

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

POLISH
ANATOMICAL
SOCIETY

POLISH SOCIETY
FOR CELL
BIOLOGY

VOL. 28, ISSUE 3/2001
(295–468)

3.08.2001

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 BILIŃSKI – biologia rozwoju, embriologia, cytoskielet, połączenia międzykomórkowe – developmental biology, embryology, cytoskeleton, cell junctions – *Inst. Zoologii UJ, 30-060 Kraków, Ingardena 6*

Lilla HRYNIEWIECKA – energetyka komórki, mitochondria – cell energetics, mitochondria – *Zakład Bioenergetyki, Uniwersytetu im. A. Mickiewicza, 61-701 Poznań, ul. Fredry 10*

Bożena KAMIŃSKA – neurobiologia, biologia molekularna – neurobiology, molecular biology – *Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego 02-097 Warszawa, ul. Pasteura 3*

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 PŁYTYCZ – 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, hybridocytochemistry), cell ultrastructure – *Zakład Histologii AM, 50-368 Wrocław, ul. Chatubińskiego 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, Olgiard NARKIEWICZ, Aleksandra PRZEŁĘCKA, Aleksandra STOJAŁOWSKA, Lech WOJTCZAK

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

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

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

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

W tym zeszycie Postępów Biologii Komórki

- Selektywna eliminacja komórek jest warunkiem prawidłowego przebiegu rozwoju rośliny, podobnie jak i zwierzęcia. Niektóre przejawy apoptozy opisane u zwierząt zaobserwowano także podczas degradacji komórek i tkanek roślinnych. Mimo podobieństw w przebiegu tych procesów postuluje się, że apoptoza nie jest formą śmierci komórek roślinnych, a pojawiające się wówczas zmiany określa się jako *apoptosis-like* (patrz strona 317).
- Lipoksyny (LXs) tworzą wraz z innymi metabolitami kwasu arachidonowego dużą grupę autakoidów zwanych łącznie eikozanoidami. Biosyntezę oraz właściwości immunomodulacyjne lipoksyn opisano na stronie 335.
- Prawidłowe funkcjonowanie komórki zależy od sprawnej wymiany białek i RNA pomiędzy cytoplazmą i jądrem komórkowym. Transport ten jest selektywny i odbywa się poprzez złożone struktury białkowe, jakimi są jądrowe kompleksy porowe. Więcej informacji na ten temat można znaleźć na stronie 373.
- Wpływ TNF, czynnika martwicy nowotworu, na łożysko naczyńnowe nowotworów omówiono na stronie 351. TNF mimo swej toksyczności znajduje zastosowanie w terapii nowotworów. W artykule przedstawiono główne mechanizmy modulującego działania TNF na wzrost nowotworu.



RAK I CYKL KOMÓRKOWY

CANCER AND CELL CYCLE

Jacek Z. KUBIAK

CNRS UMR 6061, Université Rennes,
Biologie et Génétique du Développement Faculté de Médecine,
2 av Prof. Leon Bernard, CS 34317 35043 Rennes cedex, Francja

Streszczenie: W styczniu 2001 odbyła się w szwajcarskiej Lozannie konferencja naukowa zatytułowana "Rak i cykl komórkowy" – "*Cancer & Cell Cycle*" zorganizowana przez ISREC (Szwajcarski Instytut Badań Eksperymentalnych nad Rakiem). Ten artykuł przedstawia najciekawsze, zdaniem autora, doniesienia z tej konferencji. Dotyczą one nie tylko samej kontroli cyklu komórkowego, ważnego aspektu kontroli procesu nowotworzenia, ale również najnowszych osiągnięć w dziedzinie walki z rakiem.
(*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28: 297–307)

Summary: In January 2001, a conference organized by ISREC (Swiss Institute for Experimental Research on Cancer) entitled "Cancer & Cell Cycle" took place in Lausanne in Swiss. This article renders account of the most interesting, from my point of view, presentations from this conference. They concern not only the cell cycle aspects of the cancerogenesis, but also the most recent advances in the battle against cancer.

(*Advances in Cell Biology* 2001; 28: 297–307)

WSTĘP

W styczniu 2001 odbyła się w szwajcarskiej Lozannie konferencja naukowa zatytułowana "Rak i cykl komórkowy" - "*Cancer & Cell Cycle*" zorganizowana przez ISREC (Szwajcarski Instytut Badań Eksperymentalnych nad Rakiem). Niniejsze sprawozdanie prezentuje najciekawsze zdaniem autora zagadnienia.

Wady w kontroli cyklu komórkowego są jedną z najważniejszych przyczyn procesu nowotworzenia. Dlatego przywracanie sprawnej kontroli cyklu komórkowego uważane jest często za antidotum na raka. W procesie nowotworzenia biorą

udział zarówno błędy w replikacji DNA, jak brak kontroli typu *checkpoint* monitorującej prawidłowy przebieg cyklu i pozwalającej komórce na uzyskanie czasu niezbędnego do naprawy wadliwego procesu, niesprawna naprawa DNA, lub całkowity jej brak, nieprawidłowa struktura chromatyny interfazowej i chromosomów, niekontrolowane rozpoczęcie podziału komórkowego (mitotycznego i mejotycznego), wadliwa kontrola rozdzielania chromosomów podczas mitozy i mejozy, nieprawidłowe wyznaczanie płaszczyzny podziału komórki i zła koordynacja procesu cytokinezy. Rak byłby banalną chorobą, gdyby jego przyczyna była wadą tylko jednego ze wspomnianych wyżej procesów. Niestety, przyczyną raka jest zwykle akumulacja wielu błędów w funkcjonowaniu komórki. W dodatku komórki, które uległy transformacji nowotworowej, przemieszczają się powodując przerzuty i indukują zmiany w organizmie sprzyjające rozwojowi guzów, np. rozrost naczyń krwionośnych (neoangiogeneza). Również w tych procesach kontrola cyklu komórkowego odgrywa ważną rolę. Z tych powodów dokładne poznanie zarówno fizjologii, jak i patologii cyklu komórkowego może przyczynić się do skutecznej walki z rakiem.

PROCES NOWOTWORZENIA I TELOMERAZA

Robert Weinberg przedstawił przegląd mechanizmów molekularnych prowadzących do transformacji nowotworowej komórek człowieka. Rak rozwija się etapowo. Wymykające się spod kontroli zmiany w DNA zdrowej do tej pory komórki powodują, że staje się ona potencjalnym źródłem nowotworu. Wzmożona proliferacja komórek potomnych daje początek guzowi. Proces ten zachodzi, gdy komórki przestają reagować na zewnętrzne bodźce powstrzymujące podziały komórkowe i uzyskują nieśmiertelność. Następuje tzw. erozja telomerów, czyli skracanie do pewnej progowej długości końcowych sekwencji DNA każdego chromosomu. Następne etapy rozwoju raka to hyperplazja, czyli rozrost guza, utrata normalnych interakcji komórek z podłożem dająca początek metastazie i indukcja naczyń krwionośnych wspomagających wzrost guza dzięki dostarczaniu mu materiałów odżywczych.

Wiadomo od dawna, że do indukcji transformacji nowotworowej w mysich komórkach hodowanych *in vitro* wystarczy eksperymentalna aktywacja dwóch genów: *LT* (ang. *large T-antigen*) wirusa SV40 i protoonkogenu *ras*. Ten sam zabieg nie powoduje jednak transformacji komórek ludzkich. Grupa Weinberga wykryła w roku 1999, że w ludzkich komórkach proces ten wymaga dodatkowo aktywacji genu telomerazy [3]. W ten sposób wykazano bardzo istotną różnicę pomiędzy komórkami myszy i ludzi: te ostatnie mają wyjątkowo niską aktywność telomerazy. Podwyższona aktywność tego enzymu powoduje, że komórki mogą odtwarzać po każdym podziale komórkowym telomery – końcówki nici DNA budujących chro-

mosomy. Telomerowe DNA skracają się po każdym podziale i w końcu jest tak krótkie, że nie spełnia już swojej roli zabezpieczającej koniec chromosomu. Dalsze podziały komórkowe są niemożliwe i komórka obumiera. Komórki zarodkowe posiadają enzym telomerazę, który pozwala odtwarzać telomery po każdym podziale komórkowym. Później w trakcie rozwoju organizmu stopniowo tracą go i wówczas komórkom naszego ciała pozostaje ograniczona liczba podziałów – tylko do czasu erozji telomerów. U różnych gatunków zmniejszenie aktywności telomerazy w trakcie rozwoju organizmu przebiega z różną szybkością. Między innymi w wyniku utraty aktywności telomerazy komórki stają się śmiertelne. Zabieg wprowadzenia aktywnej telomerazy do komórek w hodowli *in vitro* pozwolił wywołać w nich wstępną fazę nieśmiertelności – uwolnił je od groźby starzenia. Sama aktywność telomerazy nie wystarcza jednak do unieśmiertelnienia komórek. Dopiero równoczesna aktywacja telomerazy i wirusowego onkogenu *LT* pozwoliła grupie Weinberga doprowadzić ludzkie komórki do nieśmiertelności.

Wirusowe białko *LT* blokuje działanie dwóch białek niezbędnych do prawidłowego namnażania komórek: *p53* i *pRb*. *p53* jest głównym supresorem procesu transformacji nowotworowej i podstawowym czynnikiem kontrolującym naprawę DNA. Bez jego prawidłowego działania niemożliwa jest prawidłowa kontrola replikacji DNA. Bezpośrednim skutkiem inaktywacji tego białka jest więc gromadzenie się w DNA komórki mutacji prowadzących do transformacji nowotworowej. *p53* odgrywa jeszcze jedną bardzo ważną funkcję w komórce. Uaktywnia proces apoptozy, czyli programowanej śmierci komórki. Podobne funkcje odgrywa białko *pRb*. Mutacja tego białka (podobna do zablokowania jego aktywności przez wirusowe białko *LT*) jest przyczyną siatkówczaka (retinoblastoma) – nowotworu oka u dzieci. Zablokowanie działania obu białek kontrolnych: *p53* i *pRb* pozbawia ludzkie komórki nadzoru i wraz z uaktywnieniem telomerazy doprowadza je do stanu nieśmiertelności. Wyjaśnienie tych procesów ma kapitalne znaczenie dla poznania mechanizmów prowadzących do powstania raka. Poznanie różnic w procesie nowotworzenia w ludzkich i mysich fibroblastach może doprowadzić do przełomu w rozumieniu etiologii raka.

Weinberg i współpracownicy badają obecnie kilka ludzkich linii komórkowych, które wyłamują się z opisanego powyżej schematu. Na przykład, okazuje się, że keratynocyty, w których wywołano ekspresję ludzkiej telomerazy, zachowują ciągłe cechy zwykłych keratynocytów.

Szczególną zagadką pozostaje linia komórkowa GM847. Są to transformowane przy pomocy wirusa SV40 ludzkie fibroblasty, w których aktywność telomerazy nie jest wysoka, a pomimo to mają charakter komórek nowotworowych. Komórki te zachowują długie telomery, nawet gdy ulegną transformacji mutantem telomerazy o charakterze znoszącym całkowicie funkcje tego enzymu (tzw. ang. *dominant negative mutant*). Obserwacje te sugerują, że w komórkach GM847 istnieje niezależny od telomerazy mechanizm zabezpieczający chromosomy przed skracaniem telo-

merów podczas podziałów komórkowych. Wykrycie tego mechanizmu może wyjaśnić wiele zagadek dotyczących procesu powstawania raka.

Robert Weinberg wskazał również na rolę innego białka wirusa SV40 w procesie nowotworzenia. Białkiem tym jest ST (ang. *small T-antigen*). Jednym z enzymów, których aktywność jest blokowana przez ST, jest fosfataza PP2A – białko o kluczowym znaczeniu w kontroli cyklu komórkowego. Zahamowanie funkcji tej fosfatazy może hamować aktywację kinaz ERK 1 i ERK 2 (ang. *Extracellular Regulated Kinase*) z grupy kinaz MAP (ang. *Mitogen Activated Protein kinase*) niezbędnych do prawidłowego przekazywania sygnałów kontrolujących podziały komórkowe.

p53 - CEL ANTYRAKOWEJ TERAPII GENOWEJ

Mutacje genu kodującego białko p53 są przyczyną bardzo wielu nowotworów. W celu przywrócenia normalnego stanu komórkom rakowym ze zmutowanym genem kodującym p53 należałoby naprawić w nich ten właśnie gen. W tym celu wprowadza się do komórek nowotworowych, w których stwierdzono defekt genu kodującego p53, niezmutowaną formę tego genu. Jego ekspresja przywraca komórkom naprawcze funkcje p53, jak i zdolność do apoptozy. Jako wektorów wprowadzających do komórki zdrowy gen używa się odpowiednio przygotowanych adenowirusów. Jednak aby kuracja była skuteczna, nie wystarczy wprowadzić zdrowy ludzki gen do wirusa. Trzeba jeszcze skierować go wprost do komórek nowotworowych, tak aby nie zaszkodził zdrowym komórkom organizmu.

Richard Iggo z ISREC w Lozannie, jeden z organizatorów konferencji, użył do tego celu adenowirusa, którego pozbawił możliwości namnażania się w komórkach ludzkich. Pozostawił w nim natomiast nietknięte zdolności przenikania poprzez błony komórkowe. Wirusy są zdolne do atakowania tylko tych komórek, które znajdują się w ich bezpośrednim sąsiedztwie. Dlatego trzeba wstrzykiwać je wprost do guzów nowotworowych. Wirus zaopatrzony w funkcjonalny gen *p53* nie mogąc namnażać się w organizmie ludzkim nie jest w stanie atakować oddalonych od miejsca wstrzyknięcia zdrowych komórek. Zabieg ten wymaga doskonałego rozoznania w ilości guzów w organizmie, co w przypadku przerzutów nie zawsze jest łatwe do osiągnięcia. Taka eksperymentalna terapia ogranicza się więc na razie tylko do nowotworów, do których naukowcy mają łatwy dostęp, np. nowotworów szyi i głowy. Niemniej jednak rezultaty ataku adenowirusa są spektakularne. Guzy nowotworowe po prostu znikają pod jego wpływem. Pojawiające się w komórkach nowotworowych wraz z wirusem zdrowe białko p53 włącza proces apoptozy i obumieranie tych komórek. Richard Iggo planuje usprawnienia wirusa, tak aby namnażał się wyłącznie w komórkach rakowych. Taki zabieg pozwoliłby na wpro-

wadzenie go do organizmu chorego poza guzem nowotworowym, np. w postaci zastrzyku dożylnego, i pozostawiałyby samemu wirusowi odnalezienie i zniszczenie komórek nowotworowych w organizmie.

Również Franck McCormick, pionier w dziedzinie terapii antyrakowej z użyciem wirusów wywołujących apoptozę, prowadzi podobne badania. On również uzyskał spektakularne wyniki w leczeniu nowotworów głowy i szyi używając wirusa ONYX-015. Jedną z ważnych cech wirusów ONYX jest to, że namnażają się wyłącznie w komórkach pozbawionych funkcjonalnej formy białka p53. Są więc one świetnymi wektorami do selektywnego wprowadzania niezmutowanego genu *p53* do komórek rakowych. Badania kliniczne tej grupy badawczej dają bardzo zachęcające wyniki w przypadku iniekcji wirusa wprost do guza (rak szyi i głowy), jak i po wprowadzaniu go do organizmu pacjenta przez krwioobieg (rak trzustki i wątroby). Kombinacja terapii wirusem ONYX z chemioterapią lub radioterapią daje jeszcze bardziej zachęcające wyniki. Na przykład zaawansowany rak szyi o średnicy 4 cm zanika zupełnie po 22 dniach takiej podwójnej terapii. McCormick przygotowuje już nową generację wirusów ONYX. Celem, poza wprowadzeniem do komórek genu kodującego funkcjonalne białko p53, jest także dostarczenie wprost do tych samych komórek substancji aktywujących leki antynowotworowe. Połączenie terapii genowej z precyzyjnym wzmocnieniem efektu chemoterapii wyłącznie w komórkach nowotworowych powinno zaowocować wyprodukowaniem niezwykle skutecznego leku na raka.

ROLA BIAŁEK BRCA1 i BARD1 W PROCESIE NOWOTWORZENIA

Mutacje w genie *BRCA1* są związane z powstawaniem raka piersi i jajników u kobiet [10]. David Livingston przedstawił wyniki badań nad funkcją białka BRCA1 i pokrewnych białek – BARD1 i BACH1. BRCA1 jest specyficznym supresorem procesu nowotworzenia w gruczołach mlekowych i jajnikach kobiet. Białko BRCA1 bierze udział w procesach naprawczych DNA zarówno tzw. „naprawie uszkodzeń obu nici” (ang. *double strand break repair*), jak i w naprawach DNA związanych z transkrypcyjnymi uszkodzeniami oksydacyjnymi. Grupa Livingstona wykazała tę rolę genu *brca1* badając myszy pozbawione tego genu. Komórki myszy pozbawionych genu *brca1* wykazują bardzo wysoką częstotliwość aneuploidii i fragmentacji chromosomów, co sugeruje, że produkt tego genu zaangażowany jest również w proces kontroli podziału komórkowego „punkt kontrolny organizatora wrzeciona mitotycznego” (ang. *spindle assembly checkpoint*).

Jednym z partnerów BRCA1 jest białko BARD1. Oba białka tworzą wspólny kompleks i wykazują obecność mutacji w komórkach raka piersi i jajnika. Są ze sobą również bardzo blisko spokrewnione ewolucyjnie. Livingston podejrzewa, że

BARD może być ewolucyjnym archetypem *BRCA*, ponieważ jego homolog został zidentyfikowany w genomie roślin, a nie ma tam obu genów *BRCA1* i 2 obecnych u zwierząt.

Białka *BRCA1* i *BARD1* są również niezbędne do prawidłowego rozwoju zarodków *Xenopus laevis*. Eliminacja zarówno *BRCA1*, jak i *BARD1* z zarodków uzyskana przez wprowadzenie antysensownych oligodezoksyrybonukleotydów w stosunku do sekwencji ich cDNA wywołuje najczęściej dorsalizację zarodków. Zmianom tym towarzyszy wysoka aneuploidia komórek. Okazuje się, że oba białka kontrolują nawzajem swoją transkrypcję lub też stabilizują się nawzajem. Eksperymentalne zwiększenie ilości produktu genu *brca1* powoduje zwiększenie ilości produktu genu *bard1* i *vice versa*. Te obserwacje pozwolą zapewne w niedługim czasie wyjaśnić w pełni funkcję obu białek i zrozumieć ich rolę w procesach wywołujących wybiórczo raka piersi i jajnika.

KINAZY REGULUJĄCE FUNKCJE CENTROSOMÓW

Hyperplazja centrosomów – organelli tworzących między innymi bieguny wrzeciona podziałowego, a więc odpowiedzialnych za podział komórki – jest często obserwowaną cechą komórek nowotworowych. Centrosomy są odpowiedzialne za proces nukleacji mikrotubul – włókien budujących zarówno wrzeciono podziałowe, jak i podstawową sieć włókien cytoszkieletu komórki interfazowej. Biorą one również udział w reorganizacji mikrotubul w trakcie cyklu komórkowego, różnicowania komórek między innymi poprzez regulację stabilności tych włókien w komórce. Centrosom tworzy parę centriol otoczoną amorficznym, gęstym elektro-nowo materiałem, noszącym nazwę materiału pericentriolarnego. Poza zwiększoną liczbą centrosomów obserwuje się również zwiększone rozmiary tych organelli będące wynikiem ekspansji właśnie materiału pericentriolarnego. Centrosomy skupiają niezwykle wysoką liczbę enzymów znanych z ważnych funkcji w regulacji cyklu komórkowego. Część z nich jest specyficzna właśnie dla tych organelli, inne zaś występują również w cytoplazmie czy nukleoplazmie. Wiele z nich jest szczególnie zagęszczona właśnie w obrębie centrosomów. Do tej grupy należy główny czynnik mitotyczny – MPF (ang. *M-phase Promoting Factor*), czyli kompleks homologu kinazy *Cdc2* drożdży z cyklina B, jak również inne enzymy z grupy kinaz zależnych od cyklin CDK (ang. *Cyclin-Dependent Kinase*), np. *Cdk2/cyklina A* lub *E*, kinazy z grupy MAP (np. wspomniane już kinazy *ERK1* i *ERK2*), fosfatazy z grupy *PP2A* i *PP1*. Ta akumulacja enzymów regulujących procesy fosforylacji i defosforylacji od dawna intryguje biologów komórki [8]. O szczególnej roli kinaz białkowych w cyklu przemian centrosomów opowiadał na lozanskiej konferencji Erich Nigg.

Replikacja centrosomów jest niezależna od cyklu replikacyjnego DNA komórki, lecz jest bardzo ściśle z nim związana. W komórkach ssaków proces ten jest re-

gulowany przez kompleks Cdk2/cykliny A. Z niewiadomych przyczyn, u *Xenopus* funkcje te pełni Cdk2 w kompleksie z cykliną E. Można więc wnioskować, że aktywność kinazy Cdk2 odgrywa tu ważną rolę, a cyklina związana z tym enzymem w jakiś sposób zmienia jego specyfikę, np. decydując o fosforylacji takiego, a nie innego substratu. Proces separacji centrosomów, niezbędny do dostarczenia każdego z tych organelli do przyszłych biegunów wrzecionowa podziałowego, wymaga pracy licznych motorów komórkowych. Zaangażowane są w ten ruch liczne białka z tej grupy: BinC, Cut 7, KLP 61 i Eg5. To ostatnie jest fosforylowane bezpośrednio przez MPF (Cdc2/cykliny B). Dopiero fosforylacja Eg5 przez Cdc2 na początku fazy M pozwala na połączenie tego białka-motora z mikrotubulami, co umożliwi aktywny transport centrosomów. Eg5 jest również substratem innej kinazy – Eg2 – enzymu z grupy "*Aurora-like kinases*". Geny kodujące enzymy mają charakter protoonkogenów i ich ilość często wzrasta w komórkach rakowych (np. w raku piersi). O funkcji tych enzymów w trakcie rozwoju *Xenopus laevis* donosili na konferencji również Claude Prigent i Catherine Jessus.

Jedną z kinaz o sprecyzowanej ostatnio przez Ericha Nigga funkcji w cyklu centrosomalnym jest Nek2. Kinaza ta fosforyluje białko C-Nap1, które wchodzi w skład włóknistego „łącznika” obu centrioli w obrębie centrosomu. Fosforylacja C-Nap1 przez Nek2 jest niezbędna do eliminacji „łącznika” pod koniec interfazy. Dzięki temu możliwy jest rozdział obu centrioli. Ponieważ każda z centrioli indukuje tworzenie centrioli potomnej, zahamowanie funkcji kinazy Nek2, uniemożliwiające rozdzielenie centrioli-matek, prowadzi do zwielokrotnienia liczby centrioli w obrębie centrosomu. Taki sam efekt wywołuje zwiększenie ilości C-Nap1 w komórce. Wydaje się, że wówczas endogenna kinaza Nek2 nie jest w stanie ufosforylować w odpowiednim momencie zwiększonej ilości substratu. Wadliwa regulacja tego typu fosforylacji (jak i towarzyszącej jej nieodłącznej reakcji defosforylacji prowadzonej przez fosfatazę PP1) może odgrywać podstawową rolę zarówno w procesie hyperplazji centrosomów, jak i wtórnie w wywoływaniu aneuploidii w następstwie wadliwych podziałów komórkowych.

Inna niezwykle interesująca i istotna kinaza zaangażowana zarówno w regulację cyklu komórkowego, jak i wpisanego weń cyklu przemian centrosomów jest Plk1 (ang. *Polo-like kinase 1*). Enzym ten odgrywa kluczową rolę w kontroli przebiegu cyklu komórkowego. Zaangażowany jest w regulację wszystkich bez wyjątku faz podziału komórki: w dojrzewanie centrosomów, zarówno w aktywację jak i inaktywację MPF (to ostatnie dzięki aktywacji systemu degradacji białek mitotycznych podczas mitozy i mejozy), jak również w przebieg cytokinezy. Jest też jednym z podstawowych enzymów specyficznym blokowanych przez system monitorujący replikację i naprawę DNA (tzw. ang. *DNA damage checkpoint*). Aby wykryć substraty kinazy Plk1 bezpośrednio zaangażowane w poszczególne etapy cyklu centrosomów, ekipa Nigga przeprowadziła spektakularną serię doświadczeń. Dzięki użyciu metody *two hybrid*, w której wykorzystano Plk1 jako „przynętę”, zidentyfikowano 25 genów

potencjalnych partnerów tej kinazy. Następnie uzyskano cDNA tych klonów, a każdy z nich „zaznaczono” sekwencją kodującą fluorescencyjne białko GFP (ang. *Green Fluorescence Protein*). Po transfekcji komórek w hodowli *in vitro* można było śledzić lokalizację poszczególnych fluoryzujących białek syntetyzowanych w komórce. W ten sposób uzyskano 4 klony, których białka lokalizowały się na centrosomach. Jedno z nich, nazwane *ninein-like protein 1* – Nlp1, jest bardzo podobne do znanej z lokalizacji w centrosomach *nineiny*. Dokładniejsza analiza wykazała, że Nlp1 jest obecne w centrosomach interfazowych, a zanika w fazie M, gdy tworzą się bieguny wrzeciona. Wykazano następnie, że Nlp1 powoduje gromadzenie się -tubuliny (białka o podstawowym znaczeniu dla nukleacji mikrotubul) w centrosomach interfazowych. Tylko N-końcowa część, w której zlokalizowana jest sekwencja aminokwasów fosforylowana przez Plk1, wykazuje tę cechę. Ekipa Nigga wykazała, że fosforylacja końca N-końcowej części Nlp1 przez Plk1 powoduje zarówno zanik zdolności Nlp1 do gromadzenia -tubuliny, jak i jego delokalizację z centrosomów w fazie M. Naukowcy podejrzewają, że proces fosforylacji Nlp1 przez Plk1 prowadzi do zmian niezbędnych do nabycia przez centrosom funkcji mitotycznych. Usunięcie białka Nlp1 jest prawdopodobnie niezbędne do zastąpienia go przez inne białko lub białka, zaangażowane w tworzenie wrzeciona mitotycznego i jego funkcje. Jednym z kandydatów jest produkt genu *Asp*, którego mutacje powodują powstawanie wrzecion acentriolarnych (stąd nazwa genu *Asp* – ang. *Acen-triolar spindle*). Wyniki te pozwalają lepiej zrozumieć koordynację pomiędzy składnikami cyklu komórkowego: cyklu DNA i cyklu centrosomów.

KOORDYNACJA FUNKCJI WRZECIONA PODZIAŁOWEGO I EKSPRESJI GENÓW

Liczne białka zaangażowane w posttranskrypcyjną regulację ekspresji genów poprzez regulację długości łańcucha poliadenylogowego na końcu 3' mRNA są zgromadzone we wrzecionie mitotycznym [2]. Jednym z nich jest „maskin”, białko zaangażowane w maskowanie (stąd nazwa) mRNA kodujących cykliny mitotyczne. Taki mechanizm regulacji ekspresji mRNA jest niezbędny do kontroli przebiegu cykli komórkowych zarodka *Xenopus laevis*. Co więcej wykazano, że samo mRNA cyklin mitotycznych też jest zgromadzone właśnie we wrzecionie mitotycznym. W związku z tym podejrzewa się, że lokalizacja zarówno maszyny zaangażowanej w regulację posttranskrypcyjnej ekspresji cyklin, jak i samego mRNA jest niezbędna do prawidłowej regulacji syntezy tych białek. Cykliny są niezbędne właśnie w obrębie wrzeciona podziałowego [5]. Wydaje się więc, że ich synteza powinna odbywać się właśnie w tym miejscu. Zakłócenie regulacji tego procesu może przyczynić się do nieprawidłowej lokalizacji cyklin mitotycznych, a tym samym do błędów w samym procesie podziału komórki. Podejrzewa się również, że podobny

mechanizm regulacji posttranskrypcyjnej ekspresji genów zaangażowany jest w kontrolę cyklu komórek somatycznych, a jego wadliwa regulacja może być przyczyną niektórych typów raka.

W trakcie konferencji Mike Lee przedstawił bardzo interesujące dane dotyczące lokalizacji i funkcji homologu białka Maskin u *Drosophila melanogaster* – białka o nazwie TACC3. Białka z tej rodziny mają specyficzną sekwencję TACC (*TACC box*), która dała im nazwę. Ilość białka TACC3 w komórce wzrasta wyraźnie w fazie S. Eliminacja genu *tacc3* u myszy jest letalna – powoduje zahamowanie wzrostu, defekty morfologiczne zarodka, zwiększoną apoptozę i szybką śmierć zarodków. O współpracy TACC z *p53* świadczy fakt, że u myszy pozbawionych genu kodującego *p53* niektóre aspekty fenotypu eliminacji TACC3 (między innymi poziom apoptozy) są o wiele łagodniejsze niż w zarodkach, w których wyeliminowano tylko gen *tacc3*. TACC3 lokalizuje się w centrosomach w trakcie mitozy i TACC-box jest niezbędny do tej lokalizacji. Jednym z partnerów TACC3 u *D. melanogaster* jest produkt genu *mmps* (*Minispindles*), który jest białkiem towarzyszącym mikrotubulom (ang. *MAP – Microtubule Associated Protein*) o nazwie MAP215. To właśnie interakcja TACC3 z MAP215 pozwala na lokalizację kompleksu na mikrotubulach biegunów wrzeciona. Podejrzewa się, że TACC3 pełni funkcje „łącznika” pomiędzy centrosomem i utworzonymi przezeń mikrotubulami właśnie dzięki interakcji z MAP215. Czy TACC3 pełni równocześnie tę samą funkcję w regulacji syntezy cyklin mitotycznych, co maskin u *Xenopus*? Pytanie to pozostaje na razie bez odpowiedzi. Jeśli tak, to może okazać się ono jednym z podstawowych czynników dla funkcji wrzeciona mitotycznego. Potwierdzenie jego istotnej roli w życiu komórki może sugerować, że zaburzenia w funkcjonowaniu TACC3 mogą być przyczyną nie tylko nieograniczonej proliferacji komórek rakowych, ale także niesprawnego systemu regulacji ekspresji genów w tych komórkach.

Również komórkowy mechanizm deadenylicacji mRNA, tj. procesu odwrotnego do poliadenylacji, a polegającego na skracaniu sekwencji poliadenylowej na końcu 3' mRNA, może uczestniczyć w regulacji genów związanych z procesem nowotworzenia. Autor tego sprawozdania (J. Kubiak) przedstawił w Lozannie wyniki badań jednego z czynników regulujących ten proces w oocytach i zarodkach *Xenopus laevis*. Czynnikiem ten o nazwie EDEN-BP (ang. *Embryonic Deadenylation Element-Binding Protein*) podlega regulacji przez fosforylację i defosforylację. Kinaza ERK2 z rodziny MAP odgrywa ważną rolę w tym procesie. Jej inaktywacja po zapłodnieniu jest niezbędna do aktywacji procesu deadenylicacji licznych mRNA kodujących geny regulujące ważne aspekty kontroli cyklu komórkowego (np. *c-mos*, *cdk2*, *Eg2* i *Eg5*), a więc do wyciszenia ekspresji tych genów w trakcie wczesnego rozwoju *Xenopus laevis* [4, 9]. Nasze wyniki wskazują, że proces ten może być również zaangażowany w powstawanie raka piersi. Wykazaliśmy bowiem, że wzór fosforylacji czynnika EDEN-BP w niektórych typach raka piersi odpowiada stanowi aktywności kinaz ERK1 i ERK2. Enzymy te są nieaktywne w samym guzie, podczas

gdy wykazują aktywność w sąsiednich tkankach piersi pacjentek. Stan defosforylacji EDEN-BP zależnej od obu kinaz może być związany z podwyższoną aktywnością deadenylacji pewnych typów mRNA, a więc potencjalnie ze zmniejszoną produkcją pewnych białek właśnie w guzach. Jednym z enzymów – kandydatów do takiej regulacji jest kinaza Syk [1, 11]. Obserwuje się bowiem zmniejszenie poziomu ekspresji tego białka w komórkach niektórych typów raka piersi. W dodatku, podwyższona ekspresja genu kodującego kinazę Syk powoduje cofnięcie fenotypu komórek transformowanych *in vitro*. Dalsze badania potwierdzą, w jakim stopniu mechanizm kontroli ekspresji tego i innych białek jest zaangażowany w proces nowotworzenia.

PODSUMOWANIE

W powyższym sprawozdaniu skoncentrowałem się zaledwie na kilku wybranych aspektach kontroli cyklu komórkowego w procesach nowotworzenia. Na konferencji wysłuchaliśmy ponad 60 mówców i mogliśmy zapoznać się z ponad dwiema setkami doniesień w formie posterów. Przedstawienie wszystkich z nich w tak krótkim tekście było niemożliwe. Wyborem zaprezentowanych tu zagadnień kierowały zarówno moje własne zainteresowania, jak i bliskie perspektywy zastosowań opisanych wyżej odkryć w terapii antyrakowej.

Najważniejszym środkiem walki z rakiem wydają się bez wątpienia wirusy typu ONYX. Zastosowanie terapii genowej przy użyciu „inteligentnych” wektorów, które namnażają się tylko w chorobowo zmienionych komórkach ciała i w dodatku uwrażliwiają je na działanie chemoterapii i radioterapii, to zapewne bliska już przyszłość onkologii początków XXI wieku.

Druga ważna droga do produkcji leków antyrakowych to wykorzystanie wiedzy o mechanizmach regulujących cykl komórkowy poprzez mechanizmy fosforylacji i defosforylacji. Kilku mówców (np. Giulio Draetta) poświęciło swoją uwagę właśnie metodom badań produktów interferujących z kinazami cyklu komórkowego. Właśnie inhibitory kinaz zarówno naturalne białka – produkty genów zaangażowanych w kontrolę cyklu komórkowego, np. enzymy z grupy inhibitorów CDK, jak i produkty syntezy chemicznej wydają się szczególnie interesujące w ograniczaniu proliferacji komórek rakowych. W inhibitorach enzymów CDK upatruje się również środków ograniczających efekty uboczne chemoterapii. Firma Glaxo Wellcome prowadzi zaawansowane badania efektów jednego z inhibitorów CDK2, który zapobiega wypadaniu włosów – ubocznego skutku wspólnego stosowania dwóch środków antyrakowych o nazwach etopozyd i cyklofosfaamid-doksorubicyna [7]. Pełne zrozumienie kontroli kinaz kierujących cyklem komórkowym, w tym również cyklem dojrzewania centrosomów, pozwoli zapewne w przyszłości na uzyskanie nowych środków leczniczych. Innym obiecującym celem ataku przeciwrakowego są substancje interferujące z aktywnością telomerazy i protoonkogenów c-Myc i Ras.

Czy strategie rozwoju środków antyrakowych uznane za wiodące na tej konferencji okażą się rzeczywiście najskuteczniejsze, pokaże niedaleka przyszłość.

PODZIĘKOWANIE

Dziękuję Dr Marii Annie Ciemerych za dyskusję i korektę tekstu.

LITERATURA

- [1] COOPMAN PJ, DO MT, BARTH M, BOWDEN ET, HAYES AJ, BASYUK E, BLAZNCA-TO JK, VEZZA PR, McLESKEY SW, MANGEAT PH, MUELLER SC. The Syk tyrosine kinase suppresses malignant growth of human breast cancer cells. *Nature* 2000; **406**: 742–747.
- [2] GROISMAN I, HUANG Y-S, MENDEZ, R, CAO Q, THERKAUF W, RICHTER JD. CPEB, maskin, and cyclin B1 mRNA at the mitotic apparatus: Implications for local translational control of cell division. *Cell* 2000; **103**: 435–447.
- [3] HAHN WC, COUNTER CM, LUNDBERG AS, BEIJERSBERGEN RL, BROOKS MW, WEINBERG RA. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 1999; **400**: 464–468.
- [4] KUBIAK JZ. Wczesne podziały komórkowe zarodka kręgowców. W „Molekularne mechanizmy rozwoju zarodkowego”. Red. H. Krzanowska i W. Sokol-Misiak. PWN Warszawa 2001 (w druku).
- [5] KUBIAK JZ, WEBER M, DE PENNART H, WINSTON NJ, MARO B. The metaphase II arrest in mouse oocytes is controlled through microtubule-dependent destruction of cyclin B in the presence of CSF. *EMBO J* 1993; **12**: 3773–3778.
- [6] KUBIAK JZ i POLANSKI Z. Meiotyczny cykl komórkowy u zwierząt. *Kosmos* 1998; **47** (2): 147–157.
- [7] MARX J. Preventing hair loss from chemotherapy. *Science* 2001; **291**: 25–26.
- [8] NIGG EA. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nature Review* 2001; **2**: 21–32.
- [9] PAILLARD L, OMILLI F, LEGAGNEUX V, BASSEZ T, MANIEY D, OSBORNE HB. EDEN and EDEN-BP, a cis element and an associated factor that mediate sequence-specific mRNA deadenylation in *Xenopus* embryos. *EMBO J* 1998; **17**: 278–287.
- [10] SCULLY R, LIVINGSTON, DM. In search of the tumor-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature* 2000; **408**: 429–432.
- [11] STEWART ZA, PIETENPOL JA. Syk: a new player in the field of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2001; **3**: 5–7.

Redaktor prowadzący – B. Kamińska-Kaczmarek

Otrzymano: 27.02.2001 r.

Przyjęto: 11.04.2001 r.

Adres autora: CNRS UMR 6061, Université Rennes,

2 av Prof. Leon Bernard, CS 34317 35043 Rennes cedex, Francja

WSPÓŁCZESNE POGLĄDY DOTYCZĄCE WPLYWU REAKTYWNYCH FORM TLENU NA FUNKCJE PLEMNIKÓW U SSAKÓW

PRESENT CONCEPTION REGARDING THE EFFECT
OF REACTIVE OXYGEN SPECIES
ON FUNCTIONS OF MAMMALIAN SPERMATOZOA

Zofia LUBERDA

Katedra Biochemii Zwierząt Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

Streszczenie: W prezentowanym artykule omówiono pochodzenie reaktywnych form tlenu w nasieniu ssaków oraz szlaki generowania tych metabolitów. Scharakteryzowano również krótko enzymatyczne układy antyoksydacyjne nasienia. Przedstawiono współczesne poglądy dotyczące pozytywnego udziału reaktywnych form tlenu w procesie zapłodnienia i toksycznego oddziaływania stresu oksydacyjnego na strukturę i funkcję biologiczną plemników ssaków.

(Postępy Biologii Komórki 2001; 28: 309–316)

Słowa kluczowe: plemniki, ssak, zapłodnienie, reaktywne formy tlenu, stres oksydacyjny, peroksydacja lipidów.

Summary: The source of reactive oxygen species and the pathway generation of the metabolites were discussed in this article. The enzymatic antioxidants systems occurring in semen were characterized. In this article, positive effect of reactive oxygen species on process of fertilization and the toxic effect of oxidative stress on the structure and biological function of mammalian spermatozoa were introduced.

(Advances in Cell Biology 2001; 28: 309–316)

Key words: spermatozoa, mammal, fertilization, reactive oxygen species, oxidative stress, lipid peroxidation.

WSTĘP

Męskie komórki rozrodcze są zdolne do generowania reaktywnych form tlenu (RFT), które w niewielkich ilościach są niezbędne do zapewnienia prawidłowego

przebiegu procesu zapłodnienia. Jednakże pojawienie się tych metabolitów w nadmiarze wywołuje stan określany stresem oksydacyjnym (ang. *oxidative stress*). Stan ten pojawia się wówczas, kiedy zostaje zachwiana równowaga między systemami generującymi RFT a antyoksydacyjnymi mechanizmami obronnymi w komórce.

Stres oksydacyjny jest jednym z ważniejszych czynników odpowiedzialnych za zakłócenie funkcji biologicznych nasienia. Plemniki bowiem ze względu na obecność wysokiej zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w fosfolipidach błonowych i relatywnie niski poziom enzymów antyoksydacyjnych są szczególnie narażone na szkodliwe oddziaływanie reaktywnych metabolitów tlenu.

ŹRÓDŁA REAKTYWNYCH FORM TLENU

W nasieniu ssaków można wyróżnić dwa główne źródła reaktywnych form tlenu, a mianowicie plemniki oraz fagocytujące leukocyty (głównie neutrofile). W plemnikach źródłem RFT może być zarówno mitochondrialny łańcuch oddechowy, jak i błonowa oksydaza NADPH. Plemniki ssaków są relatywnie obfite w mitochondria i charakteryzują się potencjalnie wysokim poziomem fosforylacji oksydacyjnej. W mitochondriach tlen może być częściowo (1–2%) zredukowany do reaktywnych form tlenu. W czasie przepływu elektronów przez składowe mitochondrialnego łańcucha oddechowego część elektronów „wycieka” i w drodze jednoelektronowej redukcji O_2 tworzy anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), który następnie drogą dysmutacji może być transformowany do H_2O_2 . W nienaruszonych mitochondriach człowieka stałe poziomy $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 wynoszą odpowiednio 10^{-11} M i około 10^{-7} M [cytowane za 12]. W nasieniu królika około połowa produkcji anionorodnika ponadtlenkowego pochodzi właśnie z mitochondriów [18].

Innym źródłem reaktywnych metabolitów tlenu może być podobnie jak w leukocytach fagocytujących oksydaza NADPH. Ostatnio [28] potwierdzono aktywność tego enzymu w plemnikach człowieka. Uważa się, że jego aktywność jest ściśle powiązana ze szlakiem pentozofosforanowym, który jest głównym dostawcą NADPH, będącego źródłem elektronów do redukcji tlenu do anionorodnika ponadtlenkowego. Warto zaznaczyć, że odnotowano [15] pozytywną korelację między aktywnością dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej głównego enzymu kontrolującego szlak pentozofosforanowy a szybkością indukowanego generowania wolnych rodników. Wykazano również, że egzogeny NADPH indukuje wytwarzanie RFT w plemnikach człowieka [5].

W nasieniu obfitych ilości reaktywnych metabolitów tlenu mogą dostarczać infiltrujące leukocyty fagocytujące. W czasie fagocytozy komórki te charakteryzują się znacznie zwiększonym zapotrzebowaniem na tlen (ang. *respiratory burst*) do produkcji reaktywnych form tlenu, wykorzystywanych przez nie do zabijania drobnoustrojów. Za powstanie tego zjawiska jest odpowiedzialny wielokompleksowy enzym błonowy zwany oksydazą NADPH. Leukocyty fagocytujące, które zawiera

każda próbka ludzkiego nasienia, są potężnymi generatorami RFT i wydają się być spontanicznie aktywne w natywnych ejakulatach [2].

Nadmierne generowanie wolnych rodników przez męskie komórki rozrodcze może być również indukowane w trakcie oksydoredukcyjnych przemian ksenobiotyków czy nadmierną dostępnością metali grup przejściowych. Stres oksydacyjny może być także wywołany na skutek osłabienia funkcjonowania układów antyoksydacyjnych spowodowanych niewłaściwą dietą, wiekiem czy czynnikami genetycznymi.

FUNKCJE FIZJOLOGICZNE REAKTYWNYCH FORM TLENU

Już podczas spermatogenezy reaktywne formy tlenu biorą czynny udział w tak ważnych procesach, jak: kondensacja DNA czy regulacja liczby komórek rozrodczych, poprzez indukcję apoptozy czy stymulację podziału spermatogonii [1]. W dojrzałych gametach RFT w niskich stężeniach odgrywają pozytywną rolę w procesach fizjologicznych prowadzących do zapłodnienia komórki jajowej [10, 14, 17].

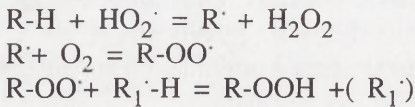
Udokumentowano udział nadtlenu wodoru i anionorodnika ponadtlenkowego w kapacytacji oraz reakcji akrosomalnej w plemnikach ssaków i to w nasieniu zarówno świeżym, jak i konserwowanym. Dla przykładu wykazano, że O_2^- [34] i H_2O_2 [17] uczestniczą w procesie kapacytacji plemników człowieka. Nadtlenek wodoru również aktywnie uczestniczy w procesie kapacytacji plemników chomika [9]. Wzrost H_2O_2 generowanego przez dysmutazę ponadtlenkową wpływa na podniesienie poziomu jonów Ca^{2+} i zwiększenie zdolności zapładniającej plemników myszy [11]. U szczura również odnotowano [19] pozytywną korelację między poziomem RFT generowanych przez octan ołowiu a odsetkiem kapacytowanych i wykazujących reakcję akrosomalną plemników z ogona najądrzy. Anionorodnik ponadtlenkowy i nadtlenek wodoru biorą udział odpowiednio w procesie kapacytacji i reakcji akrosomalnej w plemnikach kriokonserwowanego nasienia buhaja [27]. Autorzy badań sugerują, że H_2O_2 w niskich stężeniach może wpływać na modyfikację enzymów i błon komórkowych, które w rezultacie prowadzą do indukcji reakcji akrosomalnej. Jeżeli natomiast chodzi o kapacytację plemników, to zakłada się, że proces ten jest indukowany kaskadowo za pośrednictwem cAMP, którego poziom jest regulowany przez status redox w komórce plemnikowej [6, 34].

POWSTAWANIE NADTLENKÓW LIPIDÓW W PLEMNIKACH SSAKÓW

Szkodliwy wpływ reaktywnych form tlenu na strukturę i funkcję plemników jest przede wszystkim efektem ich nadmiernej reaktywności z ważnymi biomole-

kułami różnych organelli tych komórek. Szczególnie wrażliwe na ich działanie są wielonienasycone kwasy tłuszczowe fosfolipidów plazmolemy, które w wyniku ich ataku ulegają peroksydatywnemu rozszczepieniu do wodoronadtlenków lipidów.

Proces peroksydacji lipidów w plemnikach ssaków wg Alvareza i Storeya [7] przebiega następująco. Kaskadę wolnorodnikowej reakcji łańcuchowej autooksydacji lipidów inicjuje rodnik wodoronadtlenkowy – $\text{HO}_2\cdot$ (ang. *hydroperoxyl radical*). Inicjujący rodnik „wrywa” wodór (*) z grupy metylenowej między dwoma wiązaniami podwójnymi ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2^*-\text{CH}=\text{CH}-$) nienasyconego kwasu tłuszczowego w cząsteczce fosfolipidu błonowego (R-H) i powstaje rodnik lipidowy ($\text{R}\cdot$). Po przyłączeniu cząsteczki tlenu do rodnika lipidowego tworzy się rodnik nad-tlenkowy lipidu ($\text{R}-\text{OO}\cdot$). Ten ostatni przyłącza labilny wodór z kolejnej cząsteczki lipidu (R_1-H) i w rezultacie powstaje wodoronadtlenek lipidowy ($\text{R}-\text{OOH}$) zgodnie ze schematem:



Nowopowstały rodnik lipidowy ($\text{R}_1\cdot$) inicjuje kolejny cykl utleniania wolnorodnikowego. Wodoronadtlenek lipidowy natomiast pod wpływem fosfolipazy A_2 może ulec hydrolitycznemu rozpadowi z uwolnieniem wodoronadtlenku wolnego kwasu tłuszczowego i lizofosfolipidu. W końcowej fazie następuje peroksydatywna degradacja uwolnionych wodoronadtlenków kwasów tłuszczowych, prowadząca m.in. do fragmentacji łańcuchów kwasów tłuszczowych, generowania kolejnych wolnych rodników czy syntezy aldehydów w tym dialdehydu malonowego i innych produktów.

Uwolnione pod wpływem fosfolipazy A_2 lizofosfolipidy mogą być z powrotem reacylowane. Jeżeli szybkość tego procesu będzie mniejsza od hydrolizy wodoronadtlenków lipidów, to plazmolema będzie akumulować lizofosfolipidy. Nadmierna akumulacja tych związków może być powodem utraty bariery przepuszczalności przez błonę i w rezultacie „wycieku” z plemników ważnych metabolitów, a w szczególności ATP, co w końcowym efekcie może doprowadzić do utraty ruchliwości i śmierci tych komórek.

Peroksydatywny rozpad fosfolipidów błonowych męskich komórek rozrodczych zależy od ich rodzaju. Spośród głównych grup tych związków fosfatydyloetanoloaminy szybciej ulegają degradacji niż cząsteczki fosfatydylocholino czy sfingomieliny. Wśród innych rodzajów największą labilnością charakteryzują się fosfatydyloseryny, natomiast kardiolipiny i fosfatydyloinozytole tylko w niewielkim stopniu podlegają peroksydacji [7].

WPLYW STRESU OKSYDACYJNEGO NA FUNKCJE NASIENIA

Stres oksydacyjny wywiera wpływ nie tylko na obniżenie ruchliwości i przeżywalności męskich komórek rozrodczych, ale także na ich funkcjonowanie w procesie zapłodnienia. Reaktywne formy tlenu generowane w nadmiarze wpływają na obniżenie zdolności plemników zarówno do reakcji akrosomalnej, jak i fuzji plemnik – oocyt. Griveau i in. [16] zaobserwowali niekorzystny wpływ H_2O_2 i O_2^- generowanych *in vitro* na indukowaną jonoforem wapniowym reakcję akrosomalną plemników człowieka. Z kolei Aitken i in. [4] odnotowali, że plemniki człowieka poddane niewielkiemu stresowi oksydacyjnemu, który nie obniżał ich ruchliwości, penetrowały statystycznie istotnie niższy odsetek oocytów chomika w porównaniu do prób kontrolnych. Statystycznie istotne różnice odnotowano również w średniej liczbie plemników penetrujących każdy oocyt. Roca i in. [29] z drugiej strony zaobserwowali, że antyoksydacyjna aktywność dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy wywiera korzystny wpływ na zdolność do penetracji niedojrzałych oocytów świń przez zamrożone - rozmrożone plemniki knura. Enzymy te wpływały również pozytywnie na zdolność zapładniającą wymienionych plemników w warunkach *in vivo*.

Mechanizm odpowiedzialny za obniżenie zdolności plemników do reakcji akrosomalnej i w konsekwencji do zapłodnienia może wiązać się z utratą płynności plazmolemy czy też selektywną inaktywacją niektórych biochemicznych szlaków prowadzących do tej reakcji, takich jak system wtórnych przekazników. Nie wyklucza się również, że RFT w niskim stężeniu (nie obniżającym ruchliwości plemników) mogą wywierać supresyjny wpływ na fuzję plemnik - oocyt poprzez utlenianie grup sulfhydrylowych -SH w białkach plazmolemy [24], w wyniku czego następuje „usztynienie” błony. W jeszcze innych badaniach [3], w których używano oksydazy ksantynowej do wytwarzania wolnych rodników w plemnikach zdrowych mężczyzn, odnotowano supresję ich ruchliwości i zdolności do zapłodnienia oocytów chomika. Reaktywne formy tlenu obniżają nie tylko intensywność, ale także jakość ruchu męskich komórek rozrodczych [16]. Generowane *in vitro* nadtlenek wodoru i anionorodnik ponadtlenkowy wpływały statystycznie istotnie zarówno na obniżenie odsetka ruchliwych plemników człowieka, jak i na niektóre parametry charakteryzujące ten ruch, takie jak: prędkość krzywoliniową (droga rzeczywista, jaką przebył plemnik w jednostce czasu), prędkość postępową (droga mierzona prostoliniowo, przebyta przez plemnik w jednostce czasu) czy liniowość ruchu. Badania bezpośredniego wpływu RFT na ruchliwość pozbawionych błon plemników człowieka wykazały, że w warunkach *in vitro* najbardziej toksyczny był nadtlenek wodoru. Wolne rodniki (O_2^- i OH^-) były nieco mniej toksyczne. Utrata ruchliwości związana była z wyczerpywaniem się ATP [13].

Według niektórych autorów [8] znaczący spadek zawartości antyoksydantów (m.in. dysmutazy ponadtlenkowej i zredukowanego glutationu) w plemnikach poddawanych obróbce technologicznej zamrażania i rozmrażania stanowi istotną przyczynę obniżenia płodności tych komórek po kriokonserwacji. Ostatnio również odnotowano powiązania między poziomem glutationu w nasieniu człowieka a zdolnością tych komórek do penetracji śluzu szyjki macicy [26].

Nadmierne wytwarzanie reaktywnych form tlenu zakłócające funkcjonowanie nasienia związane jest nie tylko z atakiem tych molekuł na membrany, ale także na genom komórki plemnikowej. W uszkodzonych przez stres oksydacyjny plemnikach nieplodnych mężczyzn obserwowano fragmentację DNA [21, 22, 25, 33]. Ilość uszkodzeń DNA w plemnikach człowieka była negatywnie powiązana z tradycyjnymi kryteriami jakości nasienia (ilość plemników, ruchliwość, morfologia), jak również z efektywnością zapłodnienia *in vitro* [33].

UWAGI DOTYCZĄCE UKŁADÓW ANTYOKSYDACYJNYCH W NASIENIU

Podstawowy enzymatyczny system antyoksydacyjny w nasieniu ssaków obejmuje dysmutazę ponadtlenkową, peroksydazę glutationową z jej pomocniczym enzymem – reduktazą glutationową i substratem redoks – glutationem. Enzymy te są zlokalizowane zarówno w plemnikach, jak i plazmie nasienia większości ssaków, a aktywność ich jest uwarunkowana gatunkowo. Więcej szczegółów na ten temat zawiera poprzednia praca autorki [23].

Natomiast jeżeli chodzi o aktywność katalazy, to stosowane metody jej oznaczania przez rozkład H_2O_2 nie są dostatecznie przekonujące. Uzyskana bowiem w ten sposób aktywność tego enzymu może wynikać z innych sposobów dysmutacji nadtlenu wodoru. Generalnie plemniki są wysoce zależne od antyoksydacyjnych właściwości plazmy nasienia, ponieważ ich własna zdolność do niwelowania stresu oksydacyjnego jest ograniczona. Mimo że plemniki większości ssaków, jak wspomniano wcześniej, zawierają główne enzymy antyoksydacyjne, to efektywność ich działania jest niewystarczająca ze względu na ograniczoną koncentrację i dystrybucję. Wszystkie protekcyjne enzymy są bowiem pochodzenia cytoplazmatycznego, a plemniki są unikatowym typem komórek, w których podczas spermatogenezy znaczna część cytoplazmy jest odrzucana, a reszta jest ograniczona do wstawki. Ponadto ten już zawężony system antyoksydacyjny jest zlokalizowany wewnątrz komórki w regionie wstawki, a nie w pobliżu plazmolemy otaczającej powierzchnię plemnika dużo większą w porównaniu do wstawki.

Należy również zaznaczyć, że antyoksydacyjna aktywność enzymatyczna w nasieniu ssaków jest wspomagana przez szereg białek plazmowych [30, 31, 32], jak

i niespecyficzne substancje niskocząsteczkowe, takie jak: zredukowany glutation, ergotioneina, kwas L-askorbinowy i inne [20, 26, 31, 32].

PIŚMIENNICTWO

- [1] AITKEN RJ. The human spermatozoon – a cell in crisis? *J Reprod Fertil* 1999; **115**: 1–7.
- [2] AITKEN RJ, BUCKINGHAM D, BRINDLE J, GOMEZ E, BAKER G, IRVINE S. Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress created by leucocytes in washed sperm preparation and seminal plasma. *Hum Reprod* 1995; **10**: 2061–2071.
- [3] AITKEN RJ, BUCKINGHAM D, HARKISS D. Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1993; **97**: 441–450.
- [4] AITKEN RJ, CLARKSON JS, FISHEL S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* 1989; **40**: 183–197.
- [5] AITKEN RJ, FISHER HM, FULTON N, GOMEZ E, KNOX W, LEWIS B, IRVINE DS. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenyle iodonium and quinarcine. *Mol Reprod Dev* 1997; **47**: 468–482.
- [6] AITKEN RJ, HARKISS D, KNOX W, PATERSON M, IRVINE DS. A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterized by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation. *J Cell Sci* 1998; **111**: 645–656.
- [7] ALVAREZ JG, STOREY BT. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 1995; **42**: 334–346.
- [8] BILODEU JF, CHATTERJEE S, SIRARD MA, GAGNON C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod Dev* 2000; **55**: 282–288.
- [9] BIZE I, SANTANDER G, CABELLO P, DRISCOLL D, SHARPE C. Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation *in vitro*. *Biol Reprod* 1991; **44**: 398–403.
- [10] BONDIN P, COENEN K, SIRARD MA. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. *J Androl* 1997; **18**: 454–460.
- [11] COHEN N, LUBART R, RUBINSTEIN S, BREITBART H. Light irradiation of mouse spermatozoa: stimulation of *in vitro* fertilization and calcium signals. *Photochem Photobiol* 1998; **68(3)**: 407–413.
- [12] CUMMINS JM, JEQUIER AM, KAN R. Molecular biology of human male infertility: Links with aging, mitochondrial genetics, and oxidative stress? *Mol Reprod Dev* 1994; **37**: 345–362.
- [13] DE LAMIRANDE E, GAGNON C. Reactive oxygen species and human spermatozoa II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *J Androl* 1992; **13**: 379–386.
- [14] DE LAMIRANDE E, JIANG H, ZINI A, KODAMA H, GAGNON C. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* 1997; **2**: 48–54.
- [15] GOMEZ E, BUCKINGHAM DW, BRINDLE J, LANZAFAME F, IRVINE DS, AITKEN RJ. Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress and sperm function. *J Androl* 1996; **17**: 276–287.
- [16] GRIVEAU JF, DUMONT E, RENARD P, CALLEGARI JP, LE LANNOU D. Reactive oxygen species lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1995; **103**: 17–26.

- [17] GRIVEAU JF, LE LANNOU D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl* 1997; **20**: 61–69.
- [18] HOLLAND MK, STOREY BT. Oxygen metabolism of mammalian spermatozoa. Generation of hydrogen peroxide by rabbit epididymal spermatozoa. *Biochem J* 1981; **198**: 273–280.
- [19] HSU PING CHI, HSU CHAO CHIN, LIU MING YIE, CHEN LIH YUH, GUO YL, HSU PC, HSU CC., LIU MY, CHEN LY, GUO YLL. Lead-induced changes in spermatozoa function and metabolism. *J Toxicol Environ Health* 1998; **55**(1): 45–64.
- [20] KIM IH, van LANGENDONCKT A, van SOOM A, VANROOSE G, CASI AL, HENDRIKSEN PJM, BEVERS MM. Effect of exogenous glutathione on the *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 1999; **52** (3): 537–547.
- [21] KODOMA H, YAMAGUCHI R, FUKUDA J, KASAI H, TANAKA T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril* 1997; **68**: 519–524.
- [22] LOPES S, JURISICOVA A, SUN JG, CASPER RF. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 1998; **13**(4): 896–900.
- [23] LUBERDA Z, STRZEŻEK J. Wybrane aspekty peroksydacji lipidów w nasieniu. *Post Nauk Roln* 1990; **4/5/6**: 95–107.
- [24] MAMMOTO A, MASUMOTO N, TAHARA M, IKEBUCHI Y, OCHMACHI M, TASAKA K, MIYAKE A. Reactive oxygen species block sperm-egg fusion via oxidation of sperm sulphydryl proteins in mice. *Biol Reprod* 1996; **55**(5): 1063–1068.
- [25] NI Z-Y, LIU Y-Q, SHEN H-M, CHIA SE, ONG CN. Does the increase of 8-hydroxyguanosine lead to poor sperm quality? *Mut Res* 1997; **381**: 77–82.
- [26] OCHSENDORF FR, BUHL R, BASTLEIN A, BESCHMANN H. Glutathione in spermatozoa and seminal plasma of infertile men. *Hum Reprod* 1998; **13**: 353–359.
- [27] O'FLAHERTY CM, BEORLEGUI NB, BECONI MT. Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Theriogenology* 1999; **52**: 289–301.
- [28] RICHER S, WHITTINGTON K, FORD WCL. Confirmation of NADPH oxidase activity in human sperm. *J Reprod Fert Abstract Series* 1998; **21**: p. 118.
- [29] ROCA J, RODRIGUEZ MJ, GILL MA, LUCAS X, VAZQUEZ JM, MARTINEZ EA. Effect of catalase and superoxide dismutase on viability and *in vitro* penetrability of frozen-thawed boar spermatozoa. *Theriogenology* 2000; **53**: 263.
- [30] STRZEŻEK J, FRASER L, DEMIANOWICZ W, KORDAN W, WYSOCKI P, HOŁODY D. Effect of depletion tests (DT) on the composition of boar semen. *Theriogenology* 2000; **54**: 949–963.
- [31] STRZEŻEK J, KOSINIAK-KAMYSZ K, BITTMAR A, PODSTAWSKI Z, KUKLIŃSKA M, RAFALSKI G. Antioxidants of seminal plasma in fertile stallions. The XVII th Inter Con Farm An Reprod Liptovsky Jan, 1-2. 06. 2000.
- [32] STRZEŻEK J, ŁAPKIEWICZ S, LECEWICZ M. A note antioxidant capacity of boar seminal plasma. *An Sci Pap Rep* 1999; **17**(4): 181–188.
- [33] SUN JG, JURISICOVA A, CASPER RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization *in vitro*. *Biol Reprod* 1997; **56**: 602–607.
- [34] ZHANG H, ZHENG RL. Promotion of human sperm capacitation by superoxide anion. *Free Rad Res* 1996; **24**: 261–268.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 03.01.2001 r.

