.
- [27] KITMITTO A, MUSTAFA AO, HOLZENBURG A, FORD RC. Three-dimensional structure of higher plant photosystem I determined by electron crystallography. *J Biol Chem* 1998; **273**: 29592–29599.
- [28] KNOETZEL J, BOSSMANN B, GRIMME LH. *Chlorina* and *viridis* mutants of barley (*Hordeum vulgare* L.) allow assignment of long-wavelength chlorophyll forms to individual Lhca proteins of photosystem I *in vivo*. *FEBS Lett* 1998; **436**: 339–342.
- [29] KNOETZEL J, SVENDSEN I, SIMPSON DJ. Identification of the photosystem I antenna polypeptides in barley. *Eur J Biochem* 1992; **206**: 209–215.
- [30] KOEHNE B, TRISSL HW. The cyanobacterium *Spirulina platensis* contains a long-wavelength-absorbing pigment C-738 (F-760(77K)) at a room temperature. *Biochemistry* 1998; **37**: 5454–5500.
- [31] KRAUSS N, SCHUBERT W-D, KLUKAS O, FROMME P, WITT HT, SAENGER W. Photosystem I at 4 Å resolution represents the first structural model of a joint photosynthetic reaction center and core antenna system. *Nature Str Biology* 1996; **3**: 965–973.
- [32] KUHLEBRANDT DT, WANG DN, FUJIYOSHI Y. Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* 1994; **367**: 614–621.
- [33] LAME E, ORTIZ W, MALKIN R. Chlorophyll *alb* proteins of photosystem I. *FEBS Lett* 1984; **168**: 10–14.
- [34] LEE AI-C, THORNBER JP. Analysis of the pigment stoichiometry of pigment-protein complexes from barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Physiol* 1995; **107**: 565–574.
- [35] MAKEWICZ A, RADUNZ A, SCHMID GH. Comparative immunological detection of lipids and carotenoids on peptides of photosystem I from higher plants and cyanobacteria. *Z Naturforsch* 1996; **51c**: 319–328.

- [36] MANNAN RM, HE W-Z, METZGER S, WHITMARSH J, MALKIN R, PAKRASI HR. Active photosynthesis in cyanobacterial mutants with directed modifications in the ligands for two iron-sulfur clusters in the PsaC protein of photosystem I. *EMBO J* 1996; **15**: 1826–1833.
- [37] MAURO S, DAINESE P, LANNOYE R, BASSI R. Cold-resistant and cold-sensitive maize lines differ in the phosphorylation of the photosystem II subunit, CP29. *Plant Physiol* 1997; **115**: 171–180.
- [38] PALSSON LO, SPANGFORT MD, GULBINAS V, GILLBRO T. Ultrafast chlorophyll b-chlorophyll a excitation energy transfer in the isolated light harvesting complex, LHCII, of green plants. Implication for the organization of chlorophylls. *FEBS Lett* 1994; **339**: 134–138.
- [39] PALSSON LO, TJUS S, ANDERSSON B, GILLBRO T. Ultrafast energy transfer dynamics resolved in isolated spinach light-harvesting complex I and the LHCI-730 subpopulation. *Biochim Biophys Acta* 1995; **1230**: 1–9.
- [40] SCHELLER HU, NAVER H, MOLLER BL. Molecular aspects of photosystem I. *Physiol Plant* 1997; **100**: 842–851.
- [41] SCHMID VHR, CAMMARATA KV, BRUNS BU, SCHMIDT GW. *In vitro* reconstitution of the photosystem I light-harvesting complex LHCI-730: heterodimerization is required for antenna pigment organization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 7667–7772.
- [42] SCHUBERT WD, KLUKAS O, KRAUSS N, SAENGER W, FROMME P, WITT HT. Present state of the crystal structure analysis of photosystem I at 4.5 Å resolution. [w] Mathis P [red.] Photosynthesis: from light to biosphere, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers 1995: 3–10.
- [43] SHUBIN LB, BEZSMERTNAYA IN, KARAPETYAN NV. Efficient energy transfer from the long-wavelength antenna chlorophylls to P700 in photosystem I complexes from *Spirulina platensis*. *J Photochem Photobiol* 1995; **30**: 153–160.
- [44] SMART LB, WARREN PV, GOLBECK JH, MC INTOSH L. Mutational analysis of the structure and biogenesis of the photosystem I reaction center in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 1132–1136.
- [45] TJUS S, ROOBOL-BOZA M, PALSSON LO, ANDERSSON B. Rapid isolation of photosystem I chlorophyll-binding proteins by anion exchange perfusion chromatography. *Photosynth Res* 1995; **45**: 41–49.
- [46] TRINKUNAS G, HOLZWARTH AR. On the spatial distribution of chlorophyll spectral types in photosystem I. [w] Mathis P [red.] Photosynthesis: from light to biosphere. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers 1995: 51–54.
- [47] WOLLENBERGER L, STEFANSSON H, YU S-G, ALBERTSSON P-A. Isolation and characterization of vesicles originating from the chloroplast grana membranes. *Biochim Biophys Acta* 1994; **1184**: 93–102.
- [48] WOLLENBERGER L, WEIBULL C, ALBERTSSON P-A. Further characterization of the chloroplast grana margins: the non-detergent preparation of granal photosystem I cannot reduce ferredoxin in the absence of NADP⁺ reduction. *Biochim Biophys Acta* 1995; **1230**: 10–22.
- [49] YU L, SMART LB, JUNG YS, GOLBECK J, MC INTOSH L. Absence of PsaC subunit allows assembly of photosystem I core but prevents the binding of PsaD and PsaF in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol Biol* 1995; **29**: 331–342.
- [50] ZHANG H, GOODMAN HM, JANSSON S. Antisense inhibition of the photosystem I antenna protein Lhca 4 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 1997; **115**: 1525–1531.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 05.08.1999 r.