Przyjęto: 27.04.2001 r.

Adres autora: 10-718 Olsztyn-Kortowo, ul. Oczapowskiego 5

e-mail: kbz@moskit.uwm.edu.pl

SYMPTOMY PROGRAMOWANEJ ŚMIERCI KOMÓREK PODCZAS ROZWOJU ROŚLIN

THE SYMPTOMS OF PROGRAMMED CELL DEATH DURING PLANT DEVELOPMENT

Marzena WOJCIECHOWSKA

Katedra Cytologii i Cytochemii Roślin, Zakład Anatomii i Embriologii, UŁ, Łódź

Streszczenie: Selektywna eliminacja komórek jest warunkiem koniecznym prawidłowego przebiegu rozwoju roślin. Odgrywa ona istotną rolę w embriogenezie i homeostazie dojrzałych organów. W pewnych przypadkach degradacja protoplastu umożliwia prawidłowe funkcjonowanie martwych elementów tkanki. Niektóre symptomy apoptozy opisane u zwierząt zaobserwowano także podczas degradacji komórek i tkanek roślinnych. Mimo podobieństw w przebiegu tych procesów postuluje się, że apoptoza nie jest formą śmierci komórek roślinnych, a pojawiające się wówczas zmiany określa się jako *apoptosis-like*. Procesy autolizy i autofagii, towarzyszące genetycznie zaprogramowanej śmierci, wydają się odgrywać istotne znaczenie w unicestwianiu komórek roślinnych. Niniejsza praca przedstawia i charakteryzuje symptomy towarzyszące eliminacji komórek podczas różnicowania tkanek i rozwoju roślin wyższych. Główny nacisk położono na opis zdarzeń podczas końcowych etapów różnicowania tkanek efemerycznych i na procesy degradacyjne umożliwiające dalsze, prawidłowe funkcjonowanie komórek w organizmie.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28: 317–333)

Słowa kluczowe: apoptoza, programowana śmierć komórki (PCD), proteiny cysteinowe, autoliza, autofagia, mitochondria, bielmo, tapetum, elementy naczyniowe

Summary: Selective elimination of cells is required for the normal development of plants. It plays an essential role in embryogenesis and mature organs homeostasis. In some cases degradation of cell content enables correct functioning of dead elements of tissues. Some symptoms of apoptosis described in animal have been observed during plant cell and tissue degradation. In spite of some similarities in the course of these processes it is suggested that apoptosis does not occur during plant cell death and the process is called *apoptosis-like*. The autolysis and autophagy, processes accompanying programmed cell death, appear to have an essential influence on selfdestruction of plant cells. This review describes and characterizes the symptoms accompanying certain types of plant cell degradation during tissue differentiation and plant development. The main emphasis has been focused on the description of events occurring during terminal differentiation of ephemeric tissues and on degradation processes which enable further

proper functioning of the organism cells.
(*Advances in Cell Biology* 2001; 28: 317–333)

Key words: apoptosis, programmed cell death (PCD), cysteine proteases, autolysis, autophagy, mitochondria, endosperm, tapetum, tracheary elements

WSTĘP

Śmierć komórek może mieć podłoże patologiczne lub być elementem genetycznie zakodowanego programu eliminacji. Dlatego z biologicznego punktu widzenia wyróżnia się dwie formy umierania komórek: patologiczną i fizjologiczną. Śmierć fizjologiczna to jeden z elementów genetycznego programu, który realizowany jest podczas rozwoju i morfogenezy organizmu w celu kontroli liczby komórek oraz usunięcia komórek uszkodzonych, niezdolnych do spełniania właściwych sobie funkcji i takich, które mogą być potencjalnie szkodliwe dla innych. Przeciwdziała to ich namnażaniu się i rozprzestrzenianiu w organizmie [60]. Ta forma eliminacji, zwana także programowaną śmiercią komórki (*programmed cell death*, PCD), towarzyszy rozwojowi, jest zaangażowana w morfogenezę tkanek embrionalnych, jak i homeostazę dojrzałych organów. Zachodzi podczas starzenia się organizmu [47] lub jest odpowiedzią na infekcję mikroorganizmów patogennych jako tzw. *hypersensitive response* (HR) [46].

U roślin programowana śmierć komórek występuje w różnych fazach rozwoju zarówno w pokoleniu gametofitu, jak i sporofitu. Jest ona zaangażowana m.in. w proces degradacji trzech нефunkcjonalnych megaspor podczas formowania monosporowych woreczków zalążkowych [4], w degenerację wieszadełka (*suspensor*) [8] i komórek bielma (*endosperm*) [17], a także w eliminację zawiązków pręcików w jednopłciowych kwiatach żeńskich [8] czy komórek czapeczki korzenia [44]. Ponadto towarzyszy różnicowaniu naczyniowych elementów ksylemu [22]. Degradację komórek na dużą skalę obserwuje się w trakcie starzenia się tkanek rośliny [47].

Obok tej formy śmierci pojedynczych lub całych zespołów komórek występuje również śmierć patologiczna, zwana nekrozą (*martwica*). Zachodzi ona w sposób przypadkowy, zwykle w wyniku mechanicznego uszkodzenia tkanki lub zadziałania silnych czynników stresowych, takich jak: niedotlenienie, utrata równowagi osmotycznej, drastyczne zmiany temperatury czy ekspozycja na związki toksyczne [13].

Mimo iż programowanej śmierci komórek u roślin towarzyszą niektóre ze zmian obserwowanych podczas apoptozy u zwierząt, uważa się, że PCD nie jest odpowiednikiem apoptozy, a obserwowane wówczas zmiany określa się jako nieapoptotyczne lub *apoptosis like* [26]. Heterofagowa eliminacja martwych komórek, wyraźna cecha apoptozy u zwierząt, nie została stwierdzona u roślin. Za eliminację komórek roślinnych wydają się być odpowiedzialne autoliza i autofagia.

Wśród autorów prac dotyczących śmierci komórek istnieje duże zróżnicowanie w stosowanej terminologii. Choć określenia „apoptoza” i „programowana śmierć komórki” są często używane wymiennie jako synonimy, *de facto* nie są one równoznaczne.

Stwierdzenie: „Apoptoza, zwana też PCD...”, jest nieprecyzyjne. Bardziej dokładne wydaje się: „Apoptoza określa zespół charakterystycznych zmian morfologicznych, będących rezultatem uruchomienia mechanizmów biochemicznych genetycznie zaprogramowanego procesu samodestrukcji” [13]. Mechanizmy samobójczej śmierci komórki mogą być także aktywowane w odpowiedzi na biotyczne i abiotyczne czynniki środowiska. Mimo iż powodują one wystąpienie zmian opisywanych jako apoptotyczne, to nie są one jednak elementami fizjologicznej samozagłady, tj. nie są równoznaczne z PCD.

CZYNNIKI REGULUJĄCE ŚMIERĆ KOMÓRKI

Regulacja procesów związanych ze śmiercią komórki u roślin i zwierząt zachodzi przede wszystkim na poziomie genomu i jest kontrolowana genetycznie [60]. Dotychczas zidentyfikowano wiele genów uczestniczących w procesach apoptozy, które odgrywają także istotną rolę podczas proliferacji komórek, co przemawia za ścisłym związkiem obu tych procesów. Wejście komórki na drogę apoptozy zależy od wielu czynników pełniących funkcje regulacyjne. W organizmach roślinnych i zwierzęcych można wyróżnić fizjologiczne aktywatory i inhibitory śmierci [30].

Choć jest oczywiste, że PCD występuje podczas rozwoju roślin, to sygnały aktywujące tę formę śmierci u roślin nie zostały dokładnie poznane. Ostatnie badania pokazują, że szlaki apoptotyczne w komórkach roślinnych i zwierzęcych są podobne z morfologicznego i biochemicznego punktu widzenia [25]. Wiele cech apoptozy u zwierząt, takich jak: oligonukleosomalna fragmentacja DNA, udział Ca^{2+} , zmiany poziomu fosforylacji białek, wzrost zawartości chromatyny skondensowanej czy udział reaktywnych form tlenu, było obserwowanych również podczas PCD u roślin [8]. Ostateczna faza śmierci także u roślin jest zależna od specyficznych proteinaz cysteinowych [54].

Rola proteinaz

Apoptoza, forma samobójczej śmierci komórki, wymaga wyspecjalizowanej i niezawodnie funkcjonującej maszyny. Jednym z głównych jej elementów jest proteolityczny system obejmujący rodzinę proteinaz cysteinowych, nazwanych kaspazami (ang. *caspases*, *cysteine aspartate-specific proteases*) [59]. Zależna od kaspaz proteoliza ma selektywny charakter i jej celem jest tylko pewna grupa białek komórkowych. Ich degradacja zachodzi według ściśle określonego scenariusza i prowadzi do systematycznego i uporządkowanego demontażu poszczególnych stru-

ktur komórkowych oraz dezaktywacji podstawowych procesów metabolicznych [13]. W ostatnich latach zidentyfikowano wiele substratów białkowych ulegających proteolitycznej fragmentacji za pośrednictwem kaspaz w trakcie apoptotycznej śmierci komórki. Są wśród nich zarówno białka enzymatyczne, jak i strukturalne.

Na udział kaspaz w procesie apoptozy wskazano, gdy w 1993 roku okazało się, że sekwencja aminokwasowa białka kodowanego przez jeden z genów śmierci *Caenorhabditis elegans* – *ced-3* wykazuje podobieństwo do specyficznej proteiny ludzkiej ICE (*Interleukin-1 β -Converting Enzyme*) [65]. Podobieństwa między białkami Ced-3 i ICE wskazują na kluczową rolę proteinaz cysteinowych w procesie apoptotycznej śmierci komórki. Ponieważ PCD podczas rozwoju *Caenorhabditis elegans* jest uwarunkowana aktywnością enzymów proteolitycznych z rodziny kaspaz, jest prawdopodobne, że ekspresja genów kodujących proteiny cysteinowe u roślin indukuje serię zdarzeń towarzyszących PCD. U roślin udział proteinaz cysteinowych w śmierci komórek został odnotowany między innymi podczas różnicowania elementów naczyniowych [22], podczas starzenia się tkanek, organów i całych roślin [7], w warunkach stresu oksydacyjnego [54], a także w reakcjach typu HR [46]. U roślin jednakże nie zidentyfikowano typowych dla zwierząt kaspaz, a także nie została opisana kaskada proteinaz. Znalezione w wielu przypadkach śmierci roślin proteiny cysteinowe wykazują kaspazo-podobną proteolityczną aktywność. Mimo iż jest ona skorelowana ze zdarzeniami związanymi z PCD, to nie wiadomo, czy proteoliza uczestniczy w inicjowaniu czy realizacji programu śmierci komórek roślinnych. Charakterystyczny dla zwierzęcych kaspaz sposób fragmentacji białek odnotowano podczas reakcji typu HR u tytoniu (*Nicotiana tabacum*) [11]. Wiadomo ponadto, że u zwierząt istnieje kaspazo-niezależna droga śmierci komórki [28].

Rośliny mają duży arsenał genów inhibitorów proteinaz [54], których ekspresja jest zwykle ograniczona do specyficznych organów lub określonego etapu rozwoju rośliny [16]. Aktywność roślinnych proteinaz i ich inhibitorów jest regulowana przez wiele czynników [29].

W kulturach komórkowych soi (*Glycine max*) stres oksydacyjny uruchamia zespół nieaktywnych dotychczas proteinaz i syntezę nowych białek niezbędnych do realizacji programu umierania. Aktywność tych enzymów może zostać zablokowana zarówno przez endogenne, jak i syntetyczne inhibitory hamujące proces PCD [54]. Podobne wyniki uzyskano w kulturach *Arabidopsis*, gdzie traktowanie H₂O₂ aktywowało zespół genów niezbędnych do PCD i syntezę nowych białek [12]. Te wyniki sugerują, że umieranie komórek roślinnych jest regulowane przez aktywność zarówno proteinaz, jak i ich inhibitorów. Kwestią kolejnych badań jest ocena wrażliwości roślin na inhibitory zwierzęcych kaspaz, co może ujawnić u roślin obecność homologów zwierzęcych proteinaz śmierci. Wyniki, jakie uzyskano w hodowlach komórek pomidora (*Lycopersicon esculentum*), w których chemicznie indukowano śmierć komórek, sugerują, że kaspazo-podobne proteiny są zaangażowane w apoptotyczny

szlak śmierci u roślin [10], bowiem zastosowanie inhibitorów typowych, zwierzęcych kaspaz skutecznie blokowało śmierć tych komórek.

Inhibitorową aktywność w odniesieniu do proteinaz wykazuje wiele roślinnych białek, określanych jako nsLTPs (*non-specific Lipid Transfer Proteins*). Ich obecność została stwierdzona m.in. w tapetum, komórkach aleuronowych, różnicujących się naczyniach oraz w ośrodku (nucellus), tj. w komórkach tkanek, które ulegają rozwojowemu programowi degradacji. Na tej podstawie przypuszcza się, że nsLTPs są związane z PCD [16 i ref.]. W kulturach komórkowych cynii (*Zinnia elegans*) gen *TED4* ulega ekspresji podczas ksylogenezy, a jego produkt białkowy, należący do grupy nsLTPs, może blokować aktywność proteinaz umożliwiając przeżycie komórek, które sąsiadują z elementami naczyniowymi. Ten mechanizm reprezentuje specyficzną formę obrony żywych komórek przed zagrożeniem, jakie stanowią dla nich proteiny pochodzące z umierających w ich sąsiedztwie komórek. Ma to istotne znaczenie dla przeżycia roślin, u których martwe komórki i ich szczątki nie są zamykane w ciała apoptotyczne i niszczone przez makrofagi, jak u zwierząt, lecz ich zawartość zostaje usunięta na zewnątrz [16].

Geny programu śmierci

Śmierć komórek jest procesem dynamicznym, który wymaga ściśle określonych zmian ekspresji genów [23, 30]. W przeciwieństwie do komórek zwierzęcych i ludzkich, gdzie uwarunkowania genetyczne i systemy sygnałów zewnętrz- i wewnętrzkomórkowych są dokładnie zbadane, u roślin procesy te zostały dotychczas poznane jedynie w niewielkim stopniu. Zidentyfikowano geny: *dad-1*, *lsd1*, *lls1*, *acd1*, o których wiadomo, że uczestniczą w blokowaniu PCD u roślin. Antyapoptotyczny gen *dad-1* został opisany jako endogenny supresor PCD u *Caenorhabditis elegans* i ssaków [55]. Homologi ludzkiego *dad-1* znaleziono u ryżu (*Oryza sativa*). Mogą one blokować śmierć mutantów *dad-1* u chomika. Sugeruje to, że występujący u ryżu homolog *dad-1* funkcjonuje jako supresor PCD [58]. Aminokwasowa sekwencja produktu białkowego tego genu okazała się wysoce konserwatywna zarówno u roślin, jak i u zwierząt. U *Arabidopsis* i ryżu wykazano ekspresję białek podobnych do DAD-1, co sugeruje że rośliny i zwierzęta mogą mieć część komponentów PCD-podobnych. Wykazano, że ekspresja genu *dad-1* maleje dramatycznie w starzejących się płatkach korony grochu (*Pisum sativum*) oraz że jest on negatywnie regulowany przez etylen [42]. Z kolei jednak sekwencje tożsame z wysoce konserwatywnymi inhibitorami PCD zwierząt, np. *ced-9* *Caenorhabditis elegans* i ludzkim *bcl-2* czy *bcl-xL* nie zostały znalezione u roślin [3].

Geny, które są indukowane podczas starzenia się roślin, zostały nazwane SAGs (*Senescence Associated Genes*). Wśród nich znaleziono takie, które kodują enzymy degradacyjne (proteiny i nukleazy) oraz enzymy zaangażowane w metabolizm lipidów i węglowodanów [7]. U *Arabidopsis*, traktowanie etylenem stymuluje eks-

presję zespołu genów *SAGs*, a analiza porównawcza sekwencji nukleotydowej dwóch z nich – *SAG2* i *SAG12* ujawniła, że kodują one proteiny cysteinowe [7]. Podobnych wyników dostarczyło porównanie sekwencji genów *SENU2* i *SENU3* (*SENescence Upregulated gene*) [14].

Mitochondria

Uważa się, że organellami odgrywającymi kluczową rolę w kontroli śmierci komórki, zarówno u roślin jak i u zwierząt, są mitochondria [25]. Sądzi się, że stanowią one centralny skład sygnałów determinujących los komórki. Mogą być ośrodkiem, w którym zapada ostateczna decyzja o życiu i śmierci komórki [34].

Mitochondria są miejscem syntezy i magazynem wielu białek, które po przedostaniu się do cytoplazmy biorą udział w procesach samobójczej śmierci komórki. Zasadniczą rolę regulatorową w procesie migracji tych białek odgrywają pory w zewnętrznej błonie tej organelli tworzone przez kompleks VDAC (*Voltage-Dependent Anion Channel*), umożliwiające białkom mitochondrialnym przenikanie do cytozolu. Wśród tych białek są: cytochrom c (*Apaf-2*), AIF (*Apoptosis Inducing Factor*), Apaf-1 (*Apototic Protease Activating Factor*) i niektóre prokaspazy [9]. W 1999 r. Shimizu i wsp. [53] udowodnili, że białka rodziny Bcl mogą łączyć się z kompleksem VDAC zmieniając przepuszczalność błony i regulując w ten sposób proces apoptozy. Niektóre z tych białek, np. Bcl-2, zabezpieczają komórkę przed samobójczą śmiercią; inne, jak Bax i Bak, umożliwiają śmiercionośnym białkom mitochondrialnym przemieszczanie się do cytozolu. Ostatnie badania wskazują, że Bcl-2 i Bax mogą pełnić podobną funkcję u roślin i drożdży [25 i ref.]. Ekspresja transgenów kodujących antyapoptotyczne regulatory Bcl-x_L i Ced-9 blokuje śmierć komórek tytoniu wywołaną reakcją typu HR, jak i indukowaną przez UV [40], podczas gdy ekspresja transgenu *bax*, kodującego proapoptotyczny czynnik, aktywuje śmierć tych komórek w sposób podobny do HR [33].

Wykazano, że uwalnianie cytochromu c może odgrywać istotną rolę w procesie umierania komórek roślinnych [25 i ref.]. Zastanawiające jest, jak cytochrom c aktywuje PCD w komórkach roślin, które nie mają typowych dla zwierząt kaspaz. Według jednej z hipotez uwolniony cytochrom c generuje letalny poziom reaktywnych form tlenu (*Reactive Oxygen Species*, ROS) [6]. Równie prawdopodobne wydaje się, że funkcję kaspaz spełniają proteiny obecne u roślin [25]. Taki mechanizm może reprezentować kaspazo-niezależny sposób aktywacji programu śmierci.

UDZIAŁ WAKUOL W ŚMIERCI KOMÓRKI

Obecność ściany w komórkach roślinnych uniemożliwia odizolowanie zawartości umierającej komórki poprzez ciała apoptotyczne, a następnie pochłanianie przez sąsiadujące z nią komórki, jak to ma miejsce u zwierząt. Wobec tego u roślin

eliminacja protoplastu umierającej komórki odbywa się zasadniczo inną drogą [34]. Fagocyty, odgrywające ważną rolę w usuwaniu martwych i uszkodzonych komórek oraz ich szczątków u zwierząt [50], nie zostały zidentyfikowane u roślin. Heterofagia w apoptotycznej formie śmierci komórek zwierzęcych jest mniej prawdopodobną cechą nieapoptotycznej śmierci u roślin, w której uczestniczą raczej procesy autolizy i autofagii. Zatem samounicestwienie się komórki roślinnej zapobiega uwalnianiu jej elementów do przestrzeni pozakomórkowej. Przypuszcza się, że w procesach tych zasadniczą rolę odgrywają wakuole.

Enzymy hydrolityczne zawarte w wakuoli są letalne dla komórki i w normalnych warunkach nie dochodzi do ich uwolnienia, chyba że ma miejsce zaprogramowana forma autolizy. Kluczowym zdarzeniem towarzyszącym temu zjawisku jest przerwanie ciągłości tonoplastu i gwałtowna liza cytoplazmy, co zostało odnotowane m.in. w różnicujących się elementach naczyniowych [19] czy podczas degradacji wieszadełka [3 i ref.].

Pojedyncza komórka może zawierać więcej niż jeden rodzaj wakuol. W komórkach aleuronowych bielma u owsa (*Avena sativa*) znaleziono dwa typy tych organelli. Obok magazynujących wakuol PSVs (*Protein Storage Vacuoles*) występują tzw. wtórne wakuole (*secondary vacuoles*). Jedynie te drugie pełnią funkcje podobne do lizosomów i mogą być zaangażowane w PCD komórek aleuronowych [57].

Roślinne wakuole zawierają enzymy trawienne zdolne do rozkładu cytoplazmatycznych komponentów. Schemat autofagowego trawienia zachodzącego w wakuolach pod wpływem enzymów hydrolitycznych może obejmować inwaginację tonoplastu i formowanie membranowych inkluzji. U roślin odnotowano wiele przykładów autofagowej działalności wakuol. Formowanie organelli o takim charakterze było związane ze wzrostem tempa wewnątrzkomórkowej proteolizy [38 i ref.], a także było obserwowane w warunkach głodzenia komórek [64]. Autofagia jako forma degradacji odgrywa centralną rolę w procesie określanym jako obieg (ang. *turnover*) składników komórki roślinnej, polegającym na wykorzystaniu produktów rozpadu do ponownej syntezy w innych częściach rośliny.

DEGRADACJA KOMÓREK SPEŁNIAJĄCYCH TYMCZASOWE FUNKCJE

Eliminacja tapetum

Tapetum (tkanka wyścielająca), to najbardziej wewnętrzna tkanka subepidermalnej warstwy pylnika, odgrywająca istotną rolę w ochronie i odżywianiu rozwijających się mikrosporocytów i mikrospor. Po okresie wzmożonej aktywności i spełnieniu wymienionych powyżej funkcji, tkanka ta przestaje być potrzebna i

ulega naturalnej, fizjologicznej degradacji. Symptomy tego procesu zostały opisane u wielu gatunków roślin jedno- i dwuliściennych [1, 8, 36, 43, 61, 66].

Początkowe zmiany w tapetum mogą być związane z funkcją, jaką tkanka ta pełni w odniesieniu do rozwijających się ziaren pyłku, nie zaś z jej degradacją [43]. Rowley [48] uważa, że wiele symptomów, które mogą być interpretowane jako degeneracja tapetum i jego starzenie się, są w istocie pierwszymi objawami wydzielniczej aktywności tej tkanki. Według Piffanelli i wsp. [45] jest to przykład programowanej śmierci komórek.

Podczas degradacji tapetum u okrytonasiennych (*Angiospermae*) obserwowano zmiany typowe dla apoptozy u zwierząt. Najbardziej znaczące są modyfikacje, jakim podlega jądro komórkowe. Kondensacja chromatyny i jej peryferyczne rozmieszczenie obserwowane u *Tillandsia albidia* i *Lobivia rauschii* oraz specyficzna fragmentacja DNA są uważane za typowe objawy apoptozy [43].

W komórkach tapetum został wykazany znamieny dla zmian apoptotycznych udział nukleaz we fragmentacji DNA [43]. Metoda TUNEL [56] ujawniła degradację jądrowego DNA w komórkach tapetum i okrywie pylników jęczmienia (*Hordeum vulgare*). Proces ten nie występuje w mikrosporach [61]. U *Landsberg erecta* fragmentacja DNA potwierdzona testem TUNEL [1] wykazała, że po otwarciu pylników wzrasta liczba jąder TUNEL-pozytywnych we wszystkich tkankach pylnika. Wzrost poziomu fragmentacji jądrowego DNA tapetum podczas różnicowania ziaren pyłku wykazano również u *Ornithogalum virens* i *Nicotiana tabacum*, przez wykorzystanie testu kometowego [36]. Pierwsze oznaki uszkodzeń DNA w komórkach tapetum, ujawniane powstawaniem tzw. komety, pojawiają się w fazie późnej tetrady i stopniowo wzrastają aż do fazy dwukomórkowego ziarna pyłku; odpowiada to okresowi destrukcji komórek tapetum [36]. W tej fazie rozwoju pylników jęczmienia elektroforeza ujawniła drabinkowy wzór rozdziału wyizolowanego DNA, co wskazuje na internukleosomalną fragmentację DNA [61].

Ponieważ apoptozie nie zawsze towarzyszy fragmentacja DNA [43 i ref.], istotnego znaczenia nabierają badania za pomocą mikroskopu elektronowego, dostarczające istotnych danych o fizjologicznym stanie analizowanych komórek. Leśniewska i wsp. [35] obserwowali destrukcję ścian komórkowych i utratę plasmodesm w komórkach tapetum *Ornithogalum virens* oraz zmiany w strukturze jąder, podobne do opisywanych w apoptotycznych komórkach zwierząt. Zmiany takie zostały odnotowane również podczas degradacji komórek tapetalnych u *Lobivia rauschii* i *Tillandsia albida* [43].

Cechą charakterystyczną umierających komórek zwierząt jest powstawanie otoczonych błoną ciałek apoptotycznych. Formowanie nieobłonionych struktur, będących cytoplazmatycznymi pozostałościami komórek, znaleziono w wielu przypadkach degradacji tapetum [43 i ref.]. Pomimo braku błony mogą być one uważane za analogi ciałek apoptotycznych opisanych u zwierząt, u których obecność błony jest niezbędna do ich rozpoznania przez makrofagi [50]. U roślin makrofagi

nie występują, a trawienie części cytoplazmy komórek tapetum w wakuolach jest funkcjonalnie analogiczne do procesów zachodzących w makrofagach. W wakuolach degenerującego tapetum *Lobivia rauschii* i *Tillandsia albida* obserwowano materiał pochodzenia cytoplazmatycznego [43].

Analiza ultrastruktury komórek tapetum ujawniła, że najbardziej stabilnymi organellami podczas degradacji tej tkanki są mitochondria [43]. Także ta cecha jest charakterystyczna dla apoptozy u zwierząt, przynajmniej we wczesnych jej fazach [43 i ref.]. Stabilność mitochondriów – generatorów energii w komórce sugeruje, że degradacja tapetum jest procesem wymagającym dostarczenia energii, co potwierdza aktywną formę śmierci tej tkanki wykluczając umieranie bierne – nekrozę.

Degradacja komórek bielma

Bielmo to jedna z tkanek efemerycznych, która ulega degradacji, gdy tylko zmagazynowane w niej rezerwy pokarmowe ulegną mobilizacji. Eliminacja tej tkanki w nasionach bezbielmowych jest realizowana w czasie rozwoju zarodka. W ziarniakach zbóż, które są przykładem nasion bielmowych, jako pierwsza w okresie kiełkowania nasion degeneruje część skrobionośna. Komórki aleuronowe zamierają później – w zaawansowanym okresie kiełkowania nasion i rozwoju siewki [5]. Wyniki badań wielu prac dotyczących starzenia bielma wskazują, że w degradację tej tkanki zaangażowany jest proces PCD.

Wiele badań nad kontrolą enzymów zaangażowanych w mobilizację rezerw bielma podczas kiełkowania nasion zostało przeprowadzonych u zbóż. We wczesnej fazie kiełkowania ziarniaków wydzielane przez zarodek gibereliny przenikają do komórek warstwy aleuronowej i pełnią rolę sygnałów do aktywacji i sekrecji enzymów hydrolitycznych, np. α -amylazy oraz nukleaz i proteinaz [23]. Aktywność tych enzymów doprowadza z czasem do całkowitej degradacji komórek bielma. Proces ten regulowany jest w czasie tak, aby zmagazynowane zasoby wystarczyły siewce do momentu osiągnięcia przez nią stadium umożliwiającego jej samodzielne przetrwanie i dalszy rozwój. Na tym etapie komórki aleuronowe, które wypełniły swoją funkcję, nie stają się częścią młodej rośliny, lecz umierają w naturalny sposób.

Podczas kiełkowania nasion katabolizm białek jest istotnym elementem wzrostu i rozwoju siewek. Selektywna proteoliza to mechanizm umożliwiający przetwarzanie białek i ponowne wykorzystanie organicznych form azotu do utrzymania komórkowej homeostazy i dalszego wzrostu i rozwoju. Choć rośliny mogą syntetyzować aminokwasy *de novo*, to znaczna część nowych białek jest syntetyzowana z prekursorów odzyskiwanych w wyniku proteolizy [23]. Proces ten wymaga zaangażowania wielu enzymów. U roślin enzymami katabolizmu większości białek zapasowych nasion są cysteinowe proteinazy (*CYS*teine *Proteases*, *CYS* Ps). U ryżu (*Oryza sativa*) REP-1 to proteinaza odpowiedzialna za hydrolizę glutein, zaś EPA i EPB przeprowadzają rozkład hordein owsa [23 i ref.]. Ekspresja genów kodujących *CYS*

Ps u tych gatunków jest indukowana przez kwas giberelinowy (GA), zaś blokowana przez kwas abscysynowy (ABA).

Analiza zdarzeń towarzyszących degradacji bielma rącznika (*Ricinus communis*) ujawniła, że niewielkie organelle komórek tej tkanki – rycynosomy uwalniają do cytoplazmy cysteinową endoproteinazę (*CYS*teine *Endo*Protease, CYS-EP), zaangażowaną w proces PCD endospermu [51]. Charakteryzuje się ona specyficznym C-terminalnym motywem KDEL oraz znaczną homologią do cysteinowych proteinaz w starzejących się tkankach wielu gatunków roślin [52]. Wykazano, że rozwój rycynosomów i wzrost ich liczebności towarzyszą postępującej fragmentacji DNA w bielmie rącznika, co zostało potwierdzone metodą TUNEL.

Choć sygnały inicjujące program PCD w bielmie roślin nie zostały szczegółowo poznane, to zmiany, jakie obserwowano w czasie tego procesu, są w dużej mierze zbieżne z tymi, które opisano dla apoptozy u zwierząt.

Internukleosomalna fragmentacja DNA to jedna z wielu charakterystycznych cech apoptozy, prowadząca do nieodwracalności programu śmierci komórki. Została ona wykazana w przebiegu PCD u zwierząt oraz roślin [49]. Jej wskaźnik – drabinkowy wzór rozdziału elektroforetycznego DNA opisano podczas PCD bielma u kukurydzy (*Zea mays*) i pszenicy (*Triticum aestivum*), w końcowym etapie procesu, podczas którego genom ulega stopniowej degradacji [63]. Wyniki testu TUNEL dowiodły, że grupy 3'-OH DNA kumulują się w jądrach umierających komórek bielma [5, 51]. W komórkach aleuronowych ziarniaków owsa zidentyfikowano Zn^{2+} -zależną DNazę powodującą hydrolizę DNA, prowadzącą do powstawania fragmentów jedno- i dwuniciowych [20 i ref.].

Charakterystyczne dla PCD zmiany w materiale genetycznym bielma podczas rozwoju nasion *Haemanthus albiflos* są ujawniane przez wyniki testu kometowego [36]. W tkance tej nie stwierdzono fragmentacji genomu w fazie syncytialnej bielma. Po jego celularyzacji obserwowano jądra reprezentujące różny stopień uszkodzenia DNA. Jest to wynik stopniowego różnicowania i ostatecznie śmierci komórek endospermu. Pojawienie się komet związane jest ze zmianami struktury chromatyny, jakie towarzyszą starzeniu tkanek [36 i ref.]. Fragmentacja DNA i reorganizacja chromatyny są symptomami tego samego procesu – degradacji genomu.

Cytomorfologiczna analiza komórek aleuronowych ujawniła postępujące obkurczanie protoplastu, zmniejszanie się rozmiarów jąder oraz wzrost wakuolizacji komórek [5]. W proces degradacji tych komórek u owsa są zaangażowane autofagowe wakuole, a u pszenicy jest to poprzedzone wzrostem poziomu jonów wapnia w cytozolu [31]. Objawy degradacji komórek w drodze programowanej śmierci odnotowano również w bielmie *Echinocystis lobata* (Wojciechowska, niepubl.). Dotyczą one zmian w strukturze chromatyny i integralności genomu, a wyrażają się pojawieniem jąder TUNEL-pozytywnych i internukleosomalną fragmentacją DNA. Istotnym zmianom ulega także ultrastruktura komórek. Odnotowano zmiany ich kształtów, rozluźnienie struktury ściany komórkowej, postępujące obkurczanie pro-

toplastu, a także peryferyczne rozmieszczenie chromatyny. W efekcie opisanych zmian, w dojrzałych nasionach *Echinocystis lobata* brak jest endospermu.

Wiele danych wskazuje, że istotną rolę w zmianach aktywności nukleaz i śmierci komórek roślinnych odgrywa etylen. Traktowanie nasion zbóż etylenem przyspiesza rozpoczęcie internukleosomalnej degradacji DNA bielma, zaś zastosowanie inhibitorów tego fitohormonu redukuje zasięg fragmentacji lub opóźnia jej inicjację [63]. Towarzyszący śmierci wzrost produkcji etylenu może indukować enzymy degradujące ścianę komórek starzejącego się bielma. Taką zależność obserwowano podczas wielu procesów, takich jak np.: odpadanie liści i kwiatów, zmiękczenie i gnienie dojrzałych owoców [3] oraz formowanie lizogennej aerenchymy w korzeniach kukurydzy w warunkach niedotlenienia [15].

Uważa się, że PCD w komórkach bielma jest regulowana hormonalnie i jest częścią programu rozwojowego zapewniającego prawidłowy przebieg kiełkowania nasion. Procesy sekrecyjne i śmierć komórek są stymulowane przez gibereliny, natomiast kwas abscysynowy blokuje efekt GA i opóźnia lub wstrzymuje rozwój zarodkowy i śmierć komórek [5, 37]. Protoplasty komórek aleuronowych owsa hodowane w obecności GA reagują silną wakuolizacją, przerwaniem ciągłości tonoplastu i obumieraniem [5].

Śmierć synergid i suspensora

Degradacja synergid i wieszadełka to przykład selektywnej eliminacji komórek, która zapewnia prawidłowy przebieg embriogenezy.

W procesie zapłodnienia u roślin kwiatowych wnikająca do woreczka zalążkowego łagiewka pyłkowa penetruje jedną z synergid wykazującą wstępne objawy degradacji. Sugerowano, że destrukcja tej komórki to nekrotyczna odpowiedź na uszkodzenie. Ponieważ degradacja synergidy może także zachodzić bez zapylenia, postulowano, że u pewnych gatunków komórki te giną w wyniku zaprogramowanej śmierci [3]. U tytoniu program śmierci synergid wydaje się być inicjowany przez sygnały pochodzące z łagiewki pyłkowej [3 i ref.]. Aczkolwiek rola fitohormonów w eliminacji synergid nie jest dokładnie poznana, to w kulturach niezapłodnionych komórek jajowych zalążków bawełny (*Gossypium* sp.) w obecności GA i IAA (kwas β -indoliloctowy) ma miejsce degradacja synergid, przejawiająca się wzrostem gęstości cytoplazmy i uszkodzeniem wakuol [3 i ref.]. Jony wapnia mogą być zaangażowane w śmierć synergid, prawdopodobnie poprzez aktywację proteinaz i endonukleaz. Podczas penetracji synergidy przez łagiewkę pyłkową u prosa (*Panicum* sp.) wzrasta w tej synergidzie poziom jonów wapnia, które przemieszczając się do jądra uczestniczą w jego reorganizacji i w konsekwencji – degradacji [4 i ref.].

Wieszadełko to organ, który stabilizuje zarodek w woreczku zalążkowym, przekazuje substancje odżywcze z innych tkanek i jest źródłem sygnałów lub przekazuje

sygnały wpływające na przebieg embriogenezy. Z chwilą zrealizowania tych funkcji, suspensor ulega degradacji. W procesie tym mogą uczestniczyć komórki zarodka [3 i ref.]. Badania przeprowadzone na fasoli (*Phaseolus coccineus*) i nasturcji (*Tropaeolum majus*) wykazały, że degradacja i śmierć suspensora odbywa się w drodze PCD [24]. W ulegających degradacji komórkach tych organów znajdują się liczne autofagowe pęcherzyki zawierające enzymy hydrolityczne. Ostatecznie podczas autolizy, uwolnienie hydrolaz powoduje rozpad protoplastu. Organellami, które w komórkach suspensora nie przejawiają oznak degradacji do momentu przerwania ciągłości tonoplastu, są plastydy i jądro [3]. Podobne zjawiska obserwowano podczas rozpadu protoplastów komórek naczyniowych podczas ksylogenezy u cynii [19].

DEGRADACJA PROTOPLASTU JAKO KOŃCOWY PRZEJAW RÓŻNICOWANIA KOMÓREK

Formowanie elementów naczyniowych

Większość komórek pełni swoje funkcje do czasu śmierci, ale istnieją i takie, które właściwe sobie zadania wypełniają jako elementy martwe tkanki. Przykładem tych ostatnich są elementy naczyniowe (*Tracheary Elements*, TEs). W ich różnicowanie zaangażowany jest proces PCD.

Molekularne mechanizmy kontrolujące różnicowanie TEs nie zostały jeszcze dokładnie poznane, ale dotychczasowe obserwacje wskazują, że tworzenie wtórnej ściany komórkowej jest zsynchronizowane ze śmiercią tych komórek. Dochodzi wówczas do sekrecji proteiny serynowej, która inicjuje dalsze przemiany prowadzące do śmierci elementów naczyniowych. Proces ten wymaga obecności Ca^{2+} i przejawia się pękaniem tonoplastu i łączeniem hydrolitycznej zawartości wakuol z cytoplazmą [22]. W wyniku tego następuje całkowita degradacja protoplastu, co sugeruje, że proteoliza odgrywa kluczową rolę w realizacji PCD komórek naczyniowych [32]. Jednakże to, czy uwolnienie enzymów katabolicznych, będące efektem degradacji tonoplastu, jest przyczyną czy wynikiem PCD, nie zostało ustalone. Z kolei zniszczenie wakuol przed rozpadem innych organelli sugeruje, że to właśnie uwalniane enzymy hydrolityczne są odpowiedzialne za degradację protoplastu [21].

W różnicujących się TEs zidentyfikowano wiele hydrolaz, których aktywność jest istotnym elementem PCD [2]. Degradacji struktur komórkowych w wyniku autolizy towarzyszy wzrost aktywności swoistej endonukleazy, powodującej jednoniciowe pęknięcia DNA, grupy RNaz oraz proteinaz cysteinowych i serynowych. Badania dotyczące różnicowania elementów naczyniowych, zarówno w systemie *in vitro* jak i *in vivo*, nie wykazały fragmentacji jąder czy peryferycznego rozmieszczenia chromatyny [19], jednakże obserwowano zaburzenie jej charaktery-

stycznej organizacji [22]. Uważa się, że jądro jest stosunkowo stabilną organellą i jedną z ostatnich ulegających lizie podczas PCD w TEs.

Nukleaza powodująca jednoniciowe pęknięcia DNA ulega aktywacji podczas rozwoju naczyń u *Zinnia elegans* w obecności jonów Ca^{2+} [41 i ref.]. Prawdopodobnie jest ona odpowiedzialna za akumulację fragmentów 3'-OH DNA [21, 41], czyli spełnia takie funkcje, jakie przypisuje się nukleazom związanym z PCD u zwierząt. Spośród wielu nukleaz związanych z różnicowaniem TEs u cynii zidentyfikowano również Zn^{2+} -zależną DNazę. Powoduje ona hydrolizę DNA prowadzącą do powstania jedno- i dwuniciowych fragmentów. Metoda TUNEL ujawniła fragmentację DNA w rozwijających się elementach naczyniowych korzenia *Pisum sativum* w stadium poprzedzającym ostateczne zniszczenie jądra [41]. Pozytywny wynik tego testu odnotowano także podczas różnicowania *in vitro* elementów naczyniowych u cynii tuż przed lub po przerwaniu ciągłości tonoplastu [21]. Analiza fragmentacji DNA metodą TUNEL sugeruje, że procesy apoptozo-podobne mogą stanowić elementy PCD w TEs. Jednak należy podkreślić, że sama fragmentacja DNA nie jest wystarczającym kryterium do identyfikacji apoptozy.

Wydaje się, że proteiny, zaangażowane w dezintegrację organelli [39] i odpowiedzialne również za degradację białek komórkowych, uczestniczą w PCD różnicujących się elementów naczyniowych [22]. W komórkach tych stwierdzono wysoką aktywność proteolityczną i zidentyfikowano proteiny zarówno serynowe, jak i cysteinowe [62]. Zahamowanie ich aktywności blokowało różnicowanie TEs i degradację jądra, co sugeruje, iż odgrywają one kluczową rolę w procesie ksylogenezy.

Mimo że degradacji protoplastów podczas ksylogenezy towarzyszą przemiany charakterystyczne dla nekrozy [18], to PCD w TEs reprezentuje aktywną formę śmierci, różniąc się od nekrozy – biernego umierania zarówno morfologicznie, jak i kinetycznie. Komórkowo-autonomiczne procesy podczas PCD elementów naczyniowych obejmują aktywną degradację zawartości protoplastu bez udziału i wpływu na komórki sąsiednie [21], pomimo braku udziału ciałek apoptotycznych i makrofagów. Prawdopodobnie jest to wynikiem udziału autofagowych wakuol pobierających pozostałości komórek, a także białek z rodziny nsLTPs [16].

Powstawanie aerenchymy

Adaptacja roślin do warunków niedotlenienia

Powstanie aerenchymy umożliwia roślinom tolerowanie niskiego poziomu tlenu (hipoksja) w glebie. Tworzenie tej tkanki poprzedzone jest śmiercią niektórych komórek kory pierwotnej korzenia. W komórkach tej tkanki u *Sagittaria lancifolia* obserwowano płatowate jądra i skondensowaną chromatynę [15 i ref.]. U ryżu i kukurydzy [27] wczesnym sygnałem degradacji komórek kory korzenia było zniszczenie struktury błon komórkowych. Ostatecznie, podczas formowania aerenchymy

następuje przerwanie ciągłości tonoplastu i uwolnienie enzymów hydrolitycznych, co powoduje lizę cytoplazmy i degradację zawartości komórki do zaniku ścian komórkowych włącznie. Wśród wielu enzymów towarzyszących śmierci komórek kory korzenia są proteiny, lipazy, DNazy oraz celulaza, uczestnicząca w degradacji ścian komórkowych. Inicjatory umierania to etylen, jony wapnia czy kwas okadejowy powodują wzrost aktywności celulazy [15 i ref.].

PODSUMOWANIE

Badania przebiegu procesu śmierci komórek u różnych gatunków roślin i w różnych tkankach wskazują na występowanie wielu typów ich degradacji. We wszystkich tych procesach śmierć komórek obserwuje się na określonym etapie ontogenezy. Uzyskane wyniki wskazują na udział programowanej śmierci komórki w czasie determinacji płci (nie omówionej w niniejszym opracowaniu), rozwoju gamet, zapłodnienia, embriogenezy, rozwoju i różnicowania organów oraz ich starzenia, a także podczas obrony przed mikroorganizmami patogennymi. Mimo istnienia pewnych funkcjonalnych i morfologicznych podobieństw PCD u roślin z apoptozą u zwierząt, na molekularnym poziomie ciągle brak potwierdzeń i dowodów na istnienie ścisłej analogii. U zwierząt zidentyfikowano wiele pozytywnych (np. *ced-3* i *ced-4*) i negatywnych (*ced-9*, *bcl-2*, *dad-1*) regulatorów śmierci komórki, jednakże z jednym wyjątkiem – *dad-1*, homologiczne geny u roślin nie zostały znalezione. W wielu przypadkach śmierci komórek roślinnych procesy autofagii oraz autolizy komórki są krytycznymi zdarzeniami prowadzącymi do jej degradacji.

Obecnie brak jest jednoznacznych danych o sygnałach inicjujących PCD u roślin. Organizmy te unieruchomione i związane z miejscem, w którym wyrosły, nie mogą oddalić się od źródła bodźca docierającego z otoczenia i jako podstawową strategię obserwuje się u nich przystosowanie do zaistniałych warunków. Dlatego też właściwie każda reakcja na sygnał wewnętrzny jest w znacznym stopniu uzależniona od czynników środowiska. O losie komórki decydują także sygnały docierające z otaczających komórek lub regulatory wzrostu z odległych często tkanek.

Wiele kwestii dotyczących śmierci komórki roślinnej pozostaje jeszcze do wyjaśnienia. Duża luka w opisie jej przebiegu skłania do porównań z apoptozą u zwierząt. Czy istnieje ogólny mechanizm inicjujący i kontrolujący PCD u roślin, pozostaje wciąż kwestią nie rozstrzygniętą.

LITERATURA

- [1] AARTS M, de FOLTER S, FRANKEN J, LAMERS G, PEREIRA A, van LOOKEREN CAMPAGNE M, ANGENENT G. Programmed cell death during anther development. 9 th International Conference on *Arabidopsis* Research. University of Wisconsin-Madison, June 24–29, 1998.

- [2] AOYAGIS, SUGIYAMA M, FUKUDA H. BEN1 and ZEN1 cDNA encoding S1-type DNase that are associated with programmed cell death in plants. *FEBS Lett* 1998; **429**: 134–138.
- [3] BEERS EP. Programmed cell death during plant growth and development. *Cell Death Differ* 1997; **4**: 649–661.
- [4] BELL PR. Megaspore abortion: a consequence of selective apoptosis? *Int J Plant Sci* 1996; **157**: 1–7.
- [5] BETHKE PC, LONSDALE JE, FATH A, JONES RL. Hormonally regulated programmed cell death in barley aleurone. *Plant Cell* 1999; **11**: 1033–1046.
- [6] BLACKSTONE NW, GREEN DR. The evolution of mechanism of cell suicide. *BioEssay* 1999; **21**: 84–88.
- [7] BUCHANAN-WOLLASTON V. The molecular biology of leaf senescence. *J Exp Bot* 1997; **48**: 181–199.
- [8] BUCKNER B, JANIK-BUCKNER D, GRAY J, JOHAL GS. Cell-death mechanisms in maize. *Trends Plant Sci* 1998; **3**: 218–223.
- [9] CROMPTON M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999; **341**: 233–249.
- [10] DE JONG AJ, HOEBERICHTS FA, YAKIMOVA ET, MAXIMOVA E, WOLTERING EJ. Chemical-induced apoptotic cell death in tomato cells: involvement of caspase-like proteases. *Planta* 2000; **211**: 656–662.
- [11] del POZO P, LAM E. Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. *Curr Biol* 1998; **8**: 1129–1132.
- [12] DESIKAN R, REYNOLDS A, HANCOCK JT, NEILL SJ. Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defence gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. *Biochem J* 1998; **330**: 115–120.
- [13] DOMIŃSKI Z. Apoptoza: śmierć komórek w życiu organizmów zwierzęcych. *Kosmos* 1999; **48**: 385–396.
- [14] DRAKER, JOHN J, FARRELL A, COOPER W, SCHUCH W, GRIERSON D. Isolation and analysis of cDNAs encoding tomato cysteine proteases expressed during leaf development. *Plant Mol Biol* 1996; **30**: 755–767.
- [15] DREW MC, HE CH-J, MORGAN PW. Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. *Trends Plant Sci* 2000; **5**: 123–127.
- [16] ENDO S, DEMURA T, FUKUDA H. Inhibition of proteasome activity by the TED4 protein in extracellular space: a novel mechanism for protection of living cells from injury caused by dying cells. *Plant Cell Physiol* 2001; **42**: 9–19.
- [17] FATH A, BETHKE PC, JONES RL. Barley aleurone cell death is not apoptotic: characterization of nuclease activities and DNA degradation. *Plant J* 1999; **20**: 305–315.
- [18] FUKUDA H. Xylogenesis: initiation, progression and cell death. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1996; **47**: 299–325.
- [19] FUKUDA H. Programmed cell death during vascular system formation. *Cell Death Differ* 1997; **4**: 684–688.
- [20] FUKUDA H. Tracheary element differentiation. *Plant Cell* 1997; **9**: 1147–1156.
- [21] GROOVER A, DeWITT N, HEIDEL A, JONES A. Programmed cell death of plant tracheary elements differentiating in vitro. *Protoplasma* 1997; **196**: 197–211.
- [22] GROOVER A, JONES AM. Tracheary element differentiation uses a novel mechanism coordinating programmed cell death and secondary cell wall synthesis. *Plant Physiol* 1999; **119**: 375–384.
- [23] HO S-L, TONG W-F, YU S-M. Multiple mode regulation of a cysteine proteinase gene expression in rice. *Plant Physiol* 2000; **122**: 57–66.
- [24] JONES AM, DANGL JL. Logjam at the Styx: programmed cell death in plants. *Trends Plant Sci* 1996; **4**: 114–119.

- [25] JONES A. Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? *Trends Plant Sci* 2000; **5**: 225–230.
- [26] KATSUHARA M. Apoptosis-like cell death in barley roots under salt stress. *Plant Cell Physiol* 1997; **38**: 1091.
- [27] KAWAI M, SAMARAJEWA PK, BARRERO RA, NISHIGUCHI M, UCHIMIYA H. Cellular dissection of the degradation pattern of cortical cell death during aerenchyma formation of rice roots. *Planta* 1998; **204**: 277–287.
- [28] KITANAKA C, KUCHINO Y. Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology. *Cell Death Differ* 1999; **6**: 508–515.
- [29] KOIWA H, BRESSAN RA, HASEGAWA PM. Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends Plant Sci* 1997; **2**: 379–384.
- [30] KOPEĆ-SZLEZAK J. Czynniki regulacyjne apoptozy. *Post Biol Kom* 1996; **3**: 445–456.
- [31] KUO A, CAPPELLUTI S, CERVANTES-CERVANTES M, RODRIGUEZ M, BUSH DS. Okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, block calcium changes, gene expression and death induced by gibberellin in wheat aleurone cells. *Plant Cell* 1996; **8**: 259–269.
- [32] KURIYAMA H. Loss of tonoplast integrity programmed in tracheary element differentiation. *Plant Physiol* 1999; **121**: 763–774.
- [33] LACOMME C, SANTA CRUZ S. Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 7956–7961.
- [34] LAM E, PONTIER D, del POZO O. Die and let live-programmed cell death in plants. *Curr Opin Plant Biol* 1999; **2**: 502–507.
- [35] LEŚNIEWSKA J, GRĄDZKA I, SZUMIEL I, CHARZYŃSKA M. PCD-related DNA degradation in the nuclei of anther tapetum identified by the comet assay. XXII Conference of Embryology, Kraków-Osieczany, 1997.
- [36] LEŚNIEWSKA J, SIMEONOVA E, SIKORA E, MOSTOWSKA A, CHARZYŃSKA M. Application of the comet assay in studies of programmed cell death (PCD) in plants. *Acta Soc Bot Pol* 2000; **69**: 101–107.
- [37] LOVEGROVE A, HOOLEY R. Gibberellin and abscisic acid signalling in aleurone. *Trends Plant Sci* 2000; **5**: 102–110.
- [38] MARTY F. Plant vacuoles. *Plant Cell* 1999; **11**: 587–600.
- [39] MINAMI A, FUKUDA H. Transient and specific expression of a cysteine endopeptidase during autolysis in differentiating tracheary elements from *Zinnia* mesophyll cells. *Plant Cell Physiol* 1995; **36**: 1599–1606.
- [40] MITSUHARA I, MALIK KA, MIURA M, OHASHI Y. Animal cell-death suppressor Bcl-XL and Ced-9 inhibit cell death in plants. *Curr Biol* 1999; **9**: 775–778.
- [41] MITTLER R, LAM E. In situ detection of nDNA fragmentation during the differentiation of tracheary elements in higher plants. *Plant Physiol* 1995 b; **108**: 489–493.
- [42] ORZAEZ D, GRANELL A. The homologue of the defender against apoptotic death gene is down-regulated during senescence of flower petals. *FEBS Lett* 1997; **404**: 275–278.
- [43] PAPINI A, MOSTI S, BRIGHIGNA L. Programmed cell death events during tapetum development of Angiosperms. *Protoplasma* 1999; **207**: 213–221.
- [44] PENNEL RJ, LAMB CH. Programmed cell death in plants. *Plant Cell* 1997; **9**: 1157–1168.
- [45] PIFFANELLI P, ROSS JHE, MURPHY DJ. Biogenesis and function of the lipidic structures of pollen grains. *Sex Plant Reprod* 1998; **11**: 65–80.
- [46] PONTIER D, BALAQUE C, ROBY D. The hypersensitive response. A programmed cell death associated with plant resistance. *C R Acad Sci III* 1998; **321**: 721–734.
- [47] QUIRINO BF, NOH Y-S, HIMELBLAU E, AMASINO RM. Molecular aspects of leaf senescence. *Trends Plant Sci* 2000; **5**: 278–282.
- [48] ROWLEY JR. Cycles of hyperactivity in tapetal cells. *Plant Syst Evol* 1993; Suppl 7: 23–37.
- [49] RYERSON DE, HEATH MC, WANG H, LI J, BOSTOCK RM, GILCHRIST DG. DNA ladders connecting animals and plants. *Trends Plant Sci* 1996; **1**: 212.

- [50] SAVILL J. Phagocytic docking without shocking. *Nature* 1998; **392**: 442–443.
- [51] SCHMID M, SIMPSON D, GIETL CH. Programmed cell death in castor bean endosperm is associated with the accumulation and release of a cysteine endopeptidase from ricinosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 14159–14164.
- [52] SCHMID M, SIMPSON D, KALOUSEK F, GIETL CH. A cysteine endopeptidase with a C-terminal KDEL motif isolated from castor bean endosperm is a marker enzyme for the ricinosome, a putative lytic compartment. *Planta* 1998; **206**: 466–475.
- [53] SHIMIZU S, NARITA M, TSUJIMOTO Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 1999; **399**: 483–487.
- [54] SOLOMON M, BELENGHI B, DELLEDONNE M, MENACHEM E, LEVINE A. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell* 1999; **11**: 431–443.
- [55] SUGIMOTO A, HOZAK RR, NAKASHIMA T, NISHIMOTO T, ROTHMAN JH. dad-1, an endogenous programmed cell death suppressor in *Caenorhabditis elegans* and vertebrates. *EMBO J* 1995; **14**: 4434–4441.
- [56] SULEJCZAK D. Apoptoza i metody jej identyfikacji. *Post Biol Kom* 2000; **4**: 527–568.
- [57] SWANSON SJ, BETHKE PC, JONES RL. Barley aleurone cells contain two types of vacuoles: characterization of lytic organelles by use of fluorescent probes. *Plant Cell* 1998; **10**: 685–698.
- [58] TANAKA Y, MAKISHIMA T, SASABE M, ICHINASE Y, SHIRAISHI T, NISHIMOTO T, YAMADA T. dad-1, a putative programmed cell death suppressor gene in rice. *Plant Cell Physiol* 1997; **38**: 379–383.
- [59] THORNBERRY NA, LAZEBNIK Y. Caspase: enemies within. *Science* 1998; **281**: 1312–1317.
- [60] VOUX DL, KROSMEYER SJ. Cell death in development. *Cell* 1999; **96**: 245–254.
- [61] WANG M, HOEKSTRA S, van der HEIJDEN MW, de PRIESTER W, SCHILPEROORT RA. Apoptosis in developing anthers and the role of ABA in this process during androgenesis in *Hordeum vulgare* L. *Plant Mol Biol* 1999; **39**: 489–501.
- [62] YE Z-H, VARNER JE. Induction of cysteine and serine proteases during xylogenesis in *Zinnia elegans*. *Plant Mol Biol* 1996; **30**: 1233–1246.
- [63] YOUNG TE, GALLIE DR. Analysis of programmed cell death in wheat endosperm reveals difference in endosperm development between cereals. *Plant Mol Biol* 1999; **39**: 915–926.
- [64] YU S-M. Cellular and genetic response of plants to sugar starvation. *Plant Physiol* 1999; **121**: 687–693.
- [65] YUAN JY, SHAHAM S, LEDOUX S, ELLIS HM, HORVITZ HR. The *C.elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1-beta-converting enzyme. *Cell* 1993; **75**: 641–652.
- [66] ZAJĄC K. Ultrastructural changes of the tapetal cell during pollen development of *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. ecotype Columbia. *Acta Biol Sil* 1997; **48**: 49–55.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 14.03.2001 r.

Przyjęto: 02.04.2001 r.

Adres autora: ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź
marwoj@biol.uni.lodz.pl

BIOSYNTeza ORAZ WŁAŚCIWOŚCI IMMUNOMODULACYJNE LIPOKSYN – METABOLITÓW KWASU ARACHIDONOWEGO*

BIOSYNTHESIS AND IMMUNOMODULATORY PROPERTIES OF LIPOXINS – METABOLITES OF ARACHIDONIC ACID

Szczepan JÓZEFOWSKI, Janusz MARCINKIEWICZ

Katedra Immunologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

Streszczenie: Odkryte w 1984 roku lipoksyny (LXs) tworzą wraz z innymi metabolitami kwasu arachidonowego dużą grupę autakoidów zwanych łącznie eikozanoidami. Spośród trzech najlepiej poznanych dróg biosyntezy lipoksyn (LXA₄ i LXB₄), dwie katalizowane są przez sekwencyjnie działające 5- i 12/15-lipoksygenazę, natomiast trzecia inicjowana jest przez acetylowaną przez aspirynę cyklooksygenazę-2 i generuje 15-epimery lipoksyn (15R-LXA₄ i B₄). W odróżnieniu od innych eikozanoidów, lipoksyny są głównie produkowane przez dwie kooperujące ze sobą komórki, na przykład neutrofile i płytki krwi. Scharakteryzowano dwa typy receptorów dla lipoksyn: receptor specyficzny dla lipoksyny A₄, podlegający ekspresji w monocytach, granulocytach i enterocytach oraz występujący w komórkach innych niż neutrofile receptor peptydoleukotrienów, dla którego LXA₄ jest częściowym agonistą. Z dotychczasowych badań wynika, że *in vitro* lipoksyny mają właściwości immunomodulacyjne, natomiast trudno jest powiedzieć, jaka jest ich rola w reakcjach immunologicznych *in vivo*, w których biorą udział inne eikozanoidy. Uważa się, że lipoksyny są mediatorami odczynu zapalnego, działają przeciwnie do leukotrienów (*stop signaling* hipoteza Charlesa Serhana) i w drodze autokrynej hamują aktywność neutrofilei.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28: 335–350)

Słowa kluczowe: lipoksyny, aspiryna, eikozanoidy

Summary: Lipoxins belong to the group of eicosanoids, i.e. metabolites of arachidonic acid. Out of three biosynthetic pathways leading to the formation of lipoxins (LXA₄ and LXB₄) two of them are catalysed by a sequential action of 5- and 12/15-lipoxigenases, whereas the third one is catalysed by aspirin-acetylated cyclooxygenase 2 (COX-2). The products of the latter reaction are 15-epi-lipoxins (15 epi-LXA₄ and B₄). Lipoxins are mainly the products of intercellular co-operation (e.g. neutrophils and platelets). There have been characterised two receptors for lipoxins: the LXA₄ specific receptor, expressed in

*Praca wykonana w ramach badań własnych WŁ/137/P/L

monocytes, granulocytes and enterocytes, and receptor shared with peptidoleukotrienes, found in other cells. *In vitro* lipoxins were shown to have immunomodulatory properties. Thus far it is suggested that they are mediators of inflammatory reactions, they oppose the action of proinflammatory leukotrienes (stop signalling according to Charles Serhan), and they inhibit the function of neutrophils. But it is difficult to explain how they contribute to the role of all eicosanoids *in vivo*. (*Advances in Cell Biology* 2001; 28: 335–350)

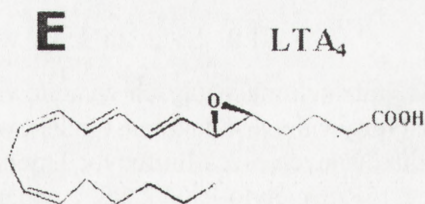
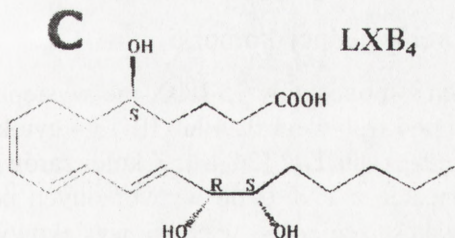
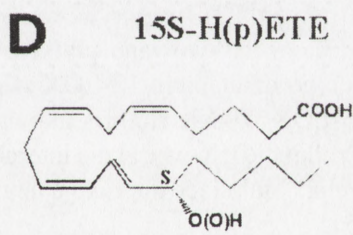
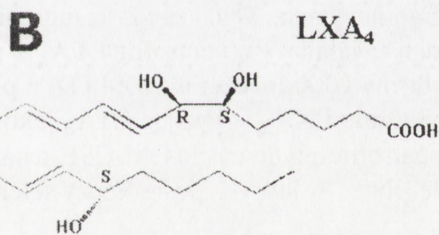
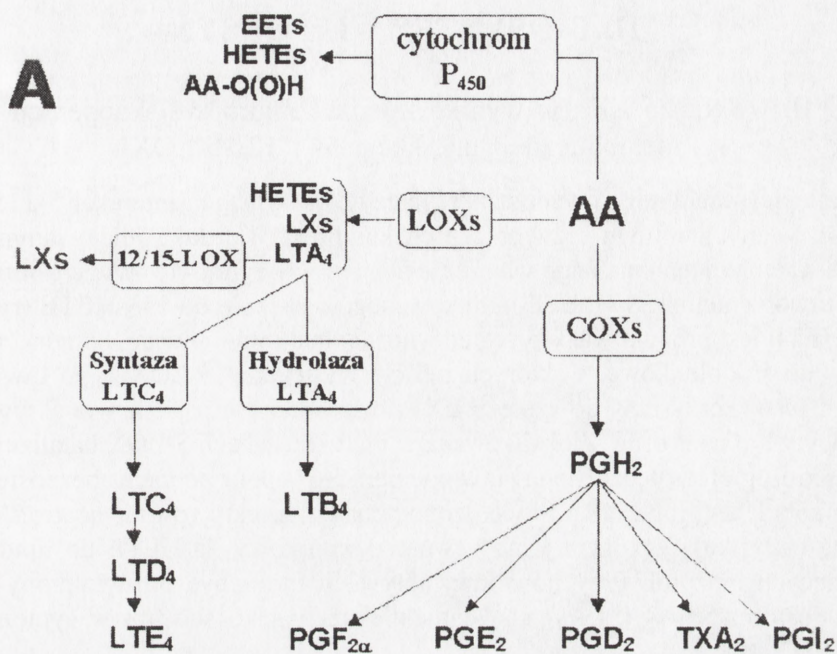
Key words: lipoxins, aspirin, eicosanoids

I. WSTĘP

Kwas arachidonowy (AA), uwolniony w wyniku działania lipaz na fosfolipidy błon komórkowych, staje się prekursorem licznych autakoidów, takich jak: prostaglandyny (PGs), tromboksany (TXs), leukotrieny (LTs), lipoksyny (LXs), zwanych łącznie eikozanoidami (ryc. 1A). AA przekształcany jest głównie przez dwa typy enzymów: cyklooksygenazy (COXs: kostytutywna COX-1 i indukowana przez czynniki prozapalne COX-2) oraz lipoksygenazy (LOXs: 5-, 12- i 15-LOX). Cyklooksygenazy inicjują syntezę PGs i TXs, czyli prostanoidów, podczas gdy 5-LOX odpowiada za syntezę LTs i LXs. Głównymi komórkami układu immunologicznego produkującymi eikozanoidy są makrofagi, neutrofile, eozynofile, komórki dendrytyczne oraz komórki tuczne. O ile prostanoidy oraz LTs powstają w obrębie jednej komórki, to LXs tworzą się głównie w wyniku interakcji dwóch komórek (na przykład neutrofile i płytek krwi). Lipoksyny A₄ (ryc. 1B) i B₄ (ryc. 1C) są produktami sekwencyjnego działania dwu enzymów, najczęściej 5- i 12/15-LOX, prowadzącego do wbudowania w cząsteczkę AA trzech atomów tlenu [5,50,51].

Prostaglandyny oraz LTs są mediatorami odczynu zapalnego, a ponadto selektywnie regulują syntezę cytokin typu T_H1 i T_H2. Na przykład, PGE₂ hamuje syntezę IL-2, IFN- γ (cytokiny T_H1), a stymuluje syntezę IL-4 (T_H2) [21,31]. Immunoregulacyjna rola LXs *in vivo* jest niejasna i kontrowersyjna. Badania Charlesa Serhana wskazują na ich działanie przeciwzapalne. Zasadniczo LXs hamują funkcje granulocytów, natomiast aktywują monocyty. Silnie przeciwzapalne działanie LXs kontrastuje z głównie pro-zapalnym działaniem innych przekaźników lipidowych i sugeruje możliwość zastosowania LXs w leczeniu licznych chorób związanych ze stanem zapalnym (reumatoidalne zapalenie stawów, astma, choroba Alzheimer) [1,5,50,51]. Na podstawie aktualnej wiedzy o immunoregulującym działaniu LXs można postawić następującą tezę:

- i. LXs mają działanie przeciwstawne do LTs.
- ii. Głównym źródłem LXs w systemie odpornościowym są neutrofile.
- iii. LXs hamują odczyn zapalny (*stop signalling* – Ch. Serhan).
- iv. LXs wpływają na funkcje T_H1/T_H2 (?)



RYCINA 1. Eikozanoidy – schemat syntezy (A) oraz wzory strukturalne: LXA_4 (kwasu 5S,16R,15S-trójhidroksy-7,9,13-trans-11-cis-eikozatetraenowego) (B), LXB_4 (kwasu 5S,14R,15S-trójhidroksy-6,10,12-trans-8-cis-eikozatetraenowego) (C), 15S-H(p)ETE (kwasu 15S-hidroksy-(hydroperoksy-)eikoz-5Z,8Z,11Z,13E-tetraenowego) (D) i LTA_4 (E). EETs – kwasy epoksy-eikozatrienowe; pozostałe objaśnienia w tekście

II. BIOSYNTENZA LIPOKSYN

II.1. Synteza LXs w wyniku międzykomórkowej kooperacji metabolicznej: interakcja 5- i 12/15-LOX

Najlepiej scharakteryzowane szlaki syntezy LXs wymagają interakcji 5- i 15-LOX, zlokalizowanych w dwu różnych typach komórek. W szlaku inicjowanym przez 15-LOX, enzym ten katalizuje włączenie tlenu przy węglu C-15 AA (w konfiguracji S), z utworzeniem 15S-HpETE, zredukowanego następnie do 15S-HETE (ryc. 1D). 15S-HETE jest produkowany przez eozynofile, makrofagi płucne, komórki nabłonkowe lub śródbłonkowe, w których obficie występuje 15-LOX, i po uwolnieniu może być wykorzystany do syntezy LXs przez obecne w sąsiedztwie aktywowane monocyty lub neutrofile. Zlokalizowana w tych komórkach 5-LOX katalizuje wbudowanie drugiej cząsteczki tlenu z utworzeniem 5(6)-epoksytetraenu, bezpośredniego prekursora LXA₄ lub LXB₄. Stwierdzono ponadto, że aktywowane neutrofile gwałtownie estryfikują egzogenne lub zewnątrzkomórkowe 15-HETE do lipidów zawierających inozytol. Przy powtórnej aktywacji może być on uwolniony z błon przez fosfolipazę A₂ (PLA₂) i ewentualnie użyty jako substrat w syntezie LXs [8,50,51].

Alternatywnie, LXs syntetyzowane są z LTA₄ (ryc. 1E), produktu 5-LOX i prekursora innych LTs w aktywowanych granulocytach. Wykazano, że agregujące z neutrofilami aktywowane płytki pobierają uwalniany z neutrofilii LTA₄ i przekształcają go działaniem 12-LOX w obie formy LXs. Inaczej niż 12-LOX z płytek krwi, 15-LOX wydaje się produkować wyłącznie LXA₄ używając LTA₄ jako substratu. Produkcję LXs w trakcie interakcji neutrofile-płytki nasila GM-CSF, a hamują przeciwciała blokujące interakcje neutrofile-płytki, w których pośredniczy selektyna P [49–51].

II.2. Synteza LXs w obrębie jednej komórki

W ludzkich makrofagach wyhodowanych z monocytów 15-LOX nie występuje konstytutywnie, jest natomiast indukowana pod wpływem IL-4 lub IL-13 – cytokin produkowanych przez limfocyty T pomocnicze typu T_H2 [24,46]. Z kolei zarówno sama 15R/S-metylo-LXA₄, jak i podana łącznie z TNF-α do wytworzonych pod skórą myszy torebek powietrznych zwiększała stężenie IL-4 w płynie wysiękowym [20]. Odwrotnie, cytokiny typu Th1 (IFN-γ) i prozapalne (TNF-α) hamują aktywność 15-LOX [24] (ryc. 2). Można się więc spodziewać, że produkcja LXs charakteryzuje zwłaszcza reakcje odpornościowe typu T_H2, rozwijające się pod wpływem zakażeń robakami i w alergiach. Neutrofile pozyskane od astmatyków, w przeciwieństwie do osób zdrowych, po stymulacji jonoforem wapnia syntetyzowały LXA₄ z endogennych substratów [8]. W przeciwstawnym sposobie cytokiny T_H1 i T_H2 regulują

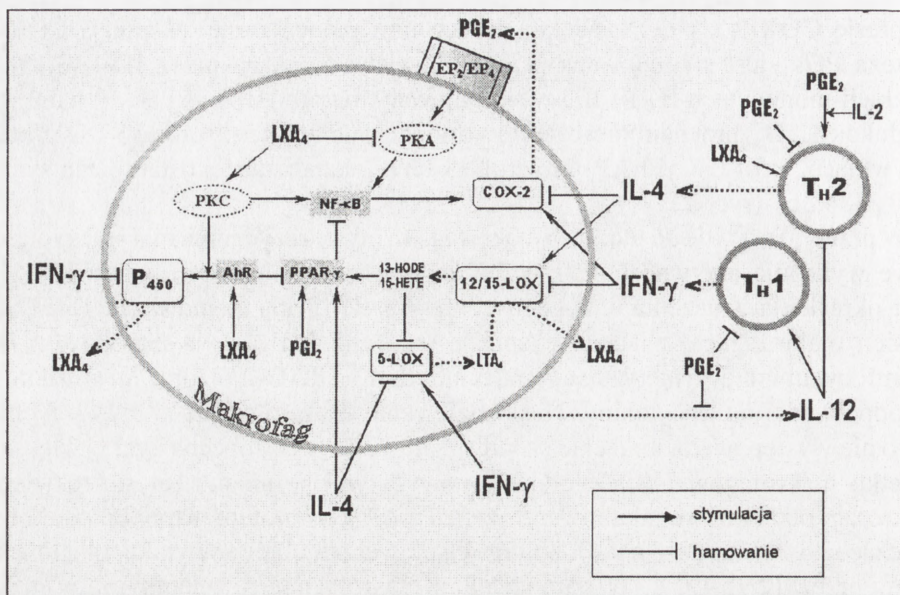
ekspresję COX-2 i 5-LOX. W komórkach linii monocytarnej ekspresja COX-2 i synteza PGs jest stymulowana przez IFN- γ , a hamowana przez IL-4 [3,15]. W ludzkich monocytach IL-1 i IFN- γ stymulowały, natomiast IL-4 i IL-13 hamowały produkcję LTB₄, przynajmniej częściowo poprzez wpływ na ekspresję 5-LOX, białka aktywującego 5-LOX (FLAP) i hydrolazy LTA₄, katalizującej ostatni etap syntezy LTB₄ [34,36] (ryc. 2).

W przeciwieństwie do ludzkich makrofagów, mysie rezydentne makrofagi otrzewnowe wykazują aktywność 12/15-LOX nawet bez stymulacji IL-4 lub IL-13. W celu określenia znaczenia endogennych IL-4 i IL-13 dla ekspresji 12/15-LOX w mysich makrofagach, zbadano ekspresję tego enzymu u dwu szczepów myszy: z limfocytami nie syntetyzującymi IL-4 i IL-13 (RAG-2^{-/-}) oraz u niezdolnych do odpowiedzi na te cytokiny. Niespodziewanie okazało się, że u myszy tych nie tylko nie występowało obniżenie ekspresji, ale 12/15-LOX obecna była w większym odsetku makrofagów [48]. Zgodnie z powyższymi wynikami, mysie rezydentne makrofagi otrzewnowe inkubowane *in vitro* z AA i jonoforem wapnia produkowały znaczące ilości LXs (~18 ng/10⁶ komórek), prawdopodobnie w wyniku transformacji LTA₄ przez 12/15-LOX. W porównaniu z makrofagami rezydentnymi, w makrofagach zapalnych występował blok syntezy LXs i LTs, zaś produkcja 12- i 15-HETE była dramatycznie obniżona [6].

II.3. Synteza LXs pod wpływem aspiryny: interakcja acetylowanej COX-2 i 5-LOX

Aspiryna (kwas acetylosalicylowy) jest jednym z najstarszych i najczęściej stosowanym lekiem przeciwzapalnym. Badania ostatnich lat potwierdziły ponadto skuteczność niskich dawek aspiryny w przeciwdziałaniu zawałowi serca i w obniżaniu ryzyka raka płuc, jelita grubego i piersi. Do niedawna panujący pogląd, że przeciwzapalne działanie aspiryny wynika wyłącznie z bezpośredniego hamującego wpływu na aktywność obu form COX, wydaje się niewystarczający do wyjaśnienia wszystkich farmakologicznych efektów aspiryny. Ponadto, *in vivo* aspiryna ulega szybkiej deacetylacji do kwasu salicylowego, będącego bardzo słabym inhibitorem COXs [10,27]. Opisano szereg innych mechanizmów działania farmakologicznego salicylanów, potencjalnie istotnych dla wyjaśnienia ich efektu terapeutycznego, takich jak: hamowanie aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B [55], modyfikacja transkrypcji COX-2 [54,56] i działanie pro-apoptotyczne, związane z aktywacją kinazy p38 z grupy kinaz aktywowanych przez mitogeny (MAPK) [47].

Niektóre wreszcie z działań aspiryny mogą być związane z pobudzaniem syntezy lipoksyn ATLs (ang. *Aspirin-Triggered Lipoxins*). Acetylacja przez aspirynę seryny w centrum katalitycznym COX-2 przełącza jej swoistość enzymatyczną z syntazy PGs na R-lipoksygenazę, tzn. acetylowana COX-2 (ale nie COX-1) syntetyzuje 15R-HETE zamiast PGH₂. 15R-HETE, produkowany przez acetylowaną COX-2



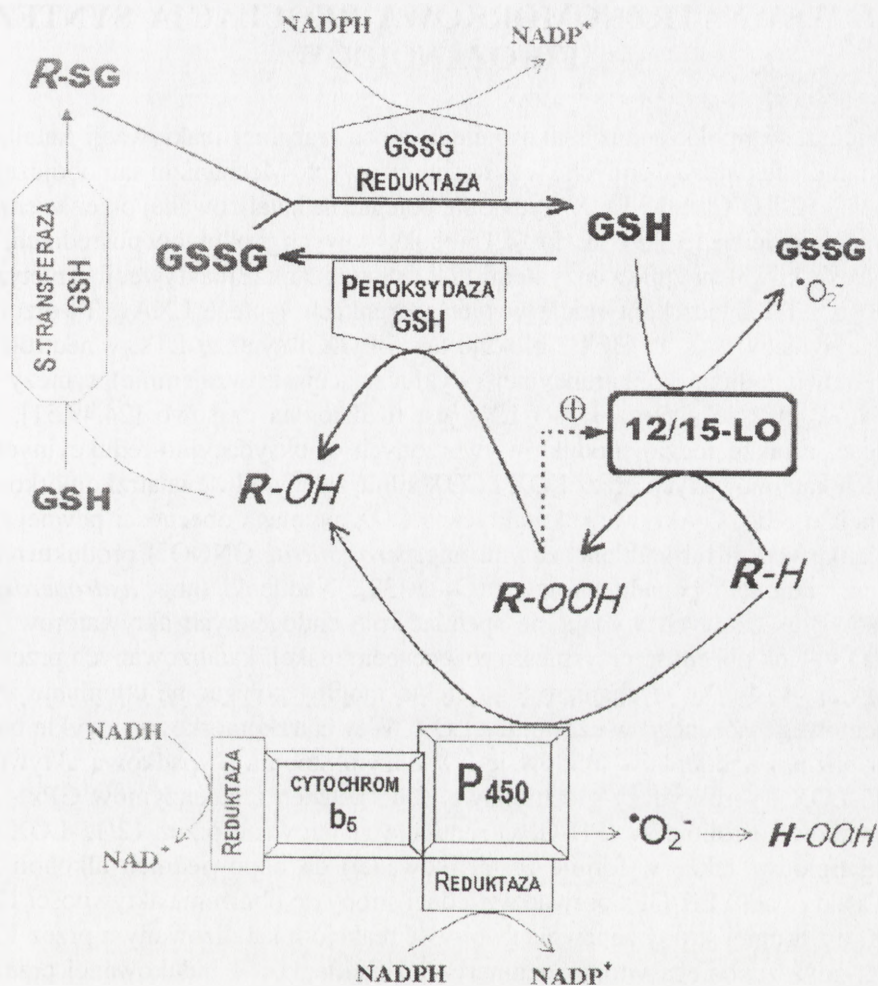
RYCINA 2. Niektóre interakcje pomiędzy LXA₄ i PGE₂ a cytokinami T_{H1} (IFN-γ) i T_{H2} (IL-4); oznaczenia: EP₂ i EP₄ – podtypy receptorów PGE₂, 13-HODE – kwas 13-hydroksyoktadeka-9Z,11E-dienowy (metabolit kwasu linolowego), PGJ₂ – 15-deoksy-Δ^{12,14}-PGJ₂ (metabolit PGD₂), PPAR-γ – typ γ receptora dla aktywatorów proliferacji peroksyzomów (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor-γ*); pozostałe objaśnienia w tekście

w aktywowanym komórkach nabłonka lub śródbłonka, wychwytywany jest przez przylegające neutrofile i przekształcany w 15R-epimery LXs [10,44,50]. Okazało się, że 15-epi-LXA₄ hamuje adhezję neutrofile do komórek śródbłonka prawie dwukrotnie silniej od natywnej (15S) LXA₄, częściowo z powodu większej odporności na biodegradację. Z kolei 15-epi-LXB₄ hamuje proliferację komórek rakowych adenokarcinoma silniej niż LXB₄ lub LXA₄ [12].

II.4. Inne szlaki syntezy: cytochrom P450

Oprócz szlaków inicjowanych przez LOX i COX, leukocyty dysponują także trzecim torem metabolizmu AA, katalizowanym przez zlokalizowany we frakcji mikrosomalnej układ cytochromu P₄₅₀ (ryc. 3). W makrofagach i monocytach niektóre izoenzymy cytochromu P₄₅₀ (CYP) występują konstytutywnie, podczas gdy inne są indukowane pod wpływem różnorodnych bodźców, np. przyleganie do plastiku i stymulacja LPS-em indukuje w ludzkich monocytach i makrofagach ekspresję CYP1A1 [2].

Różne izoformy cytochromu P₄₅₀ w leukocytach mogą katalizować zarówno rozkład (por.V), jak i syntezę eikozanoidów. Utlenienie AA przez cytochrom P₄₅₀



RYCINA 3. Rola antyoksydacyjnego systemu glutationowego, cytochromu P₄₅₀ i 12/15-LO w regulacji wewnątrzkomórkowego poziomu nadtenków kwasów tłuszczowych (R-OOH) i ich zredukowanych form alkoholowych (R-OH). GSH i GSSG – zredukowana i utleniona forma glutationu

daje ~40% epimeru 15R i ~60% epimeru 15S 15-HETE [7]. Udowodniono, że cytochrom P₄₅₀ partycypuje w produkcji 15-HETE przez komórki ludzkiej linii adenokarcinoma, przekształcanego następnie przez hodowane łącznie neutrofile w 15-epi-LXA₄ [12]. Cytochrom P₄₅₀ odpowiada także w dużym stopniu za stymulowaną przez aspirynę syntezę 15-HETE i 15-epi-LXs w komórkach wątrobowych szczura zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* [53].

III. WEWNĄTRZKOMÓRKOWA REGULACJA SYNTEZY EIKOZANOIDÓW

Większość lipoksygenaz ssaków ulega nieodwracalnej inaktywacji katalizując utlenianie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Mechanizm samobójczej inaktywacji 12-LOX lub 15-LOX wydaje się polegać na katalizowanej przez te enzymy wtórnej konwersji 15-HPETE do 14,15-epoksydowych produktów pośrednich, wiążących się kowalencyjnie z enzymem. 12-LOX ulega także inaktywacji syntetyzując LXB_4 z LTA_4 , lecz kontynuuje w tych warunkach syntezę LXA_4 . Tworzony w trakcie syntezy LXs 15-HETE blokuje też 5-LOX i syntezę LTs w neutrofilach, co stanowi podłoże konkurencyjnej (wykluczającej się wzajemnie) syntezy LXs i LTs. W efekcie synteza LTs i LXs jest rozdzielona czasowo [24,49,51].

Ilość, a także rodzaj produktów tworzonych w oksydacyjno-redukcyjnych reakcjach katalizowanych przez LOX i COX silnie zależy od wewnątrzkomórkowego potencjału redoks. Aktywacja katalityczna COX wymaga obecności pewnej ilości nadtlenu wodoru lub nadtlenuazotynu (ang. *peroxynitrite*, $ONOO^-$), produktu reakcji NO z anionem ponadtlenkowym (O_2^-) [32]. Nadtlenki (ang. *hydroperoxides*) kwasów tłuszczowych wydają się spełniać rolę endogennych aktywatorów 12- i 15-LOX – ich obecność przyspiesza rozpoczęcie reakcji katalizowanych przez wyizolowaną 15-LOX. Mechanizm tego efektu mógłby polegać na utlenianiu żelaza niehemowego obecnego w cząsteczce LOX. Wewnątrzkomórkowy, zwykle bardzo niski poziom nadtlenu lipidów jest w dużym stopniu wypadkową aktywności 12/15-LOX i peroksydazy glutationowej (GPx). Jeden z izoenzymów GPx - GPx nadtlenu fosfolipidów (PH-GPx) redukuje generowane przez 12/15-LOX nadtlenki lipidów (także w formie zestryfikowanej) do odpowiednich alkoholi (ryc. 3). Ta aktywność PH-GPx prowadzi z jednej strony do obniżenia aktywności 12/15-LOX, a z drugiej strony zapewnia swoistość reakcjom katalizowanym przez 12/15-LOX, gdyż zapobiega wtórnej izomeryzacji nadtlenu i indukowanej przez nie nieswoistej peroksydacji [24,45,52]. Z kolei wywołany przez cytokiny typu T_H2 , IL-4 i IL-13, wzrost ekspresji 12/15-LOX z równoległym obniżeniem ekspresji GPx, prowadzi do znacznego wzrostu poziomu endogennych nadtlenu lipidów [46]. Tak więc stymulujący wpływ IL-4 na aktywność 15-LOX może wynikać nie tyle ze zwiększenia ekspresji 12/15-LOX, co z jej aktywacji enzymatycznej. Obecność nieaktywnej 15-LOX wykryto w ludzkich neutrofilach [37].

W przeciwieństwie do wpływu na syntezę LXs, spadek wewnątrzkomórkowego GSH prowadzi do drastycznego zahamowania syntezy peptydoleukotrienów, w której GSH jest substratem [41]. W płytkach krwi czynniki obniżające poziom GSH nasilają konwersję LTA_4 do LXs i jednocześnie blokują konwersję LTA_4 do peptydoleukotrienów [50,51]. W aktywowanych makrofagach GSH utleniany jest bezpośrednio przez aktywowane LOX lub zużywany na redukcję nadtlenu

lipidów, usuwanie reaktywnych form tlenu i azotu oraz stymulowane przez NO tworzenie glutationowych adduktów białek [38,42] (ryc. 3).

Tlenek azotu wywiera dwufazowy wpływ na aktywność 15-LOX. Po początkowym zahamowaniu aktywności wskutek wiązania NO do Fe(II) w nieaktywnym enzymie, następuje powolna, nieodwracalna konwersja tego kompleksu do preaktywowanej formy 15-LOX, zawierającej Fe(III) i podatnej na aktywację przez nadtlarki. Wypadkowa tych efektów wydaje się zależeć od wewnątrzkomórkowego poziomu nadtlarków. Przy ich niskim poziomie duża część enzymu występuje w nieaktywnej formie żelazawej i w związku z tym jest podatna na aktywację przez NO, natomiast przy wysokim poziomie nadtlarków można się spodziewać częściowego zahamowania aktywności 15-LOX przez NO [22].

IV. RECEPTORY DLA LIPOKSYN

Swoisty (nie wiążący LXB₄ i LTB₄) receptor LXA₄ (LXA₄R) w ludzkich neutrofilach wiąże LXA₄ z K_D ~0,5 nM. Receptor ten, reprezentujący nadrodzinę kooperujących z białkami G receptorów serpentynowych, jest bliżej spokrewniony z receptorami dla peptydów (60% homologia do receptora fMLP) niż z należącymi do tej samej nadrodziny receptorami dla PGs. W neutrofilach LXA₄ w stężeniu nanomolowym wywołuje zależną od białek G aktywację PLD i PLA₂, uwalnianie AA i aktywację kinaz tyrozynowych [39,50]. Mechanizm transdukcji sygnału z LXA₄R obejmuje interferencję z nowoopisanym szlakiem fosforanów terpenów. Aktywacja receptora LTB₄ w neutrofilach stymuluje raptowną degradację dwufosforanu preskwalenu (produkt pośredni w syntezie cholesterolu), który w niepobudzonych komórkach wydaje się tonicznie hamować PLD. Agoniści LXA₄-R hamują hydrolizę dwufosforanu preskwalenu wywołaną przez LTB₄, przeciwdziałając odhamowaniu PLD i produkcji O₂- pod wpływem LTB₄ [26].

Identyczny receptor sklonowano także z komórek monocytowej linii THP-1. Receptor ten ulegał raptownej desensytyzacji pod wpływem LXA₄, a wywołaną przez LXA₄ za jego pośrednictwem mobilizację jonów wapnia i adhezję blokowała toksyna krztuśca [28]. Fakt, że ten sam receptor wydaje się wywierać przeciwny wpływ na funkcje neutrofilów i monocytów, usiłowano tłumaczyć różnym stopniem mobilizacji jonów wapnia [40].

Fakt, że adhezja neutrofilów i monocytów do śródbłonnka jest regulowana podobnie przez obie LXs [40,50], sugeruje, że w działaniu LXs pośredniczy co najmniej jeszcze jeden receptor. Taki polimorfizm nie byłby wyjątkiem wśród receptorów dla eikozanoidów, np. u myszy scharakteryzowano do tej pory osiem różnych receptorów wiążących prostanoidy [35]. W komórkach innych niż neutrofile, takich jak: komórki mezangialne i śródbłonne, LXA₄ wiąże się ponadto do receptora

dla peptydoleukotrienów (cysLT/LXA₄R). Receptor ten, dla którego LXA₄ jest częściowym agonistą, odpowiada między innymi za wzrost przepuszczalności naczyń i skurcz mięśni gładkich w niektórych narządach [19,49,50]. W ludzkich komórkach mezangialnych w aktywacji kinaz MAP: p38 i ERK przez LXA₄ wydają się pośredniczyć dwa typy receptorów – odpowiednio cysLT/LXA₄R i LXA₄R. Tylko aktywacja p38 przez LXA₄ była blokowana przez toksynę krztuśca (angażowała białko G_i) i przez antagonistę cysLT/LXA₄R [33]. Inhibitor kinaz MAP przeciwdziałał obniżeniu ekspresji β₂ integryn wywołanemu przez LXA₄ w ludzkich leukocytach krwi [16].

Oprócz działania auto- lub parakrynnego, LXs mogą również funkcjonować w obrębie komórek jako wtórne lub trzeciorzędowe przekaźniki. Receptor węglowodorów aromatycznych (ang. *Aryl hydrocarbon Receptor*, AhR) jest aktywowanym przez ligandy czynnikiem transkrypcyjnym należącym do nadrodziny Per (*Period*), ARNT, Sim (*Single minded*)/*basic helix-loop-helix*. Prototypowymi ligandami AhR są policykliczne (np. benzo[*a*]piren) i heterocykliczne (np. dioksyna) węglowodory aromatyczne. Ligandy te indukują za pośrednictwem AhR ekspresję enzymów, które ułatwiają ich rozkład i wydalanie (poprzez zwiększenie hydrofilowości), takich jak cytochrom P₄₅₀, S-transferaza glutationowa i transferaza UDP-glukuronowa (ryc. 3). W nieobecności liganda, AhR związany jest w cytoplazmie z dwoma cząsteczkami hsp90 (*heat shock proteins*). Związanie liganda inicjuje odłączenie hsp90 i translokację do jądra, w którym AhR tworzy heterodimer z należącym do tej samej nadrodziny czynnikiem transkrypcyjnym ARNT (*AhR nuclear translocator*). Heterodimer AhR/ARNT jest aktywną formą, regulującą ekspresję genów poprzez bezpośrednie wiązanie do ich enhanserowych sekwencji DREs (*dioxin/xenobiotic response elements*) [18,43].

Stwierdzono ostatnio, że LXA₄, ale nie inne eikozanoidy (LXB₄, HETEs i LTs), jest jednym z ligandów AhR, regulującym transkrypcję genu podległego AhR. W komórkach Hepa-1 LXA₄ zwiększała aktywność promotorową DREs oraz aktywność cytochromu P₄₅₀ z EC₅₀~60 nM. W przeciwieństwie do innych ligandów AhR, LXA₄ wywoływała tylko przejściową aktywację cytochromu P₄₅₀, z maksimum po ok. 8 h i powrotem do poziomu wyjściowego w ciągu 48 h. Przedstawiono dowody, że chwilowy charakter aktywacji wynika z katabolizmu LXA₄ przez wyindukowany cytochrom: w komórkach ze zmutowaną, nieaktywną formą CYP1A1 poziom mRNA dla CYP1A1 pozostawał podwyższony przez 24 h, a ponadto LXA₄ hamowała kompetycyjnie katalizowaną przez CYP1A1 O-deetylację etoksyrezorufiny. Tak więc, tak jak inne ligandy AhR, LXA₄ w wysokich stężeniach stymuluje ekspresję enzymów katalizujących jej rozkład [43]. W leukocytach śledzionowych myszy PMA i jonofor wapniowy stymulowały 6-krotny wzrost ekspresji AhR. W aktywowanych leukocytach zaobserwowano ponadto jądrową translokację AhR, jego wiązanie do sekwencji DREs i aktywację transkrypcji *CYP1A1* w nieobecności egzogennych ligandów [14]. Niewykluczone, że nasilenie ekspresji CYP i prze-

prowadzanej przez CYP degradacji przyczynia się do obniżenia syntezy LTs i LXs w aktywowanych leukocytach [por. II.2.].

Stymulacja transkrypcji genu *CYP1A1* przez AhR wymaga współdziałania kinazy białkowej C (PKC). Co ciekawe, ligandy AhR, w tym LXA₄, są często także aktywatorami PKC. LXA₄ aktywowała PKC silniej niż diacyloglicerol [9,11,49]. Odwrotnie, LXA₄ znosiła aktywację PKA wywołaną przez PGE₂ i forskolinę w makrofagach [17]. Inhibitor PKC hamował stymulowaną przez LXA₄ ekspresję czynnika tkankowego (ang. *tissue factor*, TF – aktywator krzepnięcia krwi) w komórkach ECV304. Wpływu LXA₄ na ekspresję TF nie blokował natomiast antagonistą cysLT/LXA₄R, ani nie naśladowali syntetyczni agoniści LXA₄R (15(R/S)-metylo-LXA₄ lub 16-fenoksy-LXA₄), co raczej wyklucza rolę znanych receptorów błonowych dla LXA₄ [30].

V. KATABOLIZM LIPOKSYN

LXs są szybko degradowane i dlatego ich działanie wydaje się być ograniczone do lokalnego środowiska. LXA₄ jest substratem ω -hydroksylazy LTB₄ i mono-oksigenazy (izoformy CYP) oraz dehydrogenazy 15-hydroksyprostaglandynowej, odgrywającej główną rolę w katabolizmie PGE₂ [43]. Wykazano, że ludzkie monocyty gwałtownie (w ciągu 30 s) przekształcają przeszło 80% dodanej LXA₄ lub LXB₄ do nieaktywnych biologicznie produktów. Przekształcenie to prawdopodobnie katalizowane jest przez zależną od NAD dehydrogenazę 15-hydroksyprostaglandynową oraz 12-hydroksydehydrogenazę LTB₄ i obejmuje odwodorowanie oraz redukcję wiązań podwójnych, dające jako produkt końcowy odpowiednio 13,14-dihydro-LXA₄ i 6,7-dihydro-LXB₄. Stymulowany przez LXA₄ naciek monocytów do ognisk zapalnych – o ile istnieje, podlegałby więc samoograniczeniu, w wyniku inaktywacji LXs przez napływające monocyty. Natomiast w neutrofilach tylko ~12% dodanej LXB₄ podlega katalizowanej przez ω -hydroksylazę LTB₄ ω -hydroksylacji do 20-OH-LXB₄ i 20-COOH-LXB₄, które, odwrotnie niż produkty monocytów, zachowują aktywność biologiczną [13,29]. W obecności cytochromu b₅ i reduktazy NADPH-P₄₅₀, rekombinacyjna ω -hydroksylaza LTB₄ z ludzkich neutrofilów (CYP 4F3) oprócz LTB₄ utlenia także z mniejszym powinowactwem LXA₄, LXB₄, 5-HETE i 12-HETE, ale nie AA i 15-HETE [23].

VI. WPŁYW LIPOKSYN NA FUNKCJE KOMÓREK FAGOCYTARNYCH

W stężeniach nanomolowych LXA₄ hamuje chemotaksję ludzkich neutrofilów i eozynofili w kierunku fMLP lub LTB₄, a także przeciskanie się (diapedezę) neutrofilów przez warstwę komórek nabłonkowych lub śródbłonkowych. Obie LXs obniżają

selektywnie pobudzaną przez LTs (ale nie przez fMLP lub fragment dopełniacza C5a) adhezję neutrofilów do komórek śródbłonka. LXs zarówno hamują (za pośrednictwem PGI_2) wywołaną przez LTC_4 mobilizację selektyny P w komórkach śródbłonka, jak i przeciwdziałają wywołanej przez LTB_4 w neutrofilach aktywacji β_2 integrzyn i syntezie fosforanu inozytolu (IP_3). Każdy z tych efektów mógł partycytować w zaobserwowanym *in vivo* zahamowania nacieku neutrofilów i eozynofili do ognisk zapalnych pod wpływem syntetycznych analogów LXs [1,11,16,39]. *In vivo* 15R/S-metylo- LXA_4 obniżała drastycznie nacieki leukocytów wywołany przez $\text{TNF-}\alpha$ w modelu podskórnych torebek powietrznych u myszy. Na efekt ten prawdopodobnie składało się zahamowanie syntezy MIP2 i IL-1 β oraz stymulacja syntezy IL-4. Lipoksyna A_4 i jej stabilne analogi hamują także wywołaną przez $\text{TNF-}\alpha$ produkcję O_2^- w ludzkich granulocytach. LXA_4 wydaje się regulować selektywnie aktywację neutrofilów wywołaną przez $\text{TNF-}\alpha$, ponieważ ani LXA_4 , ani jej analogi nie hamowały wybuchu tlenowego wywołanego przez fMLP lub PMA oraz produkcji IL-1 β stymulowanej przez GM-CSF lub zymosan [20]. Większość z przytoczonych dotychczas wyników uzyskana została przez wiodący w badaniu LXs zespół Charlesa Serhana. O odwrotnym – stymulacji, a nie hamowaniu – wpływie LXA_4 na adhezję ludzkich neutrofilów do warstwy komórek śródbłonka donosili Lerner i wsp. [25].

W przeciwieństwie do wpływu na funkcje neutrofilów, obie LXs silnie pobudzają chemotaksję i adhezję monocytów, chociaż tylko LXA_4 wywołuje w tych komórkach mobilizację wewnątrzkomórkowych jonów wapnia i ekspresję TF. Inaczej niż większość innych chemoatraktantów, LXs nie pobudzają w monocytach degranulacji i wybuchu tlenowego [28-30,40]. Pikomolowe stężenia LXs i ich analogów stymulują natomiast „nieflogistyczną” (niezwiązaną z uwalnianiem mediatorów prozapalnych) fagocytozę apoptotycznych neutrofilów przez makrofagi. W fagocytozie stymulowanej przez LXA_4 wykazano udział receptora CD36 oraz $\alpha_v\beta_3$ i β_2 integrzyn. Lipoksyna A_4 wywiera więc przeciwny wpływ na funkcje β_2 integrzyn w neutrofilach i monocytach. Stymulację fagocytozy blokowała toksyna krztuśca, (co sugeruje udział receptora swoistego dla LXA_4) i analog cyklicznego AMP, a naśladował inhibitor PKA [17]. Ani LXA_4 , ani jej syntetyczny analog nie wpływały na cytotoksyczność monocytów. Lipoksyny blokują natomiast cytotoksyczność ludzkich komórek NK [28]. Z kolei inni autorzy zaobserwowali *in vitro* stymulację przez LXA_4 cytotoksyczności neutrofilów wobec komórek śródbłonka [4]. Stymulujący wpływ LXs na funkcje fagocytów jednojądrzastych obejmuje także promowanie mielopojezy [49].

Od odkrycia lipoksyn upłynęło prawie 20 lat. Poznano dokładnie ich biosyntezę, a nadal niewiele wiadomo o udziale LXs w regulacji odczynu zapalnego i swoistej odpowiedzi immunologicznej przez eikozanoidy. Szczególne znaczenie w regulacji odpowiedzi immunologicznej mogą mieć lipoksyny uwalniane *in vivo* pod wpływem podawania aspiryny (ATLs). Do kompleksowego poznania regulacji indukcji od-

powiedzi immunologicznej przez eikozanoidy konieczne jest wykazanie, czy komórki prezentujące antygen (np. komórki dendrytyczne) produkują LXs i czy zmieniają one, podobnie jak PGE₂, funkcje limfocytów T (odpowiedź immunologiczną typu T_H1 lub T_H2).

BIBLIOGRAFIA

- [1] BANDEIRA-MELO C, BOZZA PT, DIAZ BL, CORDEIRO RSB, JOSE PJ, MARTINS MA, SERHAN CN. Lipoxin (LX) A₄ and aspirin-triggered 15-epi-LXA₄ block allergen-induced eosinophil trafficking. *J Immunol* 2000; **164**: 2267–2271.
- [2] BARON JM, ZWADLO-KLARWASSER G, JUGERT F, HAMANN W, RUBBEN A, MUKHTAR H, MERK HF. Cytochrome P₄₅₀ 1B1: A major P₄₅₀ isoenzyme in human blood monocytes and macrophage subsets. *Biochem Pharmacol* 1998; **56**: 1105–1110.
- [3] BLANCO JC, CONTURSI C, SALKOWSKI CA, DEWITT DL, OZATO K, VOGEL SN. Interferon regulatory factor (IRF)-1 and IRF-2 regulate interferon γ -dependent cyclooxygenase 2 expression. *J Exp Med* 2000; **191**: 2131–2144.
- [4] BRATT J, LERNER R, RINGERTZ B, PALMBLAD J. Mechanisms for lipoxin A₄-induced neutrophil-dependent cytotoxicity for human endothelial cells. *J Lab Clin Med* 1995; **126**: 36–43.
- [5] BROCK TG, McNISH RW, PETERS-GOLDEN M. Arachidonic acid is preferentially metabolized by cyclooxygenase-2 to prostacyclin and prostaglandin E₂. *J Biol Chem* 1999; **274**: 11660–11666.
- [6] CALORINI L, MANNINI A, BIANCHINI F, MUGNAI G, RUGGIERI S. The change in leukotrienes and lipoxins in activated mouse peritoneal macrophages. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1484**: 87–92.
- [7] CAPDEVILA J, YADAGIRI P, MANNA S, FALCK JR. Absolute configuration of the hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) formed during catalytic oxygenation of arachidonic acid by microsomal cytochrome P₄₅₀. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; **141**: 1007–1011.
- [8] CHAVIS C, VACHIER I, CHANEZ P, BOUSQUET J, GODARD P. 5(S),15(S)-dihydroxyeicosatetraenoic acid and lipoxin generation in human polymorphonuclear cells: Dual specificity of 5-lipoxygenase towards endogenous and exogenous precursors. *J Exp Med* 1996; **183**: 1633–1643.
- [9] CHEN Y-H, TUKEY RH. Protein kinase C modulates regulation of the *CYP1A1* gene by the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem* 1996; **271**: 26261–26266.
- [10] CHIANG N, TAKANO T, CLISH CB, PETASIS NA, TAI H-H, SERHAN CN. Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A₄ (ATL) generation by human leukocytes and murine peritonitis exudates: development of a specific 15-epi-LXA₄ ELISA. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; **287**: 779–790.
- [11] CHUNG-A-ON KO, SOYOMBO O, SPUR BW, LEE TH. Stimulation of protein kinase C redistribution and inhibition of leukotriene B₄-induced inositol 1,4,5-triphosphate generation in human neutrophils by lipoxin A₄. *Br J Pharmacol* 1996; **117**: 1334–1340.
- [12] CLÀRIA J, LEE MH, SERHAN CN. Aspirin-triggered lipoxins (15-epi-LX) are generated by the human lung adenocarcinoma cell line (A549)-neutrophil interactions and are potent inhibitors of cell proliferation. *Mol Med* 1996; **2**: 583–596.
- [13] CLISH CB, LEVY BD, CHIANG N, TAI H-H, SERHAN CN. Oxidoreductases in lipoxin A₄ metabolic inactivation. A novel role for 15-oxoprostaglandin 13-reductase/leukotriene B₄ 12-hydroxydehydrogenase in inflammation. *J Biol Chem* 2000; **275**: 25372–25380.

- [14] CRAWFORD RB, HOLSAPPLE MP, KAMINSKI NE. Leukocyte activation induces aryl hydrocarbon receptor up-regulation, DNA binding, and increased Cyp1a1 expression in the absence of exogenous ligand. *Mol Pharmacol* 1997; **52**: 921–927.
- [15] DWORSKI R, SCHELLER JR. Differential sensitivities of human blood monocytes and alveolar macrophages to the inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by interleukin-4. *Prostaglandins* 1997; **53**: 237–251.
- [16] FILEP JG, ZOUKI C, PETASIS NA, HACHICHA M, SERHAN CN. Anti-inflammatory actions of lipoxin A₄ stable analogs are demonstrable in human whole blood: modulation of leukocyte adhesion molecules and inhibition of neutrophil-endothelial interactions. *Blood* 1999; **94**: 4132–4142.
- [17] GODSON C, MITCHELL S, HARVEY K, PETASIS NA, HOGG N, BRADY HR. Lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. *J Immunol* 2000; **164**: 1663–1667.
- [18] GONZALEZ FJ, FERNANDEZ-SALGUERO P. The aryl hydrocarbon receptor. Studies using the AHR-null mice. *Drug Metab Disp* 1998; **26**: 1194–1198.
- [19] GRONERT K, MARTINSSON-NISKANEN T, RAVASI S, CHIANG N, SERHAN CN. Selectivity of recombinant human leukotriene D₄, leukotriene B₄, and lipoxin A₄ receptors with aspirin-triggered 15-epi-LXA₄ and regulation of vascular and inflammatory responses. *Am J Pathol* 2001; **158**: 3–9.
- [20] HACHICHA M, POULIOT M, PETASIS NA, SERHAN CN. Lipoxin (LX)A₄ and aspirin-triggered 15-epi-LXA₄ inhibit tumor necrosis factor 1 α -initiated neutrophil responses and trafficking: regulators of a cytokine-chemokine axis. *J Exp Med* 1999; **189**: 1923–1929.
- [21] HILKENS CM, VERMEULEN H, VAN NEERVEN RJ, SNIJDEWINT FG, WIERENGA EA, KAPSENBERG ML. Differential modulation of T helper type 1 (Th1) and T helper type 2 (Th2) cytokine secretion by prostaglandin E₂ critically depends on interleukin-2. *Eur J Immunol* 1995; **25**: 59–63.
- [22] HOLTZHÜTTER HG, WIESNER R, RATHMAN J, STÖFLER R, KÜHN H. Kinetic studies on the interaction of nitric oxide with a mammalian lipoxygenase. *Eur J Biochem* 1997; **245**: 608–616.
- [23] KIKUTA Y, KUSUNOSE E, SUMIMOTO H, MIZUKAMI Y, TAKESHIGE K, SAKAKI T, YABUSAKI Y, KUSUNOSE M. Purification and characterization of recombinant human neutrophil leukotriene B₄ ω -hydroxylase (cytochrome P₄₅₀ 4F3). *Arch Biochem Biophys* 1998; **355**: 201–205.
- [24] KÜHN H, HEYDECK D, BRINCKMAN R, TREBUS F. Regulation of 15-lipoxygenase activity on pretranslational, translational, and posttranslational levels. *Lipids* 1999; **34**: S273–S279.
- [25] LERNER R, HEIMBURGER M, PALMBLAD J. Lipoxin A₄ induces hyperadhesiveness in human endothelial cells for neutrophils. *Blood* 1993; **82**: 948–953.
- [26] LEVY BD, FOKIN VV, CLARK JM, WAKELAM MJO, PETASIS NA, SERHAN CN. Polyisoprenyl phosphate (PIPP) signaling regulates phospholipase D activity: a 'stop' signaling switch for aspirin-triggered lipoxin A₄. *FASEB J* 1999; **13**: 903–911.
- [27] LEVY GN. Prostaglandin H synthases, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and colon cancer. *FASEB J* 1997; **11**: 234–247.
- [28] MADDOX JF, HACHICHA M, TAKANO T, PETASIS NA, FOKIN VV, SERHAN CN. Lipoxin A₄ stable analogs are potent mimetics that stimulate human monocytes and THP-1 cells via a G-protein-linked lipoxin A₄ receptor. *J Biol Chem* 1997; **272**: 6972–6978.
- [29] MADDOX JF, SERHAN CN. Lipoxin A₄ and B₄ are potent stimuli for human monocyte migration and adhesion: Selective inactivation by dehydrogenation and reduction. *J Exp Med* 1996; **183**: 137–146.

- [30] MADERNA P, GODSON C, HANNIFY G, MURPHY M, BRADY HR. Influence of lipoxin A₄ and other lipoxygenase-derived eicosanoids on tissue factor expression. *Am J Physiol* 2000; **279**: C945–C953.
- [31] MARCINKIEWICZ J, CHAIN BM. Differential cytokine regulation by eicosanoids in T cells primed by contact sensitization with TNP. *Cell Immunol* 1993; **149**: 303–314.
- [32] MARNETT LJ, ROWLINSON SW, GOODWIN DC, KALGUTKAR AS, LANZO CA. Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition. *J Biol Chem* 1999; **274**: 22903–22906.
- [33] McMAHON B, STENSON C, McPHILIPS F, FANNING A, BRADY HR, GODSON C. Lipoxin A₄ antagonizes the mitogenic effects of leukotriene D₄ in human renal mesangial cells. *J Biol Chem* 2000; **275**: 27566–27575.
- [34] MONTERO A, NASSAR GM, UDA S, MUNGER KA, BADR KF. Reciprocal regulation of LTA₄ hydrolase expression in human monocytes by gamma-interferon and interleukins 4 and 13: potential relevance to leukotriene regulation in glomerular disease. *Exp Nephrol* 2000; **8**: 258–265.
- [35] NARUMIYA S, SUGIMOTO Y, USHIKUBI F. Prostanoid receptors: structure, properties, and functions. *Physiol Rev* 1999; **79**: 1193–1226.
- [36] NASSAR GM, MONTERO A, FUKUNAGA M, BADR KF. Contrasting effects of proinflammatory and T-helper lymphocyte subset-2 cytokines on the 5-lipoxygenase pathway in monocytes. *Kidney Int* 1997; **51**: 1520–1528.
- [37] NICHOLS RC, VANDERHOEK JY. 5-Hydroxyeicosanoids selectively stimulate the human neutrophil 15-lipoxygenase to use endogenous substrate. *J Exp Med* 1990; **171**: 367–375
- [38] PADGETT CM, WHORTON AR. Cellular responses to nitric oxide: Role of protein S-thiolation/dethiolation. *Arch Biochem Biophys* 1998; **358**: 232–242.
- [39] PAPAYIANNI A, SERHAN CN, BRADY HR. Lipoxin A₄ and B₄ inhibit leukotriene-stimulated interactions of human neutrophils and endothelial cells. *J Immunol* 1996; **156**: 2264–2272.
- [40] ROMANO M, MADDOX JF, SERHAN CN. Activation of human monocytes and the acute monocytic leukemia cell line (THP-1) by lipoxins involves unique signaling pathways for lipoxin A₄ versus lipoxin B₄. *J Immunol* 1996; **157**: 2149–2154.
- [41] ROUZER CA, SCOTT WA, GRIFFITH OW, HAMILL AL, COHN ZA. Arachidonic acid metabolism in glutathione-deficient macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; **79**: 1621–1625.
- [42] ROY P, SAJAN MP, KULKARNI AP. Lipoxygenase-mediated glutathione oxidation and superoxide generation. *J Biochem Toxicol* 1995; **10**: 111–120.
- [43] SCHALDACH CM, RIBY J, BJELDANES LF. Lipoxin A₄: A new class of ligand for the Ah receptor. *Biochemistry* 1999; **38**: 7594–7600.
- [44] SCHNEIDER C, BRASH AR. Stereoselectivity of hydrogen abstraction in the conversion of arachidonic acid to 15R-HETE by aspirin-treated cyclooxygenase-2 – Implication for the alignment of substrate in the active site. *J Biol Chem* 2000; **275**: 4743–4746.
- [45] SCHNURR K, BELKNER J, URSINI F, SCHEWE T, KÜHN H. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase controls the activity of the 15-lipoxygenase with complex substrates and preserves the specificity of the oxygenation products. *J Biol Chem* 1996; **271**: 4653–4658.
- [46] SCHNURR K, BORCHERT A, KÜHN H. Inverse regulation of lipid-peroxidizing and hydroperoxyl lipid-reducing enzymes by interleukin 4 and 13. *FASEB J* 1999; **13**: 143–154.
- [47] SCHWENGER P, BELLOSTA P, VIETOR I, BASILICO C, SKOLNIK EY, VILCEK J. Sodium salicylate induces apoptosis via p38 mitogen-activated protein kinase but inhibits tumor necrosis factor-induced c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 2869–2873.

- [48] SENDOBRY SM, CORNICELLI JA, WELCH K, GRUSBY MJ, DAUGHERTY A. Absence of T lymphocyte-derived cytokines fails to diminish macrophage 12/15-lipoxygenase expression *in vivo*. *J Immunol* 1998; **161**: 1477–1482.
- [49] SERHAN CN, ROMANO M. Lipoxin biosynthesis and actions: role of the human platelet LX-synthase. *J Lipid Mediators Cell Signalling* 1995; **12**: 293–306.
- [50] SERHAN CN. Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins (ATL): A jungle of cell-cell interactions or a therapeutic opportunity? *Prostaglandins* 1997; **53**: 107–137.
- [51] SERHAN CN. Lipoxins biosynthesis and its impact in vascular and vascular events. *Biochim Biophys Acta* 1994; **1212**: 1–25.
- [52] SHORNICK LP, HOLTZMAN MJ. A cryptic, microsomal-type arachidonate 12-lipoxygenase is tonically inactivated by oxidation-reduction conditions in cultured epithelial cells. *J Biol Chem* 1993; **268**: 371–376.
- [53] TITOS E, CHIANG N, SERHAN CN, ROMANO N, GAYA J, PUEYO G, CLARIA J. Hepatocytes are rich source of novel aspirin-triggered 15-epi-lipoxins A₄. *Am J Physiol* 1999; **277**: C870–C877.
- [54] XU X-M, SANSORES-GARCIA L, CHEN X-M, MATIJEVIC-ALEKSIC N, DU M, WU KK. Suppression of inducible cyclooxygenase 2 gene transcription by aspirin and sodium salicylate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 5292–5297.
- [55] YIN M-J, YAMAMOTO Y, GAYNOR RB. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I κ B kinase- β . *Nature* 1998; **396**: 77–80.
- [56] YUAN CJ, MANDAL AK, ZHANG ZJ, MUKHERJEE AB. Transcriptional regulation of cyclooxygenase-2 gene expression: Novel effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Res* 2000; **60**: 1084–1091.

Redaktor prowadzący – Barbara Płytycz

Otrzymano: 15.01.2001 r.

Przyjęto: 23.03.2001 r.

Adres autora: ul. Czysła 18, 31-121 Kraków

WPLYW CZYNNIKA MARTWICY NOWOTWORU (TNF) NA ŁOŻYSKO NACZYNIOWE NOWOTWORÓW*

INFLUENCE OF TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF)
ON TUMOR VASCULATURE

Patrycja KOSZAŁKA, Jacek BIGDA

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-AMG,
Katedra Histologii i Immunologii, Akademia Medyczna w Gdańsku

Streszczenie: Czynn timer martwicy guza (TNF, TNF- α , kachektyna) jest pleiotropową cytokiną prozapalną produkowaną głównie przez aktywowane makrofagi i monocyty. Oprócz działania immunomodulatoryjnego TNF wywiera również efekt przeciwnowotworowy hamując wzrost niektórych guzów nowotworowych, a nawet powodując ich regresję. Dlatego TNF, pomimo swej toksyczności, znajduje zastosowanie w terapii nowotworów, głównie nieoperacyjnych czerniaków oraz mięsaków kończyn. Analiza danych uzyskanych na różnych modelach doświadczalnych pozwoliła na wyróżnienie trzech głównych mechanizmów modulującego działania TNF na wzrost nowotworów: 1) bezpośredniego efektu toksycznego na komórki nowotworowe, 2) efektu pośredniego wywołanego poprzez wpływ na układ immunologiczny oraz 3) efektu pośredniego wywołanego poprzez wpływ na łożysko naczyniowe guza. Niniejsza praca przedstawia mechanizmy przeciwnowotworowego działania TNF, skupiając się głównie na efektach wywieranych na łożysko naczyniowe guza. TNF działa bezpośrednio cytostatycznie lub cytotoksycznie na komórki śródbłnka naczyniowego lub też pośrednio poprzez modulację funkcji neutrofilów. TNF wywiera również wpływ na proces angiogenezy prowadzący do rozwoju unaczynienia guza nowotworowego. TNF wpływa także na procesy krzepnięcia krwi oraz fibrynolizy, modyfikując dopływ krwi do tkanek nowotworu. TNF zwiększa infiltrację tkanek guza przez komórki układu immunologicznego jednocześnie modulując aktywność tych komórek. Wpływając na ekspresję cząsteczek adhezyjnych na powierzchni komórek śródbłnka i komórek nowotworowych TNF modyfikuje proces tworzenia przerzutów. Działania wywierane przez TNF wobec łożyska naczyniowego guza są najprawdopodobniej niezależne od stopnia wrażliwości komórek nowotworowych na bezpośrednie działanie toksyczne TNF. Dokładne poznanie oddziaływania TNF na łożysko naczyniowe nowotworów ma zatem duże znaczenie praktyczne, bowiem naczynia guza mogą stanowić uniwersalny punkt

*Praca wykonana w ramach tematu finansowanego przez KBN, Nr rej. 6 P04B 012 12.

docelowy terapii przeciwnowotworowej.
(*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28: 351–372)

Słowa kluczowe: TNF, nowotwory, naczynia, angiogeneza, adhezja komórek

Summary: Tumor necrosis factor (TNF-alpha, cachectin) is a pleiotropic proinflammatory cytokine, produced mainly by activated macrophages and monocytes. Besides immunomodulatory activity, TNF also exerts anti-tumor effect by inhibiting growth of some tumors or even by causing tumor regression. Therefore TNF, in spite of its toxicity, is used in some clinical protocols, mainly of inoperable limb melanomas and sarcomas. Analysis of the data from different experimental models distinguishes three main mechanisms responsible for TNF action on tumor growth: 1) direct toxic effect on tumor cells, 2) indirect action effected by immunomodulation, 3) indirect action effected by modulation of tumor vasculature. The presented paper concentrates mainly on TNF influence on vascular bed of tumors. TNF exerts direct cytostatic or cytotoxic effect on endothelial cells as well as an indirect effect obtained by modulation of neutrophil function. TNF affects also process of angiogenesis, which is a process leading to development of tumor vascularization. TNF modulates also blood coagulation and fibrinolysis, eventually affecting blood supply of tumor tissues. TNF increases infiltration of tumor tissues by immune cells and modulates their activity simultaneously. TNF-mediated modulation of expression of adhesion molecules on surface of endothelial and tumor cells can affect the process of metastasis formation. Effects of TNF on tumor vascular bed are most likely independent of tumor cells sensitivity to direct toxic effect of TNF. Therefore detailed understanding of TNF effect on tumor vasculature has great practical meaning, as tumor blood vessels can be universal destination point of anti-tumor therapies.
(*Advances in Cell Biology* 2001; 28: 351–372)

Key words: TNF, tumor, vasculature, angiogenesis, cell adhesion

Spis skrótów: **ADCC** (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) – cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał; **BCG** (*bacillus Calmette-Guérin*) – atenuowany szczep bydłczego prątka gruźlicy; **CTL** (*cytotoxic T lymphocytes*) – cytotoksyczne limfocyty T; **CD** (*cluster of differentiation*) – antygeny komórkowe; **CR** (*complement receptor*) – receptor komórkowy dla składników dopełniacza; **ELAM-1** (*endothelial leukocyte adhesion molecule-1*) – selektyna E; **EMAP II** (*Endothelial-Monocyte Activating Polypeptide II*); **ICAM-1** (*intercellular adhesion molecule 1*) – cząstka adhezyjna ICAM-1; **IL** (*interleukin*) – interleukina; **ILP** (*isolated limb perfusion*) – izolowana perfuzja kończyn; **LFA-1** (*leukocyte functional antigen-1*) – integryna LFA-1; **MHC** (*major histocompatibility complex*) – główny układ zgodności tkankowej; **NF-κB** (*nuclear factor B*) – czynnik transkrypcyjny B; **NK** (*natural killer*) – komórki „naturalni zabójcy”; **nu** (*nude*) – myszy nagie; **PA** (*plasminogen activator*) – aktywator plazminogenu; **PAI** (*plasminogen activator inhibitor*) – inhibitor aktywatora plazminogenu; **Thy-1** (*T cell-specific surface antigen*) – antygen theta; **TM** (*thrombomodulin*) – trombomodulina; **TNF** (*tumor necrosis factor*) – czynnik martwicy guza, nowotworu, TNF-alfa, kachektyna; **TNF-R** (*tumor necrosis factor - receptor*) – receptor dla czynnika martwicy guza, nowotworu; **VCAM-1** (*vascular cell adhesion molecule-1*) – cząstka adhezyjna VCAM-1; **VEGF** (*vascular-endothelial growth factor*) – naczyniowoskróblonkowy czynnik wzrostu; **VLA-4** (*very late activation antigen*) – integryna VLA-4.

WSTĘP

Czynnik martwicy guza (TNF, TNF-alfa, kachektyna) jest cytokiną prozapalną produkowaną głównie przez aktywowane makrofagi i monocyty. Produkowany może być także, choć w niewielkich ilościach przez inne typy komórek m.in. niektóre linie nowotworowe [1, 2, 3]. TNF jest białkiem o masie cząsteczkowej 17 kDa, występującym w stanie natywnym głównie pod postacią rozpuszczalnego trimery

[4, 5], a także jako forma prekursorowa o masie cząsteczkowej 26 kDa, będąca białkiem błonowym [6].

TNF działa na komórki poprzez dwa receptory o masach molekularnych: 55 kDa (p55 TNFR) oraz 75 kDa (p75 TNFR) będące glikoproteinami integralnymi błony komórkowej i mogącymi występować także w formie rozpuszczalnej [7]. Receptory dla TNF są obecne na prawie wszystkich jednojądrzastych komórkach organizmu w ilości od kilkudziesięciu do kilkudziesięciu tysięcy cząsteczek na powierzchni pojedynczej komórki [8]. Większość linii komórkowych posiada oba typy receptorów, jednak receptor p55 przeważa ilościowo na komórkach pochodzenia nabłonkowego, a receptor p75 na komórkach pochodzenia szpikowego [9]. Związanie TNF do poszczególnych typów receptorów wywołuje dość szerokie spektrum aktywności biologicznych, choć większość z nich wydaje się być indukowana poprzez receptor p55 [5].