Przyjęto: 19.11.1999 r.

Adres autora: 61-713 Poznań, Al. Niepodległości 14

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.

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.

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.

Warunki prenumeraty kwartalnika PBK

Prenumerata na rok 2000

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 2000 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 2000:

dla instytucji (bibliotek) wynosi 68 zł,
 a dla odbiorców indywidualnych 25 zł.

Subscription orders for **POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI** for 2000 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. 444) 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, SPELTZBERG 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. 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 o dołączenie do maszynopisu tytułu artykułu i podpisanej odpowiedzi na następujące pytania:

Dołączono 2 kopie maszynopisu,		Treść pracy nie była uprzednio publikowana nie została	
tabel i rycin.	tak	wysłana do innej redakcji	tak nie
Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę.	tak	Dołączono kopię pracy na dyskietce z podaniem nazwy	
Jest zgoda osób, których informacje niepubli-	tak	pliku i użytego programu edycyjnego z komputera IBM	tak nie
kowane są zamieszczone w tekście artykułu	tak	Odpowiadam za całość pracy opisanej w zał. maszyn.	tak nie
Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w "Postępiech Biologii Komórki" przechodzi na własność redakcji i jego reprodukcja			tak nie
wymaga zgody redakcji.			podpisy wszystkich autorów

TREŚĆ – CONTENTS

Wykaz recenzentów z 1999 r. tomu 26.	1
W tym Zeszytcie	2
KACZANOWSKA J.: Günter Blobel – Nobel 1999	3
MATYSIAK R., LORENC-PLUCIŃSKA G.: Cykl ksantofilowy w warunkach stresu abiotycznego The xanthophyll cycle under abiotic stress	17
MOTYL T., GAJKOWSKA B., PIOSZAJ T., WAREŃSKI P., ORZECZOWSKI A., ZIMOWSKA W., WOJEWÓDZKA U., RYNIOWICZ Z., REKIEL A.: Rola Bax i Bcl-2 w regulacji apoptozy komórek nabłonka gruczołu mlekowego Role of Bax and Bcl-2 in regulation of mammary epithelial cells apoptosis	31
KMIECIAK D., TRZECIAK W. H.: Efekty cytotoksyczne w infekcji wirusem HIV-1, wywołane za pośrednictwem glikoproteiny 120 Glycoprotein 120-mediated cytopathic effects in HIV-1 infection	53
KMIECIAK D., TRZECIAK W. H.: Wykorzystanie produktu białkowego genu <i>env</i> , gp160, do immunizacji przeciwkowsirusowi HIV-1 Application of protein product of the <i>env</i> gene, gp160, in the immunization against HIV-1 virus	69
BRZEZIŃSKA A., BALIŃSKA M.: Rola homocysteiny w procesie rozwoju zmian miażdżycowych na poziomie komórkowym Role of homocysteine in progress of atherosclerosis on cellular level.	81
ZAGÓRSKA-MAREK B.: O przyczynach zmienności planu budowy kwiatu Mechanisms of patterning in flowers	97
LACHOWICZ A., RĘBAS E., ŻYLIŃSKA L., LACHOWICZ L.: Różnorodne aspekty działania kinaz białkowych w apoptozie Various aspects of protein kinases action in apoptosis	111
ŁAZARCZYK M., GRZELA T.: Rodzina peptydów z domeną koniczyno-podobną Family of trefoil peptides	123
JACKOWSKI G.: Struktura i właściwości funkcjonalne fotosystemu I The structure and functional properties of photosystem I	137
Wskazówki przygotowania rysunków i streszczeń do publikacji w PBK	151
Warunki prenumeraty kwartalnika PBK	151