TNF działa głównie jako czynnik o charakterze immunomodulacyjnym m.in. wpływając na proces aktywacji i proliferacji limfocytów B [10], T [11] i komórek NK [12], indukując ekspresję antygenów MHC i molekuł adhezyjnych [13, 14], syntezę prostaglandyn [15, 16] oraz wydzielanie niektórych interleukin m.in. IL6 [17] i IL8 [18]. TNF może wywoływać również efekty niekorzystne dla ustroju m.in. odgrywa ważną rolę w reakcjach zapalnych [19] i wstrząsie septycznym [20]. Po podaniu ogólnym egzogennego TNF obserwuje się m.in. znaczne zmniejszenie liczby leukocytów i płytek krwi oraz uszkodzenia wielu narządów, np. nerek, nadnerczy i wątroby [5]. Długotrwałe podawanie egzogennego TNF lub przewlekłe wydzielanie endogennego TNF u nosicieli nowotworów często prowadzi do niedokrwistości, hiperkalcemii, a nawet do kacheksji (wyniszczenia organizmu) [21, 19]. Działanie TNF jest plejotropowe, jednak nazwa tej cytokiny: „czynnik martwicy nowotworu” wywodzi się od jej wpływu na nowotwory. Nazwa ta pojawiła się po raz pierwszy w literaturze w 1975 roku, gdy terminu TNF użył Carswell określając nim czynnik wywołujący martwicę krwotoczną guzów, który wykrył w surowicy zwierząt zakażonych BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) i traktowanych endotoksyną [22]. TNF wykazuje działanie cytotoksyczne *in vitro* wobec szeregu linii nowotworowych [23], a w warunkach *in vivo* wykazuje aktywność przeciwnowotworową hamując wzrost niektórych nowotworów lub powodując ich całkowitą regresję [24, 25]. Przykładem może być też ograniczenie przez TNF tempa wzrostu guza nowotworowego w doświadczalnym modelu chemicznego czerniaka Bomirskiego [26].

Silna toksyczność TNF znacznie ogranicza możliwość stosowania tej cytokiny w terapii nowotworów. Dlatego też w najczęściej obecnie stosowanej metodzie terapii TNF wprowadzany jest w dużych dawkach do krążenia w izolowanej perfuzji kończyn (ILP) w połączeniu z innymi czynnikami terapeutycznymi, np. melphalanem. Metoda ta stosowana jest z powodzeniem głównie w leczeniu nieoperacyjnych czerniaków i mięsaków kończyn [27, 28, 29, 30, 31].

Analizując dane uzyskane na różnych modelach doświadczalnych można wyróżnić kilka głównych mechanizmów modulującego działania TNF na wzrost nowotworów:

- bezpośredni efekt toksyczny na komórki nowotworowe,
- efekt pośredni poprzez wpływ na układ immunologiczny,
- efekt pośredni poprzez wpływ na łożysko naczyńowe guza.

WPŁYW CZYNNIKA MARTWICY GUZA NA KOMÓRKI NOWOTWOROWE I KOMÓRKI UKŁADU IMMUNOLOGICZNEGO

TNF wykazuje bezpośrednie działanie cytotoksyczne w stosunku do szeregu linii nowotworowych [23, 32] i w zależności od rodzaju komórek nowotworowych może wywoływać efekt cytostatyczny [33] albo śmierć komórek wskutek nekrozy lub apoptozy [34, 35]. Nie wywiera natomiast efektu cytotoksycznego na linie nietransformowane nowotworowo, a nawet może stymulować proliferację niektórych z tych linii (głównie ludzkich fibroblastów) [32]. Różnice w działaniu TNF na komórki nowotworowe i nietransformowane nowotworowo nie są zależne od ilości i powinowactwa receptorów [32, 36]. Także w przypadku linii nowotworowych zazwyczaj nie występuje korelacja między wrażliwością danej linii nowotworowej na TNF a ilością receptorów dla TNF [32, 37, 38]. Jednak niektóre modele badawcze dostarczają danych wskazujących na istnienie takiej korelacji [39, 36], a także na zależność między wpływem TNF na komórki nowotworowe, a ich ploidią. Na przykład w modelu mięsaka S 180 komórki aneuploidalne były wrażliwsze na działanie TNF od komórek diploidalnych [40].

Pośredni efekt TNF na rozwój nowotworów przez wpływ na układ immunologiczny jest przede wszystkim wynikiem modulacji przez TNF aktywności przeciwnowotworowej CTL, makrofagów i komórek NK.

Na wpływ TNF przez mechanizmy obronne organizmu związane z aktywnością limfocytów T wskazują doświadczenia na modelu mięsaka MethA (nowotwór indukowany metylocholanrenem), w którym efekt działania TNF przy podaniu dożylnym był znacznie silniejszy w przypadku myszy BALB/c nu/+ niż w przypadku myszy nu/nu (myszy z wrodzonym brakiem grasicy prowadzącym do braku limfocytów T) [41]. Także podanie przeciwciał przeciwko antygenowi Thy-1 (*T cell-specific surface antigen*) w sposób znaczący zmniejszyło wpływ przeciwnowotworowy TNF na mięsaka MethA. Podobny efekt wywoływało podanie przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom specyficznym dla limfocytów T pomocniczych (anty-CD4) lub dla limfocytów T cytotoksycznych (anty-CD8). Sugeruje to mechanizm, w którym TNF bezpośrednio lub pośrednio aktywuje limfocyty Th, które z kolei aktywują CTL odpowiedzialne za efekt toksyczny wobec komórek

nowotworowych [42]. Badania na różnych modelach wskazują, że przez limfocyty T mediowany jest głównie wpływ TNF na regresję guza [43, 44, 45].

Natomiast doświadczenia na modelu mięsaka SA1 sugerują, że limfocyty T pomocnicze uwrażliwione na komórki nowotworowe mogą być również niezbędne do aktywacji makrofagów, których przeciwnowotworowa funkcja jest jednym z mechanizmów prowadzących do regresji guzów [46].

TNF działa jako autokryny czynnik regulatorowy już aktywowanych makrofagów [47, 48, 49] wzmacniając ich działanie przeciwnowotworowe [50]. Zwiększa także, ważną dla działania makrofagów, ekspresję cząstki adhezyjnej ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) na komórkach nowotworowych [51, 52]. Badania na klonach ludzkiego czerniaka wykazały, że dla efektu cytotoksycznego wywieranego przez aktywowane monocyty na komórki czerniaka konieczne są oddziaływania ICAM-1(CD54)/LFA-1(CD11a/CD18). Klony odporne na działanie monocytów wykazywały niską ekspresję ICAM-1, a zwiększenie ekspresji przez transfekcję genu ICAM-1 znacznie zwiększało podatność na cytotoksyczne działanie monocytów. Efekt wywierany przez monocyty na komórki nowotworowe można było także zablokować przez przeciwciała anti-ICAM-1 i anti-CD18 [53].

TNF wzmacnia także efekt cytotoksyczny komórek NK w stosunku do wielu linii nowotworowych *in vitro* [54, 55], a także działa silnie aktywująco w stosunku do komórek NK w jamie otrzewnej u zwierząt zdrowych [12]. Komórki NK jako limfocyty zdolne do spontanicznej odpowiedzi cytotoksycznej wobec komórek docelowych [56] są ważnym elementem układu immunologicznego w kontroli wzrostu i rozsiewu nowotworów. Ponieważ efekt cytotoksyczny komórek NK nie podlega restrykcji w zakresie MHC, ich rola jest szczególnie ważna w przypadku nowotworów, których komórki wykazują obniżoną ekspresję antygenów MHC klasy I [57]. TNF nie tylko działa aktywująco na komórki NK, ale także zwiększa ekspresję cząstki adhezyjnej ICAM-1 na komórkach nowotworowych [51], której oddziaływania z integryną LFA-1 na powierzchni komórek NK odgrywają ważną rolę w reakcji cytotoksycznej komórek NK [58, 59, 60]. TNF pełni również ważną rolę regulacyjną w procesie migracji komórek NK do jamy otrzewnej i kontroli przez te komórki wzrostu nowotworów w jamie otrzewnej [57]. Jednak TNF może także w sposób pośredni hamować aktywność komórek NK [16, 61]. Supresja ta jest efektem pobudzenia makrofagów przez TNF do zwiększonej produkcji prostaglandyn (gł. PGE₂) [62, 63]. Dodatkowo wzrost ekspresji antygenów MHC klasy I na komórkach nowotworowych pod wpływem TNF [51] prowadzi do nabycia przez te komórki oporności na działanie komórek NK oraz zwiększenia ich potencjału do tworzenia przerzutów [64, 65].

Wydaje się, że najbardziej złożonym mechanizmem modulującego działania TNF na wzrost nowotworów jest wpływ tej cytokiny na łożysko naczyniowe guzów nowotworowych. Wpływ ten jest głównie wynikiem bezpośredniego lub medowanego przez neutrofile efektu TNF uszkodzającego komórki śródbłonna, a także

zwiększenia przepuszczalności naczyń dla komórek naciekających guz oraz indukcji procesu krzepnięcia krwi, co prowadzi do niedokrwienia tkanek guza.

WPŁYW TNF NA ŁOŻYSKO NACZYNIOWE GUZÓW NOWOTWOROWYCH

Badania nad zależnością wpływu przeciwnowotworowego TNF, a wielkością guza wykazały, że w przypadku modelu mięsaka MCA guz musiał uzyskać odpowiednią wielkość, by efekt działania TNF był widoczny przy jednorazowym dożylnym podaniu tej cytokiny. Wskazuje to na zależność efektu działania TNF w tym modelu od uzyskania odpowiedniej wielkości przez guz, a więc najprawdopodobniej od jego odpowiedniego unaczynienia [66]. Potwierdzają to doświadczenia na modelu mięsaka MethA, którego komórki są mało wrażliwe *in vitro* na działanie cytotoksyczne TNF. Gdy guz ten był zaszczepiony dootrzewnowo, a w wyniku tego nieunaczyniony, brak było wpływu TNF na wzrost guza. Natomiast podskórne zaszczepienie tego guza, prowadzące do jego silnego unaczynienia, znacznie zwiększyło wrażliwość guza na działanie przeciwnowotworowe TNF. Dało to w efekcie zahamowanie wzrostu guza, a nawet jego całkowitą regresję pod wpływem TNF [67]. Także w innych modelach podanie TNF przyspieszało pojawienie się martwicy krwotocznej w centrum guza prowadzącej do całkowitej regresji guza lub regresji częściowej, w której żywa tkanka guza otacza zmianę martwiczą w postaci pierścienia [43, 44]. Dane te wskazywały na działanie TNF wobec naczyń krwionośnych guza.

1. Efekt wywierany przez czynnik martwicy guza na komórki śródbłonna naczyniowego i proces angiogenezy

Efekt działania TNF na komórki śródbłonna dużych i małych naczyń jest odmienny. *In vitro* TNF hamował zdolność do proliferacji komórek śródbłonna izolowanych z dużych (ludzka żyła pępowinowa i bydlęca aorta płodowa) i małych naczyń (bydlęce naczynia włosowate kory nadnerczy). Powodował także odwracalne zmiany w morfologii tych komórek, polegające głównie na zmianie ich kształtu. Cytotoksyczny efekt TNF widoczny był natomiast tylko w hodowli komórek śródbłonna naczyń włosowatych [68]. W procesie apoptozy komórek śródbłonna pod wpływem TNF zmiana kształtu komórek skorelowana była z degradacją miozyny i wimentyny [69]. Jednakże TNF *in vitro* przede wszystkim hamuje proliferację komórek śródbłonna naczyń włosowatych, a efekt cytotoksyczny w tych komórkach wywołuje dopiero po ich stymulacji czynnikami wzrostu [70].

Zaobserwowany silniejszy wpływ TNF na naczynia guza i tkanki ziarniniakowej w porównaniu do innych naczyń organizmu [71, 72, 73] tłumaczyć można tym, że naczynia krwionośne unaczyniające guz mają odmienną budowę od naczyń w

pozostałych tkankach. Ściana tych naczyń ma zazwyczaj słabą strukturę oraz nie ma unerwienia i unaczynienia odżywczego, a śródbłonek ma wysokie tempo proliferacji (ok. 20–2000 razy większe niż w przypadku pozostałych naczyń dorosłego organizmu poza łożyskiem) [74, 75]. Są także dane wskazujące na rolę czynników wydzielanych przez komórki nowotworowe w wybiórczym działaniu TNF na naczynia guza. Prawdopodobnie jednym z takich czynników jest cytokina EMAP II (*Cytokine Endothelial-Monocyte Activating Polypeptide II*), wykryta po raz pierwszy w nadsączu hodowli komórek mięsaka MethA jako jeden z trzech czynników indukujących czynnik tkankowy na komórkach śródbłonna *in vitro* [76, 77, 78]. Transkrypt tej cytokiny można wykryć we wszystkich komórkach eukariotycznych, w tym także w niemal wszystkich znanych nowotworach i liniach nowotworowych [79, 80, 81]. Jednak jako dojrzałe białko EMAP II wykrywany jest w różnym stężeniu, przede wszystkim w obrębie tkanek nowotworów [81] lub też w niektórych okresach rozwoju embrionalnego, płodowego czy poporodowego [82, 83, 84]. Uwalnianie dojrzałego EMAP II z formy prekursorowej jest wywołane bowiem przez proces apoptozy, w wyniku działania kaspaz, głównie kaspazy-7, zdolnej do trawienia prekursora EMAP II [82, 85]. Cytokina EMAP II moduluje aktywność monocytów, neutrofilów i komórek śródbłonna [86, 79]. Na komórki śródbłonna naczyń wpływa m.in. zwiększając poziom wolnego wapnia w cytoplazmie, indukując ekspresję cząstek adhezyjnych, takich jak selektyna E i selektyna P, oraz indukując aktywność prokoagulacyjną czynnika tkankowego i uwalnianie czynnika von Willebranda, co inicjuje kaskadę krzepliwości krwi [86, 81]. Zwiększa także wrażliwość komórek śródbłonna naczyń guza na działanie TNF prowadząc do martwicy krwotocznej i regresji guza [86, 87, 81]. W mysich modelach raka sutka MC2 [86], czerniaka B16 lub ludzkiego włóknakiomięsaka HT-1080 [88], w których nie obserwowano martwicy krwotocznej pod wpływem iniekcji doguzowych samego TNF lub EMAP II, podanie EMAP II uwrażliwiło guz na późniejsze podanie TNF prowadząc do wyraźnej martwicy krwotocznej z silnym nacieczeniem guza przez komórki układu immunologicznego, głównie przez neutrofile [86, 88]. Podobny efekt widoczny był *in vivo* w modelu czerniaka Pmel, w którym komórki czerniaka konstytutywnie nadprodukowały EMAP II w wyniku transdukcji retrowirusowej, przy czym same komórki nowotworowe pozostały niewrażliwe na cytotoksyczne działanie TNF *in vitro* [81]. Mechanizmy wpływu EMAP II na łożysko naczyniowe i na sam guz są złożone, ale efekt prowadzący do wzmocnienia działania przeciwnowotworowego TNF jest prawdopodobnie wynikiem zwiększenia ekspresji receptora p55 dla TNF na komórkach śródbłonna naczyniowego pod wpływem EMAP II [89, 90, 91].

TNF wpływa nie tylko na komórki śródbłonna uformowanych już naczyń, ale także na sam proces powstawania naczyń w guzie nowotworowym. Analiza wpływu TNF na stopień unaczynienia guza wykazała, że TNF w małych stężeniach indukował angiogenezę stymulując w ten sposób wzrost guza nowotworowego, w dużych stężeniach zaś hamował ją ograniczając też wzrost guza. Sugeruje się, że efekt

proangiogeny TNF jest pośredni wywołany przez prostaglandyny wydzielane przez makrofagi [92, 93, 94]. Być może jest to też wynik stymulacji przez TNF produkcji czynników angiogennych, takich jak: IL-8 czy VEGF [95, 96].

Natomiast hamujący wpływ TNF na angiogenezę naczyń krwionośnych nowotworu może wynikać z modulującego działania TNF na ekspresję lub aktywację cząstek adhezyjnych występujących na powierzchni komórek śródbłonna. TNF m.in. zwiększał ekspresję integryny $\alpha V\beta 3$ (CD51/CD61; VNR) na komórkach śródbłonna ludzkiej żyły pępowinowej jednocześnie zmniejszając zdolność tych komórek do przylegania do składników substancji międzykomórkowej w mechanizmie zależnym od integryny $\alpha V\beta 3$ (np. przyleganie do vitronektyny). TNF zmniejszał więc aktywację tej integryny prawdopodobnie wpływając na wewnątrzkomórkowe procesy transdukcji sygnału [97]. Integryna $\alpha V\beta 3$ występuje głównie na komórkach śródbłonkowych uczestniczących w fizjologicznych lub patologicznych procesach angiogenezy i pełni kluczową rolę m.in. w procesie neowaskularyzacji guzów nowotworowych [98, 99] uczestnicząc w ważnych dla procesu angiogenezy oddziaływaniach komórek śródbłonna ze składnikami substancji międzykomórkowej [100, 101]. Zmniejszenie aktywacji tej integryny pod wpływem TNF prawdopodobnie prowadzi do zaburzenia procesów sygnalizacji przez nią inicjowanych. W efekcie komórki śródbłonna mają zaburzoną zdolność do oddziaływań ze składnikami substancji międzykomórkowej i nie są zdolne do przylegania, proliferacji i rozprzestrzeniania się, co powoduje ich gwałtowną apoptozę określaną w takiej sytuacji terminem *anoikis*. Prowadzi to do uszkodzenia nowo powstających naczyń guza [102, 103, 104, 97]. Przyleganie komórek śródbłonna do podłoża może zostać zaburzone też w wyniku indukowanej przez TNF reorganizacji i/lub rozerwania układu fibronektyny w przestrzeni międzykomórkowej. Być może jest to efekt osłabienia oddziaływań między fibronektyną a integryną $\alpha 5\beta 1$ pod wpływem TNF [105].

2. Efekt wywierany przez czynnik martwicy guza na procesy regulujące krzepnięcie krwi

TNF wiążąc się do komórek śródbłonna inicjuje kaskadę reakcji zapalnych i prowadzących do krzepnięcia krwi w wyniku indukcji właściwości prokoagulacyjnych komórek śródbłonna oraz syntezy i uwalniania przez nie interleukiny 1 (IL1) [106, 107]. Zjawisko to zachodzi także w przypadku komórek niewrażliwych na bezpośredni toksyczny efekt TNF, np. komórek śródbłonna ludzkiej żyły pępowinowej [106, 107]. Natomiast analiza efektu działania wysokich dawek TNF w szczurzym modelu mięsaka, kiedy TNF podawany był w izolowanej perfuzji kończyn, wykazała, że uszkodzenie śródbłonna naczyń i wybroczenie krwi poza łożysko naczyniowe w guzie poprzedzało agregację płytek. Być może martwica krwotoczna guza jest więc efektem bezpośredniego efektu toksycznego TNF na komórki śródbłonna i aktywacji aktywności prokoagulacyjnej komórek śródbłonna

naczyń guza, co prowadzi do utworzenia skrzepu, a następnie do zablokowania przepływu krwi i niedokrwienia guza [108].

Doświadczenia na modelu mysiego mięsaka MethA wykazały, że podanie niskiej dawki TNF (3 μg /mysz) prowadziło do tworzenia się skrzeplin śródnaczyniowych blokujących przepływ krwi w naczyniach guza [109]. Analiza mikroangiograficzna guza w tym modelu wykazała przekrwienie i zwiększenie przepuszczalności naczyń po 3–6 godz. od dożylnego podania TNF. Następnie w naczyniach formowały się skrzepy, a po 12 godz. krew ulegała wybroczeniu poza łożysko naczyniowe. Po 24 godz. widoczna była także znaczna infiltracja guza neutrofilami [71] oraz w niewielkiej ilości makrofagami, limfocytami i plazmocytami [110]. W miejscach uszkodzenia śródbłonna przy podaniu TNF zarówno dożylnym [110], jak i do-guzowym [111] widoczna była agregacja płytek w naczyniach włosowatych guza.

Badania nad mechanizmem wpływu czynnika martwicy nowotworu na proces krzepnięcia w naczyniach guzów nowotworowych skupiają się głównie nad wpływem TNF na ekspresję czynnika tkankowego i czynnika von Willebranda. Badania dotyczące czynnika tkankowego (tzw. tromboplastyny tkankowej), który uczestniczy w zewnątrzpochodnym układzie krzepnięcia krwi wykazały indukcję jego ekspresji na komórkach śródbłonna naczyń guza *in vivo* pod wpływem TNF [112]. Jest to prawdopodobnie efekt wywierany przez synergistyczne działanie TNF i naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) [113], którego produkcja stymulowana jest przez TNF [95, 96]. Tworzenie skrzepu śródnaczyniowego było szybsze, jeżeli komórki nowotworowe guza także wykazywały ekspresję czynnika tkankowego. Zablokowanie ekspresji czynnika tkankowego *in vivo* w wyniku transfekcji do komórek śródbłonna antysensownego DNA zmniejszyło odkładanie włókna i przywróciło przepływ krwi w naczyniach guza. Wskazuje to na dużą rolę czynnika tkankowego w indukcji przez TNF mechanizmów krzepliwości krwi [112].

Natomiast analiza biopsji guza u pacjentów chorych na czerniaka kończyn wykazała, że po podaniu wysokiej dawki TNF w izolowanej perfuzji kończyn (ILP) następowała zmiana dystrybucji czynnika von Willebranda. Czynniki te syntetyzowane i magazynowane m.in. przez komórki śródbłonna naczyń uczestniczy w wewnątrzpochodnym procesie krzepnięcia krwi. Nie jest w nim wymagana obecność czynnika tkankowego, a krzepnięcie następuje np. w wyniku odstonięcia włókien kolagenowych znajdujących się pod śródbłonkiem naczyń krwionośnych. Przed ILP czynniki von Willebranda wykryć można było w niewielkim stężeniu w śródbłonku naczyń. Pod wpływem TNF czynniki te wykrywalny był w dużo większym stężeniu także wokół naczyń. W ciągu 24 godzin zjawisku temu towarzyszyła także agregacja płytek i zatrzymanie erytrocytów w naczyniach. Prawdopodobnie TNF uszkodzając śródbłonek powoduje uwolnienie czynnika von Willebranda, który odgrywa rolę w oddziaływaniach między trombocytami a odstoniętym podścieliskiem i tworzeniu skrzeplin śródnaczyniowych. Powoduje to zaburzenia krążenia krwi prowadząc do zahamowania jej przepływu i obrzęku – objawów wczesnego etapu martwicy krwo-

tocznej. W tym modelu nie wykrywano obecności czynnika tkankowego na śródbłonku naczyń [114].

TNF wpływa na proces krzepnięcia krwi w naczyniach krwionośnych także w wyniku modulacji aktywności neutrofilii. Przykładem tego jest wpływ neutrofilii na poziom rozpuszczalnej trombomoduliny (TM) w surowicy krwi. Trombomodulina jako glikoproteina błony komórkowej m.in. komórek śródbłonka pełni ważną rolę w procesie krzepnięcia krwi jako antykoagulant [115]. Jest to wynik zdolności TM związanej z błoną komórkową do tworzenia kompleksu z trombiną. Powstały kompleks trombiny z trombomoduliną pozwala na ujawnienie jedynie ok. 1% aktywności wolnej trombiny wyrażonej tworzeniem włóknika. Ponadto kompleks trombiny i trombomoduliny uczestniczy także w aktywacji białka C, działającego jak naturalny antykoagulant [116]. Podanie ogólne TNF pacjentom z zaawansowanymi przerzutami nowotworowymi oraz podanie TNF w modelu mysiego mięsaka MethA powodowało zwiększenie poziomu rozpuszczalnej trombomoduliny w surowicy krwi będące efektem złuszczenia TM z powierzchni komórek śródbłonka naczyń. Efekt ten *in vitro* wywoływany był przez neutrofile, a wynikał prawdopodobnie z uszkodzenia komórek śródbłonka aktywowanych przez TNF pod wpływem wydzielanych przez neutrofile produktów przemian tlenu i proteaz. Wzmocnienie procesu złuszczenia TM prowadzi natomiast do indukcji właściwości prokoagulacyjnych śródbłonka i tworzenia skrzepów [115]. TNF powodował także, w następnym etapie działania, zmniejszenie ekspresji TM na komórkach śródbłonka naczyń guza *in vivo* [115] oraz *in vitro* [117, 118] głównie w wyniku zahamowania transkrypcji [119, 117].

Innym efektem prokoagulacyjnym TNF jest także hamowanie procesu fibrylizacji, czyli usuwania skrzepu w naczyniach krwionośnych. TNF m.in. indukuje komórki śródbłonka do produkcji inhibitora aktywatora plazminogenu (PAI). PAI, który produkowany jest nie tylko przez komórki śródbłonka, ale także np. przez płytki krwi, reguluje proces fibrylizacji inaktywując aktywator plazminogenu (PA) i blokując w ten sposób tworzenie plazminy (fibrylizyny) oraz degradację proteolityczną składników skrzepu [120, 121].

3. Wpływ czynnika martwicy guza na infiltrację nowotworów przez komórki układu immunologicznego

Bezpośredni lub pośredni efekt toksyczny TNF na śródbłonek naczyń guza prowadzący do zablokowania przepływu krwi jest jednak tylko jednym z czynników w przeciwnowotworowym działaniu TNF. Wskazują na to doświadczenia na modelu mięsaka MethA, w których jednoczesne podanie heparyny z TNF zapobiegające powstawaniu skrzepu nie wpływało na zahamowanie wzrostu guza, jego regresję czy powstawanie martwicy pod wpływem TNF [72]. Być może w działaniu TNF na naczynia guza ważniejszy jest efekt zwiększenia podatności guza na infiltrację przez komórki zapalne. Wskazują na to badania na dwóch mysich modelach: włók-

niaka BP i włókniaka S180. W obrębie guza BP przeważał wpływ TNF na unaczynienie guza, można było zaobserwować skrzepy śródnacyniowe. Natomiast w obrębie guza S180 obserwowany był także wzrost infiltracji guza przez komórki zapalne, a zwłaszcza granulocyty po podaniu TNF (w guzie BP infiltracji takiej nie było). Oba guzy wykazywały martwicę po podaniu doguzowym TNF, ale tylko guz S180 uległ całkowitej regresji. Stwierdzić można więc, że wpływ TNF na naczynia jest ważny dla efektu martwicy, ale do regresji guza konieczna jest jego infiltracja przez komórki zapalne [41].

W procesie infiltracji guza przez komórki układu immunologicznego ważną rolę odgrywa wpływ TNF na cząsteczkę adhezyjną VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*). Jest to cząsteczka typu immunoglobulinowego charakterystyczna dla aktywowanych komórek śródbłonka naczyniowego rozpoznająca m.in. integrynę VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$) występującą na monocytach, limfocytach i fibroblastach [122], a także na komórkach niektórych nowotworów [123, 124]. Molekuła adhezyjna VCAM-1 obecna na śródbłonku naczyń pośredniczy w diapedezie monocytów i limfocytów (przede wszystkim limfocytów T) [125, 122], a także prawdopodobnie odgrywa rolę w migracji CTL do przerzutów nowotworowych. Ekspresja VCAM-1 na komórkach śródbłonka naczyniowego ulega zwiększeniu pod wpływem TNF [125, 126, 124] w wyniku aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B [127].

TNF zwiększa ekspresję białek adhezyjnych VCAM-1 oraz ELAM-1 (*endothelial leukocyte adhesion molecule-1*) (selektyna E) (uczestniczy w diapedezie neutrofilii i monocytów) na śródbłonku naczyń guza nowotworowego [126, 128]. W obrębie guza traktowanego TNF w izolowanej perfuzji kończyn zwiększenie ekspresji tych cząstek na komórkach śródbłonka skorelowane było z nacieczeniem guza przez neutrofile (już po 3 godzinach), a także późniejszym nacieczeniem przez makrofagi oraz limfocyty B i T (po 7–19 dniach). Sugeruje to mechanizm, w którym TNF aktywuje śródbłonek naczyń guza powodując wzmożoną ekspresję cząstek adhezyjnych, co prowadzi do akumulacji PMN, uszkodzenia śródbłonka, a w końcu do martwicy krwotocznej nowotworu [126].

4. Modulacja aktywności neutrofilii przez czynnik martwicy guza

TNF nie tylko zwiększa nacieczenie guza nowotworowego przez komórki układu immunologicznego, ale także moduluje ich aktywność i w ten sposób wywiera efekt przeciwnowotworowy. Znaczenie tego wpływu można było ocenić w modelu szczurzego mięsaka BN 175, w którym guz znajdujący się na kończynie traktowano wysokimi dawkami TNF po odłączeniu krwiobiegu kończyny w izolowanej perfuzji kończyn (ILP). Po podaniu TNF można było zaobserwować wynacznienie i infiltrację guza przez neutrofile. Wywołanie silnej neutropenii za pomocą napromieniowania powodowało zaś utratę efektu przeciwnowotworowego TNF [129].

Mechanizm wpływu TNF na naczynia krwionośne w wyniku modulacji aktywności neutrofilii jest bardzo złożony. TNF indukuje migrację neutrofilii na komórkach śródbłonna w hodowli *in vitro* oraz aktywuje funkcje neutrofilii, takie jak: m.in. odpowiedź ADCC, produkcję leukotrienów, uwalnianie elastazy, tworzenie toksycznych produktów przemian tlenu (np. nadtlenku wodoru lub rodników tlenkowych) oraz przyleganie do śródbłonna, a także zwiększa ich aktywność fagocytarną [130, 131, 132, 133, 134]. TNF zwiększa także przyleganie neutrofilii do śródbłonna naczyniowego *in vitro* [135, 136] i podatność komórek śródbłonna na zniszczenie przez neutrofile [137]. Jest to wynik oddziaływania TNF zarówno na neutrofile, jak i na śródbłonek prawdopodobnie przez regulację ekspresji cząstek adhezyjnych [135, 136]. TNF wywołuje m.in. wzrost ekspresji cząstki adhezyjnej ICAM-1 na powierzchni komórek śródbłonna, która pośredniczy w wynaczynieniu krążących leukocytów [122] wskutek oddziaływania z integrzyną LFA-1 (*leukocyte functional antigen-1*) (CD11a/CD18) [138, 51] oraz integrzyną CR3 (CD11b/CD18) [139]. Natomiast przedłużony czas przylegania neutrofilii do podłoża jest warunkiem niezbędnym do uwolnienia przez te komórki produktów przemian tlenu (głównie nadtlenku wodoru) w procesie tzw. „wybuchu tlenowego” [140, 139]

W przypadku naczyń krwionośnych guza nowotworowego akumulacja neutrofilii zwykle towarzyszy ich uszkodzeniu. Po podaniu doguzowym TNF już po 6 godzinach można było zaobserwować nagromadzone neutrofile i zwiększone uszkodzenie komórek śródbłonna naczyń włosowatych guza. Komórki śródbłonna wykazywały przede wszystkim zagęszczenie cytoplazmy, utratę organelli i wakuolizację. Natomiast w naczyniach guzów zwierząt, którym nie podawano TNF, brak było akumulacji neutrofilii. Naczynia u tych zwierząt były także mniej uszkodzone. Stymulacja neutrofilii przez TNF może prowadzić więc do gromadzenia się neutrofilii w naczyniach guza, a następnie do zniszczenia śródbłonna przez uwalniane enzymy i produkty przemian tlenu [111]. TNF w obecności neutrofilii stymuluje także odrywanie się komórek śródbłonna naczyń od ich podścieliska [136]. Mechanizm ten może tłumaczyć, dlaczego zwiększenie przepuszczalności naczyń w wyniku podania TNF można wyeliminować przez podanie przeciwciał przeciwko neutrofilom [134]. Efekt zwiększenia przepuszczalności naczyń przez TNF jest wywierany przede wszystkim na naczynia guza i tylko w niewielkim stopniu dotyczy pozostałych naczyń organizmu [141, 142].

5. Wpływ TNF na proces tworzenia przerzutów w fazie inwazyjnej wzrostu nowotworów

Nie zawsze jednak oddziaływanie TNF na naczynia krwionośne, a zwłaszcza na ekspresję cząstek adhezyjnych jest korzystne w rozwoju choroby nowotworowej, szczególnie w jej fazie inwazyjnej. Cząsteczka adhezyjna VCAM-1 odgrywa rolę nie tylko w procesie naciekania guza przez komórki układu immunologicznego,

ale prawdopodobnie pełni także rolę cząsteczki adhezyjnej, która ułatwia osiedlanie się inwazyjnych komórek nowotworowych w narządach docelowych przez wpływ na przyleganie komórek nowotworowych do śródbłonka oraz na ich diapedezę i wynacznienie [143, 123, 122]. W modelu włóknia komięsaka u myszy podanie TNF na 5 godzin przed podaniem komórek nowotworowych wywoływało zwiększenie ilości przerzutów nowotworowych w płucach. Efekt ten był zależny od dawki oraz nie występował, gdy TNF był podawany po 24 godzinach od podania komórek nowotworowych [143]. Doświadczenia na modelu czerniaka B16-BL6 wykazały, że zwiększona liczba przerzutów do płuc korelowała ze wzrostem ekspresji VCAM-1 na komórkach śródbłonka naczyń płuc obserwowanym po 4 godzinach od podania TNF. Poziom przerzutów można było zmniejszyć nie tylko przez podanie przeciwciał neutralizujących TNF, ale także przeciwciał rozpoznających VCAM-1 i VLA-4, co wskazuje na ważną rolę oddziaływań VCAM-1 na komórkach śródbłonka z VLA-4 na komórkach nowotworowych w procesie tworzenia przerzutów [123, 124].

Natomiast w przypadku linii gruczolakoraków jelita grubego COLO 205 i HT-29 wykazano, że przyleganie tych komórek do śródbłonka zależne było od cząstki adhezyjnej ELAM-1 (selektyny E) (*endothelial leukocyte adhesion molecule-1*) i antygenów sjalo-Lewis^a (sLe^a) i sjalo-Lewis^x (sLe^x), natomiast TNF nasilał proces przylegania [144]. TNF regulował także *in vitro* przyleganie komórek raka trzustki do śródbłonka mediowany przez selektynę E i antygen sjalo-Lewis^a [145]. Antygeny płodowo-nowotworowe sjalo-Lewis^a i sjalo-Lewis^x są ligandami dla selektyn i odgrywają ważną rolę w tworzeniu przerzutów drogą krwionośną [146].

Modulacja ekspresji cząsteczek adhezyjnych zachodząca pod wpływem TNF może mieć różne konsekwencje dla procesu wzrostu nowotworu. W wyniku zwiększonego nacieczenia guza przez komórki układu immunologicznego TNF wywiera wpływ przeciwnowotworowy, natomiast w wyniku ułatwienia procesu osiedlania się komórek nowotworowych w narządach docelowych w procesie tworzenia przerzutów TNF może wywierać efekt pronowotworowy. Ostateczna wypadkowa działania TNF na ekspresję cząsteczek adhezyjnych może być zatem zależna od reaktywności immunologicznej gospodarza wobec nowotworu, a także od fazy rozwoju choroby nowotworowej, a w szczególności od zdolności nowotworu do tworzenia przerzutów.

Wpływ TNF na naczynia krwionośne guza nowotworowego jest niezależny od wrażliwości komórek nowotworowych na cytotoksyczne działanie TNF. Działanie TNF uszkodzające naczynia krwionośne guza stanowi więc najprawdopodobniej uniwersalny efekt przeciwnowotworowy tej cytokiny. Dokładne poznanie mechanizmu molekularnego oddziaływania TNF na komórki śródbłonka i procesy angiogenezy nowotworowej powinno przyczynić się do poprawienia efektów terapii z zastosowaniem TNF, a następnie szerszego zastosowania TNF w leczeniu nowotworów.

LITERATURA

- [1] KRÖNKE M, HENSEL G, SCHLÜTER C, SCHEURICH P, SCHÜTZE S, PFIZENMAIER K. Tumor necrosis factor and lymphotoxin gene expression in human tumor cell lines. *Cancer Res* 1988; **48**: 5417–5421.
- [2] LUGASSY C, ESCANDE J. Immunolocalization of TNF- α /cachectin in human melanoma cells: studies on co-cultivated malignant melanoma. *J Invest Dermatol* 1991; **96**: 238–242.
- [3] BEYAERT R, FIERIS W. Molecular mechanisms of tumor necrosis factor-induced cytotoxicity: what we understand and what we do not. *FEBS Lett* 1994; **340**: 9–16.
- [4] SMITH RA, BAGLIONI C. The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J Biol Chem* 1987; **262**: 6951–6954.
- [5] VILČEK J, LEE TH. Tumor necrosis factor – new insight into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem* 1991; **266**: 7313–7316.
- [6] KRIEGLER M, PEREZ C, DEFAY K, ALBERT I, LU SD. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 1988; **53**: 45–53.
- [7] SMITH C, FARRAH T, GOODWIN RG. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation and death. *Cell* 1994; **76**: 959–962.
- [8] SMITH RA, BAGLIONI C. Characterization of TNF receptors. AGGARWAL, VILČEK (red.) Tumor necrosis factor. Structure, function and mechanism of action. Marcel Dekker Inc., New York Basel Hong Kong, 1992: 3–34.
- [9] TARTAGLIA LA, GOEDDEL DV. Two TNF receptors. *Immunol Today* 1992; **13**: 151–153.
- [10] KEHRL J, MILLER A., FAUCI AS. Effect of tumor necrosis factor- α on mitogen-activated human B cells. *J Exp Med* 1987; **166**: 786–791.
- [11] SCHEURICH P, THOMAS B, UCER U. Immunoregulatory activity of recombinant human tumor necrosis factor (TNF)- α : induction of TNF receptors on human T-cells and TNF- α mediated enhancement of T cell responses. *J Immunol* 1987; **138**: 1786–1790.
- [12] VOTH R, ROSSOL S, GALLATI H, PRACHT I, LAUBENSTEIN HP., HESS G, MÜLLER WEG, SCHRÖDER HC, JOCHUM C, MEYER ZUM BÜSCHENFELDE KH. *In vivo* and *in vitro* induction of natural killer cells by cloned human tumor necrosis factor. *Cancer Immunol Immunother* 1988; **27**: 128–132.
- [13] PFIZENMAIER K, SCHEURICH P, SCHULTER C, KRONKE M. Tumor necrosis factor enhances HLA A, B, C, and HLA DR gene expression in human tumor cells. *J Immunol* 1987; **138**: 975–980.
- [14] ROTHSTEIN R, CZAJKOWSKIM, ONEILL MM, MARLIN SD, MAINOFFE, MERLUZZI VJ. Induction of intercellular adhesion molecule-1 on primary and continuous cell lines by pro-inflammatory cytokines: regulation by pharmacologic agents and neutralizing antibodies. *J Immunol* 1988; **141**: 1665–1669.
- [15] DAYER J, BEUTLER B, CERAMI A. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E₂ production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med* 1985; **162**: 2163–2168.
- [16] BEN-EFRAIM S. Interactions between macrophage cytokines and eicosanoids in expression of antitumor activity. *Mediators Inflammation* 1992; **1**: 295–308.
- [17] ZHANG YH, LIN JX, YIP YK, VILČEK J. Enhancement of cAMP levels and of protein kinase activity by tumor necrosis factor and interleukin 1 in human fibroblasts: role in the induction of interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 6802–6805.
- [18] LARSEN CG, ANDERSON AO, OPPENHEIM JJ, MATSUSHIMA K. Production of interleukin-8 by human dermal fibroblasts and keratinocytes in response to interleukin-1 or tumor necrosis factor. *Immunology* 1989; **68**: 31–36.

- [19] TRACEY KJ, WEI H, MANOGUE KR, FONG Y, HESSE DG, NGUYEN HT, KUO GC, BEUTLER B, COTRAN RS, CERAMI A, LOWRY SF. Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation. *J Exp Med* 1988; **167**: 1211–1227.
- [20] TRACEY KJ, FONG Y, HESSE DG, MANOGUE KR, LEE A, KUO GC, LOWRY SF, CERAMI A. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteremia. *Nature* 1987; **330**: 662–664.
- [21] OLIFF A, DEFEO-JONES D, BOYER M, MARTINEZ D, KIEFER D, VUOCOLO G, WOLFE A, SOCHER SH. Tumors secreting human TNF/cachectin induce cachexia in mice. *Cell* 1987; **50**: 555–563.
- [22] CARSWELL EA, OLD LJ, KASSEL RL, GREEN S, FIORE N, WILLIAMSON B. An endotoxin-induced serum factor causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; **72**: 3666–3670.
- [23] OETTGEN HF, CARSWELL EA, KASSEL RL, FIORE N, WILLIAMSON B, HOFFMANN MK, HARANAKA K, OLD LJ. Endotoxin-induced tumor necrosis factor. Recent Results. *Cancer Res* 1980; **75**: 207–212.
- [24] OLD LJ. Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 1985; **230**: 630–632.
- [25] HARANAKA K, CARSWELL EA, WILLIAMSON BD, PRENDERGAST JS, SATOMI N, OLD LJ. Purification, characterization, and antitumor activity of nonrecombinant mouse tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 3949–3953.
- [26] KOSZALKA P, BREZA H, BIGDA J. Cloning, expression, purification of rat tumor necrosis factor and demonstration of its antitumor activity in Bomirski amelanotic melanoma. *Neoplasma* 1998; **45**: 162–168.
- [27] LIENARD D, EWALENKO P, DELMOTTE JJ, RENARD N, LEJEUNE FJ. High-dose recombinant tumor necrosis factor alpha in combination with interferon gamma and melphalan in isolation perfusion of the limbs for melanoma and sarcoma. *J Clin Oncol* 1992; **10**: 52.
- [28] LEJEUNE F, LIENARD D, EGGERMONT A, SCHRAFFORDT KOOPS H, ROSENKAIMER F, GERAIN J, KLAASE J, KROON B, VANDERVEKEN J, SCHMITZ P. Rationale for using TNF alpha and chemotherapy in regional therapy of melanoma. *J Cell Biochem* 1994; **56**: 52–61.
- [29] LEJEUNE F, LIENARD D, EGGERMONT A, SCHRAFFORDT KOOPS H, ROSENKAIMER F, GERAIN J, KLAASE J, KROON B, VANDERVEKEN J, SCHMITZ P. Administration of high-dose tumor necrosis factor alpha by isolation perfusion of the limbs. Rationale and results. *J Infusion Chemother* 1995; **5**: 73–81.
- [30] EGGERMONT AM, SCHRAFFORDT KOOPS H, LIENARD D, KROON BB, VAN GEEL AN, HOEKSTRA HJ, LEJEUNE FJ. Isolated limb perfusion with high-dose tumor necrosis factor-alpha in combination with interferon-gamma and melphalan for nonresectable extremity soft tissue sarcomas: a multicenter trial. *J Clin Oncol* 1996; **14**: 2653–2665.
- [31] EGGERMONT AM, SCHRAFFORDT KOOPS H, KLAUSNER JM, LIENARD D, KROON BB, SCHLAG PM, BEN-ARI G, LEJEUNE FJ. Isolation limb perfusion with tumor necrosis factor alpha and chemotherapy for advanced extremity soft tissue sarcomas. *Semin Oncol* 1997; **24**: 547–555.
- [32] SUGARMAN BJ, AGGARWAL BB, HASS PE, FIGARI IS, PALLADINO MA, SHEPARD HM. Recombinant human tumor necrosis factor- α : effects on proliferation of normal and transformed cells *in vitro*. *Science* 1985; **230**: 943–945.
- [33] TOMAZIC VJ, FARHA M, LOFTUS A, ELIAS EG. Anti-tumor activity of recombinant tumor necrosis factor on mouse fibrosarcoma *in vivo* and *in vitro*. *J Immunol* 1988; **140**: 4056–4061.
- [34] LASTER SM, WOOD JG, GOODING LR. Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic forms of cell lysis. *J Immunol* 1988; **141**: 2629–2634.
- [35] GROOTEN J, GOOSSENS V, VANHAESEBROECK B, FIERS W. Cell membrane permeabilization and cellular collapse, followed by loss of dehydrogenase activity: early events in tumor necrosis factor-induced cytotoxicity. *Cytokine* 1993; **5**: 546–555.

- [36] WATANABE N, NEDA H, OHTUSUKA Y, SONE H, YAMAUCHI N, MAEDA M, KURIYAMA H, NIITSU Y. Signalling pathway of tumor necrosis factor in normal and tumor cells. *Cancer Immunol Immunother* 1989; **28**: 157–163.
- [37] RUGGIERO V, LATHAM K, BAGLIONI C. Cytostatic and cytotoxic activity of tumor necrosis factor on human cancer cells. *J Immunol* 1987; **138**: 2711–2717.
- [38] TSUJIMOTO M, YIP YK, VILČEK J. Tumor necrosis factor: specific binding and internalization in sensitive and resistant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 7626–7630.
- [39] WATANABE N, NIITSU Y, YAMAUCHI N, NEDA H, SONE H, MAEDA M, URUSHIZAKI I. Cell cycle specificity of tumor necrosis factor and its receptor. *Cell Biol Int Rep* 1987; **11**: 813–817.
- [40] RYCHLY J, KNIPPEL E, KRYGIER-STOJALOWSKA A, NIZZE H, KUCHNO M, KRAEFT S. DNA cytometric and histologic findings in mouse tumors (BP and S 180) with different response to treatment with tumor necrosis factor. *Acta Oncol* 1990; **29**: 47–51.
- [41] HARANAKA K, SATOMI N, SAKURAI A. Antitumor activity of murine tumor necrosis factor (TNF) against transplanted murine tumors and heterotransplanted human tumors in nude mice. *Int J Cancer* 1984; **34**: 263–267.
- [42] ASAMI T, IMAI M, TANAKA Y, HOSAKA Y, KATO K, NAKAMURA N, HORISAWA Y, ASHIDA Y, KANAMORI T, NOBUHARA M, KURIMOTO M. *In vivo* antitumor mechanism of natural human tumor necrosis factor involving a T cell-mediated immunological route. *Jpn J Cancer Res* 1989; **80**: 1161–1164.
- [43] HAVELL EA, FIERS W, NORTH RJ. The antitumor function of tumor necrosis factor (TNF). Therapeutic action of TNF against an established murine sarcoma is indirect, immunologically dependent, and limited by severe toxicity. *J Exp Med* 1988; **167**: 1067–1085.
- [44] NORTH RJ, HAVELL EA. The antitumor function of tumor necrosis factor (TNF). Analysis of the role of endogenous TNF in endotoxin-induced hemorrhagic necrosis and regression of an established sarcoma. *J Exp Med* 1988; **167**: 1086–1099.
- [45] ASHER AL, MULE JJ, ROSENBERG SA. Recombinant human tumor necrosis factor mediates regression of a murine sarcoma *in vivo* via Lyt-2⁺ cells. *Cancer Immunol Immunother* 1989; **28**: 153–156.
- [46] NORTH RJ. The therapeutic significance of concomitant antitumor immunity. II. Passive transfer of concomitant immunity with Ly-1+2- T cells primes established tumors in T cell-deficient recipients for endotoxin-induced regression. *Cancer Immunol Immunother* 1984; **18**: 75–79.
- [47] HORI K, EHRKE MJ, MACE K, MACCUBIN D, DOYLE MJ, OTSUKA Y, MIHICH E. Effect of recombinant human tumor necrosis factor on the induction of murine macrophage tumoricidal activity. *Cancer Res* 1987; **47**: 2793–2798.
- [48] HORI K, EHRKE MJ, MACE K, MIHICH E. Effect of recombinant tumor necrosis factor on tumoricidal activation of murine macrophages: synergism between tumor necrosis factor and gamma-interferon. *Cancer Res* 1987; **47**: 5868–5874.
- [49] MACE KF, EHRKE MJ, HORI K, MACCUBBIN DL, MIHICH E. Role of tumor necrosis factor in macrophage activation and tumoricidal activity. *Cancer Res* 1988; **48**: 5427–5432.
- [50] TALMADGE JE, PHILLIPS H, SCHNEIDER M, ROWE T, PENNINGTON R, BOWERSOX O, LENZ B. Immunomodulatory properties of recombinant murine and human tumor necrosis factor. *Cancer Res* 1988; **48**: 544–550.
- [51] VÁNKY F, WANG P, PATARROYO M, KLEIN E. Expression of the adhesion molecule ICAM-1 and major histocompatibility complex class I antigens on human tumor cells is required for their interaction with autologous lymphocytes *in vitro*. *Cancer Immunol Immunother* 1990; **31**: 19–27.
- [52] WEBB DSA, MOSTOWSKI HS, GERRARD TL. Cytokine-induced enhancement of ICAM-1 expression results in increased vulnerability of tumor cells to monocyte-mediated lysis. *J Immunol* 1991; **146**: 3682–3686.

- [53] JONJIC N, ALBERTI S, BERNASCONI S, PERI G, JÍLEK P, ANICHINI A, PARMIANI G, MANTOVANI A. Heterogeneous susceptibility of human melanoma clones to monocyte cytotoxicity: role of ICAM-1 defined by antibody blocking and gene transfer. *Eur J Immunol* 1992; **22**: 2255–2260.
- [54] ØSTENSEN ME, THIELE DL, LIPSKY PE. Tumor necrosis factor-alpha enhances cytolytic activity of human natural killer cells. *J Immunol* 1987; **138**: 4185–4191.
- [55] HIEBER U, HEIM ME. Tumor necrosis factor for the treatment of malignancies. *Oncology* 1994; **51**: 142–153.
- [56] HANNA N, BURTON RC. Definitive evidence that natural killer (NK) cells inhibit experimental tumor metastases *in vivo*. *J Immunol* 1981; **127**: 1754–1758.
- [57] SMYTH MJ, KELLY JM, BAXTER AG, KÖRNER H, SEDGWICK JD. An essential role for tumor necrosis factor in natural killer cell-mediated tumor rejection in the peritoneum. *J Exp Med* 1998; **188**: 1611–1619.
- [58] TIMONEN T, PATARROYO M, GAHMBERG CG. CD11a-c/CD18 and GP84 (LB-2) adhesion molecules on human large granular lymphocytes and their participation in natural killing. *J Immunol* 1988; **141**: 1041–1046.
- [59] FIGDOR CG, VAN KOOYK Y, KEIZER GD. On the mode of action of LFA-1. *Immunol Today* 1990; **11**: 277–280.
- [60] STORKUS WJ, DAWSON JR. Target structures involved in natural killing (NK): characteristics, distribution, and candidate molecules. *Crit Rev Immunol* 1991; **10**: 393–416.
- [61] KIST A, HO AD, RATH U, WIEDENMANN B, BAUER A, SCHLICK E, KIRCHNER H, MÄNNEL DN. Decrease of natural killer cell activity and monokine production in peripheral blood of patients treated with recombinant tumor necrosis factor. *Blood* 1988; **72**: 344–348.
- [62] PARHAR RS, LALA PK. Changes in the host natural killer cell population in mice during tumor development. 2. The mechanism of suppression of NK activity. *Cell Immunol* 1985; **93**: 265–279.
- [63] BACHWICH PR, CHENSUE SW, LARRICK JW, KUNKEL SL. Tumor necrosis factor stimulates interleukin-1 and prostaglandin E2 production in resting macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; **136**: 94–101.
- [64] STORKUS WJ, HOWELL DN, SALTER RD, DAWSON JR, CRESSWELL P. NK susceptibility varies inversely with target cell class I HLA antigen expression. *J Immunol* 1987; **138**: 1657–1659.
- [65] PALMIERI G, MORRONE S, LOLLINI PL, DE GIOVANNI C, NICOLETTI G, NANNI P, FRATI L, SANTONI A. TNF impairs *in vivo* and *in vitro* natural killer (NK) susceptibility of B16 melanoma cells. *Scand J Immunol* 1992; **35**: 279–287.
- [66] MULÉ JJ, ASHER A, MCINTOSH J, LAFRENIERE R, SHILONI E, LEFOR A, REICHERT CM, ROSENBERG SA. Antitumor effect of recombinant tumor necrosis factor- against murine sarcomas at visceral sites: tumor size influences the response to therapy. *Cancer Immunol Immunother* 1988; **26**: 202–208.
- [67] PALLADINO MA Jr, SHALABY MR, KRAMER SM, FERRAILOLO BL, BAUGHMAN RA, DELEO AB, CRASE D, MARAFINO B, AGGARWAL BB, FIGARI IS, LIGGITT D, PATTON JS. Characterization of the antitumor activities of human tumor necrosis factor- α and the comparison with other cytokines: induction of tumor-specific immunity. *J Immunol* 1987; **138**: 4023–4032.
- [68] SATO N, GOTO T, HARANAKA K, SATOMI N, NARIUCHI H, MANO-HIRANO Y, SAWASAKI Y. Actions of tumor necrosis factor on cultured vascular endothelial cells: morphologic modulation, growth inhibition, and cytotoxicity. *J Natl Cancer Inst* 1986; **76**: 1113–1121.
- [69] SUAREZ-HUERTA N, LECOCQ R, MOSSELMANS R, GALAND P, DUMONT JE, ROBAYE B. Myosin heavy chain degradation during apoptosis in endothelial cells. *Cell Prolif* 2000; **33**: 101–114.

- [70] SCHWEIGERER L, MALERSTEIN B, GOSPODAROWICZ D. Tumor necrosis factor inhibits the proliferation of cultured capillary endothelial cells. *Biochem Biophys Res Comm* 1987; **143**: 997–1004.
- [71] KAWAI T, SATOMI N, SATO N, SAKURAI A, HARANAKA K, GOTO T, SUZUKI M. Necrotizing activity of tumor necrosis factor: histopathological investigation using Meth A sarcoma and granulation tissue. *Virchows Arch B* 1987; **53**: 353–358.
- [72] WATANABE N, NIITSU Y, UMENO H, KURIYAMA H, NEDA H, OHTUSUKA Y, YAMAUCHI N, MAEDA M, URUSHIZAKI I. Toxic effect of tumor necrosis factor on tumor vasculature in mice. *Cancer Res* 1988; **48**: 2179–2183.
- [73] KURODA K, MIYATA K, TSUTSUMI Y, TSUNODA S, NISHIMURA K, MITSUISHI Y, NAKAGAWA S, MAYUMI T. Preferential activity of wild-type and mutant tumor necrosis factor- α against tumor-derived endothelial-like cells. *Jpn J Cancer Res* 2000; **91**: 59–67.
- [74] DENEKAMP J. Vascular endothelium as the vulnerable element of tumors. *Acta Radiol Oncol* 1984; **23**: 217–225.
- [75] HOBSON B, DENEKAMP J. Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies. *Br J Cancer* 1984; **49**: 405–413.
- [76] CLAUSS M, MURRAY JC, VIANNA M, DE WAAL R, THURSTON G, NAWROTH P, GERLACH H, BACH R, FAMILLETTI PC, STERN D. A polypeptide factor produced by fibrosarcoma cells that induces endothelial tissue factor and enhances the procoagulant response to tumor necrosis factor/cachectin. *J Biol Chem* 1990; **265**: 7078–7083.
- [77] CLAUSS M, GERLACH M, GERLACH H, BRETT J, WANG F, FAMILLETTI PC, PAN YC, OLANDER JV, CONNOLLY DT, STERN D. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med* 1990; **172**: 1535–1545.
- [78] KAO J, RYAN J, BRETT G, CHEN J, SHEN H, FAN YG, GODMAN G, FAMILLETTI PC, WANG F, PAN YC. Endothelial monocyte-activating polypeptide II. A novel tumor-derived polypeptide that activates host-response mechanisms. *J Biol Chem* 1992; **267**: 20239–20247.
- [79] TAS MP, MURRAY JC. Endothelial-monocyte-activating polypeptide II. *Int J Biochem Cell Biol* 1996; **28**: 837–841.
- [80] TAS M, HOUGHTON, JAKOBSEN AM, TOLMACHOVA T, CARMICHAEL J, MURRAY JC. Cloning and expression of human endothelial-monocyte-activating polypeptide 2 (EMAP-2) and identification of its putative precursor. *Cytokine* 1997; **9**: 535–539.
- [81] WU PC, ALEXANDER HR, HUANG J, HWU P, GNANT M, BERGER AC, TURNER E, WILSON O, LIBUTTI SK. *In vivo* sensitivity of human melanoma to tumor necrosis factor (TNF)- α is determined by tumor production of the novel cytokine endothelial-monocyte activating polypeptide II (EMAPII). *Cancer Res* 1999; **59**: 205–212.
- [82] KNIES UE, BEHRENSDORF HA, MITCHELL CA, DEUTSCH U, RISAU W, DREXLER HCA, CLAUSS M. Regulation of endothelial monocyte-activating polypeptide II release by apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **89**: 12322–12327.
- [83] SCHWARZ M, LEE M, ZHANG F, ZHAO J, JIN Y, SMITH S, BHUVA J, STERN D, WARBURTON D, STARNES V. EMAP II: a modulator of neovascularization in the developing lung. *Am J Physiol* 1999; **276**: L365–375.
- [84] ZHANG F, SCHWARZ MA. Temporo-spatial distribution of endothelial-monocyte activating polypeptide II, an anti-angiogenic protein, in the mouse embryo. *Dev Dyn* 2000; **218**: 490–498.
- [85] BEHRENSDORF HA, VAN DE CRAEN M, KNIES UE, VANDENABEELE P, CLAUSS M. The endothelial monocyte-activating polypeptide II (EMAP II) is a substrate for caspase-7. *FEBS Lett* 2000; **466**: 143–147.
- [86] KAO J, HOUCK K, FAN Y, HAEHNEL I, LIBUTTI SK, KAYTON ML, GRIKSCHEIT T, CHABOT J, NOWYGRAD R, GREENBERG S, KUANG W, LEUNG D, HAYWARD J, KISIEL W, HEATH M, BRETT J, STERN D. Characterization of a novel tumor-derived

- cytokine. Endothelial-monocyte activating polypeptide II. *J Biol Chem* 1994; **269**: 25106–25119.
- [87] GNANT MF, BERGER AC, HUANG J, PUHLMANN M, WU PC, MERINO MJ, BARTLETT DL, ALEXANDER HR Jr, LIBUTTI SK. Sensitization of tumor necrosis factor alpha-resistant human melanoma by tumor-specific *in vivo* transfer of the gene encoding endothelial monocyte-activating polypeptide II using recombinant vaccinia virus. *Cancer Res* 1999; **59**: 4668–4674.
- [88] MARVIN MR, LIBUTTI SK, KAYTON M, KAO J, HAYWARD J, GRIKSCHIT T, FAN Y, BRETT J, WEINBERG A, NOWYGRAD R, LOGERFO P, FEIND C, HANSEN KS, SCHWARTZ M, STERN D, CHABOT J. A novel tumor-derived mediator that sensitizes cytokine-resistant tumors to tumor necrosis factor. *J Surg Res* 1996; **63**: 248–255.
- [89] LIBUTTI S, VARGAS H, WU P, TURNER E, BARTLETT D, ELIOT H, BROWN C, WONG G, STERN D, FRAKER D, ALEXANDER HR. Endothelial monocyte activating polypeptide II (EMAP II) induces expression of tumor necrosis factor (TNF) receptor P55 (R1) by endothelial cells. *Proc Soc Surg Oncol* 1997; **70**: 24.
- [90] WU PC, BERGER AC, HUANG J, GNANT M, TURNER E, ALEXANDER HR, LIBUTTI SK. *In vivo* tumors that overexpress endothelial monocyte-activating polypeptide II demonstrate upregulation of tumor necrosis factor receptor p55 on tumor neovasculature. *Surg Forum* 1998; **49**: 436–438.
- [91] BERGER AC, ALEXANDER HR, WU PC, TANG G, GNANT MF, MIXON A, TURNER ES, LIBUTTI SK. Tumour Necrosis Factor Receptor I (p55) is upregulated on endothelial cells by exposure to the tumour-derived cytokine Endothelial Monocyte-Activating Polypeptide II (EMAP-II). *Cytokine* 2000; **12**: 992–1000.
- [92] LEIBOVICH SJ, POLVERINI PJ, SHEPARD HM, WISEMAN DM, SHIVELY V, NUSEIR N. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. *Nature* 1987; **329**: 630–632.
- [93] MAHADEVAN V, HART IR, LEWIS GP. Factors influencing blood supply in wound granuloma quantitated by a new *in vivo* technique. *Cancer Res* 1989; **49**: 415–419.
- [94] FAJARDOLF, KWAN HH, KOWALSKI J, PRIONAS SD, ALLISON AC. Dual role of tumor necrosis factor- α in angiogenesis. *Am J Pathol* 1992; **140**: 539–544.
- [95] YOSHIDA S, ONO M, SHONO T, IZUMI H, ISHIBASHI T, SUZUKI H, KUWANO M. Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol Cell Biol* 1997; **17**: 4014–4023.
- [96] TORISU H, ONO M, KIRYU H, FURUE M, OHMOTO Y, NAKAYAMA J, NIHIOKA Y, SONE S, KUWANO M. Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNFalpha and IL-1alpha. *Int J Cancer* 2000; **85**: 182–188.
- [97] RÜEGG C, YILMAZ A, BIELER G, BAMAT J, CHAUBERT P, LEJEUNE FJ. Evidence for the involvement of endothelial cell integrin $\alpha V\beta 3$ in the disruption of the tumor vasculature induced by TNF and IFN- γ . *Nature Medicine* 1998; **4**: 408–414.
- [98] BROOKS PC, CLARK RA, CHERESH DA. Requirement of vascular integrin $\alpha V\beta 3$ for angiogenesis. *Science* 1994; **264**: 569–571.
- [99] MAX R, GERRITSEN RR, NOOIJEN PT, GOODMAN SL, SUTTER A, KEIHOZL U, RUITER DJ, DE WAAL RM. Immunohistochemical analysis of integrin $\alpha V\beta 3$ expression on tumor-associated vessels of human carcinomas. *Int J Cancer* 1997; **72**: 706–707.
- [100] CHERESH DA. Structure, function and biological properties of integrin $\alpha V\beta 3$ on human melanoma cells. *Cancer Metastasis Rev* 1991; **10**: 3–10.
- [101] BYZOVA TV, RABBANI R, DSOUZA SE, PLOW EF. Role of integrin $\alpha V\beta 3$ in vascular biology. *Thrombosis Haemost* 1998; **80**: 726–734.

- [102] BROOKS PC, MONTGOMERY AM, ROSENFELD M, REISFELD RA, HU T, KLIER G, CHERESH DA. Integrin $\alpha\beta 3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 1994; **79**: 1157–1164.
- [103] FRISCH SM, FRANCIS H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 1994; **124**: 619–626.
- [104] STROMBLAD S, BECKER JC, YEBRA M, BROOKS PC, CHERESH DA. Suppression of p53 activity and p21 WAF1/CIP1 expression by vascular cell integrin $\alpha\beta 3$ during angiogenesis. *J Clin Invest* 1996; **98**: 426–433.
- [105] CURTIS TM, ROTUNDO RF, VINCENT PA, McKEOWN-LONGO PJ, SABA TM. TNF- α -induced matrix Fn disruption and decreased endothelial integrity are independent of Fn proteolysis. *Am J Physiol* 1998; **275**: L126–138.
- [106] NAWROTH PP, BANK I, HANDLEY D, CASSIMERIS J, CHESS L, STERN D. Tumor necrosis factor/cachectin interacts with endothelial cell receptors to induce release of interleukin 1. *J Exp Med* 1986; **163**: 1363–1375.
- [107] NAWROTH P, HANDLEY D, ESMON CT, STERN DM. Interleukin 1 induces endothelial cell procoagulant while suppressing cell-surface anticoagulant activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 3460–3464.
- [108] NOOIJEN PTGA, MANUSAMA ER, EGGERMONT AMM, SCHALKWIJK L, MARQUET RL, DE WAAL RMW, RUITER DJ. Synergistic effects of TNF- α and melphalan in an isolated limb perfusion model of rat sarcoma: a histopathological, immunohistochemical and electron microscopical study. *Br J Cancer* 1996; **74**: 1908–1915.
- [109] NAWROTH P, HANDLEY D, MATSUEDA G, DE WAAL R, GERLACH H, BLOHM D, ESMON CT, STERN D. Tumor necrosis factor/cachectin-induced intravascular fibrin formation in Meth A fibrosarcomas. *J Exp Med* 1988; **168**: 637–647.
- [110] KAWAI T, SATOMI N, SATO N, SAKURAI A, HARANAKA K, GOTO T, SUZUKI M. Effects of tumor necrosis factor (TNF) on transplanted tumors induced by methylcholanthrene in mice. A histopathologic study. *Virchows Arch [Cell Pathol]* 1987; **52**: 489–500.
- [111] SRINIVASAN JM, FAJARDO LF, HAHN GM. Mechanisms of antitumor activity of tumor necrosis factor α with hyperthermia in a tumor necrosis factor α -resistant tumor. *J Nat. Cancer Inst* 1990; **82**: 1–04-1910.
- [112] ZHANG Y, DEND Y, WENDT T, LILIENSIEK B, BIERHAUS A, GRETEN J, HE W, CHEN B, HACH-WUNDERLE V, WALDHERR R, ZIEGLER E, MÄNNEL D, STERN DM, NAWROTH PP. Intravenous somatic gene transfer with antisense tissue factor restores blood flow by reducing tumor necrosis factor-induced tissue factor expression and fibrin deposition in mouse Meth-A sarcomas. *J Clin Invest* 1996; **97**: 2213–2224.
- [113] CAMERA M, GIESEN PL, FALLON J, AUFIERO BM, TAUBMAN M, TREMOLI E, NEMERSON Y. Cooperation between VEGF and TNF- α is necessary for exposure of active tissue factor on the surface of human endothelial cells. *Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biol* 1999; **19**: 531–537.
- [114] RENARD N, NOOIJEN PTGA, SCHALKWIJK L, MARQUET RL, DE WAAL RMW, EGGERMONT AMM, LIÉNARD D, KROON BBR, LEJEUNE FJ, RUITER DJ. vWF release and platelet aggregation in human melanoma after perfusion with TNF- α . *J Pathol* 1995; **174**: 279–287.
- [115] BOEHME MWJ, DENG Y, RAETH U, BIERHAUS A, ZIEGLER R, STREMMEL W, NAWROTH PP. Release of thrombomodulin from endothelial cells by concerted action of TNF- α and neutrophils: *in vivo* and *in vitro* studies. *Immunology* 1996; **87**: 134–140.
- [116] ESMON CT, ESMON NL, HARRIS KW. Complex formation between thrombin and thrombomodulin inhibits both thrombin-catalyzed fibrin formation and factor V activation. *J Biol Chem* 1982; **257**: 7944–7947.

- [117] LENTZ SR, TSIANG M, SADLER JE. Regulation of trombosmodulin by tumor necrosis factor- α : comparison of transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Blood* 1991; **77**: 542–550.
- [118] RAIFE TJ, DEMETROULIS EM, LENTZ SR. Regulation of thrombosmodulin expression by all-trans retinoic acid and tumor necrosis factor- α : differential responses in keratinocytes and endothelial cells. *Blood* 1996; **88**: 2043–2049.
- [119] CONWAY EM, ROSENBERG RD. Tumor necrosis factor supresses transcription of the thrombosmodulin gene in endothelial cells. *Mol Cell Biol* 1988; **8**: 5588–5592.
- [120] VAN HINSBERGH VWM, KOOISTRA T, VAN DEN BERG EA, PRINCEN HMG, FIERIS W, EMEIS JJ. Tumor necrosis factor increases the production of plasminogen activator inhibitor in human endothelial cells *in vitro* and in rats *in vivo*. *Blood* 1988; **72**: 1467–1473.
- [121] DOSNE AM, DUBOR F, LUTCHER F, PARANT M, CHEDID L. Tumor necrosis factor (TNF) stimulates plasminogen activator inhibitor (PAI) production by endothelial cells and decreases blood fibrinolytic activity in the rat. *Thrombosis Res Suppl* 1988; **8**: 115–122.
- [122] JANIĄK MK. Rola receptorów adhezyjnych w powstawaniu przerzutów nowotworowych. *Central-European J Immunol* 1996; **21**: S63–S83.
- [123] OKAHARA H, YAGITA H, MIYAKE K, OKUMURA K. Involvement of very late activation antigen 4 (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) in tumor necrosis factor α enhancement of experimental metastasis. *Cancer Res* 1994; **54**: 3233–3236.
- [124] HIGASHIYAMA A, WATANABE H, OKUMURA K, YAGITA H. Involvement of tumor necrosis factor α and very late activation antigen 4/vascular cell adhesion molecule 1 interaction in surgical-stress-enhanced experimental metastasis. *Cancer Immunol Immunother* 1996; **31**: 231–236.
- [125] BRISCOE DM, COTREN RS, POBER JS. Effects of tumor necrosis factor, lipopolysaccharide, and IL-4 on the expression of vascular cell adhesion molecule-1 *in vivo*. Correlation with CD4⁺ T cell infiltration. *J Immunol* 1992; **149**: 2954–2960.
- [126] RENARD N, LIÉNARD D, LESPAGNARD L, EGGERMONT AMM, HEIMANN R, LEJEUNE FJ. Early endothelium activation and polymorphonuclear cell invasion precede specific necrosis of human melanoma and sarcoma treated by intravascular high-dose tumor necrosis factor alpha (rTNF alpha). *Int J Cancer* 1994; **57**: 656–663.
- [127] WEBER C, ERL W, PIETSCH A, STRÖBEL M, ZIEGLER-HEITBROCK HWL, WEBER PC. Antioxidants inhibit monocyte adhesion by suppressing nuclear factor- κ B mobilization and induction of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells stimulated to generate radicals. *Arteriosclerosis Thrombosis* 1994; **14**: 1665–1673.
- [128] NOOIJEN PT, EGGERMONT AM, VERBEEK MM, SCHALKWIJK L, BUURMAN WA, DE WAAL RM, RUITER DJ. Transient induction of E-selectin expression following TNF alpha-based isolated limb perfusion in melanoma and sarcoma patients is not tumor specific. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1996; **19**: 33–44.
- [129] MANUSAMA ER, NOOIJEN PT, STAVAST J, DE WILT JH, MARQUET RL, EGGERMONT AM. Assessment of the role of neutrophils on the antitumor effect of TNFalpha in an *in vivo* isolated limb perfusion model in sarcoma-bearing brown Norway rats. *J Surg Res* 1998; **78**: 169–175.
- [130] SHALABY MR, PALLADINO MA Jr, HIRABAYASHI SE, EESSALU TE, LEWIS GD, SHEPARD HM, AGGARWAL BB. Receptor binding and activation of polymorphonuclear neutrophils by tumor necrosis factor- α . *J Leukoc Biol* 1987; **41**: 196–204.
- [131] KLEBANOFF SJ, VADAS MA, HARLAN JM, SPARKS LH, GAMBLE JR, AGOSTI JM, WALTERSDORPH AM. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. *J Immunol* 1986; **136**: 4220–4225.
- [132] TSUJIMOTOM, YOKOTA S, VILČEK J, WEISSMANN G. Tumor necrosis factor provokes superoxide anion generation from neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; **137**: 1094–1100.

- [133] BERKOW RL, WANG D, LARRICK JW, DODSON RW, HOWARD TH. Enhancement of neutrophil superoxide production by preincubation with recombinant human tumor necrosis factor. *J Immunol* 1987; **139**: 3783–3791.
- [134] ABE Y, SEKIYA S, YAMASITA T., SENDO F. Vascular hyperpermeability induced by tumor necrosis factor and its augmentation by IL-1 and IFN- γ is inhibited by selective depletion of neutrophils with a monoclonal antibody. *J Immunol* 1990; **145**: 2902–2907.
- [135] GAMBLE JR, HARLAN JM, KLEBANOFF SJ, VADAS MA. Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 8667–8671.
- [136] VON ASMUTH EJU, LEEUWENBERG JFM, VAN DER LINDEN CJ, BUURMAN WA. Tumour necrosis factor- α induces neutrophil-mediated injury of cultured human endothelial cells. *Scand J Immunol* 1991; **34**: 197–206.
- [137] VARANI J, BENDELOW MJ, SEALEY DE, KUNKEL SL, GANNON DE, RYAN US, WARD PA. Tumor necrosis factor enhances susceptibility of vascular endothelial cells to neutrophil-mediated killing. *Lab Invest* 1988; **59**: 292–295.
- [138] MARLIN SD, SPRINGER TA. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1). *Cell* 1987; **51**: 813–819.
- [139] VON ASMUTH EJ, VAN DER LINDEN CJ, LEEUWENBERG JF, BUURMAN WA. Involvement of the CD11b/CD18 integrin, but not of the endothelial cell adhesion molecules ELAM-1 and ICAM-1 in tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil toxicity. *J Immunol* 1991; **147**: 3869–3875.
- [140] NATHAN CF. Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. *J Clin Invest* 1987; **80**: 1550–1560.
- [141] FOLLI S, PÉLEGRIN A, CHALANDON Y, YAO X, BUCHEGGER F, LIENARD D, LEJEUNE F, MACH J. Tumor-necrosis factor can enhance radio-antibody uptake in human colon carcinoma xenografts by increasing vascular permeability. *Int J Cancer* 1993; **53**: 829–836.
- [142] ROWLINSON-BUSZA G, MARAVEYAS A, EOPENETOS AA. Effect of tumor necrosis factor on the uptake of specific and control monoclonal antibodies in a human xenograft model. *Br J Cancer* 1995; **71**: 660–665.
- [143] OROSZ P, ECHTENACHER B, FALK W, RÜSCHOFF J, WEBER D, MÄNNEL DN. Enhancement of experimental metastasis by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1993; **177**: 1391–1398.
- [144] MAJURI ML, NIEMELA R, TIISALA S, RENKONEN O, RENKONEN R. Expression and function of alpha 2,3-sialyl- and alpha 1,3/1,4-fucosyltransferases in colon adenocarcinoma cell lines: role in synthesis of E-selectin counter-receptors. *Int J Cancer*, 1995; **63**: 551–559.
- [145] IWAI K, ISHIKURA H, KAJI M, SUGIRA H, ISHIZU A, TAKAHASHI C, KATO H, TANABE T, YOSHIKI T. Importance of E-selectin (ELAM-1) and sialyl Lewis(a) in the adhesion of pancreatic carcinoma cells to activated endothelium. *Int J Cancer* 1993; **54**: 972–977.
- [146] DUŚ D. Rola oddziaływań międzykomórkowych w procesie inwazji i powstawania przerzutów. *Post Hig Med Dośw* 1995; **49**: 67–75.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 24.01.2001 r.

Przyjęto: 22.03.2001 r.

Adres autora: ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

e-mail: jbigd@amg.gda.pl.

TRANSPORT JĄDROWO-CYTOPLAZMATYCZNY BIAŁEK I KWASÓW RYBONUKLEINOWYCH

NUCLEOCYTOPLASMIC TRANSPORT OF PROTEINS AND RIBONUCLEIC ACIDS

Anna KRZEŚLAK, Anna LIPIŃSKA

Katedra Cytobiochemii, Uniwersytet Łódzki, Łódź

Streszczenie: W komórkach eukariotycznych otoczka jądrowa oddziela jądro – miejsce replikacji i transkrypcji DNA – od cytoplazmy, w której zachodzi proces biosyntezy białek. Prawidłowe funkcjonowanie komórki uzależnione jest od sprawnej wymiany białek i RNA pomiędzy tymi dwoma przedziałami komórkowymi. Transport jądrowo-cytoplazmatyczny odbywa się poprzez złożone struktury białkowe, jakimi są jądrowe kompleksy porowe. Transport białek i RNA jest procesem selektywnym, zależnym od energii, sygnału oraz specyficznych jądrowych i cytoplazmatycznych receptorów. (*Postępy Biologii Komórki 2001; 28: 373–393*)

Słowa kluczowe: import białek, eksport RNA, sygnały importu i eksportu jądrowego, importyny, eksportyny, GTPaza Ran.

Summary: In eukaryotic cells nuclear envelope separate nucleus – the place of DNA replication and transcription from cytoplasm where occurs biosynthesis of proteins. Regular function of cell is dependent on efficient exchange of proteins and RNAs between the two cellular compartments. Nucleocytoplasmic transport occurs through large multiprotein structures termed nuclear pore complex. Transport of proteins and RNAs is selective, signal-mediated and dependent on energy and specific nuclear and cytoplasmic receptors.

(*Advances in Cell Biology 2001; 28: 373–393*)

Key words: protein import, RNA export, signals of nuclear import and export, importins, exportins, GTPase Ran.

Wykaz skrótów: **CAS** (ang. *cellular apoptosis susceptibility protein*) – produkt białkowy genu *Cas*; **CBC** (ang. *cap-binding complex*) – kompleks białek wiążących metyloguanozynową czapeczkę w mRNA; **CBP** (ang. *cap-binding protein*) – białko wiążące się z czapeczką w mRNA; **D** (Asp) – asparaginian; **E** (Glu) – glutaminian; **eIF-5A** (ang. *eukaryotic initiation factor*) – eukariotyczny czynnik inicjacji 5A; **F** (Phe) – fenyloalanina; **G** (Gly) – glicyna; **GAP** (ang. *GTPase-activating protein*) – białko aktywujące GTPazę; **GEF** (ang. *guanine nucleotide exchange factor*) – czynnik stymulujący wymianę GDP na GTP;

HeLa – linia ludzkich komórek nabłonkowych pochodzących z raka szyjki macicy pacjentki Helen Lane lub Lange lub Larsen; **hnRNP** (ang. *heterogenous nuclear RNA-proteins complex*) – niejednorodny jądrowy RNP; **I** (Ile) – izoleucyna; **K** (Lys) – lizyna; **Kap** (ang. *karyopherin*) – karioferyna; **kDa** – kilodalton; **L** (Leu) – leucyna; **MDa** – megadalton; **NES** (ang. *nuclear export signal*) – sygnał eksportu jądrowego; **NLS** (ang. *nuclear localization signal*) – sygnał lokalizacji jądrowej; **NPC** (ang. *nuclear pore complex*) – jądrowy kompleks porowy; **NRS** (ang. *nuclear retention sequence*) – sekwencja zatrzymująca białko w jądrze; **NTF2** (ang. *nuclear transport factor 2*) – jądrowy czynnik transportu 2; **NUP** (ang. *nucleoporin*) – nukleoporyna; **P** (Pro) – prolina; **R** (Arg) – arginina; **RanBD** (ang. *Ran-binding domain*) – domena wiążąca Ran; **RanBP** (ang. *Ran-binding protein*) – białko wiążące Ran; **RCC1** (ang. *regulator of chromosome condensation*) – białko będące regulatorem kondensacji chromosomów; **Rip** (ang. *Ran interacting protein*) – białko wchodzące w interakcje z Ran; **RNP** – rybonukleoproteina; **S** (Ser) – seryna; **snRNA** (ang. *small nuclear RNA*) – mały jądrowy RNA; **T** (Thr) – treonina; **TFIII** (ang. *transcription factor polymerase RNA III*) – czynnik transkrypcyjny aktywujący polimerazę RNA klasy III; **V** (Val) – walina; **U-snRNA** – snRNA z wysoką zawartością urydyny.

WSTĘP

W tym artykule omówiono przebieg transportu jądrowo-cytoplazmatycznego makrocząsteczek, takich jak białka i kwasy rybonukleinowe. Szereg danych na ten temat przedstawiono na łamach Postępów Biochemii [36], ale ze względu na znaczny postęp badań tego procesu w niniejszym opracowaniu czytelnik znajdzie wiele nowych informacji.

W komórkach *Eukaryota* materiał genetyczny zawarty w jądrze oddziela od cytoplazmy perforowana podwójna błona określona mianem otoczki jądrowej. Zarówno w przedziale jądrowym, jak i cytoplazmatycznym zachodzą ważne dla komórki unikatowe procesy. W jądrze komórkowym ma miejsce replikacja DNA i jego transkrypcja oraz dojrzewanie powstających RNA. W cytoplazmie natomiast przebiega biosynteza białek, wśród nich enzymów niezbędnych do replikacji i transkrypcji DNA oraz szeregu innych czynników biorących udział w procesach jądrowych. W związku z powyższym musi istnieć sprawny i selektywny mechanizm umożliwiający transport odpowiednich substancji z jądra do cytoplazmy i na odwrót z cytoplazmy do jądra. W procesie transportu istotną rolę odgrywają jądrowe kompleksy porowe (ang. *nuclear pore complex* – NPC), które są dużymi białkowymi strukturami o masie około 125 MDa zbudowanymi z 50–100 różnych polipeptydów [3, 13, 23, 35, 59, 90]. Nieselektywna, bierna dyfuzja dotyczy jedynie małych cząsteczek, takich jak: jony i metabolity oraz niektóre białka o masach cząsteczkowych poniżej 40–60 kDa [3, 23]. Większość białek i RNA jest transportowanych w wyniku selektywnego procesu, zależnego od sygnału, specyficznych przenośników i energii [36, 58, 91]. Z cytoplazmy do jądra komórkowego transportowane są przede wszystkim białka, podczas gdy z jądra do cytoplazmy eksportowane są głównie kwasy rybonukleinowe. Małe jądrowe RNA bogate w urydynę (U-snRNA) są transportowane w obu kierunkach, gdyż tworzenie funkcjonalnych kompleksów

U-snRNP obejmuje łączenie ich na terenie cytoplazmy z białkami i następnie translokację do jądra komórkowego [55, 58]. Istnieje także szereg białek stale krążących pomiędzy jądrem komórkowym a cytoplazmą [36, 58].

IMPORT BIAŁEK ZAWIERAJĄCYCH NLS

Transport białek przez NPC jest procesem selektywnym, zależnym od występowania w ich cząsteczkach specyficznego sygnału. Najwcześniej i najlepiej poznanymi sygnałami, które ukierunkowują przejście kariofilowego białka z cytoplazmy do jądra komórkowego, są bogate w aminokwasy zasadowe sekwencje lokalizacji jądrowej (ang. *nuclear localization sequence lub signal* – NLS) [36].

W badaniach importu białek *in vitro* można eksperymentalnie wyróżnić 2 etapy:

1) dostarczenie i przyłączenie importowanych substratów do cytoplazmatycznej powierzchni jądrowych kompleksów porowych oraz

2) translokację przez centralny kompleks kanałowy NPC.

Pierwszy etap transportu jest całkowicie niezależny od temperatury i nie wymaga energii. Konieczność hydrolizy nukleozydotrifosforanów w czasie translokacji, postulowana wcześniej przez wielu autorów, nie jest dzisiaj tak oczywista [1, 16, 49, 75, 76, 81]. W obu etapach transportu wymagana jest obecność specyficznych czynników cytosolowych [1]. Są nimi przede wszystkim receptor NLS, GTPaza Ran oraz białko NTF2/p10.

Receptor NLS

Białka mające NLS są rozpoznawane w cytoplazmie przez rozpuszczalny receptor odpowiedzialny za ich dostarczenie i przyłączenie podczas transportu do jądrowych kompleksów porowych. Receptor ten nazwano importyną (ang. *importin*) [24] lub karioferyną (ang. *karyopherin*) [15], a także PTAC (ang. *pore targeting complex*) [27]. Receptor NLS jest heterodimerem składającym się z podjednostek α i β . Masa cząsteczkowa podjednostki α (importyny α) w zależności od rodzaju komórek, z których pochodzi, wynosi od 54 do 60 kDa, natomiast podjednostki β (importyny β) od 90 do 97 kDa [7 6]. Homologiem importyny α u drożdży jest białko Srp 1p zidentyfikowane początkowo jako supresor mutacji polimerazy RNA klasy I, a określone później jako Kap60p (ang. *karyopherin* 60 kDa). Natomiast odpowiednik importyny β u drożdży stanowi białko Kap95p [15].

Zasadniczo warunkiem przyłączenia transportowanego kariofilowego białka do NPC jest obecność obu podjednostek receptora NLS, które tworzą z nim stabilny kompleks [24, 27, 81]. Bezpośrednio z białkiem zawierającym NLS łączy się importyna α , w której można wyróżnić dwie funkcjonalne domeny: zasadowy

N-końcowy region odpowiedzialny za połączenie z importyną β oraz domenę zawierającą „ramię” stanowiące miejsce związania NLS [22, 23]. Importyna β odpowiada za przyłączenie transportowanego kompleksu do NPC. Sugeruje się, że miejscem inicjalnego przyłączenia transportowanego kompleksu jest dystalny koniec filamentów odchodzących od pierścienia cytoplazmatycznego NPC, gdzie u kręgowców zlokalizowana jest nukleoporyna RanBP2/NUP358 [21, 39, 87].

Kompleks importyn ulega dysocjacji natychmiast po ich wejściu do jądra komórkowego [24, 51, 85]. Wykazano, że GTPaza Ran w formie aktywnej, tj. z przyłączonym GTP, wiążąc się z importyną β powoduje dysocjację kompleksu importyn. Importyna β wraca do cytoplazmy w połączeniu z Ran-GTP nie odłączając się od NPC [51]. Ostatnio Kose i wsp. [38] stwierdzili, że importyna β może również opuszczać jądro komórkowe niezależnie od Ran. Autorzy sugerują więc istnienie dwóch różnych mechanizmów transportu importyny β . Natomiast importyna α do swojego powrotu wymaga specyficznego czynnika eksportu CAS (ang. *cellular apoptosis susceptibility protein*), który wiąże ją (wolną od transportowanego substratu) w obecności Ran-GTP [40, 85].

GTPaza Ran

Białko Ran jest głównym czynnikiem zaangażowanym bezpośrednio w import na etapie translokacji [36, 58]. Ran jest GTPazą (m.cz. 25 kDa) należącą do rodziny białek Ras. Podobnie jak inne GTPazy, Ran występuje w dwóch formach, tj. aktywnej z przyłączonym GTP i nieaktywnej z GDP. Przejście z jednej formy w drugą jest regulowane przy udziale białek GAP aktywujących GTPazy (ang. *GTPase activating proteins*), które wpływają na hydrolizę GTP oraz białek GEF (ang. *guanine nucleotide exchange factor*) stymulujących wymianę GDP na GTP. Do tej pory zidentyfikowano dla Ran jedno białko GAP i jedno GEF, które są zlokalizowane po przeciwnych stronach otoczki jądrowej [23, 47]. W jądrach komórek HeLa stwierdzono obecność białka o masie cząsteczkowej około 45 kDa tworzącego kompleks z Ran. Białko to określone jako RCC1 (ang. *regulator of chromosome condensation*) reprezentuje białka GEF i katalizuje specyficzną wymianę nukleotydu guaninowego na Ran [9]. W cytosolu komórek HeLa zidentyfikowano białko o masie cząsteczkowej około 65 kDa określone jako RanGAP1, które działa antagonistycznie w stosunku do RCC1, wpływając na hydrolizę GTP połączonego z Ran [8]. Homologiem RanGAP1 u *Saccharomyces cerevisiae* jest białko Rna1p, które aktywuje białko Gsp1p odpowiadające białku Ran ssaków [6, 45]. Asymetryczna dystrybucja RanGAP1 i RCC1 wytwarza gradient stężenia RanGTP/RanGDP w poprzek otoczki jądrowej, który wpływa na kierunek transportu [11, 47, 53]. Ostatnio sugeruje się, że mechanizm kontrolujący stężenie RanGTP/RanGDP w jądrze i cytoplazmie może być bardziej złożony. Zidentyfikowano bowiem jądrowe białko Mog1 myszy (odpowiednik białka Mog1p *Saccharomyces cerevisiae*), które

stymuluje odłączenie GTP od Ran. Po uwolnieniu GTP, Mog1 pozostaje połączone z Ran uniemożliwiając ponowne związanie nukleotydu guaninowego. Chociaż dokładna rola Mog1 w cyklu GTPazy Ran nie jest jeszcze znana, można przypuszczać, że białko to stanowi dodatkowy czynnik regulujący poziom RanGTP w jądrze [83].

Hydroliza GTP przez Ran wydawała się być ważnym elementem importu białek, gdyż jak wykazano niehydrolizowalne analogi GTP wyraźnie hamowały import białek [48, 49], a białko Ran w takich warunkach gromadziło się przy cytoplazmatycznej powierzchni kompleksów porowych. Ostatnie badania dowodzą jednak, że nie zawsze w translokacji wymagana jest energia i może się ona odbywać bez hydrolizy nukleozydotrifosforanów przynajmniej dla pojedynczego cyklu transportu [16, 23, 75]. Obecność niehydrolizowalnych analogów GTP blokuje raczej terminację procesu transportu niż samą translokację [23].

Wykazano, że nukleoporyna RanBP2/NUP358 oprócz Ran wiąże także białko RanGAP1 [45]. Ta interakcja wymaga ATP-zależnej potranslacyjnej koniugacji Ran-GAP1 ze 101-aminokwasowym białkiem określonym jako SUMO-1 (ang. *small ubiquitin-related modifier*) [45] lub GMP1 (ang. *GAPmodifying protein 1*) [46], a także UBL1 (ang. *ubiquitin-like protein 1*) [74].

Do grupy białek wchodzących w interakcje z Ran-GTP należy również cytosolowe białko RanBP1 [47, 64, 73]. Wszystkie białka RanBP (ang. *Ran-binding protein*) mają jedną lub kilka domen wiążących Ran (RanBD), które stabilizują Ran w formie z przyłączonym GTP oraz działają jako koaktywatory białek RanGAP [7]. Zarówno pełne białko RanBP1, jak i jego domeny RanBD zdolne są do tworzenia kompleksu z Ran i importyną β [23, 43, 47]. Importyna β i RanBP1 mają przeciwstawne działanie na aktywność GTPazy Ran w obecności RanGAP. Importyna β jest prawdopodobnie inhibitorem RanGAP. Wykazano jednak, że hamujące działanie importyny β na RanGAP może zostać zredukowane przez RanBP1 lub same domeny RanBD [43]. RanBP1 ssaków jest białkiem cytoplazmatycznym, ale izolowane domeny wiążące Ran lokalizują się w jądrze. Jądrowa lokalizacja tych domen jest zależna od zdolności do wiązania z Ran-GTP. Sekwencje odpowiedzialne za obecność RanBP1 w cytoplazmie znajdują się w regionie C-terminalnie położonym w stosunku do RanBD i zawierają sygnały eksportu jądrowego NES. Izolowane domeny RanBD blokują import białek, co sugeruje, że cytoplazmatyczna lokalizacja RanBP1 jest ważna dla tego procesu [69].

NTF2/p10

Innym czynnikiem uczestniczącym w transporcie jądrowym jest cytosolowe białko o masie cząsteczkowej 15 kDa (tworzące homodimer) określone jako NTF2/p10 (ang. *nuclear transport factor 2*) u kręgowców [63] oraz Ntf2p u drożdży [13]. Rola NTF2/p10 w imporcie białek do jądra komórkowego nie jest jeszcze dobrze

poznana. NTF2/p10 uczestniczy prawdopodobnie w późniejszych etapach importu, tj. w translokacji przez centralny kompleks kanałowy NPC [49, 63]. Wykazano, że czynnik ten wiąże się z nukleoporynami zawierającymi powtarzające się sekwencje peptydowe [56]. Jedną z nukleoporyn wchodzących w interakcje z NTF2/p10 jest p62, która znajduje się w pobliżu centralnego kompleksu kanałowego. Ujawniono, że NTF2/p10 koordynuje tworzenie pentamerowego kompleksu, w skład którego oprócz niego wchodzi: nukleoporyna, Ran-GDP oraz heterodimer importyn. Wymiana GDP na GTP powoduje dysocjację tego kompleksu. Sugeruje się, że NTF2/p10 koordynuje zależne od Ran następujące po sobie reakcje asocjacji i dysocjacji, które powodują translokację transportowanego kompleksu [56].

Ponadto wykazano, że NTF2/p10 pośredniczy w imporcie Ran, w związku z tym czynnik ten może być włączony w wytworzenie gradientu Ran-GTP – Ran-GDP w poprzek otoczki jądrowej tak ważnego dla prawidłowego funkcjonowania transportu [67, 68, 80].

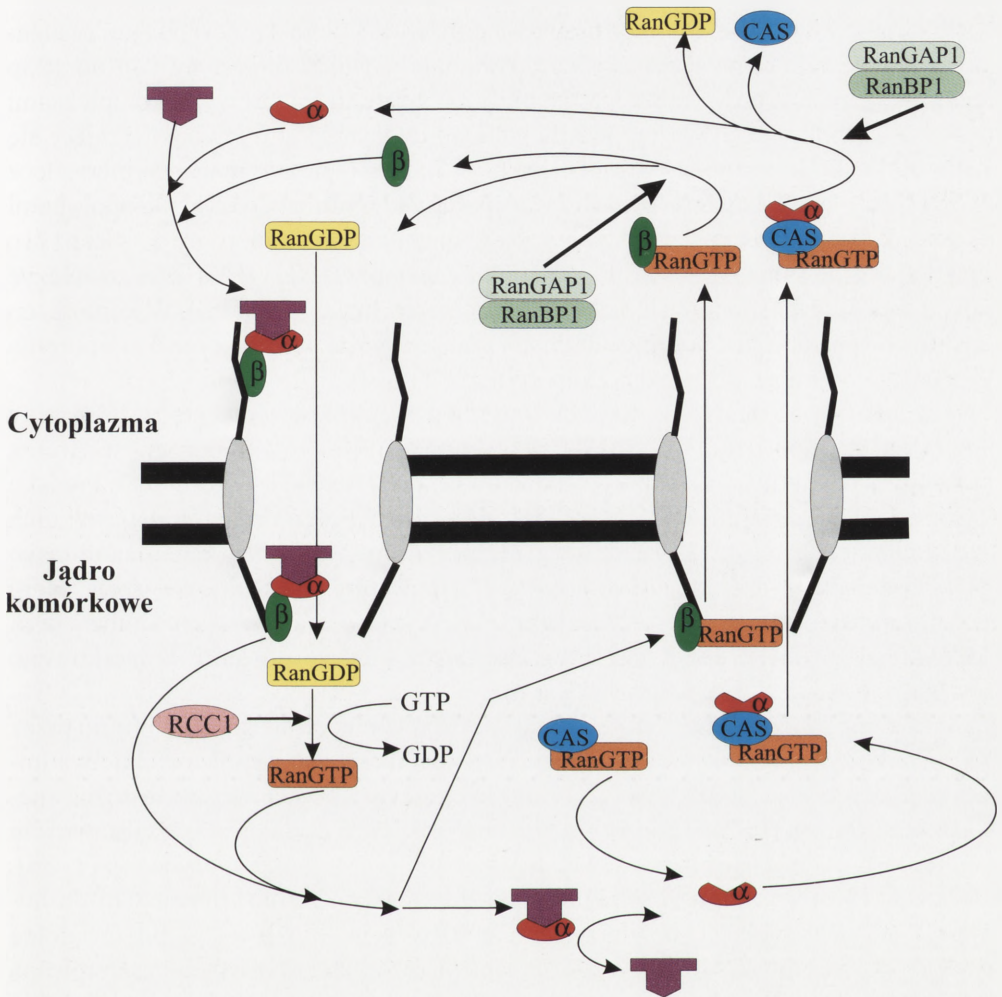
Gen kodujący Ntf2p u drożdży ma podstawowe znaczenie dla przeżywalności komórek, a jego produkt zlokalizowany jest przy otoczce jądrowej [13, 56]. Wrażliwe na temperaturę mutanty Ntf2 wykazują zahamowanie importu, ale eksport RNA nie ulega zakłóceniu, co może wskazywać na bardziej bezpośredni udział tego czynnika w imporcie białek niż eksporcie RNA [13].

Model transportu białek zawierających NLS przedstawiono na rycinie 1.

IMPORT BIAŁEK NIE ZAWIERAJĄCYCH KLASYCZNYCH NLS

Obecnie wiadomo, że istnieje więcej niż jeden mechanizm importu białek do jądra komórkowego [66, 71, 88]. Białka mające różne sygnały lokalizacji jądrowej wykorzystują odmienne receptory dla swojego transportu. Kompleks importyn α i β uczestniczących w imporcie białek zawierających klasyczne NLS jest tylko jednym z wielu czynników pełniących tę funkcję.

Istnienie takiego odmiennego mechanizmu transportu wykazano dla krążącego pomiędzy jądrem a cytoplazmą białka A1 hnRNP, które ma charakterystyczną sekwencję, stanowiącą sygnał zarówno importu, jak i eksportu (M9). Sygnał M9 rozpoznawany jest przez białko podobne do importyny β , a określone jako transportyna (ang. *transportin*) [36, 66]. Odpowiednikiem transportyny ssaków u drożdży jest białko Kap104p, które uczestniczy w imporcie białek wiążących mRNA, takich jak Nab2p i Nab4p [2]. Transportyna, chociaż strukturalnie odpowiada importynie β , działa niezależnie od importyny α i łączy funkcje obu importyn, tj. rozpoznaje sygnał importu i przyłącza transportowany kompleks do NPC [66]. Transport A1 hnRNP jest wrażliwy na niehydrolizowalne analogi GTP, co może wskazywać



RYCINA 1. Model przedstawiający import białek zawierających NLS (wg [88] zmodyfikowany). W pierwszym etapie importyny α i β tworzą z transportowanym białkiem kompleks, który jest przyłączany do filamentów cytoplazmatycznych NPC. Etap translokacji wymaga obecności GTPazy Ran z przyłączonym GDP. W jądrze komórkowym następuje wymiana GDP na GTP pod wpływem czynnika RCC1. Ran-GTP wiążąc się z importyną β powoduje dysocjację kompleksu. Importyna β wraca do cytoplazmy w połączeniu z Ran-GTP, a importyna α z kompleksem CAS/Ran-GTP. Dysocjacja tych kompleksów w cytoplazmie następuje po hydrolizie GTP na Ran przy udziale białek RanGAP1 i RanBP1

na udział GTPazy Ran w tym systemie transportu. Prawdopodobnie transportyna odgrywa także rolę w eksporcie białka A1, a pośrednio w eksporcie mRNA, ponieważ mutacje w obrębie sygnału M9, które uniemożliwiają wiązanie transportyny do białka A1, zakłócają zarówno import, jak i eksport [50].

U drożdży w transport białek rybosomalnych do jądra komórkowego zaangażowana jest importyna Kap123p [71]. Podobnie jak inne importyny β , Kap 123p jest zlokalizowana głównie w cytoplazmie oraz wiąże się z jądrowymi kompleksami porowymi w miejscach występowania nukleoporyn zawierających powtarzające się sekwencje. W przeciwieństwie do Kap95p, Kap123p nie wymaga partnera, lecz wchodzi w bezpośrednie interakcje z transportowanym substratem, nukleoporynami i Ran [71]. W przypadku delekcji genu *kap123* inny homolog importyny β – Kap121p (Pse1p, karioferyna β_3) może funkcjonalnie zastępować Kap123p i uczestniczyć w transporcie rybosomalnych białek do jądra komórkowego [71, 88]. W komórkach ssaków w transport białek rybosomalnych zaangażowane są importyna 5 i importyna 7 należące również do rodziny importyn β [23].

Łącznikowy histon H1 wymaga do importu dwóch różnych receptorów z rodziny importyn β : importyny 7 (RanBP7) oraz importyny β [31]. Importyny te tworzą heterodimer stabilny tylko w przypadku nieobecności RanGTP, a więc w środowisku cytoplazmy. Heterodimer importyn wiąże H1 bardziej efektywnie niż każda z nich oddzielnie, co sugeruje, że każda z tych importyn rozpoznaje i wiąże inną domenę H1. Dysocjacja trimerycznego kompleksu H1/Imp β /Imp7 następuje po przyłączeniu do importyny β i importyny 7 RanGTP [31]. Wyniki badań Johnson-Salibe i wsp. [33] sugerują, że histony rdzeniowe są transportowane do jądra komórkowego jedynie przy udziale importyny β .

Prawdopodobnym powodem istnienia wielu oddzielnych sposobów importu przez jądrowe kompleksy porowe jest konieczność zredukowania współzawodnictwa importu różnych klas białek. Nie jest całkowicie jasne, w jaki sposób te różne mechanizmy transportu nie interferują ze sobą przy NPC, ponieważ przedstawiciele importyn β wydają się rozpoznawać te same miejsca w nukleoporynach [71, 88]. Wykazano jednak, że poszczególne importyny mają różne powinowactwo do nukleoporyn zawierających powtarzające się sekwencje. Możliwe, że poszczególne miejsca dokowania na NPC są rozpoznawane przez kilka importyn, ale preferowana jest tylko jedna. Obniża to współzawodnictwo importyn przy NPC, a jednocześnie umożliwia maksymalne wykorzystanie dostępnych miejsc wiązania w celu zapewnienia jak największej wydajności transportu [71, 72].

Szczególnie interesujący jest fakt, że pewne białka są transportowane przez NPC niezależnie od Ran. Po raz pierwszy istnienie takiego mechanizmu wykazano podczas badania *in vitro* transportu importyny β w żywych i permeabilizowanych digitoniną komórkach ssaków. Okazało się, że wolna od importyny α i transportowanego substratu importyna β może sama migrować do jądra komórkowego, a proces ten nie wymaga zaangażowania Ran i hydrolizy GTP [37]. Później podobny mechanizm transportu wykazano także dla kilku innych białek między innymi β -katenin [89]. Ostatnio Hetzer i Mattaj [25] stwierdzili, że import białek U1A i U2B kompleksów U-snRNP do jądra komórkowego jest niezależny od receptorów z rodziny β -importyn oraz Ran, ale wymaga hydrolizy ATP. Sugeruje to istnienie jeszcze jednego sposobu

importu, w którym być może uczestniczą niezidentyfikowane dotąd białka receptorowe.

IMPORT U-snRNA

Warunkiem udziału U-snRNA w procesie składania pre-mRNA jest tworzenie U-snRNP. Wkrótce po transkrypcji U1, U2, U4 i U5 snRNA są eksportowane do cytoplazmy, gdzie łączą się z kompleksem rdzeniowych białek Sm (B, B', D1, D2, D3, E, F i G) oraz białkami specyficznymi dla każdego U-snRNA, a monometylowana guanozyna na końcu 5' (m^7G) ulega dodatkowej metylacji z wytworzeniem 2,2,7-trimetyloguanozyny (m_3G) [55].

Zidentyfikowano cytosolowe białko o masie cząsteczkowej 45 kDa określone jako snurportyna 1 (ang. *snurportin 1*), które rozpoznaje strukturę czapeczki m_3G na U-snRNA. Snurportyna zawiera N-terminalną domenę wiążącą importynę β oraz C-terminalny region wiążący czapeczkę m_3G . Snurportyna 1 wzmacnia zależny od czapeczki import jądrowy, U-snRNP zarówno w oocytach *Xenopus laevis*, jak i w permeabilizowanych digitoniną komórkach HeLa, co sugeruje, że funkcjonuje ona jako specyficzny dla snRNP receptor importu [26].

W tabeli 1 zestawiono główne czynniki biorące udział w transporcie jądrowo-cytoplazmatycznym.

EKSPORT KWASÓW RYBONUKLEINOWYCH

Z jądra komórkowego do cytoplazmy transportowane są białka oraz różne typy RNA, tj. mRNA, rRNA, snRNA oraz tRNA. Proces eksportu makrocząsteczek z jądra do cytoplazmy jest znacznie słabiej poznany niż mechanizm importu białek do jądra. Wynika to głównie z braku dobrze scharakteryzowanego modelu badawczego, który umożliwiłby analizę eksportu *in vitro*. Klasyczne badania eksportu jądrowego skupiają się na eksporcie RNA, który z reguły opuszcza jądro w połączeniu z białkami, czyli jako cząstki RNP. Badanie eksportu RNA (poza snRNA) jest dodatkowo komplikowane z powodu procesu dojrzewania pre-RNA oraz braku możliwości wyizolowania homogennej populacji całkowicie dojrzałych jądrowych RNP i precyzyjnego określenia ich składu białkowego. Pomimo tych trudności ustalono pewne zasadnicze cechy eksportu RNA. Eksport wszystkich typów RNA odbywa się poprzez jądrowe kompleksy porowe i jest procesem aktywnym (zależnym od energii), w którym zaangażowane są określone czynniki pośredniczące oraz sygnały eksportu jądrowego, znajdujące się przede wszystkim na białkach towarzyszących RNA [20, 30, 32, 36, 55]. Mechanizm eksportu każdego typu RNA wydaje się być unikatowy, gdyż uczestniczące w nim czynniki są specyficzne dla danego typu RNA [32, 65]. Ponieważ jednak eksport wszystkich RNA odbywa

TABELA 1. Główne czynniki zaangażowane w transport jądrowo-cytoplazmatyczny

Czynniki transportu w komórkach wyższych <i>Eukaryota</i>	Czynniki transportu w komórkach drożdży	Funkcja
1) Rodzina importyn α importyna α (karioferyna α , PTAC 58)	Srp1p (Kap60p)	Receptor NLS
2) Rodzina importyn β importyna β (karioferyna β , PTAC 97 transportyna (karioferyna β_2 , importyna β_2) importyna 5 (karioferyna β_3 , RanBP5) importyna 7 (RanBP7) transportyna-SR eksportyna t CAS CRM1 snurportyna eksportyna 4	Kap95p Kap 104p Kap123p Pse1p (Kap 121p) Los1p Cse1p Crm1p (eksportyna 1)	Wiąże importynę α i przyłącza transportowany kompleks do NPC Import białka A1 kompleksów hnRNP (prawdopodobnie także białek F, B, D i E) Receptor importu dla białek rybosomalnych Import białek rybosomalnych oraz udział w imporcie histonu H1 Import białek posiadających domeny SR Eksport tRNA Eksport importyny α (u drożdży Srp1p) Eksport białek posiadających NES Import U-snRNP mających czapeczkę m ₃ G Eksport czynnika eIF-5A
3) GTPaza Ran/TC4	Gsp1p i Gsp2p Spi1p	Udział w translokacji
4) Czynniki cyklu GTPazy Ran RCC1 RanGAP1 RanBP1 RanBP2 (Nup358)	Prp20p (Mtr1p, Prm1p) Pim1p Rna1p Yrb1p	Białko stymulujące wymianę GDP na GTP Białko aktywujące GTPazę Ran Białko stymulujące RanGAP1 Białko NPC
5) NTF2/p10	Ntf2p	Udział w translokacji, czynnik transportu Ran

się tą samą drogą, czyli przez NPC, nie wykluczone, że w pewne etapy transportu mogą być włączone również wspólne czynniki [32, 65].

Eksport mRNA

Wśród licznych białek zasocjowanych z RNA na szczególną uwagę w procesie transportu zasługują białka niejednorodnych jądrowych RNP (hnRNP). Niektóre spośród tych białek (np. A1) stale krążą pomiędzy jądrem a cytoplazmą i są związane z RNA w obu przedziałach komórkowych [36, 55]. Fakt, że białko A1 jest związane

z mRNA także w cytoplazmie, sugeruje, że towarzyszy mu ono w czasie wędrówki od miejsca transkrypcji przez nukleoplazmę, a ponadto pozostaje z nim związane również podczas translokacji przez jądrowe kompleksy porowe. Te sugestie są potwierdzane przez badania, w których wykazano, że białko Ct-hrp36 owada *Chironomus tentans* podobne do A1 ulega translokacji przez NPC w połączeniu z RNA [79, 86].

Kwestia roli białek hnRNP w transporcie RNA została rozwiązana dzięki identyfikacji sygnału eksportu jądrowego w białku A1 hnRNP, którym jest region M9 [28, 78]. Po translokacji białka hnRNP oddysocjują od mRNA i są importowane do jądra. Sygnałem importu A1 hnRNP jest ten sam region białka (M9), który uczestniczy w jego eksporcie [28, 78].

Podczas gdy krążące białka hnRNP pozostają połączone z hnRNA do czasu, gdy dotrze on do cytoplazmy, inne białka hnRNP, jak np. białko C czy U, nie opuszczają jądra komórkowego [54]. Podobnie zachowujące się białko wykryto w jądrach komórek ślinianek owada *Chironomus tentans* [4]. Białko Ct-hrp45, które jest homologiem czynnika składania u ssaków ASF/SF2, wiąże cząsteczki RNA podczas transkrypcji i pozostaje z nim zasocjowane, dopóki nie dotrze ono do jądrowych kompleksów porowych. To białko jest jednak uwalniane z kompleksu RNP przed wejściem do centralnego kompleksu kanałowego i nigdy nie pojawia się w cytoplazmie w połączeniu z mRNA [4]. W białku C hnRNP zidentyfikowano sekwencje zatrzymujące białko w jądrze (ang. *nuclear retention sequence* – NRS) [54]. Sugeruje się, że NRS są zdolne zagłuszać NES, ponieważ pre-mRNA/mRNA związany zarówno z białkami posiadającymi NES, jak i białkami z NRS nie może opuścić jądra komórkowego. Prawdopodobnie nie krążące białka hnRNP są usuwane przed lub w trakcie eksportu mRNA. To usuwanie wydaje się być krytyczne dla możliwości eksportu mRNA i może stanowić ważny regulatorowy etap tego eksportu [55].

Komórkowe białka hnRNP nie są jedynymi kandydatami pretendującymi do pełnienia funkcji czynników pośredniczących w eksporcie poli(A)⁺RNA. Wiele informacji dotyczących mechanizmu eksportu RNA dostarczyły badania białka Rev wirusa HIV-1. W komórkach zainfekowanych wirusem HIV białko Rev odgrywa podstawową rolę w cytoplazmatycznej akumulacji niedojrzałego lub częściowo złożonego pre-mRNA wirusa, który w nieobecności Rev pozostaje wyłącznie w jądrze [13, 36, 55]. Rev jest 116-aminokwasowym polipeptydem, który poprzez bogatą w argininę aminoterminalną domenę wiąże się ze specyficzną strukturą *stem-loop* RNA o długości 234 nukleotydów określoną jako RRE (ang. *Rev response element*). Interakcja Rev-RRE ma podstawowe znaczenie dla funkcji tego białka w eksporcie RNA [20, 55, 58]. Drugim bardzo ważnym regionem Rev, który umożliwia krążenie tego białka pomiędzy jądrem a cytoplazmą, jest C-terminalnie położona domena aktywacji. Domena ta zawiera bogatą w leucynę sekwencję LPPLERLTL stanowiącą sygnał eksportu jądrowego [17]. Sugeruje się, że Rev funkcjonuje jako czynnik

łącający eksport wirusowego pre-mRNA z mechanizmem eksportu komórkowego przez interakcje z komórkowymi czynnikami zaangażowanymi w transport [17, 19].

Opisano kilka białek komórkowych wchodzących w interakcje z Rev, które mogą pośredniczyć w jego funkcji [10, 12, 84]. Bogerd i wsp. [10] zidentyfikowali ludzkie białko Rab, które wchodzi w interakcje z Rev jak również z jego funkcjonalnym odpowiednikiem kilku innych retrowirusów włączając w to białko Rex wirusa HTLV-1. U drożdży zidentyfikowano natomiast wiążące Rev białko Rip1p (ang. *Rev-interacting protein*) [84]. Badania sekwencji wykazały, że zarówno Rab (58 kDa), jak i Rip1p (42 kDa) są polipeptydami bogatymi w fenyloalaninę, serynę i treoninę oraz zawierają dipeptydowe motywy FG powtarzające się odpowiednio 10- i 27-krotnie [10, 84]. Wielokrotne powtórzenia FG są także obserwowane w grupie nukleoporyn kręgowców, z których niektóre wydają się uczestniczyć bezpośrednio w transporcie jądrowym poprzez interakcje z cytosolowymi czynnikami transportu. Nie wiadomo jednak, czy Rab lub Rip1p są komponentami NPC. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem mikroskopii immunofluorescencyjnej wykazały, że ludzkie białko Rab jest zlokalizowane w całej nukleoplazmie, w związku z tym nie jest nukleoporyną. Natomiast białko Rip1p jest skoncentrowane przy NPC. Ponieważ pewne czynniki transportu jądrowego (które są przede wszystkim cytosolowe) *in vivo* gromadzą się przy NPC [84], nie jest jasne, czy Rip1p jest nukleoporyną czy rozpuszczalnym białkiem, które wchodzi w interakcje z NPC. Model, który łączy wszystkie te informacje, zakłada, że w translokacji Rev z jądra do cytoplazmy istotną rolę odgrywają interakcje pomiędzy Rev a białkami zawierającymi motywy FG w nukleoplazmie i przy NPC [10, 12, 84].

Zidentyfikowano czynnik rozpoznający sygnały eksportu jądrowego bogate w leucynę, które są charakterystyczne między innymi dla białka Rev. Czynnik ten określony jako CRM1 (ang. *chromosome maintenance region 1*), a później eksportyna 1 (ang. *exportin 1*) wykazuje duże podobieństwo sekwencji do rodziny importyn β zaangażowanych w import białek [18, 36, 61, 62, 82]. Badania z wykorzystaniem leptomycyny B, cytotoksyny wiążącej CRM1 potwierdziły udział tego białka w eksporcie Rev [18, 82]. Fornerod i wsp. [18] stwierdzili, że w obecności Ran-GTP tworzony jest kompleks NES/CRM1/Ran, natomiast leptomycyna blokuje tworzenie tego kompleksu i jednocześnie eksport Rev. CRM1 wchodzi także w interakcje z nukleoporyną CAN/NUP214 oraz RanBP2/NUP358 [57, 77, 85]. Sugeruje się, że CRM1 stanowi łącznik pomiędzy Rev a nukleoporynami podczas eksportu do cytoplazmy. Wspomniane wcześniej interakcje między Rev a Rip1p również wymagają obecności CRM1 [57]. Ostatnie badania wskazują, że CRM1 uczestniczy także w eksporcie snurportyny 1, z którą wiąże się o wiele silniej niż z białkiem Rev [62].

Odpowiednik białka Rev u drożdży – białko Gle1p o masie 62 kDa zawiera sygnał eksportu jądrowego, którego mutacja powoduje zahamowanie eksportu po-

li(A)⁺RNA z jądra [52]. Gle1p wchodzi w interakcje z białkiem Rip1p i nukleoporyną NUP 100 i lokalizuje się przy jądrowych kompleksach porowych. Wszystkie te właściwości sugerują, że Gle1p jest komórkowym czynnikiem eksportu RNA.

Komórkowym odpowiednikiem Rev jest również ludzkie białko Tap. Białko to rozpoznaje strukturę CTE (ang. *constitutive transport element*) w niedojrzałym RNA małpiego wirusa MPMV (ang. *Mason-Pfizer monkey virus*), która jest analogiczna ze strukturą RRE rozpoznawaną przez Rev. Tap stale krąży pomiędzy jądrem a cytoplazmą i wchodzi w bezpośrednie interakcje z nukleoporynami. Białko to zawiera dwa sygnały NLS oraz jeden NES, które są odmienne od dotychczas zidentyfikowanych sygnałów transportu. Eksport mRNA, w którym uczestniczy Tap, nie zależy od CRM1 ani innych czynników transportu z rodziny β -importyn [34, 79]

Białkiem kandydującym do roli czynnika włączonego w różne aspekty dojrzewania i eksportu RNA jest również eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 5A (eIF-5A), który wchodzi w specyficzne interakcje z domeną aktywacji Rev oraz CRM1 [14, 70]. Ostatnio Lipowsky i wsp. [42] stwierdzili, że eIF-5A o wiele silniej niż z CRM1 reaguje z nowo odkrytą eksportyną 4.

Eksport U-snRNA

U1-U5 snRNA są syntetyzowane w jądrze komórkowym przez polimerazę RNA klasy II i podobnie jak inne produkty jej działania mają kotranslacyjnie dołączoną na końcu 5' monometyloguanozynową czapeczkę, której rozpoznawanie odgrywa decydującą rolę w eksporcie [55]. Zidentyfikowano i oczyszczono białka tworzące kompleks wiążący czapeczkę (ang. *cap binding complex* – CBC), który składa się z dwóch białek CBP80 i CBP20 o właściwościach sugerujących zaangażowanie w eksport snRNA [29]. Przeciwciała przeciwko CBP20 interferują w wiązaniu CBC do czapeczki i specyficznie hamują eksport snRNA, co wskazuje na bezpośredni udział CBC w ich transporcie [29]. Z kompleksem CBC wiąże się białko PHAX (ang. *phosphorylated adaptor for RNA export*), które z kolei jest rozpoznawane przez eksportynę 1. PHAX jest fosforylowane w jądrze komórkowym, a defosforylowane w cytoplazmie. Fosforylacja PHAX ma podstawowe znaczenie dla tworzenia eksportowanego kompleksu, podczas gdy jego defosforylacja w cytoplazmie przyczynia się do dysocjacji kompleksu [60, 79].

EKSPORT RYBOSOMALNYCH RNA

5S rRNA

Obecnie znane są trzy białka, które specyficznie wiążą się z 5S rRNA: białko La, czynnik transkrypcyjny IIIA (TFIIIA) oraz rybosomalne białko L5. Białko La

przejściowo wchodzi w interakcję ze wszystkimi produktami polimerazy RNA klasy III i odgrywa rolę w terminacji transkrypcji, lecz nie jest zaangażowane w eksport 5S rRNA [13]. Ustalono natomiast, że do transportu 5S rRNA do jąderka niezbędne jest jego związanie z czynnikiem TFIIIA i białkiem L5 (oocyty *Xenopus laevis*) lub białkiem L5 (komórki somatyczne) [20, 55].

Szlak transportu 5S rRNA jest prostszy w komórkach somatycznych niż w oocytach *Xenopus laevis*. W obu przypadkach 5S rRNA jest transkrybowany w nukleoplazmie przez polimerazę RNA klasy III i następnie asocjowany z białkiem La. W kolejnym etapie po odłączeniu białka La szlak transportu, jaki jest znany w oocytach *Xenopus laevis*, różni się od tego, który występuje w komórkach somatycznych. U *Xenopus* 5S rRNA łączy się z czynnikiem transkrypcyjnym TFIIIA i tworzy kompleks 7S RNP, który jest szybko eksportowany do cytoplazmy. Po odłączeniu czynnika transkrypcyjnego TFIIIA, 5S rRNA łączy się z białkiem L5 tworząc 5S RNP, który jest importowany do jądra i następnie gromadzony w jąderku, gdzie łączy się z tworzącą się dużą podjednostką rybosomu. Po kompletnym montażu, duża podjednostka rybosomu jest eksportowana do cytoplazmy, gdzie bierze udział w translacji.

W komórkach somatycznych po dysocjacji białka La, 5S rRNA wchodzi bezpośrednio w interakcję z L5 tworząc 5S rRNP w nukleoplazmie. RNP jest lokowany w jąderku, gdzie włącza się do dużej podjednostki rybosomu i wtedy jest eksportowany do cytoplazmy. Można sądzić, że jedną z funkcji białka L5 jest dostarczenie 5S rRNA do jąderka, a problem eksportu 5S rRNA w komórkach somatycznych sprowadza się do eksportu podjednostki rybosomu.

W przypadku mutacji wymienionych białek, powodującej brak wiązania z 5S rRNA następuje jego zatrzymanie w jądrze komórkowym [55]. W czynniku transkrypcyjnym TFIIIA zidentyfikowano sekwencję NES (SLVLDKLT), która jest bardzo podobna do bogatego w leucynę sygnału eksportu białek Rev i inhibitora cAMP-zależnej kinazy białek [19].

18S, 28S i 5,8S rRNA

Wszystkie rRNA oprócz 5S rRNA, tj. 18S, 28S i 5,8S rRNA są transkrybowane przy udziale polimerazy RNA klasy I jako wspólny prekursor (pre-rRNA), który po procesie dojrzewania dostarcza rRNA, które są montowane w jąderku w rybosomalne podjednostki [23, 55]. Jądrowy eksport rRNA odbywa się jako eksport podjednostek rybosomalnych. Jest to proces jednokierunkowy, wymagający energii i zachodzący przez NPC [23, 55]. Dotąd nie zidentyfikowano receptorów dla transportu rRNA.

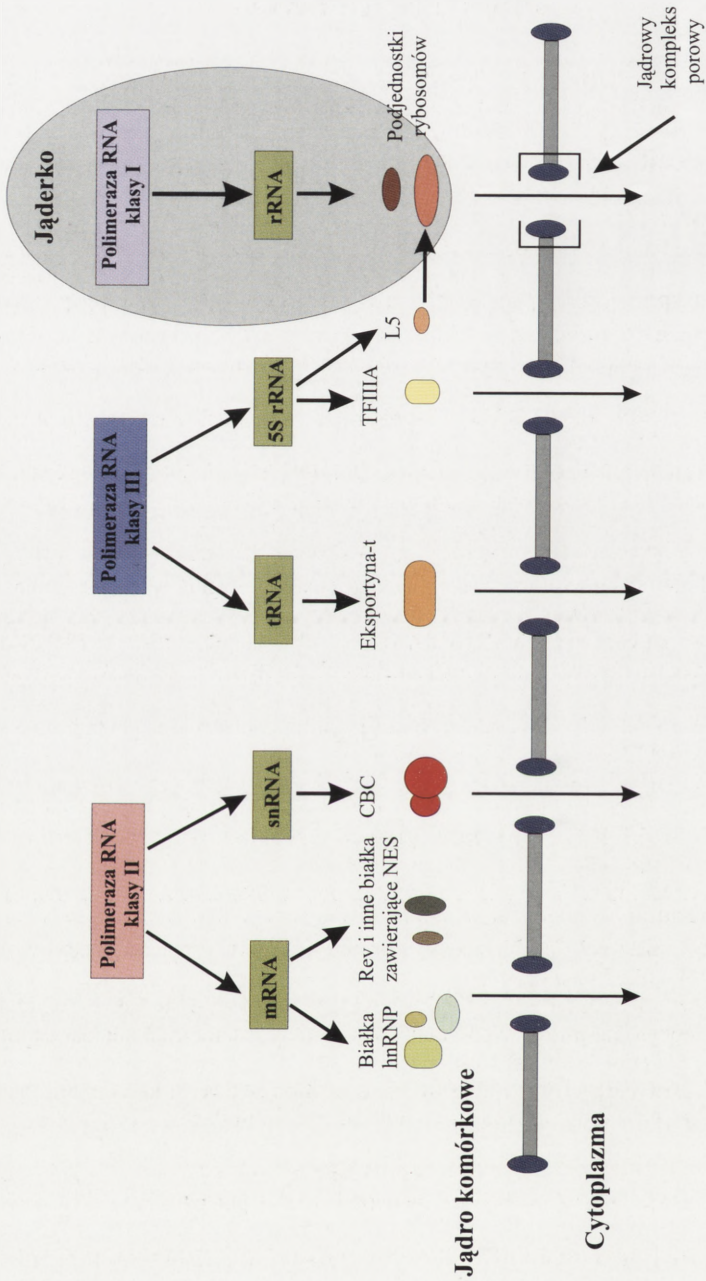
EKSPORT tRNA

Ostatnio zidentyfikowano czynnik transportu tRNA, który nazwano eksportyną-t (ang. *exportin-t*). Eksportyna-t jest jak dotąd jedynym receptorem transportu rozpoznającym i wiążącym bezpośrednio RNA [5, 41]. Eksportyna-t wiąże tRNA w jądrze w obecności Ran-GTP tworząc trójskładnikowy kompleks. Uwalnianie tRNA w cytoplazmie związane jest z hydrolizą GTP przez Ran w obecności RanGAP i RanBP1 [41]. Eksportyna-t ma wysokie powinowactwo do całkowicie dojrzałego tRNA o niezakłóconej strukturze drugo- i trzeciorzędowej, a szczególne znaczenie w tym rozpoznawaniu odgrywają końce 3' i 5' [5, 41, 44]. Wiązanie tRNA przez eksportynę-t stanowić może etap kontrolny przed jego eksportem, co zapobiega cytoplazmatycznej akumulacji niedojrzałego lub niefunkcjonalnego tRNA. Eksportyna-t nie rozróżnia jednak tRNA zawierającego introny od tRNA nie posiadającego intronów, ponieważ znajdują się one w pętli antykodonu, z którym eksportyna nie łączy się. Ostatnie badania wykazują jednak, że przynajmniej w oocytach *Xenopus laevis* składanie tRNA normalnie zachodzi przed dojrzewaniem końca 5', a więc gdy eksportyna-t wchodzi w kontakt z tRNA, jest on już właściwie pozbawiony intronów. Aminoacylacja tRNA, którą dotychczas uważano za proces cytoplazmatyczny, może zachodzić także w jądrze komórkowym. Stwierdzono, że jądrowa aminoacylacja ułatwia eksport tRNA z jądra, chociaż nie jest ona warunkiem koniecznym dla transportu tRNA [44].

Schemat transportu kwasów rybonukleinowych ilustruje rycina 2.

PODSUMOWANIE

W ciągu ostatnich dziesięciu lat zagadnieniom związanym z transportem jądrowo-cytoplazmatycznym poświęcono bardzo dużo uwagi. Opracowanie systemu *in vitro* badań importu białek z wykorzystaniem komórek ssaków permeabilizowanych digitoniną, zastosowanie nowoczesnych technik mikroskopii elektronowej oraz analiza wyselekcjonowanych mutantów *Saccharomyces cerevisiae* z defektem eksportu mRNA pozwoliły na zidentyfikowanie szeregu czynników zaangażowanych w proces wymiany jądrowo-cytoplazmatycznej. Niestety rola niektórych z tych czynników nadal nie jest w pełni poznana. Niewiele wiadomo także o mechanizmie translokacji białek i RNA przez centralny kompleks kanałowy NPC, nierozstrzygniętą pozostaje także sprawa hydrolizy GTP przy udziale GTPazy Ran. Dynamiczny rozwój badań w dziedzinie transportu jądrowo-cytoplazmatycznego budzi jednak nadzieję, że wkrótce wszystkie etapy tego fascynującego procesu zostaną dokładnie poznane.



RYCINA 2. Schemat przedstawiający udział białek wiążących RNA w eksporcie różnych typów kwasów rybonukleinowych (wg [66] zmodyfikowany)

PIŚMIENNICTWO

- [1] ADAM SA, ADAM EJH, CHI NC, VISSER GD. Cytoplasmic factors in NLS-mediated targeting to the nuclear pore complex. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1995; **LX**: 687–694.
- [2] AITCHISON JD, BLOBEL G, ROUT MP. Kap104p: a karyopherin involved in the nuclear transport of messenger RNA binding proteins. *Science* 1996; **274**, 624–627.
- [3] ALLEN TD, CRONSHAW JM, BAGLEY S, KISELEVA E, GOLDBERG MW. The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. *J Cell Sci* 2000; **113**: 1651–1659.
- [4] ALZHANOVA-ERICSSON AT, SUN X, VISA N, KISELEVA E, WURTZ T, DANEHOLT B. A protein of the SR family of splicing factors binds extensively to exonic Balbiani ring pre-mRNA and accompanies the RNA from the gene to the nuclear pore. *Gens & Dev* 1996; **10**: 2881–2893.
- [5] ARTS G-J, FORNEROD M, MATTAJ IW. Identification of a nuclear export receptor for tRNA. *Curr Biol* 1998; **8**: 305–314.
- [6] BECKER J, MELCHIOR F, GERKE V, BISCHOFF FR, PONSTINGL H, WITTINGHOFER A. RNA1 encodes a GTPase-activating protein specific for Gsp1p, the Ran/TC4 homologue of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1995; **270**: 11860–11865.
- [7] BEDDOW AL, RICHARDS SA, OREM NR, MACARA IG. The Ran/TC4 GTPase-binding domain: identification by expression cloning and characterization of a conserved sequence motif. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 3328–3332.
- [8] BISCHOFF FR, KLEBE CH, KRETSCHMER J, WITTINGHOFER A, PONSTINGL H. RanGAP1 induces GTPase activity of nuclear Ras-related Ran. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 2587–2591.
- [9] BISCHOFF FR, PONSTINGL H. Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature* 1991; **354**: 80–82.
- [10] BOGERD HP, FRIDELL RA, MADORE S, CULLEN BR. Identification of a novel cellular cofactor for the Rev/Rex class of retroviral regulatory proteins. *Cell* 1995; **82**: 485–494.
- [11] COLE CN, HAMMELL CM. Nucleocytoplasmic transport: driving and directing transport. *Curr Biol* 1998; **8**: 368–372.
- [12] COLE CN, SAAVEDRA C. Regulation of the export of RNA from the nucleus. *Cell & Dev Biol* 1997; **8**: 71–78.
- [13] CORBETT AH, SILVER PA. Nucleocytoplasmic transport of macromolecules. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997; **61**: 193–211.
- [14] ELFGANG C, ROSORIUS O, HOFER L, JAKSCHE H, HAUBER J, BEVEC D. Evidence for specific nucleocytoplasmic transport pathways used by leucine-rich nuclear export signals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 6229–6234.
- [15] 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.
- [16] ENGLMEIER L, OLIVO J-CH, MATTAJ IW. Receptor mediated substrate translocation through the nuclear pore complex without nucleotide triphosphate hydrolysis. *Curr Biol* 1998; **9**: 30–41.
- [17] FISCHER U, HUBER J, BOELENES WC, MATTAJ IW, LÜHRMANN R. The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* 1995; **82**: 475–483.
- [18] FORNEROD M, OHNO M, YOSHIDA M, MATTAJ IW. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 1997; **90**: 1051–1060.

- [19] FRIDELL RA, BOGERD HP, CULLEN BR. Nuclear export of late HIV-1 mRNAs occurs via a cellular protein export pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 4421–4424.
- [20] GERACE L. Nuclear export signals and the fast tract to the cytoplasm. *Cell* 1995; **82**: 341–344.
- [21] GOLDBERG MW, CRONSHAW JM, KISELEVA E, ALLEN TD. Nuclear-pore-complex dynamics and transport in higher eukaryotes. *Protoplasma* 1999; **209**: 144–156.
- [22] GÖRLICH D, HENKLEIN P, LASKEY RA, HARTMANN E. A 41 amino acid motif in importin- α confers binding to importin- β and hence transit into the nucleus. *EMBO J* 1996; **15**: 1810–1817.
- [23] GÖRLICH D, KUTAY U. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; **15**: 607–660.
- [24] GÖRLICH D, VOGEL F, MILLS AD, HARTMANN E, LASKEY RA. Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import. *Nature* 1995; **377**: 246–248.
- [25] HETZER M, MATTAJ IW. An ATP-dependent, Ran-independent mechanism for nuclear import of the U1A and U2B'' spliceosome proteins. *J Cell Biol* 2000; **148**: 293–303.
- [26] HUBER J, CRONSHAGEN U, KADOKURA M, MARSHALLSAY C, WADA T, SEKINE M, LÜHRMANN R. Snurportin1, an m³G-cap-specific nuclear import receptor with a novel domain structure. *EMBO J* 1998; **17**: 4114–4126.
- [27] IMAMOTO N, TACHIBANA T, MATSUBAE M, YONEDA Y. A karyophilic protein forms a stable complex with cytoplasmic components prior to nuclear pore binding. *J Biol Chem* 1995; **270**: 8559–8565.
- [28] IZAURRALDE E, JARMOŁOWSKI A, BEISEL CH, MATTAJ IW, DREYFUSS G, FISHER U. A role for the M9 transport signal of hnRNP A1 in mRNA nuclear export. *J Cell Biol* 1997; **137**: 27–35.
- [29] IZAURRALDE E, LEWIS J, GAMBERICH, JARMOŁOWSKI A, McGUIGAN C, MATTAJ IW. A cap-binding protein complex mediating U snRNA export. *Nature* 1995; **376**: 709–712.
- [30] IZZAURRALDE E, MATTAJ IW. RNA export. *Cell* 1995; **81**: 153–159
- [31] JÄKEL S, ALBIG W, KUTAY U, BISCHOFF FR, SCHWAMBORN K, DOENECKE D, GÖRLICH D. The importin beta/importin 7 heterodimer is a functional nuclear import receptor for histone H1. *EMBO J* 1999; **18**: 2411–2423.
- [32] JARMOŁOWSKI A, BOELEN WC, IZAURRALDE E, MATTAJ IW. Nuclear export of different classes of RNA is mediated by specific factors. *J Cell Biol* 1994; **124**: 627–635.
- [33] JOHNSON-SALIBA M, SIDDON NA, CLARKSON MJ, TREMETHICK DJ, JANS DA. Distinct importin recognition properties of histones and chromatin assembly factors. *FEBS Lett* 2000; **467**: 169–174.
- [34] KANG Y, CULLEN BR. The human Tap protein is a nuclear mRNA export factor that contains novel RNA-binding and nucleocytoplasmic transport sequences. *Genes & Development* 1999; **13**: 1126–1139.
- [35] KISELEVA E, GOLDBERG MW, CRONSHAW J, ALLEN TD. The nuclear pore complex: structure, function and dynamics. *Crit Rev Eukaryotic Gene Expression* 2000; **10**: 101–112.
- [36] KMIĘCIAK M, SZWEYKOWSKA-KULIŃSKA Z, JARMOŁOWSKI A. Transport białek i RNA pomiędzy jądrem komórkowym a cytoplazmą. *Post Biochem* 1999; **45**: 270–284.
- [37] KOSE S, IMAMOTO N, TACHIBANA T, SHIMAMOTO T, YONEDA Y. Ran-unassisted nuclear migration of a 97-kD component of nuclear pore targeting complex. *J Cell Biol* 1997; **139**: 841–849.
- [38] KOSE S, IMAMOTO N, TACHIBANA T, YOSHIDA M, YONEDA Y. β -subunit of nuclear pore-targeting complex (importin- β) can be exported from the nucleus in a Ran independent manner. *J Biol Chem* 1999; **274**: 3946–3952.
- [39] KRZEŚLAK A, LIPIŃSKA A. O-glikozylacja białek jądrowych. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 441–460
- [40] KUTAY U, BISCHOFF FR, KOSTKA S, KRAFT R, GÖRLICH D. Export of importin α from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell* 1997; **90**, 1061–1071.

- [41] KUTAY U, LIPOWSKY G, IZAURRALDE E, BISCHOFF FR, SCHWARZMAIER P, HARTMANN E, GÖRLICH D. Identification of a tRNA-specific nuclear export receptor. *Mol Cell* 1998; **1**: 359–369.
- [42] LIPOWSKY G, BISCHOFF FR, SCHWARZMAIER P, KRAFT R, KOSTKA S, HARTMANN E, KUTAY U, GÖRLICH D. Exportin 4: a mediator of a novel nuclear export pathway in higher eukaryotes. *EMBO J* 2000; **19**: 4362–4371.
- [43] LOUNSBURY KM, MACARA IG. Ran-binding protein 1 (RanBP1) forms a ternary complex with Ran and karyopherin β and reduces RanGTPase-activating protein (RanGAP) inhibition by karyopherin β . *J Biol Chem* 1997; **272**: 551–555.
- [44] LUND E, DAHLBERG JE. Proofreading and aminoacylation of tRNAs before export from the nucleus. *Science* 1998; **282**: 2082–2085.
- [45] MAHAJAN R, DELPHIN CH, GUAN T, GERACE L, MELCHIOR F. A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* 1997; **88**: 97–107.
- [46] MATUNIS MJ, COUTAVAS E, BLOBEL G. A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 1996; **135**: 1457–1470.
- [47] MELCHIOR F, GERACE L. Two-way trafficking with Ran. *Trend Cell Biol* 1998; **8**: 175–179.
- [48] MELCHIOR F, GUAN T, PASCHAL B, GERACE L. Biochemical and structural analysis of nuclear protein import. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1995; **LX**: 707–716.
- [49] MELCHIOR F, GUAN T, YOKOYAMA N, NISHIMOTO T, GERACE L. GTP hydrolysis by Ran occurs at the nuclear pore complex in an early step of protein import. *J Cell Biol* 1995; **131**: 571–581.
- [50] MICHAEL WM, CHOI M, DREYFUSS G. A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway. *Cell* 1995; **83**: 415–422.
- [51] MOROIANU J, BLOBEL G, RADU A. Nuclear protein import: Ran-GTP dissociates the karyopherin $\alpha\beta$ heterodimer by displacing α from an overlapping binding site on β . *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 7059–7062.
- [52] MURPHY R, WENTE SR. An RNA-export mediator with an essential nuclear export signal. *Nature* 1996; **383**: 357–360.
- [53] NACHURY MV, WEIS K. The direction of transport through the nuclear pore can be inverted. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 9622–9627.
- [54] NAKIELNY S, DREYFUSS G. The hnRNP C proteins contain a nuclear retention sequence that can override nuclear export signals. *J Cell Biol* 1996; **134**: 1365–1373.
- [55] NAKIELNY S, FISCHER U, MICHAEL WM, DREYFUSS G. RNA transport. *Annu Rev Neurosci* 1997; **20**: 269–301.
- [56] NEHRBASS U, BLOBEL G. Role of the nuclear transport factor p10 in nuclear import. *Science* 1996; **272**: 120–122.
- [57] NEVILLE M, STUTZ F, LEE L, DAVIS LI, ROSBASH M. The importin-beta family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export. *Curr Biol* 1997; **7**: 767–775.
- [58] NIGG EA. Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature* 1997; **386**: 779–787.
- [59] OHNO M, FORNEROD M, MATTAJ IW. Nucleocytoplasmic transport: the last 200 nanometers. *Cell* 1998; **92**: 327–336.
- [60] OHNO M, SEGREF A, BACHI A, WILM M, MATTAJ IW. PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation. *Cell* 2000; **101**: 187–198.
- [61] OSSAREH-NAZARI B, BACHELERIE F, DARGEMONT C. Evidence for a role of CRM1 in signal-mediated nuclear protein export. *Science* 1997; **278**, 141–143.

- [62] PARASKEVA E, IZAURRALDE E, BISCHOFF FR, HUBER J, KUTAY U, HARTMANN E, LÜRMAN R, GÖRLICH D. CRM1-mediated recycling of snurportin 1 to the cytoplasm. *J Cell Biol* 1999; **145**: 255–264.
- [63] PASCHAL BM, GERACE L. Identification of NTF2, a cytosolic factor for nuclear import that interacts with nuclear pore complex protein p62. *J Cell Biol* 1995; **129**: 925–937.
- [64] PLAFKER K, MACARA IG. Facilitated nucleocytoplasmic shuttling of the Ran binding protein RanBP1. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 3510–3521.
- [65] POKRYWKA NJ, GOLDFARB DS. Nuclear export pathways of tRNA and 40 S ribosomes include both common and specific intermediates. *J Biol Chem* 1995; **270**: 3619–3624.
- [66] POLLARD VW, MICHAEL WM, NAKIELNY S, SIOMI MC, WANG F, DREYFUSS G. A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. *Cell* 1996; **86**: 985–994.
- [67] QUIMBY BB, LAMITINA T, LHERNAULT SW, CORBETT AH. The mechanism of Ran import into the nucleus by nuclear transport factor 2. *J Biol Chem* 2000; **275**: 28575–28582.
- [68] RIBBECK K, LIPOWSKY G, KENT HM, STEWARD M, GÖRLICH D. NTF2 mediates nuclear import of Ran. *EMBO J* 1998; **17**: 6587–6598.
- [69] RICHARDS SA, LOUNSBURY KM, CAREY KL, MACARA IG. A nuclear export signal is essential for the cytosolic localization of the Ran binding protein, RanBP1. *J Cell Biol* 1996; **134**: 1157–1168.
- [70] ROSORIUS O, REICHART B, KRÄTZER F, HEGER P, DABAUVALLE M-C. Nuclear pore localization and nucleocytoplasmic transport of eIF-5A: evidence for direct interaction with the export receptor CRM1. *J Cell Sci* 1999; **112**: 2369–2380.
- [71] ROUT MP, BLOBEL G, AITCHISON JD. A distinct nuclear import pathway used by ribosomal proteins. *Cell* 1997; **89**: 715–725.
- [72] RYAN KJ, WENTE SR. The nuclear pore complex: a protein machine bridging the nucleus and cytoplasm. *Curr Cell Biol* 2000; **12**: 361–371.
- [73] SAITOH H, COOKE CA, BURGESS WH, EARNSHAW WC, DASSO M. Direct and indirect association of the small GTPase Ran with nuclear pore proteins and soluble transport factors: studies in *Xenopus laevis* egg extracts. *Mol Biol Cell* 1996; **7**: 1319–1334.
- [74] SAITOH H, PU R, CAVENAGH M, DASSO M. RanBP2 associates with Ubc9p and modified form of RanGAP1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 3736–3741.
- [75] SCHWOEBEL ED, TALCOTT B, CUSHMAN I, MOORE MS. Ran-dependent signal-mediated nuclear import does not require GTP hydrolysis by Ran. *J Biol Chem* 1998; **273**: 35170–35175.
- [76] SCHLENSTEDT G. Protein import into the nucleus. *FEBS Lett* 1996; **389**, 75–79.
- [77] SINGH BB, PATEL HH, ROEPMAN R, SCHICK D, FERREIRA PA. The zinc finger cluster domain of RanBP2 is a specific docking site for the nuclear export factor, exportin-1. *J Biol Chem* 1999; **274**: 37370–37378.
- [78] SIOMI H, DREYFUSS G. A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein. *J Cell Biol* 1995; **129**: 551–560.
- [79] SIOMI MC. The molecular mechanisms of messenger RNA nuclear export. *Cell Structure and Function* 2000; **25**: 227–235.
- [80] SMITH A, BROWNAWELL A, MACARA IG. Nuclear import of Ran is mediated by the transport factor NTF2. *Curr Biol* 1998; **8**: 1403–1406.
- [81] SMITH HMS, RAIKHEL NV. Protein targeting to the nuclear pore. What can we learn from plants? *Plant Physiol* 1999; **119**: 1157–1163.
- [82] STADE K, FORD CS, GUTHRIE C, WEIS K. Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* 1997; **90**: 1041–1050.
- [83] STEGGERDA SM, PASCHAL BM. The mammalian Mog1 protein is a guanine nucleotide release factor for Ran. *J Biol Chem* 2000; **275**: 23175–23180.

- [84] STUTZ F, KANTOR J, ZHANG D, McCARTHY T, NEVILLE M, ROSBASH M. The yeast nucleoporin Rip1p contributes to multiple export pathways with no essential role for its FG-repeat region. *Gen & Dev* 1997; **11**: 2857–2868.
- [85] ULLMAN KS, POWERS MA, FORBES DJ. Nuclear export receptors: from importin to exportin. *Cell* 1997; **90**: 967–970.
- [86] VISA N, IZAURRALDE E, FERREIRA J, DANEHOLT B, MATTAJ IW. A nuclear cap-binding complex binds Balbiani ring pre-mRNA cotranscriptionally and accompanies the ribonucleoprotein particle during nuclear export. *J Cell Biol* 1996; **133**: 5–14.
- [87] WILKEN N, SENÉCAL J-L, SCHEER U, DABAUVALLE M-C. Localization of the Ran-GTP binding protein RanBP2 at the cytoplasmic side of the nuclear pore complex. *Eur J Cell Biol* 1995; **68**: 211–219.
- [88] YASEEN NR, BLOBEL G. Cloning and characterization of human karyopherin β 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 4451–4456.
- [89] YOKOYA F, IMAMOTO N, TACHIBANA T, YONEDA Y. β -catenin can be transported into the nucleus in a Ran-unassisted manner. *Mol Biol Cell* 1999; **10**: 1119–1131.
- [90] YONEDA Y. How proteins are transported from cytoplasm to the nucleus. *J Biochem* 1997; **121**: 811–817.
- [91] YONEDA Y. Nucleocytoplasmic protein traffic and its significance to cell function. *Genes to Cells* 2000; **5**: 777–787.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 01.02.2001 r.

Przyjęto: 20.03.2001 r.

Adres autora: S. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

e-mail: annal@biol.uni.lodz.pl

**MAŁA TKANKA – DUŻA SIŁA.
TKANKA TŁUSZCZOWA BRUNATNA:
BUDOWA, WYSTĘPOWANIE, ZNACZENIE**

**SMALL TISSUE – LARGE STRENGTH.
BROWN ADIPOSE TISSUE:
STRUCTURE, EXISTENCE AND SIGNIFICANCE**

Grzegorz WYROBIEC, Monika STĘPIEŃ

Śląska Akademia Medyczna w Katowicach,
I Katedra i Zakład Histologii i Embriologii w Zabrze-Rokitnicy

Streszczenie: Tkanka tłuszczowa brunatna jest rodzajem tkanki łącznej, występującej u dorosłego człowieka w niewielkich ilościach. Znacznie większe znaczenie ma ta tkanka dla małych ssaków i zwierząt zapadających w sen zimowy. Właśnie jej rola u zwierząt przechodzących w stan hibernacji stanowi dla badaczy ekscytujący temat do rozważań nad znaczeniem tej skąpo występującej tkanki i nad możliwością wykorzystania jej termogenicznych właściwości dla człowieka. Niniejsza praca stara się usystematyzować dane dotyczące występowania i rozmieszczenia tkanki u człowieka. Przedstawia budowę mikroskopową komórek tkanki tłuszczowej brunatnej, a także zwraca uwagę na jej znaczenie w procesie wytwarzania ciepła. Mechanizmy wpływające na utlenianie przez tą tkankę kwasów tłuszczowych z wytworzeniem CO₂ i H₂O oraz uwolnieniem dużej ilości ciepła są przyczyną zainteresowania współczesnej medycyny tkanką tłuszczową brunatną i jej wykorzystaniem w walce z otyłością oraz jej następstwami, takimi jak: nadciśnienie tętnicze, choroba wieńcowa, cukrzyca. Szczegółowe poznanie budowy i mechanizmów rządzących tkanką tłuszczową brunatną u zwierząt może otworzyć nowe możliwości do leczenia otyłości u ludzi.

(Postępy Biologii Komórki 2001; 28: 395–406)

Słowa kluczowe: tkanka tłuszczowa brunatna, białko rozprzęgające, otyłość.

Summary: Brown adipose tissue is a kind of connective tissue, existing in adults in small amounts. This tissue has much more significance for small mammals and animals sinking into winter sleep. This part in animals coming into the hibernation state is an exciting subject to consider this scantily occurring tissue and a possibility to utilize its thermogenic properties for people. The present paper is intended to systematize data concerning existence and tissue distribution in people. It presents microscopic structure of brown adipose tissue cells and calls attention to its significance in heat generation process. Mechanisms

affecting fatty acid oxidation by this tissue with CO₂ and H₂O generation and release of large heat amount are reasons of interest in brown adipose tissue by modern medicine and its utilization in struggle against adiposity and its consequences, such as: arterial hypertension, coronary disease and diabetes. Detailed knowledge in structure and mechanisms managing brown adipose tissue at animals may open new possibilities to treat human adiposity.

(*Advances in Cell Biology 2001; 28: 395–406*)

Key words: brown adipose tissue, uncoupling protein, adiposity.

I. WPROWADZENIE

Pojęcie tkanki tłuszczowej brunatnej wprowadził w roku 1895 Hammar [3]. Pomimo że od tego czasu minęło ponad 100 lat, to dopiero w ostatnim czasie zwrócono uwagę na właściwości tej tkanki, mogące odegrać przełomową rolę w walce z otyłością u ludzi. Z pewnością pośredni wpływ na zainteresowanie tkanką tłuszczową brunatną ma fakt, iż otyłość jest czynnikiem wielu groźnych chorób, takich jak: cukrzyca, choroba niedokrwienna serca, nadciśnienie tętnicze, udar mózgu i wiele innych. Choroby te są główną przyczyną umieralności w krajach rozwiniętych. W związku z tym, że leczenie otyłości jest niezwykle trudne, próbuje się znaleźć nowe możliwości walki z tą chorobą. W ostatnich latach reklamowano wiele cudownych diet, środków nasilających spalanie tłuszczów, zmniejszających masę ciała. Żadna z tych cudownych metod nie oparła się kryteriom czasu, ani też nie ma rzetelnej dokumentacji naukowej [25]. Tymczasem tkanka tłuszczowa brunatna dzięki szczególnej budowie oraz unikatowym właściwościom w procesie wytwarzania ciepła może stać się alternatywą w leczeniu otyłości.

II. WYSTĘPOWANIE I ROZMIESZCZENIE

U człowieka tkanka tłuszczowa brunatna pojawia się w dwóch ostatnich miesiącach życia płodowego i w rozwiniętej postaci można ją spotkać w okresie niemowlęctwa [27, 47, 55, 58]. Tkanka tłuszczowa brunatna u noworodka występuje w największej ilości w okolicach tętnic szyjnych, wokół tętnic podobojczykowych, w dole pachowym, w śródpiersiu, w okolicy międzyłopatkowej, wokół nerek i nadnerczy [32, 41, 47, 49, 53]. W miarę dojrzewania organizmu ilość tkanki tłuszczowej brunatnej ulega zmniejszeniu. U dorosłych właściwie spotyka się ją tylko sporadycznie w postaci niewielkich skupisk [47]. Udowodniono jednakże, że u niektórych osobników tkanka tłuszczowa brunatna pozostaje do końca życia. W przeprowadzonych badaniach histopatologicznych zwłok ludzkich (wiek zmarłych powyżej 80 lat) znaleziono tkankę tłuszczową brunatną w okolicy karku, okolicy

okołoaortalnej, okołonerkowej oraz w śródpiersiu przednim [45, 47]. Klasycznie jednak adipocyty wielopęcherzykowe z czasem przechodzą w jednopęcherzykowe, przy czym zachowują potencjalne cechy czynnościowe komórek tkanki tłuszczowej brunatnej [50, 55]. Podkreśla się również, iż tkanka tłuszczowa brunatna może pojawić się ponownie u organizmów dorosłych. Z tego typu zjawiskiem spotykamy się u osób pracujących w skrajnie niskiej temperaturze, a także u pacjentów z guzem chromochłonnym nadnerczy. Pojawiająca się w tych warunkach tkanka tłuszczowa brunatna ma taką samą lokalizację jak tkanka tłuszczowa brunatna występująca u noworodków. Świadczy to o tym, iż nawet u osób dorosłych są obecne pluripotencjalne komórki macierzyste dla komórek tkanki tłuszczowej brunatnej. Podobne zjawisko nie występuje u gryzoni, u których przez całe życie utrzymują się wykrywalne ilości tkanki tłuszczowej brunatnej [47, 57]. Zwraca się również uwagę, iż w miejscach, gdzie u noworodków występuje tkanka tłuszczowa brunatna, u kilkuletnich dzieci można spotkać tkankę tłuszczową zawierającą komórki tłuszczowe brunatne w środku zrazików, a komórki tłuszczowe żółte na ich obwodzie. Stanowi to niejako dowód, iż komórki tłuszczowe brunatne z czasem mogą przekształcić się w komórki tłuszczowe żółte [35, 55]. Typowo u człowieka dochodzi do przemiany tkanki tłuszczowej brunatnej w tkankę tłuszczową żółtą. Sądzi się, że u płci żeńskiej powyższy proces odbywa się już w pierwszym miesiącu życia po urodzeniu, natomiast u płci męskiej w 6–13 miesiącu życia. Takie dłuższe trwanie tkanki tłuszczowej brunatnej u płci męskiej pozwala przypuszczać, że spełnia ona rolę okresowo czynnego gruczołu dokrewnego [37, 38]. Poparciem dla tej tezy stały się klasyczne już dzisiaj badania Fawcetta. Wykazał on mianowicie, że hypofyzektomia bądź adrenalectomia powodują u szczura m.in. zanik lipidów w komórkach tkanki tłuszczowej brunatnej i że zmiany te cofają się po podaniu egzogennych hormonów kory nadnerczy. Stwierdził także, iż w pierwszych dniach po obustronnej adrenalectomii u szczura białego pojawiają się morfologiczne i morfochemiczne wykładniki pobudzenia tkanki tłuszczowej brunatnej świadczące prawdopodobnie o syntezie i wydzielaniu przez nią kortykosterydów. Stąd nieraz nazywano tkankę tłuszczową brunatną gruczołem międzyłopatkowym czy też gruczołem tłuszczowym [3, 4]. Ostatnio zaś określono współzależność pomiędzy wielkością tkanki tłuszczowej brunatnej a nasileniem gorączki, jak również stwierdzono, iż komórki tkanki tłuszczowej brunatnej wytwarzają IL-1- α i IL-6. Powyższe ustalenia podkreślają rolę tkanki tłuszczowej brunatnej jako organu wewnątrzwydzielniczego związanego z kontrolą temperatury [5].

Tkanka tłuszczowa brunatna znacznie obficiej niż u człowieka występuje u zwierząt zapadających w sen zimowy, takich jak: jeże, niedźwiedzie, świstaki, a także u gryzoni nie zapadających w sen zimowy, a narażonych na zimno, takich jak: mysz, szczur, świnka morska, a także u owiec, bydła domowego i małp [3, 7, 45, 57]. Znane jest również zjawisko rozrostu tkanki tłuszczowej brunatnej w tarczycy niektórych gryzoni w okresie zimowym. Uważa się, iż u tych zwierząt, w nie-

korzystnych warunkach środowiska, tkanka tłuszczowa brunatna może odgrywać ważniejszą rolę w procesach termoregulacji niż gruczoł tarczowy [47]. Zwykle tkanka tłuszczowa brunatna stanowi poniżej 1% masy ciała (1–2 g u szczura, 20–40 g u noworodków ludzkich), a jej pojemność tlenowa jest 10 razy większa niż mięśni szkieletowych o odpowiadającej jej masie [45, 49]. W szczególnych przypadkach tkanka tłuszczowa brunatna stanowi znacznie większy procent masy ciała. Zdarza się to u ssaków o bardzo małych rozmiarach ciała. Takim przykładem jest ryjówka aksamitna (*Sorex araneus*). Jest to mały ssak owadożerny, u którego straty ciepła na skutek niekorzystnej proporcji między objętością a powierzchnią ciała są wyjątkowo duże. U ryjówki aksamitnej aż 8% masy ciała stanowi tkanka tłuszczowa brunatna [7].

III. BUDOWA MIKROSKOPOWA

Tkanka tłuszczowa brunatna ma niemal identyczną budowę u wszystkich ssaków. Komórki tkanki tłuszczowej brunatnej są zgrupowane w zraziki, te z kolei tworzą zrazy. Zraziki i zrazy są otoczone tkanką łączną włóknistą, widoczną w skrawkach w postaci pasm. W tych pasmach widoczne są przekroje naczyń żylnych i tętniczych, pęczki włókien nerwowych beźmielinowych, a także komórki tłuszczowe żółte. Kolor brunatny tkanki spowodowany jest obecnością cytochromów zlokalizowanych w bardzo licznych mitochondriach [7, 35, 58]. Komórki tłuszczowe brunatne mają najczęściej postać komórki tłuszczowej wielopęcherzykowej o rozmiarach 20–40 nm [2]. Jądro kształtu kulistego jest położone w środkowej części komórki. W cytoplazmie komórek tkanki tłuszczowej brunatnej (znacznie obfitszej niż w tkance tłuszczowej żółtej) krople tłuszczu (średnica od ułamka mikrometra do kilku mikrometrów) są rozmieszczone dość równomiernie i mają tendencję do sąsiedzowania z licznymi mitochondriami. Liczba i wielkość kropli tłuszczu jest zmienna. Głównym składnikiem kropli tłuszczu są trójglicerydy [2, 7, 35, 57]. Zwraca uwagę fakt, iż w komórkach hodowlanych tkanki tłuszczowej brunatnej stwierdza się jednorodną, dużą kroplę tłuszczu. Takie gromadzenie się tłuszczu, charakterystyczne przecież dla tkanki tłuszczowej żółtej, jest następstwem pozbawienia unerwienia hodowlanych komórek tkanki tłuszczowej brunatnej. Z tego też powodu odnerwionych komórek tej tkanki w mikroskopie świetlnym nie można odróżnić od komórek tkanki tłuszczowej żółtej. Dopiero wykorzystanie transmisyjnego mikroskopu świetlnego do obserwacji mitochondriów pozwala rozpoznać komórki tkanki tłuszczowej brunatnej [50]. Najbardziej wyróżniającą cechą komórek tkanki tłuszczowej brunatnej jest obecność w ich cytoplazmie dużej liczby mitochondriów o bardzo dobrze rozwiniętych grzebieniach. Grzebienie te są blaszkowate, gęsto upakowane i rozciągają się przez całą szerokość mitochondriów [7, 35]. Mitochondria tkanki tłuszczowej

brunatnej izolowane i zawieszane w 250 mM roztworze sacharozy wykazują w mikroskopie elektronowym strukturę wysoce skondensowaną [7]. Macierz mitochondrialna wykazuje gęstość elektronową wyższą niż grzebienie (tzw. odwrotny kontrast). W macierzy obserwuje się niewielkie ziarenka, prawdopodobnie rybosomy oraz większe wtręty, których rola nie jest znana [35]. Mitochondria te mają znacznie większą średnicę od mitochondriów tkanki tłuszczowej żółtej. Średnica ta wynosi 0,5–1,0 μm . W mitochondriach znajdują się cytochromy, nadające tkance brunatne zabarwienie. Pod względem zawartości cytochromów mitochondria tkanki tłuszczowej brunatnej dorównują mitochondriom serca znanym z intensywnej przemiany oddechowej. Zawierają ponadto pełen zestaw enzymów umożliwiający aktywację i utlenianie kwasów tłuszczowych. Charakterystyczna jest również obecność bardzo aktywnej flawinowej dehydrogenazy glicerofosforanowej [7]. W cytoplazmie tkanki tłuszczowej brunatnej występuje niewielka ilość błon siateczki śródplazmatycznej gładkiej i szorstkiej. Aparat Golgiego jest niewielkich rozmiarów i leży w obwodowej części komórki. Widoczne są również dość liczne rybosomy występujące w postaci polirybosomów. Błona komórkowa ma płytkie zagłębienia o wymiarach 40–50 nm tzw. jamki komórkowe, których funkcja nie jest znana. W pobliżu błony komórkowej występują pęcherzyki okryte (ang. *coated vesicles*) – są to organella biorące udział w endocytozie za pośrednictwem receptorów [35, 50]. Tkanka tłuszczowa brunatna jest bardzo silnie unaczyniona. Każda komórka tkanki tłuszczowej brunatnej kontaktuje się z naczyniem włosowatym. Zimno powoduje zwiększenie średnicy światła naczyń włosowatych. Pojawiają się także zmiany w śródbłonku tych naczyń. Jądra śródbłonka powiększają się i stają się bardziej jasne [2]. Do naczyń krwionośnych dochodzą pozazwojowe włókna nerwowe. Włókna te kończą się w ścianie naczyń krwionośnych. Do tkanki tłuszczowej brunatnej wnikają także włókna przedzwojowe łączące się za pomocą synaps z neuronami leżącymi wewnątrz zrazików. Z kolei od tych neuronów odchodzą krótkie neuryty, które kończą się w pobliżu błony komórkowej komórek tkanki tłuszczowej brunatnej. Mediatorem, który jest obecny w pęcherzykach synaptycznych zakończeń nerwowych, jest noradrenalina, która (co będzie opisane w następnej części) jest odpowiedzialna za stymulację lipolizy. Ciepło produkowane przez tkankę tłuszczową brunatną sprawia, że temperatura krwi opuszczającej tę tkankę może być o kilka stopni wyższa niż temperatura krwi dopływającej. Warto podkreślić, iż objętość krwi przepływającej przez tkankę tłuszczową brunatną może zwiększyć się nawet stukrotnie. Pozwala to na szybkie rozprowadzenie ciepła w organizmie [7, 35, 45]. Ustalono, iż ekspozycja na zimno powoduje właśnie tak znaczne zwiększenie przepływu krwi przez tkankę tłuszczową brunatną. W eksperymentach wykonanych na szczurach ustalono, iż zimno powoduje, iż przez komórki tkanki tłuszczowej brunatnej przepływa około 25% rzutu skurczowego serca [3].

IV. ZNACZENIE W PROCESIE WYTWARZANIA CIEPŁA

Gdyby nie ustalona już rola tkanki tłuszczowej brunatnej w procesach wytwarzania ciepła, tkanka ta byłaby przez wielu niedoceniana. Tymczasem funkcją tkanki tłuszczowej brunatnej tłumaczy się tzw. termogenezę indukowaną przez dietę i fakt, dlaczego niektóre osoby mogą jeść i nie być otyłe [24]. W chwili obecnej otyłość stała się chorobą cywilizacyjną i wiąże się z takimi powikłaniami metabolicznymi, jak: hiperglikemia, hiperlipemia, nadciśnienie, choroby naczyń wieńcowych. Ostatnio okazuje się, iż tkanka tłuszczowa brunatna może stać się istotnym elementem w walce z otyłością i jej następstwami [52, 56, 57].

Wytwarzanie dużej ilości ciepła przez komórki tkanki tłuszczowej brunatnej wiąże się ze swoistą cechą jej mitochondriów. W mitochondriach innych komórek energia uwalniana w łańcuchu oddechowym jest zużywana do pompowania protonów przez błonę wewnętrzną. Powstaje duże stężenie protonów w przestrzeni międzybłonowej mitochondrium. Protony te przedostają się zgodnie z gradientem stężeń przez kanały białka śródbłonowego – syntetazy ATP. Energia takiego przepływu protonów jest magazynowana w wysokoenergetycznych wiązaniach ATP, który jest syntetyzowany przez syntetazę ATP [15]. W tkance tłuszczowej brunatnej spotykamy się z małą aktywnością syntetazy ATP, a występujący normalnie po obu stronach wewnętrznej błony mitochondrialnej gradient stężeń protonów w tkance tłuszczowej brunatnej ulega ciągłej dyssypacji pod wpływem ciepłotwórczego białka – termogeniny. Białko to o masie cząsteczkowej 32 Da należy do tzw. rozprzegaczy fosforylacji oksydacyjnej i jest oznaczone jako UCP-1 (ang. *uncoupling protein*). Jest ono umiejscowione w wewnętrznej błonie mitochondrialnej i stanowi unikatowy kanał protonowy. Termogenina rozprzega gradient elektrochemiczny generowany w obrębie wewnętrznej błony mitochondrialnej w czasie procesu oddychania. W wyniku tego nie dochodzi do oksydacyjnej fosforylacji. W ten sposób energia nie zostaje zużyta do syntezy ATP, a ulega rozproszeniu w postaci ciepła [1, 17, 20, 24, 26, 28, 35, 36, 40, 41, 43, 51, 53]. Bodźcami, które wpływają na ekspresję białka UCP-1, są katecholaminy, uwalniane z zakończeń nerwów układu współczulnego np. u noworodka pod wpływem stresu z powodu niskiej temperatury otoczenia po porodzie. Uwolniona noradrenalina stymuluje receptor β_3 -adrenergiczny. Receptor ten charakteryzuje się niskim powinowactwem do typowych agonistów receptora β -adrenergicznego, natomiast wysokim powinowactwem do agonistów receptora termogenicznego (np. BRL 37344) [19, 35, 44, 54, 57]. Do tej pory udało się sklonować i zsekwencjonować receptory β_3 -adrenergiczne u 7 gatunków ssaków: człowieka, szczura, myszy, krowy, małpy rezus, świnki morskiej, psa, chomika, świni [13, 22, 23, 34, 39, 57]. U człowieka receptor ten występuje głównie w tkance tłuszczowej brunatnej, a oprócz tego w pęcherzyku żółciowym, przewodzie pokarmowym oraz w lewym przedsionku serca [18, 32, 54, 57].

U gryzoni znaleziono go oprócz tkanki tłuszczowej brunatnej w wątrobie, tchawicy, przełyku, żołądku, jelicie [19, 57]. W adipocytach tkanki tłuszczowej brunatnej receptor β_3 -adrenergiczny wiąże się z białkiem G_s i aktywuje cyklazę adenylową III. W cytoplazmie cyklaza adenylowa katalizuje powstanie cyklicznego AMP (cAMP). Związek ten uczynnia z kolei białkową kinazę A fosforylującą i czynniącą lipazę lipoproteinową. W wyniku powyższych procesów dochodzi do lipolizy trójglicerydów. Powstałe wolne kwasy tłuszczowe są utleniane do CO_2 i H_2O , a występująca w wewnętrznej błonie mitochondrialnej komórek tkanki tłuszczowej brunatnej termogenina powoduje, iż uzyskana w tym procesie energia nie zostaje zmagazynowana w wysokoenergetycznych wiązaniach ATP, tylko uwalnia się w postaci ciepła [31, 32, 54, 57]. Dokładny mechanizm działania białka UCP-1 nie został dotychczas całkowicie poznany. Sądzi się, że nie przenosi ono bezpośrednio protonów, ale aniony kwasów tłuszczowych. Aniony te dzięki wysokiemu potencjałowi błonowemu mogą przechodzić na zewnętrzną stronę wewnętrznej błony mitochondrialnej. Tam zostają uprotonowane i aby zamknąć cykl, wracają do mitochondriów, gdzie oddają proton. Zgodnie z tą teorią kwasy tłuszczowe zachowują się jak krążące protonofory, a białko UCP-1 jest transportem anionów kwasów tłuszczowych. UCP-1 ma region zwany „miejscem dokującym kwasy tłuszczowe” i z miejscem tym reagują kwasy tłuszczowe. Istotne znaczenie w tym procesie odgrywają reszty His¹⁴⁵ i His¹⁴⁷ umiejscowione w pętli po stronie matriks mitochondrialnej pomiędzy 3 i 4 helisą transbłonową białka UCP-1 [14, 17, 28, 29, 57]. Ostatnio ustalono, iż białkiem, które aktywuje syntezę mitochondrialnych białek rozprzegających w tkance tłuszczowej brunatnej, a także w tkance tłuszczowej żółtej i mięśniach, jest leptyna [10, 12, 21, 46, 48, 49]. Bezpośrednie działanie termogenne i metaboliczne leptyny na te tkanki jest wykrywalne głównie u gryzoni laboratoryjnych. Przypuszcza się, że u człowieka leptyna działa głównie ośrodkowo i wpływ obwodowy jest marginalny. Nie znaleziono także dodatniej korelacji pomiędzy stężeniem leptyny we krwi i spoczynkowym zużyciem energii przez organizm [11, 30]. Zwraca uwagę występowanie mRNA leptyny w bardzo wczesnym okresie różnicowania się adipocytów tkanki tłuszczowej brunatnej. Uważa się jednak, że ekspresja leptyny w tkance tłuszczowej brunatnej ulega zahamowaniu na skutek stymulacji rozwijającego się po urodzeniu układu adrenergicznego [8, 12, 47].

W ostatnich latach powiększono rodzinę białek UCP. Zidentyfikowano 2 nowe białka: UCP-2 i UCP-3, a także znaleziono UCP-roślinne [15, 20, 26, 33, 41, 42, 43, 51, 53, 57]. Ustalono, iż UCP-2 występuje bardzo szeroko w organizmie ludzkim. Oprócz tkanki tłuszczowej brunatnej znaleziono je w tkance tłuszczowej żółtej, nerkach, płucach, mięśniach szkieletowych, łożysku, a także w białych krwinkach i makrofogach. W przeciwieństwie do UCP-2, białko UCP-3 znaleziono tylko w mięśniach szkieletowych i tkance tłuszczowej brunatnej. Te nowe białka rozprzegające przyczyniają się do szybkości przemian metabolicznych ustroju, procesów utleniania tłuszczów. Białko UCP-2 ma szczególny wpływ na masę ciała, wiąże

termoregulacje z procesem zapalnym, ma wpływ na wydzielanie insuliny. Natomiast UCP-3 przypuszcza się, iż ma wpływ na procesy termogenezy w mięśniach szkieletowych [15, 20, 28, 29, 33, 41, 42, 51, 57]. Upośledzenie termogenezy w tkance tłuszczowej brunatnej uważa się w chwili obecnej za jeden z możliwych mechanizmów wzrostu masy ciała. Mimo iż u dorosłego człowieka tkanka tłuszczowa brunatna fizjologicznie występuje w niewielkiej ilości, to jednak nie bez znaczenia jest poznanie mechanizmów rządzących wytwarzaniem ciepła w tej tkance oraz ogólnych zasad regulujących poziom tłuszczu w organizmie przy udziale tkanki tłuszczowej brunatnej.

W badaniach przeprowadzonych przez Cittadini A. i współ. w roku 1999 wykazano, iż transgeniczna ablacja tkanki tłuszczowej brunatnej u 30 badanych myszy ma niewątpliwy wpływ na rozwój otyłości, a co za tym idzie obciążenie układu sercowo-naczyniowego i rozwój choroby wieńcowej. Grupę 30 myszy transgenicznych ze zredukowaną tkanką tłuszczową brunatną porównano z 30 osobnikami grupy kontrolnej z zachowaną tkanką tłuszczową brunatną. Osobniki pozbawione tkanki tłuszczowej brunatnej miały o 77% wyższą masę ciała w porównaniu z grupą kontrolną. Wyższej masie ciała towarzyszyło podwyższone ciśnienie tętnicze (85 ± 1 mm Hg w stosunku do grupy kontrolnej 66 ± 1 mm Hg). Określono również morfometrycznie średnice miocytów i chociaż średnice porównywanych grup zwierząt były podobne, to jednak stwierdzono większy procent zwłóknienia śródmiąższowego u myszy transgenicznych w porównaniu z grupą kontrolną ($7,5 \pm 2\%$ w porównaniu do $4,2 \pm 0,2\%$ myszy kontrolnych). We wnioskach podkreślono również fakt, iż myszy ze zredukowaną tkanką tłuszczową brunatną mogą służyć jako model obserwacji patologicznych dla powikłań układu krążenia związanych z otyłością u ludzi [9].

V. PODSUMOWANIE

Podsumowując należy podkreślić, iż tkanka tłuszczowa brunatna u dorosłego człowieka ma jak się wydaje znaczenie drugorzędne. Może ona co prawda być źródłem nowotworu łagodnego – zimowiaka rozwijającego się na szyi, ramionach, pod pachą, w okolicy międzyłopatkowej lub w śródpiersiu, ale należy on do rzadkości [6, 16]. Dyskutuje się również doniesienia o udziale tkanki tłuszczowej brunatnej w syntezie hormonów sterydowych. Podkreśla się także zjawisko hipertrofii tkanki tłuszczowej brunatnej w chorobie Addisona, ale funkcja endokrynologiczna jest problematyczna i praktycznie bez znaczenia w warunkach fizjologicznych.

Natomiast u małych ssaków i zwierząt zapadających w stan hibernacji, jej rola rośnie, gdyż stanowi główne źródło ciepła w procesie termogenezy nieodrzeniowej. U ludzi dorosłych powyższy mechanizm nie jest istotny. Jednakże dalsze badania

nad tkanką tłuszczową brunatną mogą mieć znaczenie w leczeniu otyłości poprzez takie pokierowanie szlakami metabolicznymi, aby brała w nich udział choćby rezerwowana ilość tkanki tłuszczowej brunatnej. Doprowadziłoby to do stymulacji lipolizy, zwiększenia spalania kwasów tłuszczowych do CO₂ i H₂O oraz wydzielania energii w postaci ciepła. Inna droga do walki z otyłością poprzez tkankę tłuszczową brunatną, wiedzie przez zsyntetyzowanie swoistych agonistów termogenezy. Jeśli takie selektywne aktywatory tkanki tłuszczowej brunatnej, przetestowane na zwierzętach doświadczalnych, okazałyby się skuteczne, to mogłyby być wykorzystane do stymulowania termogenezy i zmniejszenia wagi ciała u ludzi otyłych.

Nic więc dziwnego, że ta mała, ale niezmiernie silnie działająca tkanka termogeniczna jest tak atrakcyjna dla biochemików i fizjologów. Wydaje się, że kryje ona wiele wskazówek, które w niedalekiej przyszłości mogą zmienić podejście do leczenia otyłości.

LITERATURA

- [1] BOUILLAUD F. UCP-1, UCP-2 und UCP-3: are they true uncouplers of respiration? *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999; **23** Suppl 6: 19–23.
- [2] BUKOWIECKI L, COLLET AJ, FOLLEA N, GUAY G, JAHJAH L. Brown adipose tissue hyperplasia a fundamental mechanism of adaptation to cold and hyperphagia. *Am J Physiol* 1982; **242**: E 353–359.
- [3] BROŻYŃSKI KK, KMIEĆ BL. Budowa i czynności tkanki tłuszczowej brunatnej. *Post Biol Kom* 1983; **10**, 1: 1–21.
- [4] BRZEZIŃSKI W, BROŻYŃSKI K, KMIEĆ B, FORTAK W. Morphochemical study of brown adipose tissue during adrenal gland regeneration in the white rat. *Folia Hist Cytochem* 1981; **19**: 149–159.
- [5] CANNON B, HOUSTEK J, NEDERGAARD J. Brown adipose tissue. More than effector of thermogenesis? *Ann NY Acad Sci* 1998; **856**: 171–187.
- [6] CHITOKU S, KWAI S, WATABE Y, NISHITANI M, FUJIMOTO K, OTSUKA H, FUSHIMI H, KOTOH K, FUJI T. Intradural spinal hibernoma: case report. *Surg Neurol* 1998; **49**(5): 509–513.
- [7] CHRISTIANSEN EN, WOJTCZAK L. Regulacja metabolizmu energetycznego w mitochondriach brunatnej tkanki tłuszczowej. *Post Biochem* 1977; **23**: 495–521.
- [8] CINTI S, FREDRICH RC, ZINGARETTI MC, DE MATTEIS R, FLIER JS, LOWELL BB. Immunohistochemical localization of leptin and uncoupling protein and brown adipose tissue. *Endocrinology* 1997; **138**: 794–804.
- [9] CITTADINI A, MANTZOROS CS, HAMPTON TG, TRAVERS KE, KATS SE, MORGAN JP, FLIER JS, DOUGLAS PS. Cardiovascular abnormalities in transgenic mice with reduced brown fat: an animal model of human obesity. *Circ* 1999; **100** (21): 2177–2188.
- [10] COMMINS SP, WATSON PM, PADGETT MA, DUDLEY A, ARGYROPOULOS G, GETTYS TW. Induction of uncoupling protein expression in brown and white adipose tissue by leptin. *Endocrinology* 1999; **140**: 292–300.
- [11] COMPOSTANO A, GRILLO G, BESSARIONE D, DE GRANOI R, ADAMI GP. Relationships of serum leptin to body composition and resting energy expenditure. *Horm Metab Res* 1998; **30**: 646–647.

- [12] DENG C, MOINAT M, CURTIS L, NADAKAL A, PREITNER F, BOSS O, ASSIMACOPOULOS-JEANNET F, SEYDOUX J, GIACOBINO JP. Effects of β -adrenoreceptor subtype stimulation on obese gene messenger ribonucleic acid and leptin secretion in mouse brown adipocytes differentiated in culture. *Endocrinology* 1997; **138**: 548–552.
- [13] EMORINE L, BLIN N, STROBERG AD. The human β_3 - adrenoreceptor: the search for a physiological function. *Trends Pharmacol Sci* 1994; **15**: 3–7.
- [14] ESTERBAUER H, OBERKOFER H, LIU YM, BREBAN D, HELL E, KREMPLER F, PATSCH W. Uncoupling protein-1 mRNA expression in obese human subjects: the role of sequence variations at the uncoupling protein-1 gene locus. *J Lipid Res* 1998; **39**: 834–844.
- [15] FLEURY C, SANCHIS D. The mitochondrial uncoupling-2: current status. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; **31**(11): 1261–1278.
- [16] GARIJO MF, TORIO B, VAL-BERNAL JF. Mammary hamartoma with brown adipose. *Gen Diagn Pathol* 1997; **143**(4): 243–246.
- [17] GARLID KD, JABUREK M, JEZEK P. The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins. *FEBS Lett* 1998; **438**: 10–14.
- [18] GAUTHIER C, TAVERNIER G, CHARPENTIER F, LANGIN D, LE MAREC H. Functional β_3 -adrenoreceptor in the human heart. *J Clin Invest* 1996; **98**: 556–562.
- [19] GIACOBINO JP. β_3 -adrenoreceptor: an update. *Eur J Endocrinol* 1995; **132**: 377–385.
- [20] GIACOBINO JP. Effects of dietary deprivation, obesity and exercise on UCP-3 mRNA levels. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999; **23** Suppl. 6: 60–63.
- [21] GONG DW, HE Y, KARAS M, REITMAN M. Uncoupling protein-3 is a mediator of termogenesis regulated by thyroid hormone, β_3 -adrenergic agonists and leptin. *J Biol Chem* 1997; **272**: 24129–24132.
- [22] GRANNEMAN JG, LAHNESS KN, CHAUDHRY A. Molecular cloning and expression of the rat β_3 -adrenergic receptor. *Mol Pharmacol* 1991; **40**: 895–899.
- [23] GROS J, MANNING BS, PIERI-ROUXEL F, GUILAUME IL, DRUMARE MF, STROBERG AD. Site-directed mutagenesis of the human β_3 -adrenoreceptor. Transmembrane residues involved in ligand binding and signal transduction. *Eur J Biochem* 1998; **251**: 590–596.
- [24] HAMANN A, FLIER JS, LOWELL BB. Obesity after genetic ablation of brown adipose tissue. *Z Ernahrungswiss* 1998; **37** Suppl. 1: 1–7.
- [25] HAWLEY JA. Spalanie tłuszczów podczas wysiłku fizycznego. *Medycyna po Dyplomie* 1999; **9**(48): 146–156.
- [26] HOSODA K, MATSUDA J, ITHOH H, SON C, DOI K, FUKUNAGA Y, YAMORI Y, NAKAO K. New members of uncoupling protein family implicated in energy metabolism. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999; **26** (7): 561–562.
- [27] HOUSTEK J, VIZEK K, PAVELKA S, KREJCOVA E, HERMANSKA J, CERMAKOVA M. Type II iodothyronine 5-deiodinase and uncoupling protein in brown adipose tissue of human newborn. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; **77**(2): 382–387.
- [28] JEZEK P. Fatty acid interaction with mitochondrial uncoupling proteins. *J Bioenerg Biomembr* 1999; **31**(5): 457–466.
- [29] JEZEK P, GARLID KD. Mammalian mitochondrial uncoupling proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; **30**: 1163–1168.
- [30] KENNEDY A, GETTYS TW, WATSON P, WALLACE P, GANAWAY E, PAN Q, GARVEY T. The metabolic significance of leptin in humans: gender based differences in relationship to adiposity, insulin sensitivity and energy expenditure. *J Clin Endoc Metab* 1997; **82**: 1293–1300.
- [31] LANGIN D, EKHOLM D, RIDDERSTRALE M, LAFONTAN M, BELFRAGE P. c AMP dependent protein kinase activation mediated by β_3 -adrenergic receptors parallels lipolysis in rat adipocytes. *Biochem Biophys Acta* 1992; **1135**: 349–352.

- [32] MURPHY GJ, KIRKHAM DM, CAWTHORNE MA, YOUNG P. Correlation of β_3 -adreno-receptor-induced activation of cyclic AMP-dependent protein kinase with activation of lipolysis in rat white adipocytes. *Biochem Pharmacol* 1993; **266**: 24053–24058.
- [33] MUZZIN P, BOSS O, GIACOBINO JP. Uncoupling protein 3: its possible biological role and mode of regulation on rodents and humans. *J Bioenerg Biomembr* 1999; **32**(5): 467–473.
- [34] NAHMIAS C, BLIN N, ELALOUF JM, MATTEI MG, STROSBERG AD, EMORINE LJ. Molecular characterization of the mouse β_3 -adrenergic receptor: relationship with the atypical receptor of adipocytes. *EMBO J* 1997; **10**: 3721–3727.
- [35] OSTROWSKI K. (red) Histologia. Wyd. Lek. PZWL, Warszawa 1995.
- [36] PALOU A, PICO C, BONET ML, OLIVER P. The uncoupling protein, thermogenin. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; **30**(1): 7–11.
- [37] PAWLIKOWSKI T. Gruczoły dokrewne u dziecka. *Endokr Pol* 1962; **13**: 465–485.
- [38] PAWLIKOWSKI T. Tkanka tłuszczowa brunatna u człowieka. *Folia Morphol* 1955; **6**: 209–216.
- [39] PIETRI-ROUXEL F, LENZEN G, KAPOOR A, DRUMARE MF, ARCHIMBAULT P, STROSBERG AD, MANNING BS. Molecular cloning and pharmacological characterization of the bovine β_3 -adrenergic receptor. *Eur J Biochem* 1995; **270**: 350–358.
- [40] RIAL E, GONZALES-BARROSO MM, FLEURY C, BOUILLAUD F. The structure and function of the brown fat uncoupling protein UCP-1: current status. *Biofactors* 1998; **8**(3-4): 209–219.
- [41] RICQUIER D. Uncoupling protein-2 (UCP-2): molecular and genetic studies. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999; **23** Suppl. 6: 38–42.
- [42] RICQUIER D, BOUILLAUD F. The uncoupling protein homologues: UCP-1, UCP-2, UCP-3, St UCP and At UCP. *Biochem J* 2000; **345**: 161–179.
- [43] RICQUIER D, MIROUX B, CASSARD-DOULCIER AM, LEVI-MEYRVEIS C, GELLY C, RAIMBAULT S, BOUILLAUD F. Contribution to the identification and analysis of the mitochondrial uncoupling proteins. *J Bioenerg Biomembr* 1999; **31**(5): 407–418.
- [44] ROHLFS EM, DANIEL W, PREMONT RT, KOZAK LP, COLLINS S. Regulation of the uncoupling protein gene (UCP) by β_1 -, β_2 - and β_3 -adrenergic receptor subtypes in immortalized brown adipose cell lines. *J Biol Chem* 1995; **270**: 10723–10732.
- [45] ROTHWELL NJ, STOCK MJ. Termogeneza brunatnej tkanki tłuszczowej: jej rola w otyłości? *Spectrum Międzynarodowe* 1986; **37**: 1–4
- [46] SARMIENTO U, BENSON B, KAUFMAN S, ROSS L, Q, M, SCULLY S, DI PALMA C. Morphologic and molecular changes induced by recombinant human leptin in the white and brown adipose tissue of C 57 BL/6mice. *Lab Invest* 1997; **77**: 243–256.
- [47] SAWICKI B. The thyroid gland brown adipose tissue of forest mice and blank bank voles over the annual cycle. *Folia Morphol* 1998; **57**,2: 157–165.
- [48] SCARPCE PJ, MATHENY M, POLLOCK BH, TUMER N. Leptin increase uncoupling protein expression and energy expenditure. *Am J Physiol* 1997; **273**: E226–230.
- [49] SCARPCE PJ, NICOLSON M, MATHENY M. UPC-2, UPC-3 and leptin gene expression: Modulation by food restriction and leptin. *J Endocrinol* 1998; **159**: 349–357.
- [50] SCHMIDT FG, DONAT K, BUDRAS K-D. Über Entspeicherung normalen und entenverten braunen Fettgewebes beim Gebril (*Meriones unguiculatus* M.-E. 1867). *Z Mikrosk Forsch* 1982; **96**: 885–897.
- [51] SCHRAUWEN P, WALDER K, RANUSSIN E. Human uncoupling proteins and obesity. *Obes Res* 1999; **7**(1): 97–105.
- [52] SEIDEL JC. Obesity in Europe: scaling an epidemic. *Int J Obesity* 1995; (suppl 3): 51–54.
- [53] SILVA JE. The physiological role of the novel uncoupling proteins: view from the chair. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999; **23** Suppl. 6: 72–74.
- [54] STROSBERG AD. Structure and function of the β_3 -adrenergic receptor. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; **37**: 421–450.

- [55] TANUMA Y, YAMAMOTO M, ITO T, YOKOCHI Ch. Possible function of human brown adipose tissue suggested by observation on perirenal brown fats from necropsy cases of variable age groups. *Arch Histol Jap* 1976; **39**: 117–145.
- [56] TATON J. Zarys patogenezy otyłości. *Pol Tyg Lek* 1995; Suppl. 1: 3–10.
- [57] WIEJAK J, WYROBA E. Receptor β_3 -adrenergiczny – struktura oraz rola w otyłości i zaburzeniach metabolicznych. *Post Hig Med Dośw* 1999; **53**, 5: 705–715.
- [58] ZABEL M. *Histologia – podręcznik dla studentów medycyny i stomatologii*. Urban & Partner. Wrocław 2000.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 25.01.2001 r.

Przyjęto: 10.05.2001 r.

Adres autora: ul. Kościelna 6, 43-607 Jaworzno

USZKODZENIA DNA W KOMÓRKACH SSAKÓW*

DNA DAMAGE IN MAMMALIAN CELLS

Andrzej TRZECIAK

Pracownia Biologii Molekularnej, Zakład Patomorfologii Klinicznej,
Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, Łódź

Streszczenie: Uszkodzenia DNA ze względu na pochodzenie dzieli się na endogenne, związane z aktywnością endogennych procesów komórkowych, oraz egzogenne. Do procesów komórkowych odpowiedzialnych za zmiany w materiale genetycznym należą przede wszystkim: transport elektronów w łańcuchu oddechowym, reakcje enzymatyczne z udziałem oksydaz i cytochromów, cykle redoks, procesy zapalne. Zainteresowanie czynnikami egzogennymi stale rośnie ze względu na zagrożenie związane z ich występowaniem w środowisku, żywności, możliwością zastosowania w leczeniu nowotworów i innych chorób. Uszkodzenia DNA wpływają na komórkę nie tylko przez mutacje w DNA, ale również mogą modulować przebieg procesów życiowych. Przykładowo czynnik transkrypcyjny TFIID wiąże się do DNA zmodyfikowanego przez zaktywowaną *cis*-diamminodichloroplatynę, w wyniku czego ulega zahamowaniu synteza mRNA. Poznanie mechanizmów oddziaływania różnych czynników na DNA, a w dalszej kolejności na komórkę umożliwi w przyszłości lepiej zapobiegać niepożądanym skutkom wynikającym z występowania toksycznych substancji w otoczeniu oraz pozwoli na udoskonalenie metod leczenia nie tylko chorób nowotworowych.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28: 407–429)

Słowa kluczowe: uszkodzenia DNA, mutacje, ssaki, człowiek

Summary: DNA damages are divided into endogenous, connected with activity of endogenous cellular processes, and exogenous. Electron transport in respiratory chain, enzymatic reactions of oxidases and cytochromes, redox cycling, inflammatory processes are the cellular processes responsible for changes in genetic material. Interest in the exogenous factors is continuously growing because of hazard related to their occurrence in environment, food, and their application in treatment of cancer and other diseases. DNA damage effects on mutations and can modulate living processes. Transcription factor TFIID binds to DNA modified by activated *cis*-diamminodichloroplatin and consequently mRNA synthesis is stopped. Knowledge of mechanisms of influence of different factors on DNA and cell should enable us to prevent from undesirable consequences of presence of genotoxic compounds in environment and to

*Praca wykonana przy wsparciu Komitetu Badań Naukowych grant nr 4 P05E 111 17.

improve methods of treatment of not only cancer diseases.
(*Advances in Cell Biology* 2001; 28: 407–429)

Key words: DNA damage, mutations, mammals, human

WSTĘP

Trwale zmiany w materiale genetycznym – mutacje mają wpływ zarówno na poszczególne organizmy, jak i na całą biosferę. Mutacje można podzielić na germinalne i somatyczne. Konsekwencją mutacji germinalnych są zmiany genetyczne między pokoleniami; m.in. dzięki nim możliwa jest ewolucja życia na Ziemi. Z kolei mutacje somatyczne mają znaczący wpływ na starzenie się organizmów (głównie mutacje w mitochondrialnym DNA) oraz transformację nowotworową. Obydwie grupy mutacji są spowodowane utwaleniem przez proces replikacji zmian w DNA powstałych na skutek jego uszkodzenia.

Uszkodzenia DNA mogą być wywołane działaniem różnego typu czynników uszkodzających. Zależnie od typu tkanki DNA narażony jest na różną ilość poszczególnych rodzajów uszkodzeń. Spowodowane jest to zróżnicowaniem dotyczącym ekspozycji na czynniki uszkodzające, aktywności enzymów detoksykacyjnych oraz poziomu metabolizmu komórkowego.

Czynniki uszkodzające dostają się do komórki różnymi drogami. Wysokoenergetyczne promieniowanie elektromagnetyczne może penetrować cały organizm żywy; z kolei promieniowanie UV oddziałuje tylko na powierzchniowe części ciała. Związki chemiczne mogą dostawać się do organizmu trzema zasadniczymi drogami: pokarmową, oddechową i przez skórę. Na działanie toksyn narażone są głównie tkanki układów pokarmowego i oddechowego oraz skóry stykające się w pierwszej kolejności ze szkodliwymi związkami oraz tkanki i narządy, w których odbywa się ich detoksykacja zarówno przez układ monoooksygenaz mikrosomalnych, jak i niskocząsteczkowe antyoksydanty. Na szczególną uwagę zasługuje wątroba, która jest narządem wyspecjalizowanym w detoksykacji i w wyniku tego narażonym na mutageny i karcynogeny.

Przy rozważaniu toksycznego działania związków chemicznych należy brać pod uwagę informacje dotyczące ich losów od momentu dostania się do organizmu aż do przeniknięcia do komórek, zdolności do pokonania bariery, jaką jest błona cytoplazmatyczna oraz przemian wewnątrz komórki. Przykładami ilustrującymi ten problem są związki chromu i ksenobiotyki hydrofobowe.

Chrom w związkach występuje najczęściej na 3+ i 6+ stopniu utlenienia; przykładami takich substancji są odpowiednio chlorek chromu (CrCl_3) i dwuchromian potasu ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Obydwie grupy związków dostają się do organizmu ssaków drogą oddechową i pokarmową. Formą charakteryzującą się lepszym wchłanianiem

jest chrom sześciowartościowy, jednakże w odcinkach przewodu pokarmowego powyżej strefy wchłaniania oraz w płucach chrom jest redukowany do formy trójwartościowej [43]. Analogicznie z płynów ustrojowych do komórki szybciej przenikają związki Cr(VI), które do jej wnętrza są transportowane przez białkowe nośniki błonowe odpowiedzialne za przenoszenie fosforanów i siarczanów. Jony Cr^{3+} , obdarzone ładunkiem elektrycznym i nie mające odpowiednich przenośników, pozostają na zewnątrz komórki. Toksyczność Cr(VI) związana jest z aktywnością produktów powstających podczas jego redukcji: wolnych rodników, jonów Cr^{3+} i kompleksów zawierających Cr(V) i Cr(IV) [34, 51].

Ksenobiotyki o charakterze hydrofobowym jako związki łatwo rozpuszczalne w lipidach przenikają do komórki przez błonę cytoplazmatyczną w wyniku dyfuzji. W komórce są metabolizowane przez enzymy gładkiej siateczki śródplazmatycznej odpowiedzialne za procesy detoksykacji, które kolejno przekształcają je w hydrofilowe pochodne, a następnie sprzęgają z endogennymi substancjami odtruwającymi, takimi jak: reszty cukrowe, aminokwasowe, kwasów karboksylowych i nieorganicznych. Aktywacja metaboliczna szeregu związków hydrofobowych (np. benz[a]pirenu do pochodnych diolo-epoksydowych) powoduje zwiększenie lub nabycie przez nie właściwości cyto- i genotoksycznych.

Poniżej przedstawiono różne typy modyfikacji struktury DNA. Poza omówieniem mechanizmu działania czynników uszkadzających zwrócono również uwagę na losy i znaczenie poszczególnych rodzajów uszkodzeń DNA.

1. PĘKNIĘCIA NICI

Pęknięcia nici DNA mogą powstawać bezpośrednio lub pośrednio po konwersji szeregu typów uszkodzeń. **Pęknięcia jednoniciowe** DNA powstają:

- a) przez oddziaływanie z łańcuchem fosfodiestrowym DNA kwantu promieniowania jonizującego lub produktu rozpadu promieniotwórczego atomu związku wiążącego się do DNA [60];
- b) jako wynik oddziaływania ze szkieletem fosfocukrowym wolnych rodników i związków alkilujących;
- c) po konwersji miejsca apurynowego/apirymidynowego w pęknięcie;
- d) jako konsekwencja aktywności związków oddziałujących z topoizomerazami typu I (np. kamptotecyny [6]; nogalamycyny [49]);
- e) w wyniku działania systemów naprawy przez wycinanie nukleotydów oraz naprawy błędnie sparowanych zasad.

Pęknięcia dwuniciowe mogą być wynikiem:

- a) oddziaływania dwurodników, będących zaktywowanymi formami ksenobiotyków;

- b) formowania na obu niciach helisy DNA blisko siebie położonych pęknięć jednoniciowych;
- c) zachodzenia replikacji DNA w miejscach, w których nie stanowiąca matrycę zawiera pęknięcie jednoniciowe;
- d) aktywności związków oddziałujących z topoiizomerazami typu II (np. antracyklin, etoposydu i 4-hydroksymetylo-4',5'-benzopsoralenu (HMBP) [44, 55]);
- e) naprawy międzyniciowych wiązań krzyżowych DNA-DNA;
- f) nekrozy lub apoptozy.

Jedną z dróg powstawania pęknięć w DNA jest ich tworzenie po przyłączeniu się do kompleksu topoiizomeraza-DNA inhibitora topoiizomerazy. Topoiizomerazy są enzymami odpowiedzialnymi za regulowanie superskręcenia DNA w komórce. Ponadto topoiizomerazy typu II, w związku z tym że podczas oddziaływania z DNA przecinają jednocześnie dwie nici DNA, są niezbędne do rozdzielania dwóch siostrzanych chromosomów po replikacji. Inhibitory tej grupy enzymów wiążą się z DNA w jego mniejszym rowku (kamptotecyna), bądź interkalują między płaszczyzny par zasad (nogalamycyna, antracykliny, 4-hydroksymetylo-4',5'-benzopsoralen). Lek przeciwnowotworowy kamptotecyna wiąże się z odwracalnym kompleksem tworzonym przez topoiizomerazę typu I: TOP1 i blokuje ponowne połączenie się końców przeciętej nici. Kolidacja polimerazy RNA ze stabilizowanym kompleksem TOP1 na nici matrycowej prowadzi do ujawnienia się pęknięcia jednoniciowego [6]. Poza indukcją pęknięć jedno- i dwuniciowych związki stabilizujące odwracalne kompleksy topoiizomeraz prowadzą do zahamowania syntezy DNA i RNA i zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G₂, a także stymulują wymiany siostrzanych chromatyd i przyczyniają się do powstania aberracji chromosomalnych.

Wśród czynników odpowiedzialnych za tworzenie blisko siebie położonych pęknięć DNA na obu niciach DNA na szczególną uwagę zasługuje promieniowanie jonizujące oraz takie związki, jak: doksorubicyna, bleomycyna i mitomycyna C. Cechą charakterystyczną tych związków jest zdolność do wiązania się z DNA przez jego interkalację lub oddziaływanie z jego mniejszym rowkiem oraz posiadanie w swojej strukturze pierścienia chinonowego. Związki zawierające ugrupowanie chinonowe mogą przechodzić cykle redoks i uczestniczyć w tworzeniu rodników tlenowych i pęknięć nici w DNA [17, 31, 52].

2. UTRATA PURYN I PIRYMYDYN

Proces ten jest wywołany przez rozpad niestabilnego wiązania *N*-glikozydowego tworzonego przez zmodyfikowaną zasadę purynową [9] bądź jako wynik działania DNA-glikozylaz systemu naprawy przez wycinanie zasad azotowych. W warunkach fizjologicznych traconych jest około 10⁴ puryn [41] i 100 pirymidyn w przeliczeniu

na genom człowieka i 1 dzień. Miejsca w łańcuchu polinukleotydowym, w których doszło do utraty puryny lub pirymidyny, określa się jako miejsca AP (miejsca apurynowe, apirymidynowe).

Efektem utraty zasady azotowej może być powstanie pęknięcia jednoniciowego w wyniku spontanicznego pęknięcia łańcucha lub działania endonukleazy AP oraz preferencyjne włączenie adeniny do nici syntetyzowanej podczas replikacji na uszkodzonej matrycy naprzeciw miejsca AP.

3. USZKODZENIA OKSYDACYJNE

Uszkodzenia oksydacyjne DNA powstają w wyniku oddziaływania z jego składnikami wolnych rodników, będących w głównej mierze reaktywnymi formami tlenu (RFT). Najważniejszym źródłem RFT są procesy wewnątrzkomórkowe, w których tworzone są w pierwszej kolejności anionorodnik ponadtlenkowy (O_2^-) oraz nad-tlenek wodoru (H_2O_2). Przykładami procesów, podczas których może być tworzony anionorodnik ponadtlenkowy, jest transport elektronów w różnych układach komórkowych, np. w łańcuchu oddechowym w mitochondriach, utlenienie białek oddechowych przez związany z hemem tlen cząsteczkowy, reakcje enzymatyczne z udziałem oksydaz i cytochromów oraz jednoelektronowe utlenienie ksenobiotyków. Szczególnie ostatnia możliwość wydaje się być warta podkreślenia ze względu na to, że część ksenobiotyków może przechodzić cykle redoks. Związki te ulegają bowiem cyklicznej redukcji przez swoiste reduktazy oraz niskocząsteczkowe anty-oksydanty oraz utlenieniu przez tlen. Ksenobiotykami przechodzącymi cykle redoks są leki przeciwnowotworowe (bleomycyna [52]; mitomycyna C [31]; antracykliny [17]), związki fenolowe pochodzenia naturalnego (kwas chlorogenowy), jony metali przejściowych, związki ochrony roślin. Z kolei nad-tlenek wodoru jest tworzony przez oksydazy w drodze dwuelektronowej redukcji cząsteczki tlenu; może on także powstawać w wyniku reakcji dysproporcjonacji anionorodników ponadtlenowych przeprowadzanych przez dysmutazę ponadtlenkową. W wyniku reakcji rozpadu nad-tlenku wodoru katalizowanego z udziałem jonów metali przejściowych i enzymów powstaje odpowiednio rodnik hydroksylowy $\cdot OH$ i tlen singletowy 1O_2 . Wolne rodniki mogą również być tworzone w komórkach przez czynniki fizyczne, takie jak: promieniowanie jonizujące, UV [42], światło widzialne oraz ultradźwięki [19].

Szczególnie niebezpiecznymi rodnikami tlenowymi są rodnik hydroksylowy $\cdot OH$ i tlen singletowy 1O_2 [63]. Ocenia się, że w wyniku oddziaływania reaktywnych form tlenu (RFT) z cząsteczką DNA może powstać ponad 100 różnych rodzajów produktów oksydacji.

Przykładowe produkty reakcji wolnych rodników z zasadami azotowymi przedstawiono w tabeli 1. Wymienione produkty reakcji mogą ulegać dalszym przemianom.

TABELA 1. Ważniejsze produkty oddziaływania wolnych rodników z zasadami azotowymi

Zasady	Mechanizm powstawania	Ważniejsze produkty
Pirymidyny	wysycenie wiązania C5-C6	glikole, oksy-, hydroksy- i dwuhydro pochodne pirymidyn (ryc. 1)
	podstawienie atomu wodoru grupą hydroksylową	produkty podstawienia wodoru w pozycji C5, C6 pierścienia oraz grupy 5-metylowej (w przypadku tyminy) (ryc. 1)
	deaminacja	uracyl, tymina
Puryny	podstawienie atomu wodoru grupą hydroksylową	8-hydroksyadenina, 8-hydroksyguanina (ryc. 1)
	oksydacyjne otwarcie pierścienia imidazolowego puryn w pozycji C8	pochodne formamidopiryimidynowe, np. 4,6-diamino-5-formamidopirymidyna, 4,6-diamino-4-hydroksy-5-formamidopirymidyna (ryc. 1)
	deaminacja	hipoksantyna, ksantyna

Na przykład glikol tyminy w obecności RFT (reaktywnych form tlenu) może ulec przekształceniu kolejno w *N*'-formylo-*N*-pirogonylomocznik, 5-hydroksy-5-metylohydantoinę i *N*-formylomocznik [20].

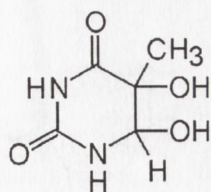
Reaktywne formy tlenu mogą również powodować tworzenie kowalencyjnych wiązań krzyżowych (np. DNA-białko [11]) oraz uszkodzenia łańcucha fosfodiestrowego. Produktem przejściowym szeregu reakcji RFT ze szkieletem fosfocukrowym DNA są rodnikowe pochodne deoksyrybozy (np. rodnik C4' z utraconym wodorem w pozycji C4'). Dalsze reakcje z udziałem tak zmodyfikowanych cukrów prowadzą do: pęknięcia łańcucha fosfocukrowego w obrębie jednego z tworzonych przez deoksyrybozę wiązań fosfodiestrowych, utraty zasady azotowej, modyfikacji deoksyrybozy poprzez wprowadzenie grupy ketonowej w pozycję C4' oraz rozpadu deoksyrybozy, np. z wytworzeniem dialdehydu malonowego (ryc. 2).

Liczba uszkodzeń oksydacyjnych w komórce człowieka jest stosunkowo duża. Szacuje się, że w jednej komórce diploidalnej znajduje się $1-2 \cdot 10^4$ 8-hydroksyguanin [15, 39].

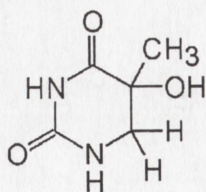
Wymienione uszkodzenia spowalniają replikację, a przy dużym nagromadzeniu powodują jej zatrzymanie. 8-hydroksyguanina indukuje u ssaków transwersję typu G→T [35], 8-hydroksyadenina tranzycję A→G oraz transwersję A→C [28].

4. TWORZENIE ADDUKTÓW

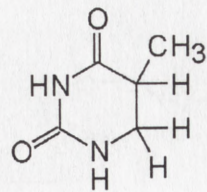
Pojęcie adduktu stosowane w epidemiologii molekularnej jest szersze w porównaniu z definicją używaną w chemii organicznej i obejmuje ono chemiczne modyfikacje DNA stanowiące produkty reakcji przyłączenia, podstawienia oraz kompleksy koordynacyjne DNA i jonów lub związków metali.



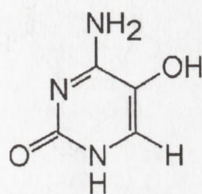
glikol tyminy



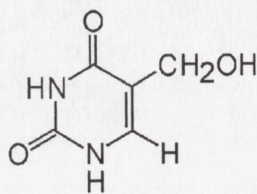
5-hydroksy-6-hydrotymina



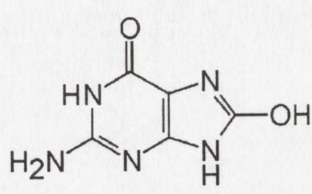
5,6-dihydrotymina



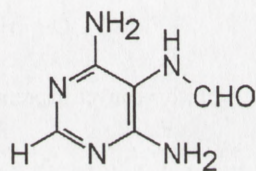
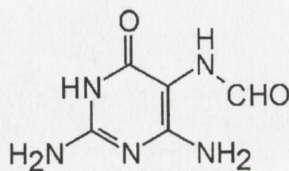
5-hydroksycytozyna



5-hydroksymetylowuracyl



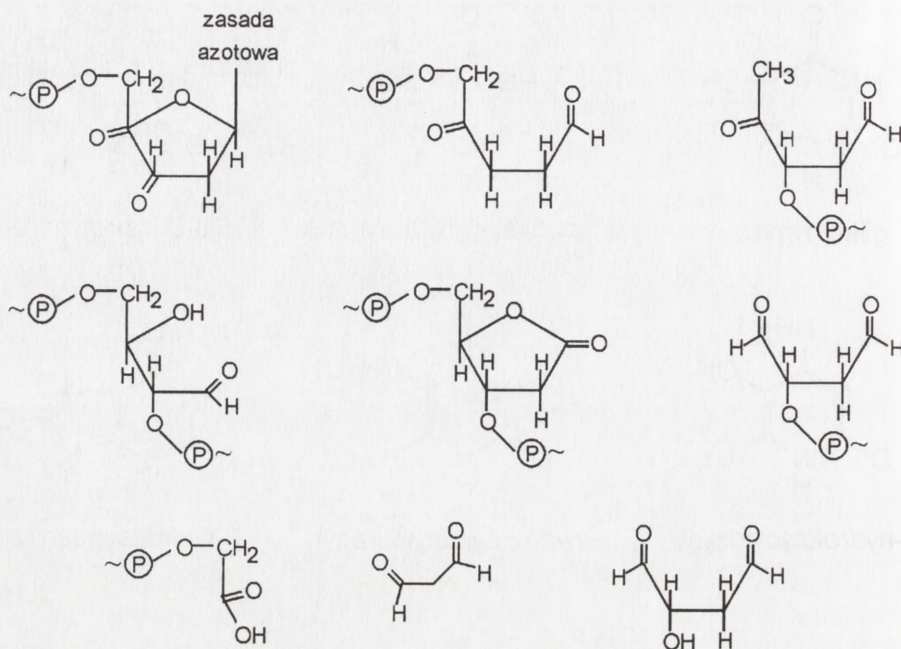
8-hydroksyguanina

4,6-diamino-5-formamido-
pirymidyna (FapyAde)4,6-diamino-4-hydroksy-
5-formamidopirymidyna
(FapyGua)

RYCINA 1. Niektóre produkty utleniania zasad azotowych

4.1. Reakcje przyłączenia z udziałem wolnych rodników

Poza prostymi adduktami tworzonymi przez reaktywne formy tlenu (8-hydroksyguanina, 8-hydroksyadenina, pochodne pirymidyn powstałe przez wysycenie wiązania C5-C6) w DNA wykrywane są również inne produkty reakcji wolnych rodników z tym kwasem nukleinowym. Rodnikami odpowiedzialnymi za tego typu modyfikacje są m.in. rodniki arylowe. Rodniki arylowe powstają po jednoelektronowym utlenieniu produktów powstających podczas szybkiego ogrzewania żywności oraz niepełnego spalania: policyklicznych węglowodorów aromatycznych [9, 54]. Szczególnie reaktywnymi pozycjami w DNA są heterocykliczne atomy azotu (N7 guaniny, N3 i N7 adeniny) oraz atom C8 guaniny. Powstające addukty są niestabilne i ulegają szybkiej konwersji w miejsca AP.



RYCINA 2. Uszkodzenia reszty cukrowej wykryte w roztworach wodnych napromieniowanych promieniowaniem jonizującym

Hazlewood i Davies [24] badali oddziaływanie pomiędzy DNA i wolnymi rodnikami, powstającymi w wyniku przemian nadtlenu benzyloвого, związku stosowanego w przemyśle chemicznym, spożywczym i kosmetycznym. Produkty rozpadu – rodniki: benzyloksylowy ($C_6H_5COO\cdot$) i fenyłowy ($C_6H_5\cdot$) – tworzą addukty w wyniku przyłączenia się do wiązania podwójnego C5-C6 pirymidyn.

4.2. Podstawienie z udziałem wolnych rodników

Do tej grupy uszkodzeń DNA wywołanej wolnymi rodnikami należą produkty tworzone w wyniku podstawienia atomu wodoru lub grupy aminowej grupą hydroksylową. Reakcja podstawienia grupy aminowej grupą hydroksylową nosi nazwę deaminacji. Podczas deaminacji 5-metylocytozyna, cytozyna, adenina, guanina ulegają przekształceniu odpowiednio w tyminę, uracyl, hipoksantynę i ksantynę. Szybkość tego procesu w warunkach fizjologicznych oszacowano na 300 deaminacji 5-metylocytozyny, 135 deaminacji cytozyny [48] i 12 deaminacji adeniny w ciągu doby w komórce człowieka. Utrata grupy aminowej w jednoniciowym DNA przebiega około 140 razy szybciej niż w DNA dwuniciowym [18]; w związku z tym zachodzi ona szczególnie szybko w regionach aktywnie transkrybowanych oraz w widelkach replikacyjnych.

Produkt deaminacji – uracyl jest stosunkowo szybko usuwany przez system naprawczy. Natomiast po przekształceniu 5-metylocytozyny do tyminy powstają miejsca błędnego parowania, w których system naprawy wycina losowo albo tyminę, albo guaninę. Konsekwencją deaminacji cytozyny (o ile uracyl nie zostanie usunięty przed kolejną rundą replikacyjną) i 5-metylocytozyny jest tranzycja C (m^5C)→T [47].

4.3. Reakcje przyłączenia i podstawienia pomiędzy DNA i związkami elektrofilowymi

Dużą klasą związków elektrofilowych odpowiedzialnych za modyfikacje DNA są czynniki alkilujące zarówno mono-, jak i bifunkcyjne; mogą one wprowadzać do DNA grupy alkilowe o różnej wielkości. Leki przeciwnowotworowe (mitomycyna C), antybiotyki (glikozyd *N*-metylo-*N*-nitrozomocznika – streptozotocyna), gazy bojowe (iperyt), środki ochrony roślin (insektycydy fosforoorganiczne), zanieczyszczenia środowiskowe (policykliczne węglowodory aromatyczne), związki powstające w źle przechowywanej żywności oraz w kwaśnej treści żołądka (nitrozoaminy) są ksenobiotykami, których metabolity są czynnikami alkilującymi.

Miejscami podatnymi w DNA na działanie związków elektrofilowych są atomy obdarzone niewielkim ładunkiem ujemnym, takie jak: N1, N3, N7 adeniny, N3, O⁶, N7 guaniny, O², N3, O⁴ tyminy, O², N3 cytozyny oraz grupa fosforanowa szkieletu fosfodiesterowego. Najbardziej reaktywnymi pozycjami są N7 guaniny i N3 adeniny. Ze względu na aktywność czynniki alkilujące dzieli się na 4 grupy (tab. 2).

Jedną grupą związków alkilujących są nitrozoaminy. Mogą one powstawać w źle przechowywanej żywności w wyniku działania flory bakteryjnej, podczas smażenia, pieczenia produktów bogatych w azot, podczas trawienia pokarmu w kwaśnej treści żołądka, a także w komórkach i płynach ustrojowych. Do nitrozoamin należy m.in. karcynogen wątroby *N,N*-dimetylnitrozoamina (DMN, NDMA) (ryc. 3a). Aktywne formy nitrozoamin powstają po ich przekształceniu w elektrofilowe metabolity. DMN jest hydroksylowany przez cytochrom P-450 2E1. Niestabilny produkt powstały w wyniku hydroksylacji ulega następnie rozpadowi z wytworzeniem jonu metyldiazoniowego i karbokationu, silnych czynników metylujących (ryc. 3b) [57].

Nitrozoamina *N*-metylo-*N*'-nitro-*N*-nitrozoguanidyna (MNNG) (ryc. 3a) jest szeroko stosowanym modelowym związkiem metylującym nie wymagającym aktywacji. MNNG może metylować wszystkie atomy tlenu i większość atomów azotu w DNA. Pozycjami w DNA metylowanymi w największym stopniu przez MNNG są N7 guaniny, N3 adeniny i guaniny oraz O⁶ guaniny. MNNG powoduje kilkaset razy więcej alkilacji DNA w porównaniu z innymi monofunkcyjnymi czynnikami alkilującymi.

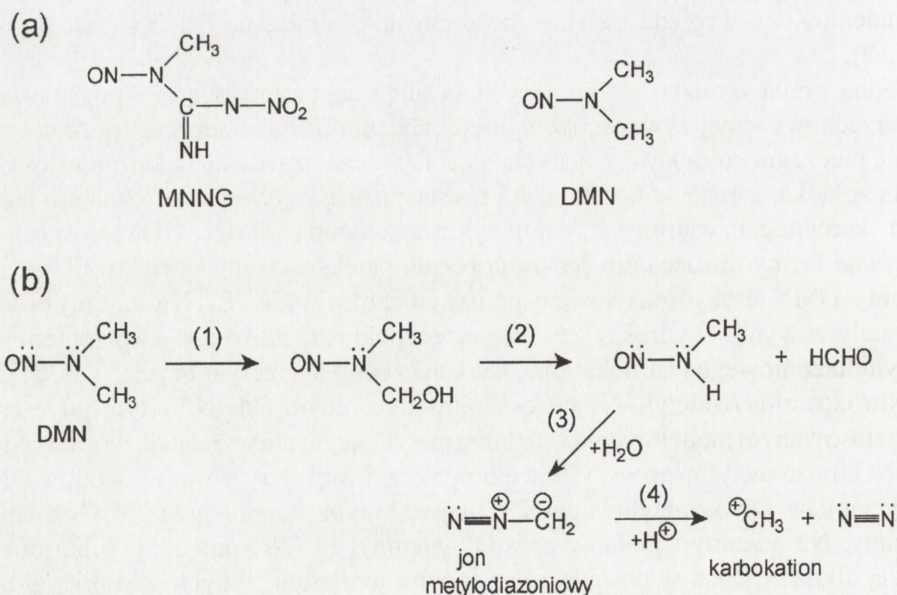
TABELA 2. Podział związków alkilujących ze względu na specyficzność reakcji z DNA

Aktywność w stosunku do zasad azotowych	Przykłady związków
Atakujące głównie heterocykliczne atomy azotu	Sulfonian dwumetylowy (MMS), siarczan dwumetylowy [61], epoksydy (np. tlenek etylenu, styrenu [46])
Alkilujące heterocykliczne atomy azotu oraz atomy tlenu	DMN ^a (<i>N,N</i> -dimetylonitrozoamina); ENU ^a (<i>N</i> -etylo- <i>N</i> -nitrozomocznik), MNU ^a (<i>N</i> -metylo- <i>N</i> -nitrozomocznik) [26], MNNG (<i>N</i> -metylo- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrozoguanidyna) [30, 38]
Czynniki bifunkcyjne ^b	Czynniki bifunkcyjne: mitomycyna C, cyklofosfamid, iperyt [36]
Alkilujące głównie grupy aminowe zasad azotowych	Aldehydy (np. aldehyd octowy [58]) i niektóre epoksydy ((+/-)- <i>anti</i> -7 <i>r</i> ,8 <i>t</i> -dihydroksy-9 <i>t</i> ,10 <i>t</i> -oksy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[<i>a</i>]piren)

^aZwiązkami charakteryzującymi się właściwościami alkilującymi są pochodne powstałe w wyniku aktywacji metabolicznej;

^bpoza tworzeniem monoadduktów indukują również kowalencyjne wiązania krzyżowe DNA-DNA oraz

Policykliczne węglowodory aromatyczne, podobnie jak nitrozoaminy, nabywają właściwości kancerogennych po wprowadzeniu do cząsteczki atomu tlenu podczas aktywacji metabolicznej. Przykładowo benzo[*a*]piren ulega aktywacji do 7*r*,8*t*-di-



RYCINA 3. a – wzory chemiczne *N*-metylo-*N'*-nitro-*N*-nitrozoguanidyny (MNNG) i *N,N*-dimetylonitrozoaminy (DMN); b – biodegradacja DMN; reakcja (1) przeprowadzana jest z udziałem cytochromu P-450

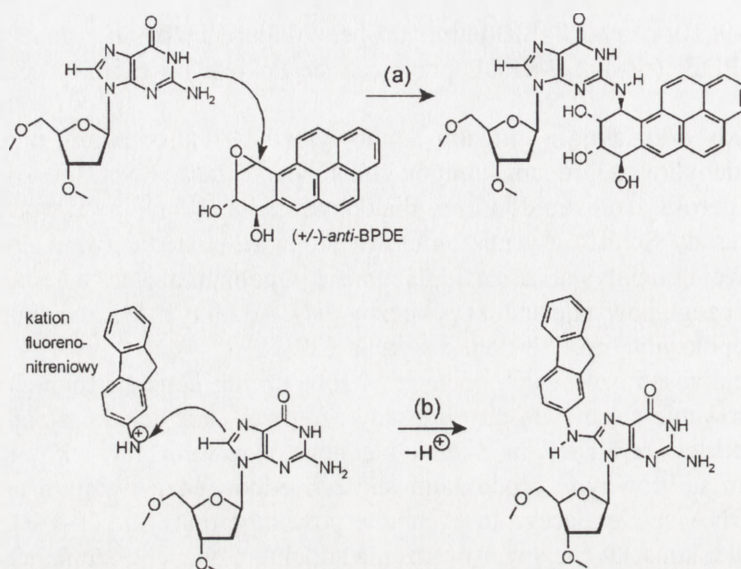
hydroksy-9*t*,10*t*-oksy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[*a*]pirenu (BPDE). Jeden z enancjomerów BPDE: (+/-)-*anti*-BPDE przyłącza się do pozycji m.in. N² guaniny (ryc. 4a) [22].

Aldehydy oddziałują z grupami aminowymi DNA; produktami przejściowymi reakcji aldehydów z grupami aminowymi DNA są zasady Schiffa. Dialdehydy – produkty peroksydacji lipidów (np. dialdehyd malonowy) – po utworzeniu przejściowej zasady Schiffa z grupą aminową mogą za pośrednictwem drugiej grupy aldehydowej oddziaływać ze znajdującym się w pobliżu azotem heterocyklicznym, w wyniku czego powstaje addukt cykliczny [64]. Addukty cykliczne tworzą również niektóre epoksydy (np. 7,8-tlenek styrenu [29]).

Alkilacja zasad azotowych pociąga za sobą szereg konsekwencji. Jedną z nich jest wbudowanie się niewłaściwej zasady azotowej naprzeciwko zmodyfikowanej zasady podczas replikacji na skutek błędnego parowania. O⁶-alkilo-dGua i O⁴-alkilo-Tym są głównymi produktami alkilacji odpowiedzialnymi za mutacje. Replikacja DNA zawierającego te pochodne powoduje tranzycje G→A [38] i T→C [30]. Z kolei konsekwencją wprowadzenia adduktu o dużych rozmiarach w pozycję N² guaniny (np. BPDE) są transwersje G→T [14]. Modyfikacja zasad azotowych może także wywoływać ich utratę spowodowaną rozpadem tworzonych przez nie wiązań glikozydowych oraz aktywnością systemu naprawy przez wycinanie zasad. Specyficzny rodzaj uszkodzeń DNA – wiązania krzyżowe wewnątrz- i międzyniciowe podczas naprawy są przekształcane w przerwy jedno- i dwuniciowe. Wiązania krzyżowe międzyniciowe mogą również zatrzymać replikację DNA.

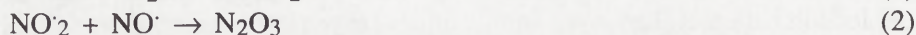
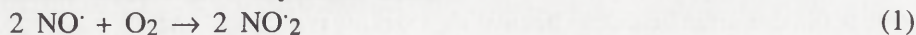
Substancjami oddziałującymi z DNA poprzez reakcję podstawienia elektrofilowego są pochodne amin heterocyklicznych, związków powstających podczas pirolizy białek. Jedną z najlepiej zbadanych amin aromatycznych jest 2-aminofluoren (2-AF). Z guaniną w pozycji C8 oddziałuje jon fluorenonitreniowy powstający po rozpadzie heterolitycznym wiązania N-O grupy hydroksyaminowej 2-hydroksyaminofluorenu, pochodnej powstającej podczas aktywacji metabolicznej 2-AF (ryc. 4b) [40]. Kompleks [AF]-C8-dG może przyjmować 2 izoenergetyczne konformacje: konformację z pierścieniem fluorenowym na zewnątrz helisy DNA (*anti*-[AF]dG) – pierścień ten znajduje się w obrębie większego rowka DNA, a guanina tworzy normalne wiązanie wodorowe z cytozyną oraz konformację z pierścieniem fluorenowym wewnątrz helisy DNA (*syn*-[AF]dG) – wówczas parowanie guaniny z cytozyną zostaje zakłócone. Druga z wymienionych konformacji może nieść za sobą mutacje [37]. Silne właściwości kancerogenne wykazuje również szereg pochodnych 2-AF, np. 2-acetyloaminofluoren (2-AAF).

Bezwodnik kwasu azotawego N₂O₃ jest związkiem elektrofilowym, który podobnie jak aminy heterocykliczne nie należy do czynników alkilujących i reaguje z DNA drogą reakcji podstawienia. N₂O₃ powoduje deaminacje guaniny i cytozyny [10]. Bezwodnik wraz z inną pochodną tlenku azotu – nadtlenoazotynem ONOO⁻ odpowiedzialny jest również za tworzenie *N*-nitrozoamin.



RYCINA 4. Oddziaływanie czynników elektrofilowych z DNA: a – tworzenie adduktu przez elektrofilowy epoksyd diolowy BPDE, b – reakcja podstawienia elektrofilowego kationu fluorenonitreniowego w pozycji C8 guaniny

N_2O_3 podobnie jak wolne rodniki może powstawać endogenicznie w komórkach z tlenku azotu $NO\cdot$ i cząsteczki tlenu:



Tlenek azotu syntetyzowany jest przez trzy różne izoformy enzymu syntazy tlenku azotu obecnego w nabłonku naczyń krwionośnych, tkance nerwowej oraz makrofagach i odgrywa rolę w regulacji przepływu i ciśnienia krwi, procesach uczenia się oraz fagocytozy. Ponadto $NO\cdot$ jest składnikiem dymu papierosowego.

4.4. Tworzenie adduktów o charakterze koordynacyjnym

Do związków odpowiedzialnych za tego typu modyfikacje należą leki przeciwnowotworowe (*cis*-diamminodichloroplatyna; *cis*-DDP [5]) oraz zanieczyszczenia środowiskowe (związki chromu(VI) [62] i inne metale przejściowe). *cis*-DDP po dostaniu się do wnętrza komórki ulega aktywacji; dopiero związek zaktywowany zawierający zamiast jonów chlorkowych dwie cząsteczki wody jest zdolny do modyfikacji DNA. Z podobną sytuacją mamy do czynienia w przypadku soli zawierających chrom na szóstym stopniu utlenienia, gdzie formą odpowiedzialną za powstawanie adduktów o charakterze koordynacyjnym jest Cr^{3+} .

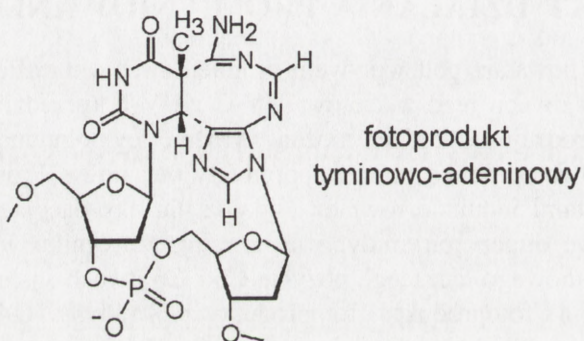
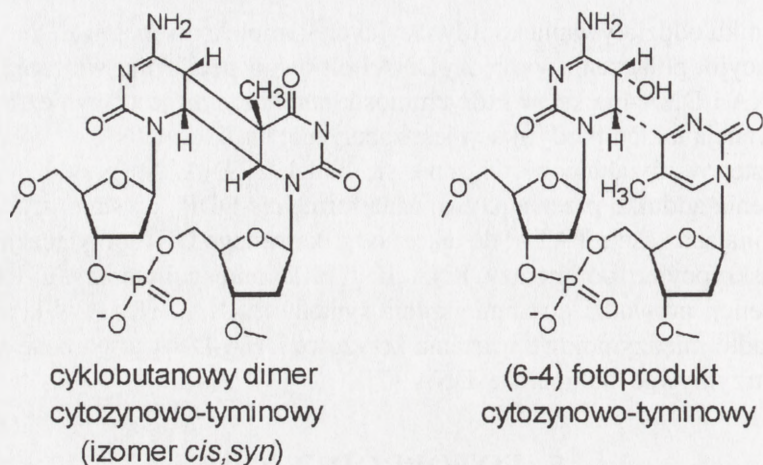
W wyniku oddziaływania koordynacyjnych kompleksów metali z DNA powstają koordynacyjne połączenia pomiędzy DNA i kationem metalu oraz wiązania krzyżowe DNA-DNA i DNA-białko, w których mostkiem łączącym jest również jon metalu. Konsekwencją takich modyfikacji jest zaburzenie struktury DNA, w wyniku czego może następować zakłócone wiązanie się białek z DNA. Na przykład w wyniku wytworzenia adduktu przez zaktywowaną formę *cis*-DDP powstaje struktura DNA przypominająca kasetę TATA; do tak zmodyfikowanego DNA przyłączają się czynniki transkrypcyjne polimerazy RNA II: TFIID oraz polimerazy I: UBF, co w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia syntezy mRNA i rRNA w komórce [27, 59]. Ponadto międzyiniowe wiązania krzyżowe DNA-DNA utworzone przez Cr^{3+} mogą zatrzymywać polimerazę DNA [7].

5. FOTOPRODUKTY – EFEKT DZIAŁANIA PROMIENIOWANIA UV

Fotoprodukty powstają pod wpływem promieniowania ultrafioletowego wchodzącego w skład dwóch jego zakresów: UV-C i UV-B (przedział 250–360 nm). W obrębie tego rodzaju uszkodzeń można wyróżnić: cyklobutanowe dimery pirymidynowe, (6-4) fotoprodukty oraz fotoprodukty purynowe. Promieniowanie UV poza fotoproduktami indukuje również uszkodzenia oksydacyjne [1, 25].

Cyklobutanowe dimery pirymidynowe powstają w wyniku wytworzenia pierścienia cyklobutanowego łączącego pozycje C5 i C6 dwóch sąsiednich pirymidyn (ryc. 5) [16]. (6-4) fotoprodukty [fotoprodukty pirymidyna (6-4) pirymidon] są również tworzone przez dwie sąsiadujące pirymidyny. Po pochłonięciu przez DNA kwantu promieniowania UV następuje jednoczesne wysycenie wiązania C5-C6 w pirymidynie leżącej od strony 5' łańcucha polinukleotydowego oraz utworzenie wiązania między atomami w pozycji C6 5'-pirymidyny i C4 3'-pirymidyny oraz transfer grupy aminowej lub hydroksylowej z pozycji C4 odpowiednio cytozyny i tyminy stanowiącej 3'-pirymidynę na C5 5'-pirymidyny (ryc. 5). Liczba powstających (6-4) fotoproduktów osiąga 20–30% liczby formowanych dimerów pirymidynowych. Mogą one ulec konwersji w izomery walencyjne Dewara [16]. Fotoprodukty purynowe są formowane w miejscu wystąpienia dwunukleotydu 5'-TA oraz 5'-AA. Fotoprodukty TpA* mają 8-członowy pierścień wytworzony przez atomy C5 i C6 tyminy oraz pierścień pirymidynowy adeniny z przerwany wiązaniem między atomami węgla C3 i C4 (ryc. 5). Fotoprodukty purynowe stanowią 1% wszystkich fotoproduktów.

Uszkodzenia wywołane działaniem promieniowania UV usuwane są przez endonukleazy systemu naprawy przez wycinanie nukleotydów. Poza tym mogą również powstawać miejsca AP (szczególnie w wyniku niestabilności wiązań *N*-glikozydowych tworzonych przez (6-4) fotoprodukty). Dimery pirymidynowe i (6-4) fo-



RYCINA 5. Fotoprodukty w DNA powstające w obecności promieniowania UV

toprodukty powodują mutacje C→T lub CC→TT; mogą także zatrzymywać syntezę DNA.

6. USZKODZENIA SPOWODOWANE NIEKOWALENCYJNYM WIĄZANIEM SIĘ LIGANDÓW W RÓWKACH DNA

Większość niebiałkowych ligandów wiążących się niekowalencyjnie z DNA oddziałuje z jego powierzchnią od strony mniejszego rowka. Typowo zawierają one proste pierścienie aromatyczne, takie jak: piryłowy, furanowy czy benzenowy, połączone wiązaniami o stosunkowo dużej możliwości rotacji. Dzięki temu mogą

się one dopasować do helikalnego kształtu rowka. Ponadto zawierają grupy naładowane dodatnio, za których pośrednictwem oddziałują ze szkieletem fosfodiastrowym. Ligandy wiążące się preferencyjnie z sekwencjami bogatymi w pary A:T często tworzą wiązanie wodorowe z tlenem karbonylowym znajdującym się w pozycji C2 tyminy oraz atomem azotu N3 adeniny, natomiast te oddziałujące z sekwencjami bogatymi w pary G:C z grupą aminową w pozycji C2 guaniny. Przykładami takich związków są bisbenzimidazole (np. Hoechst 33258, Hoechst 33342 (ryc. 6 i 7) [21]), polipirolokarboksamidy (np. netropsyna, dystamycyna A [33]), podwójne czterowartościowe sole amonowe (np. SN 6999, SN 18071 [32]), bleomycyna [52]. Związki z tej grupy są stosowane jako leki przeciwnowotworowe (polipirolokarboksamidy, kamptotecyna, bleomycyna) i barwniki fluorescencyjne (Hoechst 33258, Hoechst 33342).

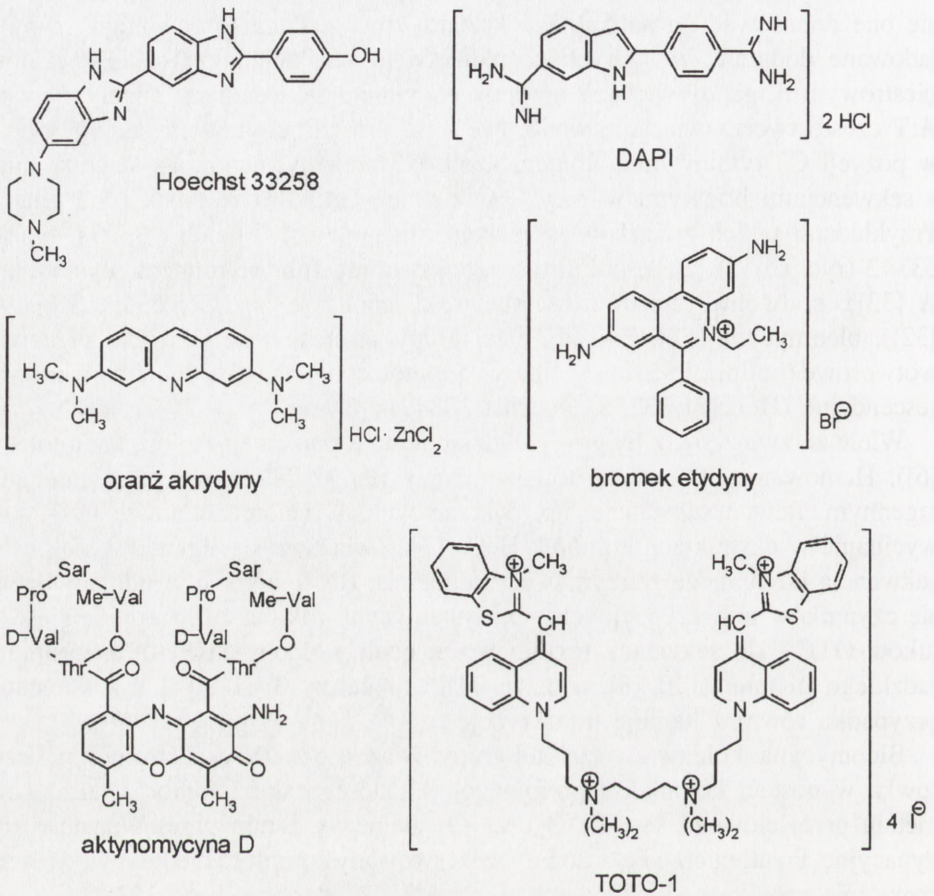
Wiele ze związków z tej grupy oddziałuje na topoizomerazy (np. kamptotecyna [6]). Hamowanie aktywności topoizomerazy jest skorelowane z działaniem mutagenym. Pewne substancje, np. dystamycyna A, hamują naprawę DNA przez wycinanie w ekstraktach komórek HeLa [3]. Związanie się ligandów z określoną sekwencją DNA może zatrzymywać polimerazę RNA, a także utrudniać wiązanie się czynników transkrypcyjnych, np. dystamycyna zakłóca przyłączanie się czynników OTF-1 do sekwencji regulatorowej genu γ -globiny, NFE-1 do promotora ludzkiego histonu H2B [8], a także TBP do kasety TATA [4], co w ostatnim przypadku również hamuje transkrypcję.

Bleomycyna, kolejny związek tej grupy, wiąże się z DNA od strony mniejszego rowka w postaci kompleksu potrójnego, w którego skład wchodzi także kation metalu przejściowego (np. Fe^{2+}) oraz O_2 związany z nim przez wiązanie koordynacyjne. Po utlenieniu Fe^{2+} do Fe^{3+} zaktywowany kompleks bleomycyny generuje powstanie rodnika nadtlenkowego w pozycji C4' deoksyrybozy [52].

7. ZABURZENIA W STRUKTURZE DNA WYWOŁANE INTERKALACJĄ

Do związków zdolnych do interkalacji pomiędzy płaszczyzny zasad azotowych należą barwniki z ugrupowaniem fenantrydynowym (np. bromek etydyny, ryc. 6; jodek propidyny), akrydyny (np. oranż akrydyny, ryc. 6; proflawina), antracykliny (daunomycyna, doksorubicyna, nogalamycyna [2]), aktynomycyna D (ryc. 6) [12]. Część z nich stosowana jest w medycynie jako leki przeciwnowotworowe (antracykliny, aktynomycyna D).

Typowe interkalatory to aromatyczne płaskie związki kationowe, które wiążą się z DNA przez wstawienie części cząsteczki zbudowanej ze skondensowanych pierścieni aromatycznych pomiędzy pary zasad DNA. Związki interkalujące powodują wydłużenie i miejscowe rozwinięcie helisy DNA, a także inne zaburzenia

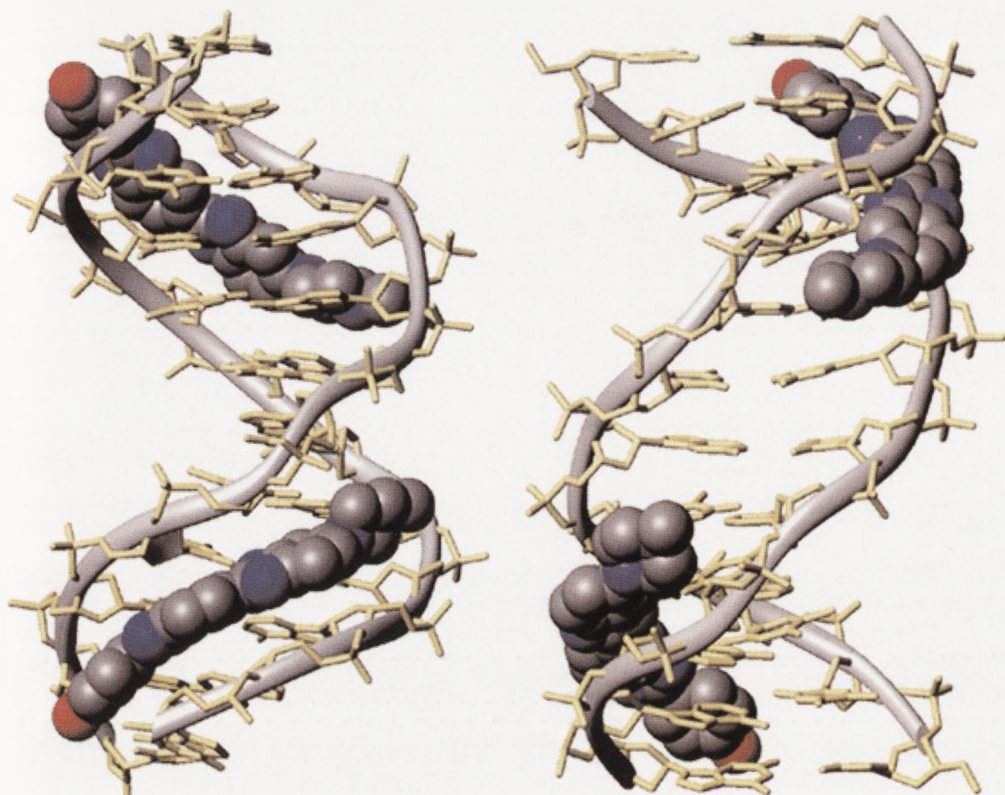


RYCINA 6. Zróżnicowanie strukturalne interkalatorów i związków wiążących się w mniejszym rowku DNA

zależne od rodzaju interkalatora (np. zakrzywianie DNA). Poza skondensowanymi pierścieniami mają one często podstawniki nie posiadające ładunku lub dodatnio naładowane, które wprowadzane są w jeden z rowków DNA.

Szczególną grupą interkalatorów są tzw. bisinterkalatory. Mają one dwa układy interkalujące połączone za pomocą łącznika o zróżnicowanej sztywności i długości. Należą tutaj m.in. barwnik fluorescencyjny TOTO-1 (ryc. 6 i 8) [50] i antybiotyki kwinoksalinowe (np. triostyna A, echinomycyna [53]).

Psoraleń, np. 4,5',8-trimetylopsonalen [45] tworzą słabe kompleksy z DNA. Po fotoaktywacji w obecności światła UV-A cząsteczki psoralenu wiążą się kowalencyjnie z zasadami pirymidynowymi. Jeżeli pirymidyna obecna jest również w sąsiedniej warstwie w nici antyrównoległej DNA, powstały monoaddukt po kolejnej

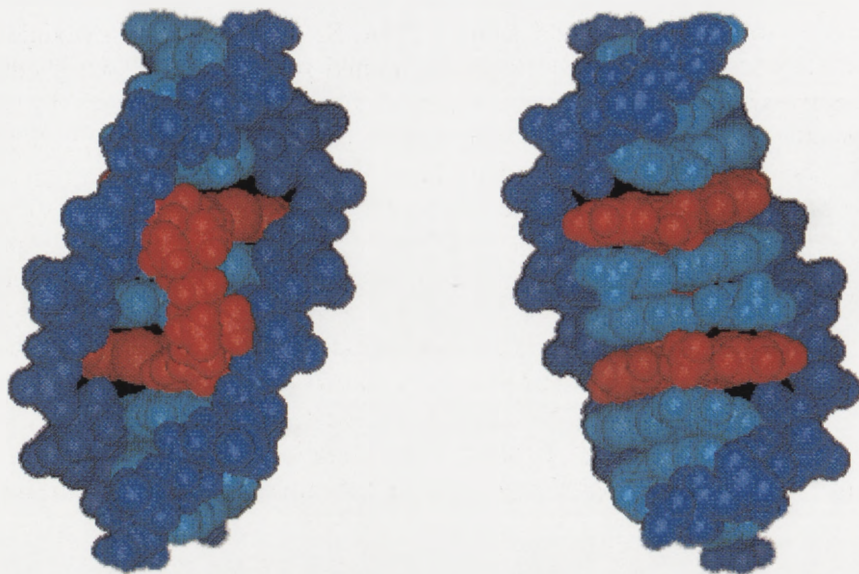


RYCINA 7. Struktura przestrzenna kompleksu Hoechstu 33258 z DNA. Wzór strukturalny Hoechstu 33258 podano na ryc. 6. Reprodukowano za zgodą autora i wydawnictwa [21]. Copyright (2000) Oxford University Press

fotoaktywacji może utworzyć wiązanie krzyżowe międzyciniowe. Addukty bifunkcyjne są w głównej mierze odpowiedzialne za efekty biologiczne.

Niektóre związki mogą interkalować lub wiązać się w jednym z rowków. Barwnik fluorescencyjny DAPI (ryc. 6) wiąże się w mniejszym rowku DNA w miejscach wystąpienia par A:T, a także ma zdolność do interkalacji w sąsiedztwie par G:C [56].

Konsekwencją interkalacji mogą być mutacje typu przesunięcia ramki odczytu. Ponadto związki należące do tej grupy czynników mogą wykazywać także inne właściwości. Aktynomycyna D zakłóca wiązanie się czynnika transkrypcyjnego Sp1 z sekwencją docelową w DNA bogatym w pary GC [13], bromek etydyny zmniejsza poziom transkrypcji w mitochondriach [23]. Szereg związków oddziałuje



RYCINA 8. Struktura przestrzenna kompleksu bisinterkalatora TOTO-1 z DNA od strony mniejszego (a) i większego (b) rowka DNA. Częśćeczkę tego bisinterkalatora oznaczono kolorem czerwonym. Wzór strukturalny TOTO-1 podano na ryc. 6. Reprodukowano za zgodą wydawnictwa [50]. Copyright (1995) American Chemical Society

z topoizomerazami, np. nogalamycyna z topoizomerazą typu I [49], natomiast 4-hydroksymetylo-4',5'-benzopsoralen (HMBP) z topoizomerazą typu II [44].

8. WBUDOWYWANIE SIĘ ANALOGÓW ZASAD AZOTOWYCH

Nukleotydy zawierające analogi zasad azotowych mogą zostać wbudowane w obręb podwójnej helisy DNA podczas replikacji. Przykładowym związkiem należącym do tej grupy jest bromouracyl (BrdU) – analog tyminy zawierający atom bromu zamiast grupy metylowej w pozycji C5. Podczas replikacji włącza się do DNA w miejsce tyminy. Bromouracyl może stosunkowo łatwo przejść z formy ketonowej do enolowej, która paruje z guaniną. Wystąpienie formy enolowej podczas kolejnej rundy replikacyjnej prowadzi do tranzycji TC.

PODSUMOWANIE

Prezentowany przegląd nie wyczerpuje złożoności zagadnienia powstawania uszkodzeń DNA ze względu na różnorodność związków uszkadzających DNA i me-

chanizmów, według których oddziałują z DNA. Szereg związków powoduje uszkodzenia DNA w różnorodny sposób. Wolne rodniki generują nie tylko uszkodzenia oksydacyjne w DNA, ale również, za pośrednictwem produktów rozpadu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, powodują powstanie adduktów. Niektóre związki mają jednocześnie właściwości interkalatorów i związków wiążących się w mniejszym rowku DNA. Z jednej strony barwnik fluorescencyjny DAPI w zależności od kontekstu sekwencyjnego DNA może się wiązać na jeden z przedstawionych sposobów, z drugiej zaś strony pewne związki, takie jak: daunomycyna, dokсорubicyna czy aktynomycyna D, mają zarówno płaski pierścień aromatyczny zdolny do interkalacji między płaszczyzny zasad azotowych, jak i podstawniki, za których pośrednictwem oddziałują z DNA od strony mniejszego rowka. Ponadto niektóre rodzaje uszkodzeń DNA ulegają konwersji w inne, głównie w wyniku aktywności systemu naprawy. Produkty podstawienia w zasadach, addukty, uszkodzenia oksydacyjne, fotoprodukty są mogą być przekształcane w pęknięcia nici DNA.

LITERATURA

- [1] ANGELOV D, SPASSKY A, BERGER M, CADET J. High-intensity UV laser photolysis of DNA and purine 2'-deoxyribonucleosides: formation of 8-oxopurine damage and oligonucleotide strand cleavage as revealed by HPLC and gel electrophoresis studies. *J Am Chem Soc* 1997; **119**: 11373–11380.
- [2] BAGINSKI M, FOGOLARI F, BRIGGS JM. Electrostatic and non-electrostatic contributions to the binding free energies of anthracycline antibiotics to DNA. *J Mol Biol* 1997; **274**: 253–267.
- [3] BARRET JM, SALLES B, PROVOT C, HILL BT. Evaluation of DNA repair inhibition by antitumor or antibiotic drugs using a chemiluminescence microplate assay. *Carcinogenesis* 1997; **18**: 2441–2445.
- [4] BELLORINI M, MONCOLLIN V, D'INCALCI M, MONGELLI N, MANTOVANI R. Distamycin A and tallimustine inhibit TBP binding and basal *in vitro* transcription. *Nucleic Acids Res* 1995; **23**: 1657–1663.
- [5] BLOMMAERT FA, FLOOT BG, VAN DIJK-KNIJNENBURG HC, BERENDS F, BAAN RA, SCHORNAGEL JH, DEN ENGELSE L, FICHTINGER-SCHEPMAN AM. The formation and repair of cisplatin-DNA adducts in wild-type and cisplatin-resistant L1210 cells: comparison of immunocytochemical determination with detection in isolated DNA. *Chem Biol Interact* 1998; **108**: 209–225.
- [6] BOWMAN KJ, NEWELL DR, CALVERT AH, CURTIN NJ. Differential effects of the poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor NU1025 on topoisomerase I and II inhibitor cytotoxicity in L1210 cells *in vitro*. *Br J Cancer* 2001; **84**: 106–112.
- [7] BRIDGEWATER LC, MANNING FC, PATIERNO SR. Arrest of replication by mammalian DNA polymerases alpha and beta caused by chromium-DNA lesions. *Mol Carcinog* 1998; **23**: 201–206.
- [8] BROGGINI M, PONTI M, OTTOLENGHI S, D'INCALCI M, MONGELLI N, MANTOVANI R. Distamycins inhibit the binding of OTF-1 and NFE-1 transactors to their conserved DNA elements. *Nucleic Acids Res* 1989; **17**: 1051–1059.
- [9] CASALE GP, SINGHAL M, BHATTACHARYA S, RAMANATHAN R, ROBERTS KP, BARBACCI DC, ZHAO J, JANKOWIAK R, GROSS ML, CAVALIERI EL, SMALL GJ,

- RENNARD SI, MUMFORD JL, SHEN M. Detection and Quantification of Depurinated Benzo. *Chem Res Toxicol* 2001; **14**: 192–201.
- [10] CAULFIELD JL, WISHNOK JS, TANNENBAUM SR. Nitric oxide-induced deamination of cytosine and guanine in deoxynucleosides and oligonucleotides. *J Biol Chem* 1998; **273**: 12689–12695.
- [11] CHAKRABARTI SK, BAI C, SUBRAMANIAN KS. DNA-protein crosslinks induced by nickel compounds in isolated rat lymphocytes: role of reactive oxygen species and specific amino acids. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; **170**: 153–165.
- [12] CHEN FM. Binding of actinomycin D to DNA oligomers of CXG trinucleotide repeats. *Biochemistry* 1998; **37**: 3955–3964.
- [13] CZYŻ M, GNIAZDOWSKI M. Actinomycin D specifically inhibits the interaction between transcription factor Sp1 and its binding site. *Acta Biochim Pol* 1998; **45**: 67–73.
- [14] DENISSENKO MF, PAO A, PFEIFER GP, TANG M. Slow repair of bulky DNA adducts along the nontranscribed strand of the human *p53* gene may explain the strand bias of transversion mutations in cancers. *Oncogene* 1998; **16**: 1241–1247.
- [15] DIZDAROGLU M, JARUGA P, RODRIGUEZ H. Measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry: comparison with measurement by gas chromatography-mass spectrometry. *Nucleic Acids Res* 2001; **29**: E12.
- [16] DOUKI T, ZALIZNIAK T, CADET J. Far-UV-induced dimeric photoproducts in short oligonucleotides: sequence effects. *Photochem Photobiol* 1997; **66**: 171–179.
- [17] FAURE H, MOUSSEAU M, CADET J, GUIMIER C, TRIPIER M, HIDA H, FAVIER A. Urine 8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosine vs. 5-(hydroxymethyl) uracil as DNA oxidation marker in adriamycin-treated patients. *Free Radic Res* 1998; **28**: 377–382.
- [18] FREDERICO LA, KUNKEL TA, SHAW BR. A sensitive genetic assay for the detection of cytosine deamination: determination of rate constants and the activation energy. *Biochemistry* 1990; **29**: 2532–2537.
- [19] FUCIARELLI AF, SISK EC, THOMAS RM, MILLER DL. Induction of base damage in DNA solutions by ultrasonic cavitation. *Free Radic Biol Med* 1995; **18**: 231–238.
- [20] GASPARUTTO D, AIT-ABBAS M, JAQUINOD M, BOITEUX S, CADET J. Repair and coding properties of 5-hydroxy-5-methylhydantoin nucleosides inserted into DNA oligomers. *Chem Res Toxicol* 2000; **13**: 575–584.
- [21] GAVATHIOTIS E, SHARMAN GJ, SEARLE MS. Sequence-dependent variation in DNA minor groove width dictates orientational preference of Hoechst 33258 in A-tract recognition: solution NMR structure of the 2:1 complex with d(CTTTTGCAAAAG)₂. *Nucleic Acids Res* 2000; **28**: 728–735.
- [22] HANELT S, HELBIG R, HARTMANN A, LANG M, SEIDEL A, SPEIT G. A comparative investigation of DNA adducts, DNA strand breaks and gene mutations induced by benzo[a]pyrene and (+/-)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-diol 9,10-oxide in cultured human cells. *Mutat Res* 1997; **390**: 179–188.
- [23] HAYAKAWA T, NODAM, YASUDA K, YORIFUJII H, TANIGUCHIS, MIWAI, SAKURA H, TERAUCHI Y, HAYASHI J, SHARP GW, KANAZAWA Y, AKANUMA Y, YAZAKI Y, KADOWAKI T. Ethidium bromide-induced inhibition of mitochondrial gene transcription suppresses glucose-stimulated insulin release in the mouse pancreatic beta-cell line betaHC9. *J Biol Chem* 1998; **273**: 20300–20307.
- [24] HAZLEWOOD C, DAVIES MJ. Benzoyl peroxide-induced damage to DNA and its components: direct evidence for the generation of base adducts, sugar radicals, and strand breaks. *Arch Biochem Biophys* 1996; **332**: 79–91.
- [25] HENRIKSEN EK, MOAN J, KAALHUS O, BRUNBORG G. Induction and repair of DNA damage in UV-irradiated human lymphocytes. Spectral differences and repair kinetics. *J Photochem Photobiol B: Biol* 1996; **32**: 39–48.

- [26] JANSEN JG, DE GROOT AJ, VAN TEIJLINGEN CM, LOHMAN PH, MOHN GR, VRIELING H, VAN ZEELAND AA. Formation and persistence of DNA adducts in pouch skin fibroblasts and liver tissue of rats exposed *in vivo* to the monofunctional alkylating agents *N*-methyl-*N*-nitrosourea or *N*-ethyl-*N*-nitrosourea. *Mutat Res* 1994; **307**: 95–105.
- [27] JORDAN P, CARMO-FONSECA M. Cisplatin inhibits synthesis of ribosomal RNA *in vivo*. *Nucleic Acids Res* 1998; **26**: 2831–2836.
- [28] KAMIYA H, MIURA H, MURATA-KAMIYA N, ISHIKAWA H, SAKAGUCHI T, INOUE H, SASAKI T, MASUTANI C, HANAOKA F, NISHIMURA S i in. 8-Hydroxyadenine (7,8-dihydro-8-oxoadenine) induces misincorporation in *in vitro* DNA synthesis and mutations in NIH 3T3 cells. *Nucleic Acid Res* 1995; **23**: 2893–2899.
- [29] KAUR S, PONGRACZ K, BODELL WJ, BURLINGAME AL. Bis(hydroxyphenylethyl)deoxyguanosine adducts identified by [³²P]-postlabeling and four-sector tandem mass spectrometry: unanticipated adducts formed upon treatment of DNA with styrene 7,8-oxide. *Chem Res Toxicol* 1993; **6**: 125–132.
- [30] KAWATE H, IHARA K, KOHDA K, SAKUMI K, SEKIGUCHI M. Mouse methyltransferase for repair of *O*⁶-methylguanine and *O*⁴-methylthymine in DNA. *Carcinogenesis* 1995; **16**: 1595–1602.
- [31] KELLEY MR, TRITT R, XU Y, NEW S, FREIE B, CLAPP DW, DEUTSCH WA. The *Drosophila* S3 multifunctional DNA repair/ribosomal protein protects Fanconi anemia cells against oxidative DNA damaging agents. *Mutat Res* 2001; **485**: 107–119.
- [32] KIRSCHSTEIN O, SIP M, KITTLER L. Quantitative and sequence-specific analysis of DNA-ligand interaction by means of fluorescent intercalator probes. *J Mol Recognit* 2000; **13**: 157–163.
- [33] LAH J, VESNAVER G. Binding of distamycin A and netropsin to the 12mer DNA duplexes containing mixed ATGC sequences with at most five or three successive AT base pairs. *Biochemistry* 2000; **39**: 9317–9326.
- [34] LEONARD S, WANG S, ZANG L, CASTRANOVA V, VALLYATHAN V, SHI X. Role of molecular oxygen in the generation of hydroxyl and superoxide anion radicals during enzymatic Cr(VI) reduction and its implication to Cr(VI)-induced carcinogenesis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2000; **19**: 49–60.
- [35] LE PAGE F, GUY A, CADET J, SARASIN A, GENTIL A. Repair and mutagenic potency of 8-oxoG:A and 8-oxoG:C base pairs in mammalian cells. *Nucleic Acid Res* 1998; **26**: 1276–1281.
- [36] LIN P, VAUGHAN FL, BERNSTEIN IA. Formation of interstrand DNA cross-links by bis-(2-chloroethyl)sulfide (BCES): a possible cytotoxic mechanism in rat keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **218**: 556–561.
- [37] MAO B, HINGERTY BE, BROYDE S, PATEL DJ. Solution structure of the aminofluorene [AF]-external conformer of the anti-[AF]-C8-dG adduct opposite dC in a DNA duplex. *Biochemistry* 1998; **37**: 95–106.
- [38] MARCELINO LA, ANDRE PC, KHRAPKO K, COLLER HA, GRIFFITH J, THILLY WG. Chemically induced mutations in mitochondrial DNA of human cells: mutational spectrum of *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine. *Cancer Res* 1998; **58**: 2857–2862.
- [39] MATSUI A, IKEDA T, ENOMOTO K, HOSODA K, NAKASHIMA H, OMAE K, WATANABE M, HIBI T, KITAJIMA M. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, in human breast cancer tissue and its relationship to GSTP1 and COMT genotypes. *Cancer Lett* 2000; **151**: 87–95.
- [40] McCLELLAND RA, GADOSY TA, REN D. Reactivities of arylnitrenium ions with guanine derivatives and other nucleophiles. *Can J Chem* 1998; **76**: 1327–1238.
- [41] NAKAMURA J, WALKER VE, UPTON PB, CHIANG SY, KOW YW, SWENBERG JA. Highly sensitive apurinic/aprimidinic site assay can detect spontaneous and chemically induced depurination under physiological conditions. *Cancer Res* 1998; **58**: 222–225.

- [42] NEWCOMB TG, ALLEN KJ, TKESHELASHVILI L, LOEB LA. Detection of tandem CC→TT mutations induced by oxygen radicals using mutation-specific PCR. *Mutat Res* 1999; **427**: 21–30.
- [43] O'FLAHERTY EJ, KERGER BD, HAYS SM, PAUSTENBACH DJ. A physiologically based model for the ingestion of chromium(III) and chromium(VI) by humans. *Toxicol Sci* 2001; **60**: 196–213.
- [44] PANI B, BARBISIN M, RUSSO E, TAMARO M, BACCICHETTI F, CARLASSARE F, MARZANO C, RODIGHIERO P, BORDIN F. DNA damage and topoisomerase II inhibition induced by a benzopsoralen derivative. *Mutat Res* 1994; **311**: 277–285.
- [45] RAMASWAMY M, YEUNG AT. The reactivity of 4,5',8-trimethylpsoralen with oligonucleotides containing AT sites. *Biochemistry* 1994; **33**: 5411–5413.
- [46] SAHA M, ABUSHAMAA A, GIESE RW. General method for determining ethylene oxide and related N7-guanine DNA adducts by gas chromatography-electron capture mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1995; **712**: 345–354.
- [47] SCHMUTTE C, YANG AS, NGUYEN TT, BEART RW, JONES PA. Mechanisms for the involvement of DNA methylation in colon carcinogenesis. *Cancer Res* 1996; **56**: 2375–2381.
- [48] SHEN JC, RIDEOUT WM 3RD, JONES PA. The rate of hydrolytic deamination of 5-methylcytosine in double-stranded DNA. *Nucleic Acids Res* 1994; **25**: 972–976.
- [49] SIM SP, PILCH DS, LIU LF. Site-specific topoisomerase I-mediated DNA cleavage induced by nogalamycin: a potential role of ligand-induced DNA bending at a distal site. *Biochemistry* 2000; **39**: 9928–9934.
- [50] SPIELMANN HP, WEMMER DE, JACOBSEN JP. The Solution Structure of a DNA Complex with the Fluorescent bis-intercalator TOTO determined by NMR Spectroscopy. *Biochemistry* 1995; **34**: 8542–8553.
- [51] SUGDEN KD, STEARNS DM. The role of chromium(V) in the mechanism of chromate-induced oxidative DNA damage and cancer. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2000; **19**: 215–230.
- [52] SUH D, POVIRK LF. Mapping of the cleavage-associated bleomycin binding site on DNA with a new method based on site-specific blockage of the minor groove with *N*²-isobutyrylguanine. *Biochemistry* 1997; **36**: 4248–4257.
- [53] TAKUSAGAWA HL, TAKUSAGAWA F. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of d(ACGTAGCTACGT)₂:[actinomycin D, (echinomycin)₂] and d(ACGTAGCTACGT)₂:[actinomycin D, (trioestin A)₂] complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2000; **56**: 344–347.
- [54] TODOROVIC R, ARIESE F, DEVANESAN P, JANKOWIAK R, SMALGJ, ROGAN E, CAVALIERI E. Determination of benzo[*a*]pyrene- and 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene-DNA adducts formed in rat mammary glands. *Chem Res Toxicol* 1997; **10**: 941–947.
- [55] TRONOV VA, KONOPLYANNIKOV MA, NIKOLSKAYA TA, KONSTANTINOV EM. Apoptosis of unstimulated human lymphocytes and DNA strand breaks induced by the topoisomerase II inhibitor etoposide (VP-16). *Biochemistry (Moscow)* 1999; **64**: 412–420.
- [56] TROTAE, D'AMBROSIO E, RAVAGNAN G, PACI M. Simultaneous and different binding mechanisms of 4',6-diamidino-2-phenylindole to DNA hexamer (d(CGATCG))₂. A ¹H NMR study. *J Biol Chem* 1996; **271**: 27608–27614.
- [57] TU YY, YANG CS. Demethylation and denitrosation of nitrosoamines by cytochrome P-450 isozymes. *Arch Biochem Biophys* 1985; **242**: 32–40.
- [58] VACA CE, FANG JL, SCHWEDA EK. Studies of the reaction of acetaldehyde with deoxynucleosides. *Chem Biol Interact* 1995; **98**: 51–67.
- [59] VICHI P, COIN F, RENAUD JP, VERMEULEN W, HOEIJMAKERS JH, MORAS D, EGLY JM. Cisplatin- and UV-damaged DNA lure the basal transcription factor TFIID/TBP. *EMBO J* 1997; **16**: 7444–7456.

- [60] WALICKA MA, DING Y, ROY AM, HARAPANHALLI RS, ADELSTEIN SJ, KASSIS AI. Cytotoxicity of [¹²⁵I]iodoHoechst 33342: contribution of scavengable effects. *Int J Radiat Biol* 1999; **75**: 1579–1587.
- [61] XIAO W, CHOW BL, RATHGEBER L. The repair of DNA methylation damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 1996; **30**: 461–468.
- [62] XU J, BUBLEY GJ, DETRICK B, BLANKENSHIP LJ, PATIERNO SR. Chromium(VI) treatment of normal human lung cells results in guanine-specific DNA polymerase arrest, DNA-DNA cross-links and S-phase blockade of cell cycle. *Carcinogenesis* 1996; **17**: 1511–1517.
- [63] YANG JL, WANG LC, CHANG CY, LIU TY. Singlet oxygen is the major species participating in the induction of DNA strand breakage and 8-hydroxydeoxyguanosine adduct by lead acetate. *Environ Mol Mutagen* 1999; **33**: 194–201.
- [64] YI P, SUN X, DOERGE DR, FU PP. An improved ³²P-Postlabeling/High-performance liquid chromatography method for the analysis of the malondialdehyde-derived 1,N²-propanodeoxyguanosine DNA adduct in animal and human tissues. *Chem Res Toxicol* 1998; **11**: 1032–1041.

Redaktor prowadzący –Maria Olszewska

Otrzymano: 17.04.2001 r.

Przyjęto: 15.05.2001 r.

Adres autora: ul. Rzgowska 281/289, 93-338 Łódź

e-mail: antrzeciak@wp.pl

WYKORZYSTANIE ANALIZY SEKWENCJI DNA W BADANIACH FILOGENETYCZNYCH I TAKSONOMICZNYCH MSZAKÓW

APPLICATION OF DNA SEQUENCE ANALYSIS TO PHYLOGENETIC AND TAXONOMIC STUDIES OF BRYOPHYTES

Paweł FIEDOROW, Andrzej PACAK

Zakład Ekspresji Genów, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii,
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Streszczenie: Wykorzystanie analizy sekwencji DNA pozwoliło na wysunięcie szeregu nowych hipotez dotyczących filogenezy i systematyki organizmów żywych. Użycie nowej metodyki przyczyniło się do znaczącego postępu w dziedzinie badań taksonomicznych i filogenetycznych mszaków. W pracy przedstawiono obecny stan badań oraz nowe hipotezy dotyczące filogenezy mszaków wysunięte na podstawie analizy sekwencji DNA *Bryophyta*. Przedstawiono również hipotezy dotyczące pochodzenia roślin lądowych w aspekcie badań ewolucji molekularnej mszaków. Opisane wyniki badań pozwalają w nowy sposób spojrzeć na systematykę mszaków oraz pochodzenie roślin lądowych.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28: 431–441)

Słowa kluczowe: *Bryophyta*, ewolucja molekularna, filogeneza

Summary: DNA sequence analysis has enabled to put forward several new hypotheses concerning phylogeny and systematics of living organisms. The application of new methodology has contributed to a significant progress in research on taxonomy and phylogeny of bryophytes. In this paper, the state of the art as well as new hypotheses concerning phylogeny, based on *Bryophyta* DNA sequence analysis, were presented. Moreover, hypotheses on the subject of the origin of land plants were discussed in the aspect of the studies of molecular evolution of bryophytes. Results of the described studies give a new insight into systematics of bryophytes and origin of land plants.

(*Advances in Cell Biology* 2001; 28: 431–441)

Key words: *Bryophyta*, molecular evolution, phylogeny

WSTĘP

Rozwój metod stosowanych w biologii molekularnej stał się przyczyną zrewolucjonizowania wielu dziedzin współczesnej nauki. Poznanie struktury DNA oraz podstawowych zasad genetyki molekularnej pozwoliło na znaczący rozwój między innymi systematyki oraz badań dotyczących ewolucji organizmów żywych.

W pierwszych pracach dotyczących systematyki roślin, w których wykorzystano analizę kwasów nukleinowych, stosowano głównie metodę całkowitej hybrydyzacji DNA/DNA [5]. Na podstawie analizy temperatury topnienia hybrydów nici DNA pochodzących z różnych organizmów starano się określić ich wzajemne pokrewieństwo [1]. Wyniki powyższych badań były jednak w przypadku roślin wyższych dość trudne do interpretacji. Sytuacja taka miała miejsce szczególnie wtedy, gdy badaniom podawano blisko spokrewnione gatunki [24]. Odkrycie enzymów restrykcyjnych stało się nowym impulsem w molekularnych badaniach taksonomicznych i filogenetycznych. Analiza długości fragmentów restrykcyjnych RFLP pozwoliła na znaczący rozwój taksonomii i systematyki roślin [1, 14, 24, 26].

Prawdziwym przełomem stało się jednak dopiero opracowanie w ostatnich latach techniki PCR [18] oraz uzyskanie możliwości łatwego sekwencjonowania DNA [22]. Wykorzystanie metod szybkiego i łatwego amplifikowania oraz sekwencjonowania DNA umożliwiło przeprowadzanie badań filogenetycznych przy wykorzystaniu bezpośredniej analizy zmienności sekwencji DNA. Technika PCR stała się również narzędziem pozwalającym na badanie organizmów już wymarłych. Spektakularnym przykładem tego typu prac wykonywanych na materiale roślinnym była amplifikacja genu *rbcl* z mioceńskich szczątków liścia *Magnolia latahensis* [12]. Dzięki wykorzystaniu metody PCR opracowano również technikę RAPD (losowo amplifikowany polimorficzny DNA) pozwalającą na prostą analizę zmienności populacyjnej badanych organizmów. Metoda RAPD została zaprezentowana po raz pierwszy przez Williama na przykładzie analizy zmienności soi i kukurydzy [29]. Dzięki stosowaniu coraz doskonalszej metodologii, bezpośrednia analiza sekwencji DNA staje się obecnie narzędziem coraz częściej używanym w badaniach systematycznych i filogenetycznych.

Zastosowanie nowych metod przyczyniło się do powstania nowych hipotez często sprzecznych z uznawanym dotąd podziałem taksonomicznym. Gwałtowny rozwój badań w dziedzinie ewolucji molekularnej zaowocował w ostatnich latach licznymi pracami z zakresu systematyki *Bryophyta*. Przedstawione w tych publikacjach hipotezy są jednak w wielu aspektach niejednoznaczne i sprzeczne. Dalszy rozwój opisanych prac badawczych może jednak w najbliższej przyszłości stać się podstawą do znacznego zmodyfikowania podejścia do niektórych aspektów rozwoju rodowego mszaków. W tej sytuacji wydaje się zasadne syntetyczne przedstawienie obecnego stanu wiedzy w tej dziedzinie.

PODZIAŁ SYSTEMATYCZNY MSZAKÓW NA PODSTAWIE ANALIZY SEKWENCJI DNA WYBRANYCH MARKERÓW GENETYCZNYCH

Intensywne prace z wykorzystaniem metod molekularnych były dotąd prowadzone przede wszystkim w przypadku roślin nasiennych. Ze względu na niewielkie znaczenie gospodarcze gromada *Bryophyta* była dotąd przedmiotem dość sporadycznych prac wykorzystujących bezpośrednią analizę kwasów nukleinowych. Ostatnio można jednak zanotować coraz większe zainteresowanie molekularnymi badaniami filogenezy mszaków, szczególnie w aspekcie poznawania cech łączących tę grupę roślin z pierwszymi roślinami lądowymi [13, 16, 20]. Prowadzenie coraz liczniejszych prac wykorzystujących analizę sekwencji DNA w badaniach taksonomicznych i filogenetycznych pozwoliło na postawienie nowych hipotez dotyczących rozwoju rodowego mszaków.

Jądrowe geny *18S rRNA*

W ostatnich latach bardzo intensywne badania nad pokrewieństwem *Bryophyta* prowadzone były przez Capesius i Boppa z Instytutu Botaniki Uniwersytetu w Heidelbergu. Badacze ci wykorzystywali jako marker genetyczny jądrowe geny *18S rRNA*. Analiza ich sekwencji pozwoliła na zaproponowanie zupełnie nowego podziału systematycznego mszaków. Analizie poddano pierwotnie 14 kompletnych sekwencji genu *18S rRNA* [3, 4, 6]. Prace powyższe rozwinęto następnie analizując 22 sekwencje genu *18S rRNA* różnych mszaków [7]. Uzyskane sekwencje poddano analizie kladystycznej, z wykorzystaniem metody maksymalnej parsymonii oraz fenetycznej stosując metodę Neighbor-Joining. Niezależnie od metody użytej w konstrukcji dendrogramu mszaków, uzyskano wyniki będące w sprzeczności z tradycyjnie przyjmowanym podziałem *Bryophyta* na trzy klasy: *Bryopsida* (mchy), *Hepaticopsida* (wątrobowce) oraz *Anthocerotopsida* (glewiki). Zgodnie z wynikami analizy genów *18S rRNA*, podklasy wątrobowców *Marchantiidae* i *Jungermannniidae* wykazują tak znaczące różnice, iż należałoby podnieść je do rangi klasy: *Marchantiopsida* oraz *Jungermannniopsida* [4, 7]. Proponowane klasy *Marchantiopsida* i *Jungermannniopsida* stanowiłyby zupełnie niezależne linie ewolucyjne. Według autorów tych prac również właściwa analiza danych morfologicznych powinna doprowadzić do nadania podklasom *Marchantiopsida* oraz *Jungermannniopsida* wyższej rangi [7]. Odrębność tych podklas potwierdza także fakt występowania procesu redagowania mitochondrialnego mRNA u *Jungermannniidae* i jego brak w przypadku *Marchantiidae* [25].

Analiza sekwencji jądrowych genów *18S rRNA* mszaków pozwoliła na wyciągnięcie dalszych wniosków filogenetycznych będących w jeszcze głębszej sprzeczności z tradycyjnym podziałem systematycznym *Bryophyta*. Na utworzonych

dendrogramach proponowana klasa *Jungermanniopsida* stanowi grupę siostrzaną klasy mchów *Bryopsida* i jest z nią wyraźnie bliżej spokrewniona niż z klasą *Marchantiopsida*. Proponowany nowy podział mszaków wskazywałby na wyraźnie parafiletyczny charakter wątrobowców [3, 4, 6, 7]. Również pozycja klasy *Anthocerotopsida* nie jest zgodna z tradycyjną systematyką. Glewiki zgodnie z wynikami analizy jądrowych genów *18S rRNA* są taksonem najbliższym spokrewnionym z proponowaną klasą *Jungermanniopsida*. Zgodnie z postulowanym, nowym podziałem systematycznym, *Jungermanniopsida* byłyby bliżej spokrewnione z *Anthocerotopsida* niż z mchami [4, 6]. Pozycja filogenetyczna *Anthocerotopsida* została jednak ustalona na podstawie analizy tylko jednej sekwencji jądrowego genu *18S rRNA* glewika *Anthoceros agrestis*. Trzeba również zauważyć, że w ostatnich publikacjach autorzy badań nie przedstawiają wyników analizy sekwencji *Anthoceros agrestis* na dendrogramach *Bryophyta* [7]. Zgodnie z nową systematyką mszaków, stworzoną przy wykorzystaniu danych molekularnych, klasa *Jungermanniopsida* byłaby najbliższym spokrewnioną z klasą *Anthocerotopsida*, choć wynik ten jest słabo udokumentowany, a następnie z klasą *Bryopsida*. Najbardziej odległą i ewolucyjnie starszą klasą mszaków byłaby klasa *Marchantiopsida*. Również w przypadku mchów wyniki uzyskane dzięki analizie sekwencji jądrowych genów *18S rRNA* pozwalają na zaproponowanie podniesienia podklasy *Sphagnidae* do rangi klasy *Sphagnopsida* [4]. Analiza proponowanej klasy *Jungermanniopsida* ujawniła, iż na podstawie danych molekularnych badanych sekwencji jądrowych genów *18S rRNA* dziesięciu przedstawicieli tego taksonu nie można odróżnić wchodzących w skład tej grupy rzędów *Metzgeriales* i *Jungermanniales* [7]. Jest to dość zaskakujący wynik, gdyż badane rzędy różnią się znacznie pod względem morfologicznym. Wyraźnie odrębny charakter podklas *Marchantiidae* oraz *Jungermanniidae* był sugerowany również przez innych badaczy korzystających z metod molekularnych w badaniach filogenetycznych.

Wyniki analizy sekwencji *5S rRNA* czterech mszaków pozwoliły na wyciągnięcie bardzo podobnych wniosków co do odrębności badanych podklas wątrobowców [28]. Również badania częściowej sekwencji jądrowych genów *18S* [8, 17] oraz *25S rRNA* [8] grupy różnych gatunków roślin, w tym jednego przedstawiciela podklasy *Jungermanniidae* (*Porella*), wskazywały na odrębność *Jungermanniidae* i *Marchantiidae*.

Chloroplastowe geny *rbcL*

Dalsze prace nad systematyką *Bryophyta* wykorzystujące w charakterze markera genetycznego sekwencje chloroplastowego genu *rbcL* z dwudziestu czterech wątrobowców, także wykazały znaczące różnice między podklasami *Hepaticopsida*: *Jungermanniidae* i *Marchantiidae* [15]. Porównanie sekwencji obu badanych podklas wątrobowców wykazało, iż mają one różne tempa substytucji nukleotydowych.

Tempo substytucji nukleotydowych *Jungermanniiidae* było wyższe od analogicznej wartości tego współczynnika u *Marchantiidae*. Również wynik analizy parsymonicznej genów *rbcL* badanych wątrobowców wskazywał na silną odrębność *Jungermanniiidae* i *Marchantiidae* [15].

Chloroplastowe sekwencje cpITS2, cpITS3 i cpITS4

Proponowany na podstawie analizy sekwencji jądrowych genów *18S rRNA* nowy podział mszaków stanowi interesującą alternatywę dla tradycyjnej taksonomii *Bryophyta*, jednakże należy zaznaczyć, że nie wszystkie badania wykorzystujące analizę markerów DNA potwierdzają powyższą hipotezę. Wyniki analizy chloroplastowych sekwencji DNA: cpITS2, cpITS3 oraz cpITS4, pochodzących z dwudziestu pięciu różnych gatunków mszaków, są sprzeczne z wnioskami wyciągniętych na podstawie badań sekwencji DNA jądrowych genów *18S rRNA* [21]. Sekwencje: cpITS2, cpITS3 oraz cpITS4 rozdzielają w obrębie chloroplastowych rejonów powtórzonych i odwróconych (*inverted repeat*) odpowiednio geny: *23S rRNA*, *4.5S rRNA*, *5S rRNA* oraz *tRNA^{Arg}_{ACG}* [19,21]. Wnioski wynikające z badań filogenetycznych wykonywanych przy wykorzystaniu sekwencji: cpITS2, cpITS3 oraz cpITS4, analizowane z użyciem metody Neighbor-Joining, potwierdzają przyjmowany w tradycyjnych systemach taksonomicznych monofiletyczny charakter wątrobowców oraz ich podział na dwie podklasy: *Jungermanniiidae* i *Marchantiidae* [21]. Wyniki powyższe potwierdzają również tradycyjny podział mszaków na trzy klasy: *Bryopsida*, *Hepatocopsida* oraz *Anthocerotopsida*. Analiza podklasy wątrobowców *Jungermanniiidae* wykazała natomiast wyraźny podział tego taksonu na dwie odrębne grupy wątrobowców odpowiadające rzędowi: *Metzgeriales* i *Jungermanniales* [21].

Wyniki analizy sekwencji chloroplastowych: cpITS2, cpITS3 oraz cpITS4 w pełni potwierdzają tradycyjną systematykę mszaków i są w wyraźnej sprzeczności z wnioskami wyciągniętymi na podstawie badania sekwencji jądrowych genów *18S rRNA*.

Mitochondrialne geny *nad5*

Tradycyjny podział taksonomiczny mszaków znalazł również potwierdzenie w wynikach badań, w których jako markera genetycznego użyto sekwencji DNA mitochondrialnego genu *nad5* [2]. Sekwencje genu *nad5* przebadano u trzydziestu mchów, piętnastu wątrobowców, dwóch glewików oraz jednego przedstawiciela glonów. Stwierdzono występowanie w obrębie sekwencji genu *nad5* wątrobowców oraz mchów intronu należącego do grupy I, charakterystycznego tylko dla tych dwóch taksonów. Występowania tego typu intronu nie stwierdzono w sekwencjach *nad5* badanych glewików *Anthoceros husnotii* i *Anathoceros punctatus*, przedstawiciela glonów *Lamprothamnium papulosum* (*Charales*) oraz w znanych genach *nad5* roślin naczyniowych. W przypadku glewika *Anthoceros punctatus* stwierdzono natomiast

występowanie intronu należącego do grupy II. Obecność tego rodzaju intronu genu *nad5* w pozycji charakterystycznej dla *Anthoceros punctatus* nie było dotąd odnotowane u żadnej innej rośliny.

Wykorzystując uzyskane sekwencje genów *nad5* oraz sekwencje odkrytych u wątrobowców i mchów intronów z grupy I, skonstruowano dendrogramy *Bryophyta*. Wzajemne położenie wątrobowców i mchów na dendrogramach potwierdza bliskie pokrewieństwo tych dwóch taksonów i pozwala na traktowanie ich jako grup siostrzanych. Odrębność mchów i wątrobowców od pozostałych roślin podkreślana jest także przez występowanie charakterystycznego tylko dla tych dwóch taksonów intronu z grupy I mitochondrialnego genu *nad5*.

Wyniki powyższe zdają się raczej potwierdzać tradycyjny podział systematyczny mszaków oraz monofiletyczny charakter wątrobowców. Wnioski wyciągnięte na podstawie powyższych badań są więc niezgodne z hipotezą postulowaną z uwagi na przeprowadzoną analizę sekwencji jądrowych genów *18S rRNA* [4, 7]. Analiza sekwencji mitochondrialnego genu *nad5* podkreśla odrębność glików od pozostałych taksonów *Bryophyta*. Wniosek ten znajduje silne poparcie ze względu na brak u glików charakterystycznego dla reszty mszaków intronu z grupy I. Zgodnie z uzyskanymi wynikami można stwierdzić, iż *Anthocerotopsida* stanowią silnie zróżnicowaną grupę starych filogenetycznie roślin. Jak sami autorzy przyznają, na podstawie testowanych danych można jedynie stwierdzić odrębność glików, jednakże pewne ustalenie ich pozycji na dendrogramie względem pozostałych grup mszaków jest niemożliwe [2].

Porównanie wyników badań filogenetycznych mszaków wykonanych z użyciem omówionych markerów genetycznych

Analiza różnych markerów genetycznych dostarczyła sprzecznych wyników, które z jednej strony potwierdzają klasyczny podział systematyczny mszaków, z drugiej zaś negują uznawane obecnie poglądy na temat filogenezy *Bryophyta*. Sytuacja ta, choć ukazuje ograniczenia nowej metodyki wykorzystującej analizę sekwencji DNA, może stać się impulsem do dalszych prac badawczych, które pozwolą na falsyfikację jednej z przedstawionych wyżej hipotez i dalszy rozwój wiedzy dotyczącej filogenezy roślin.

POCHODZENIE ROŚLIN LĄDOWYCH W ASPEKCIE BADAŃ EWOLUCJI MOLEKULARNEJ MSZAKÓW

Dzięki badaniom dotyczącym ewolucji molekularnej mszaków uzyskano wiele wyników pozwalających w nowy sposób spojrzeć na pochodzenie roślin lądowych. Analiza różnych markerów genetycznych pozwoliła na postawienie nowych hipotez dotyczących filogenetycznej roli mszaków w procesie zasiedlania lądu przez rośliny.

Analiza sekwencji cDNA transkryptów mitochondrialnych genów *cox3*

Intensywne prace dotyczące pochodzenia i filogenezy roślin lądowych prowadzone były między innymi na podstawie analizy sekwencji cDNA transkryptów mitochondrialnych genów *cox3* [16]. Analiza utworzonych przy zastosowaniu metod fenetycznych i kladystycznych dendrogramów pozwoliła na uznanie klasy *Anthocerotopsida* za takson bazalny roślin lądowych, najbliższej spokrewniony z glonami z klasy *Charophyceae* (ramienicowe), która zgodnie z powszechnie przyjętym poglądem stanowi grupę roślin wodnych najbliższych lądowym [11, 27].

Wywodzenie roślin lądowych od glonów z klasy *Charophyceae* (gromada *Chlorophyta* – zielenice) było proponowane już wcześniej na podstawie badań molekularnych, wykorzystujących jako marker genetyczny sekwencje 5S rRNA roślin [9]. Pozycja klasy *Charophyceae* jako grupy wyjściowej glonów, która dała początek roślinom lądowym, jest ogólnie uznawana, jednakże łączenie ich z glewikami jest tylko jedną z wielu możliwych hipotez. Z analizy cDNA transkryptów genu *cox3* wyciągnięto również bardziej szczegółowy wniosek dotyczący grupy glonów, z których miały wywodzić się rośliny lądowe. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, iż najbliższe spokrewnione z roślinami lądowymi są należące do klasy *Charophyceae* glony z rzędu *Charales* reprezentowane w badaniach przez rodzaj *Chara* [16]. Przeprowadzona analiza pozwoliła natomiast na uznanie wątrobowców oraz mchów za taksony blisko spokrewnione z *Tracheophyta* (rośliny naczyniowe). Zgodnie z uzyskanymi wynikami nie można było jednak ustalić, który z tych taksonów stanowi bezpośrednią grupę siostrzaną *Tracheophyta* [16]. Stwierdzono również, iż transkrypty genu *cox3* u *Bryophyta* ulegają redagowaniu. Uzyskanie tego wyniku obaliło twierdzenie, zgodnie z którym redagowanie mitochondrialnych transkryptów zachodzi wyłącznie u roślin naczyniowych. Pierwotnie zakładano bowiem, że występowanie redagowania jest zjawiskiem filogenetycznie związanym z roślinami naczyniowymi. Dzięki badaniom cDNA genu *cox3* stwierdzono występowanie redagowania transkryptów we wszystkich klasach *Bryophyta*. Redagowanie transkryptów wykryto w przypadku wątrobowca *Pellia epiphylla* i mchów *Ceratodon purpureus* i *Tetraphis pellucida* oraz glewika *Anthoceros crispulus* [16]. Uzyskanie tych wyników pozwoliło na wysunięcie tezy, iż redagowanie jest procesem starym filogenetycznie, zachodzącym u wszystkich roślin lądowych. Zgodnie z opinią autorów pracy, redagowanie jest wynikiem reakcji organizmów na tendencję wywołującą w genomie wzrost poziomu par G+C, spowodowany substytucjami tymidyny w cytydynę. Proces ten zaburza prawidłowy odczyt kodonów, co wywołuje konieczność kompensacji przez redagowanie zmian w transkryptach i zamianę cytydyn w urydyny [16].

Hipoteza głosząca, że proces redagowania jest szeroko rozpowszechniony wśród wszystkich roślin lądowych, znalazła potwierdzenie w pracach nad redagowaniem transkryptów genów plastydowych: *ndhB* oraz *rbcL* [10]. Wykazano, iż proces

redagowania transkryptów występuje we wszystkich głównych grupach roślin lądowych, w tym również u mszaków. Częstość występowania redagowania nie jest skorelowana z pozycją filogenetyczną badanych organizmów [10].

Analiza jądrowych genów *18S rRNA* w badaniach pochodzenia roślin lądowych

Badania dotyczące pochodzenia roślin lądowych oraz roli, jaką mszaki odgrywają w filogenezie roślin lądowych, prowadzone były również przy stosowaniu analizy sekwencji jądrowych genów *18S rRNA* [13]. Wyniki sugerują, iż współczesne rośliny lądowe, w tym mszaki, wywodzą się z glonów należących do rzędu *Coleochaetales* (klasa *Charophyceae*) [13]. Hipoteza ta jest sprzeczna z wnioskami wynikającymi z analizy cDNA transkryptów genów *cox3*, gdyż zgodnie z nią pierwsze rośliny lądowe wywodzą się z glonów należących do rzędu *Charales* (klasa *Charophyceae*) [16]. Hipoteza dotycząca pochodzenia roślin lądowych jest obecnie przedmiotem dyskusji. Analiza niektórych cech morfologicznych i anatomicznych skłania jednak wielu badaczy ku tezie zgodnej z wynikami analizy jądrowych genów *18S rRNA*, iż rośliny lądowe wywodzą się z glonów bliskich rzędowi *Coleochaetales* [27]. Jest to jednak problem daleki od definitywnego rozwiązania.

Analiza struktury rDNA

Wyniki ostatnich badań nad strukturą rDNA mszaków wykazały występowanie u tej grupy roślin wspólnej lokalizacji genów: *18S*, *5,8S* i *26S rRNA* (tworzą one wraz z sekwencjami rozdzielającymi fragment DNA kodujący 45S rRNA) oraz genu *5S rRNA* [23]. U *Bryophyta* stwierdzono występowanie genu *5S rRNA* w obrębie sekwencji NTS (*nontranscribed spacer*) między genami *26S* oraz *18S rRNA*. Obecność takiego niespotykanego u pozostałych roślin lądowych układu genów rRNA odkryto u wątrobowca *Marchantia polymorpha*, dzięki badaniom z użyciem hybrydyzacji typu Southern oraz fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH). Podobny układ genów rRNA znaleziono również u mchu *Funaria hygrometrica* [23]. Występowanie sekwencji genu *5S rRNA* oraz sekwencji DNA kodującej 45S rRNA we wspólnej lokalizacji stwierdzono także u kilku glonów z gromady *Cryptophyta* (kryptofity). Podobnego uporządkowania genów rRNA nie znaleziono jednak u innych glonów, w tym gromady *Chlorophyta*. Glony z gromady *Chlorophyta*, do których należy omawiana powyżej klasa *Charophyceae*, jest zgodnie z ogólnie przyjętym poglądem najbliższą roślinom lądowym gromadą glonów [27]. Z powyższych względów autorzy skłaniają się ku hipotezie, iż obecność sekwencji genów *5S rRNA* oraz sekwencji DNA kodującej 45S rRNA we wspólnej lokalizacji jest wynikiem niezależnych procesów rearanżacji genomu i nie świadczy o filogenetycznej bliskości mszaków i kryptofitów. Zgodnie z opinią autorów pracy, prze-

niesienie sekwencji genu *5S rRNA* do sekwencji NTS miałyby nastąpić u mszaków, już po wyodrębnieniu się tej grupy z najbardziej pierwotnych roślin lądowych [23].

Badanie obecności intronów *cox2.i3* oraz *cox2.i4* mitochondrialnego genu *cox2* oraz intronu *nad1.i4* mitochondrialnego genu *nad1*

Dalsze badania pochodzenia pierwszych roślin lądowych dały silne podstawy hipotezie zakładającej, iż pierwszymi roślinami lądowymi były wątrobowce [20]. W celu przeprowadzenia analizy filogenetycznej wykonano doświadczenia mające na celu określenie obecności lub braku intronów występujących w mitochondrialnym genie *cox2* (badano występowanie dwóch intronów: *cox2.i3* oraz *cox2.i4*) oraz w innym mitochondrialnym genie *nad1* (badano występowanie jednego intronu: *nad1.i4*). Badaniom poddano w sumie trzysta pięćdziesiąt dwa gatunki roślin lądowych (wątrobowce, glewiki, paprocie, rośliny nasienne) oraz glonów. Stwierdzono okazjonalny brak jednego oraz rzadziej dwóch intronów u mchów, glewików i innych roślin lądowych, jednakże zupełny brak wszystkich trzech intronów stwierdzono wyłącznie w przypadku badanych gatunków wątrobowców oraz glonów. Na podstawie tych wyników wyciągnięto wniosek, iż pierwszymi roślinami lądowymi były wątrobowce. Trzy badane introny miałyby powstać dopiero u wywodzącego się z wątrobowców wspólnego przodka pozostałych roślin lądowych [20].

Obecny stan badań prowadzonych na poziomie kwasów nukleinowych, dotyczących roli mszaków w procesie powstania roślin lądowych

Badania pochodzenia roślin lądowych z wykorzystaniem analizy sekwencji kwasów nukleinowych pozwalają na proponowanie nowych hipotez. Trzeba jednak przyznać, iż podobnie jak w przypadku opisanych w pierwszej części pracy prób odtworzenia filogenezy mszaków uzyskane wyniki są sprzeczne i nie pozwalają na wyciąganie jednoznacznych wniosków. Powyższy problem jest ciągle wyzwaniem dla badaczy i wymaga przeprowadzenia dalszych doświadczeń.

PODSUMOWANIE

Wykorzystanie sekwencji DNA w badaniach taksonomicznych i filogenetycznych pozwala na wyciąganie wniosków na podstawie danych stanowiących bezpośredni wynik procesów zachodzących na poziomie molekularnym, podlegających dziedziczeniu i przekazywaniu z pokolenia na pokolenie. Ten nowy rodzaj metodyki badawczej daje możliwość uchwycenia zmian ewolucyjnych na poziomie materiału genetycznego, gdzie procesy te ulegają utrwalaniu. Chociaż wykorzystanie technik biologii molekularnej daje nowe możliwości badawcze trzeba pamiętać, iż wyniki

takiej analizy nie są pozbawione ograniczeń, które mogą być powodem błędów oraz wyciągania sprzecznych wniosków. Przykład taksonomicznych badań mszaków wskazuje wyraźnie, iż podstawą sukcesu tego typu analizy jest właściwy wybór sekwencji DNA mającej służyć jako marker genetyczny. W celu rozwiązania sprzeczności w hipotezach dotyczących filogenezy i taksonomii mszaków będzie konieczne przeprowadzenie dalszych prac z użyciem innych markerów DNA. Dla badacza posługującego się metodami molekularnymi bardzo ważną jest świadomość, że stosowane nowe techniki są tylko uzupełnieniem metodycznym badań prowadzonych wcześniej i nie mogą stanowić wyłącznej podstawy analizy filogenetycznej.

LITERATURA

- [1] AVISE JC. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*, Chapman & Hall 1994.
- [2] BECKERT S, STEINHAUSER S, MUHLE H, KNOOP V. A molecular phylogeny of bryophytes based on nucleotide sequences of the mitochondrial *nad5* gene. *Plant Syst Evol* 1999; **218**: 179–192.
- [3] BOPP M, CAPESIUS I. New aspects of the systematics of bryophytes. *Naturwissenschaften* 1995; **82**: 193–194.
- [4] BOPP M, CAPESIUS I. New aspects of Bryophyte taxonomy provided by a molecular approach. *Bot Acta* 1996; **109**: 368–372.
- [5] BRITTEN RJ, GRAHAM DE, NEUFELD BR. Analysis of repeating DNA sequences by reassociation. *Methods Enzymol* 1974; **29**: 363–418.
- [6] CAPESIUS I. A molecular phylogeny of bryophytes based on the nuclear encoded *18S rRNA* genes. *J Plant Physiol* 1995; **146**: 59–63.
- [7] CAPESIUS I, BOPP M. New classification of liverworts based on molecular and morphological data. *Plant Syst Evol* 1997; **207**: 87–97.
- [8] CHAPMAN RL, BUCHHEIM MA. Green algae and the evolution of the land plants: Inferences from nuclear-encoded rRNA gene sequences. *BioSystems* 1992; **28**: 127–137.
- [9] DEVEREUX R, LOBLICH AR III, FOX GE. Higher plant origins and the phylogeny. *J Mol Evol* 1990; **31**: 18–24.
- [10] FREYER R, KIEFER-MEYER M, KOSSEL H. Occurrence of plastid RNA editing in all major lineages of land plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 6285–6290.
- [11] GRAHAM LE. The origin of life cycle of land plants. *Am Sci* 1984; **73**: 178–186.
- [12] GOLENBERG EM. Amplification and analysis of Miocene plant fossil DNA. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1991; **333**: 419–427.
- [13] KRANZ HD, MIKS D, SIEGLER M, CAPESIUS I, SENSEN CW, HUSS VAR. The origin of land plants: phylogenetic relationships among Charophytes, Bryophytes and vascular plants inferred from complete small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *J Mol Evol* 1995; **41**: 74–84.
- [14] LEARN GL, SCHAAL R. Population subdivision for rDNA repeat variants in *Clematis fremontii*. *Evolution* 1987; **41**: 433–437.
- [15] LEWIS LA, MISHLER BD, VILGALYS R. Phylogenetic relationships of the liverworts (*Hepaticae*), a basal embryophyte lineage, inferred from nucleotide sequence data of the chloroplast gene *rbcL*. *Mol Phylogenet Evol* 1997; **7**: 377–393.
- [16] MALEK O, LATTING K, HIESEL R, BRENNICKE A, KNOOP V. RNA editing in bryophytes and a molecular phylogeny of land plants. *EMBO J* 1996; **15**: 1403–1411.

- [17] MISCHLER BD, LEWIS LA, BUCHHEIM MA, RENZAGLIA KS, GARBARY DJ, DELEWICHE CF, ZECHMAN FW, KANTZ TS, CHAPMAN RL. Phylogenetic relationships of the green algae and bryophytes. *Ann Missouri Bot Gard* 1994; **81**: 451–483.
- [18] MULLIS KB, FALOONA FA. Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; **55**: 335–350.
- [19] OHYAMA K. Chloroplast and mitochondrial genomes from a liverwort, *Marchantia polymorpha* – gene organisation and molecular evolution. *Biosci Biotechnol Biochem* 1996; **60**: 16–24.
- [20] QIU YL, CHO Y, COX C, PALMER JD. The gain of three mitochondrial introns identifies liverworts as the earliest land plants. *Nature* 1998; **394**: 671–674.
- [21] SAMIGULLIN TH, VELIEJO-ROMAN KM, TROITSKY AV, BOBROVA VK, FILIN VR, MARTIN W, ANTONOV AS. Sequences of rDNA internal transcribed spacers from the chloroplast DNA of 26 bryophytes: properties and phylogenetic utility. *FEBS Lett* 1998; **422**: 47–51.
- [22] SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; **74**: 5463–5467.
- [23] SONE T, FUJISAWA M, TAKENAKA M, NAKAGAWA S, YAMAOKO S, SAKAIDA M, NISHIYAMA R, YAMATO KT, OHMIDO N, FUKUI K, FUKUZAWA H, OHYAMA K. Bryophyte 5S rDNA was inserted into 45S rDNA repeat units after the divergence from higher land plants. *Plant Mol Biol* 1999; **41**: 679–685.
- [24] STACE CA. *Plant Taxonomy and Biosystematics*, Press Syndicate of the University of Cambridge 1989.
- [25] STEINHAUSER S, BECKERT S, CAPESIUS I, MALEK O, KNOOP V. Plant mitochondrial RNA editing. *J Mol Evol* 1999; **48**: 303–312.
- [26] SYTSMA KJ, GOTTLIEB LB. Chloroplast DNA evolution and phylogenetic relationships in *Clarkia* section *Peripetasma*. *Evolution*, Lancaster 1986; **40**: 1248–1261.
- [27] SZWEYKOWSKA A, SZWEYKOWSKI J. *Botanika (Systematyka)*. Wydawnictwo Naukowe PWN 1995.
- [28] VAN DE PEER Y, DE BAERE R, CAUWENBERGHS J, DE WACHTER R. Evolution of green plants and their relationship with other photosynthetic eukaryotes as deduced from 5S ribosomal RNA sequences. *Plant Syst Evol* 1990; **170**: 85–96.
- [29] WILLIAMS JGK, KUBELIK AR, LIVAK KJ, RAFALSKI JA, TINGEY SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acid Res* 1990; **18**: 6531–6535.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 10.04.2001 r.

Przyjęto: 22.05.2001 r.

Adres autora: ul. Międzychodzka 5, 60-371 Poznań,

e-mail: pawfie@main.amu.edu.pl

TRANSPORT MAKROMOLEKUŁ POMIĘDZY SIATECZKĄ ŚRÓDPLAZMATYCZNĄ A APARATEM GOLGIEGO. ROLA PĘCHERZYKÓW COPI i COPII ORAZ PRZEDZIAŁU POŚREDNIEGO

TRANSPORT OF MACROMOLECULES BETWEEN THE ENDOPLASMIC RETICULUM AND THE GOLGI APPARATUS. THE ROLE OF COPI- AND COPII- COATED VESICLES AND THE INTERMEDIATE COMPARTMENT

Katarzyna ROSZEK, Jadwiga GNIOT-SZULŻYCKA

Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi,
Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Zakład Biochemii, Toruń

*Streszczenie:*Transport syntetyzowanych w siateczce śródplazmatycznej (ER) makromolekuł zachodzi z udziałem pęcherzyków opłaszczonych kompleksem białek COP I i COP II. Polimorficzny tubularno-pęcherzykowy przedział pośredni (IC, VTCs lub ERGIC), zlokalizowany pomiędzy siateczką śródplazmatyczną a cysternami cis aparatu Golgiego, uczestniczy w regulacji transportu i sortowaniu makromolekuł poprzez procesy rozpoznawania sekwencji sygnałowych. Przykładowo, sekwencja difenyloalaninowa (FF) stanowi sygnał eksportu z ER, sekwencja dilyzynowa (KKXX) jest natomiast nieodzowna dla powrotu białek do siateczki śródplazmatycznej. Omówiono również znaczenie białek cyklicznie krążących, w szczególności przedstawicieli rodziny p24, w procesach zagęszczania i sortowania w przedziale ER ↔ IC ↔ aparat Golgiego.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28: 443–465)

Słowa kluczowe: pęcherzyki opłaszczone, COP I, COP II, tubularno-pęcherzykowy przedział pośredni (IC, VTCs lub ERGIC)

Summary: Transport of the macromolecules synthesized in the endoplasmic reticulum (ER) is mediated by COP I- and COP II-coated vesicles. The polymorphic vesicular-tubular structure, ER-Golgi intermediate compartment (IC, VTCs or ERGIC), regulates transport and sorting of macromolecules via recognition of signal motifs. For example, the diphenylalanine (FF) signal is important for the export from ER while the dilysine (KKXX) signal is necessary for retrograde transport of proteins back to the reticulum. The role of constitutively cycling proteins, especially those from the p24 family, which

participate in the concentration and sorting in compartment ER ↔ IC ↔ Golgi, has been described. (*Advances in Cell Biology* 2001; 28: 443–465)

Key words: coated vesicles, COP I, COP II, ER-Golgi intermediate compartment (IC, VTCs or ERGIC)

Wykaz skrótów: ARF – czynnik ADP-rybozylacji; BFA – brefeldyna A; COP – kompleks białek opłaszczających pęcherzyki transportujące; ER – siateczka śródplazmatyczna, retikulum endoplazmatyczne; ERGIC (ang. *ER-Golgi Intermediate Compartment*), IC (ang. *Intermediate Compartment*), VTCs (ang. *Vesicular-Tubular Clusters*) – przedział pośredni; GAP – białko aktywujące GTP-azę; GEF – czynnik wymiany nukleotydów; GTPγS – guanozyna-5-[γ-tio]trifosforan; PLD – fosfolipaza D; PtdIns(4, 5)P₂ – fosfatydyloinozytolo-4, 5-bisfosforan; PtdIns(3, 4, 5)P₃ – fosfatydyloinozytolo-3, 4, 5-trifosforan.

WSTĘP

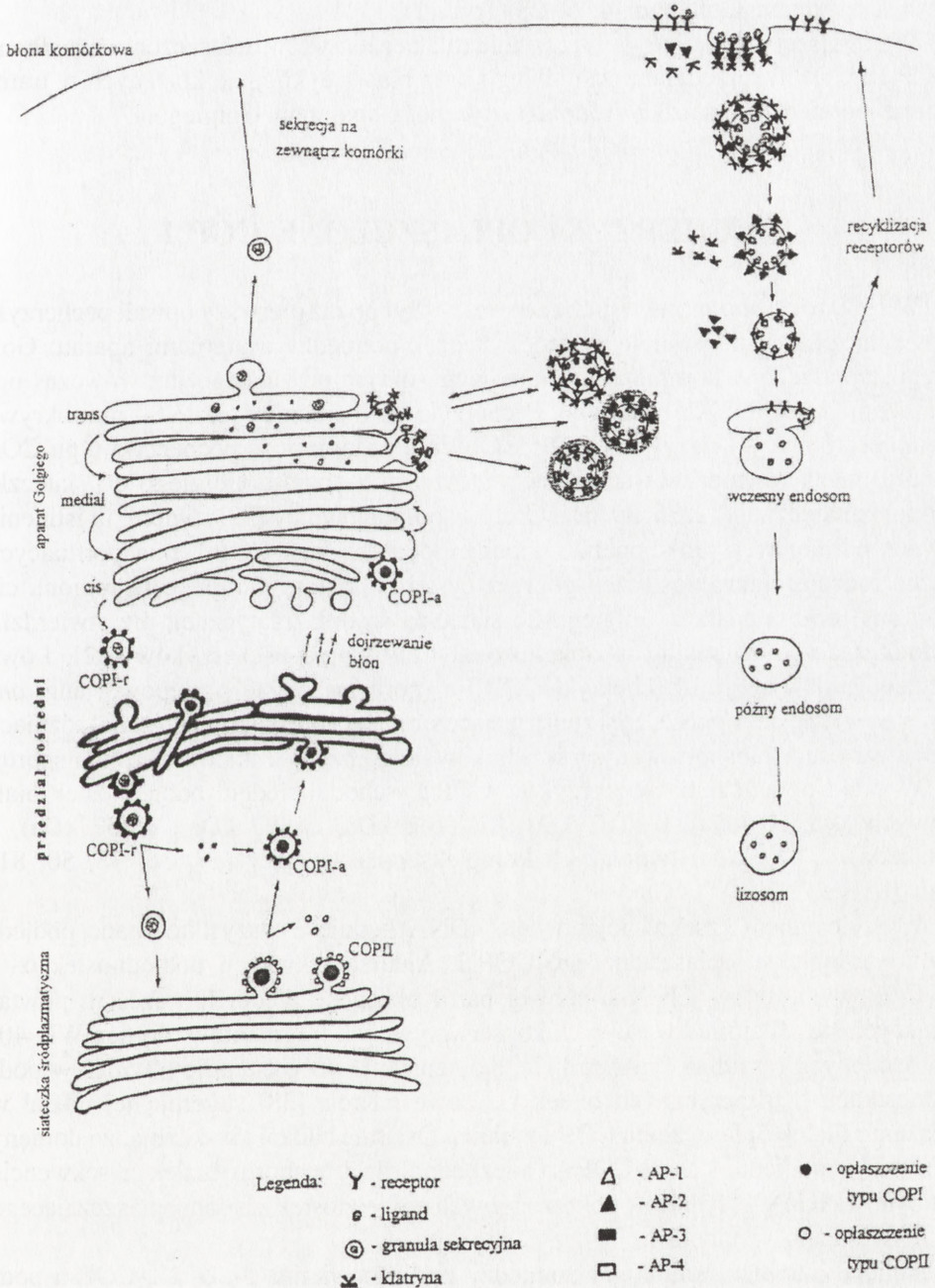
Siateczka śródplazmatyczna (ER) jest miejscem syntezy białek i lipidów zarówno pozostających na terenie komórki, jak również tych wydzielanych poza komórkę. Większość białek syntetyzowanych w ER, bez względu na ich ostateczną lokalizację, podlega modyfikacjom. Procesy modyfikacji niektórych białek rozpoczynają się już w siateczce śródplazmatycznej (modyfikacje kotranslacyjne) lub też zachodzą w aparacie Golgiego (modyfikacje potranslacyjne).

W ogólnym ujęciu, transport pomiędzy przedziałami błonowymi w komórce zachodzi z udziałem pęcherzyków pączkujących z błon przedziału donorowego, ulegających następnie fuzji ze ściśle określoną błoną docelową. Transport makromolekuł z siateczki śródplazmatycznej do aparatu Golgiego i w obrębie struktur przedziału pośredniego, łączącego powyższe struktury (ryc. 1), jest dwukierunkowy (postępowy i wsteczny) i odbywa się za pośrednictwem pęcherzyków opłaszczonych kompleksem cytosolowych białek COP (ang. *coat protein*). Pęcherzyki COP są odmienne od pęcherzyków opłaszczonych klatryną i białkami adaptorowymi AP, uczestniczących w zależnej od receptorów endocytozie i sortowaniu białek [27, 34, 42, 63, 64, przegląd literatury w języku polskim: 56].

Dotychczas opisano dwa typy pęcherzyków opłaszczonych kompleksem białek COP: COP I i COP II (ryc. 1 i 4).

COP I zidentyfikowano po raz pierwszy w 1989 roku [39] jako pęcherzyki uczestniczące w transporcie postępowym pomiędzy cysternami regionów cis, pośrednim i trans aparatu Golgiego. Obecnie wiadomo, że pośredniczą one również w transporcie wstecznym z aparatu Golgiego do siateczki śródplazmatycznej [38, 50, 52, 61, 63]. Pęcherzyki COP II uczestniczą w transporcie postępowym, zagęszczaniu oraz segregacji białek i lipidów błon siateczki śródplazmatycznej przeznaczonych do transportu [5, 6, 28, 60, 63].

Pęcherzyki COP II odpączkowujące z błon ER podlegają fuzji, w wyniku czego tworzy się pleomorficzna struktura pęcherzykowo-tubularna, tzw. przedział pośredni



RYCINA 1. Pęcherzyki opłaszczone klatryną oraz COPI i COPII w transporcie wewnątrzkomórkowym

(IC, VTCs, ERGIC), zlokalizowany w cytosolu pomiędzy siateczką śródplazmatyczną a aparatem Golgiego [4, 5, 28] (ryc. 1).

W niniejszej pracy omówiona zostanie rola pęcherzyków opłaszczonych białkami COP I i COP II, przedziału pośredniego oraz białek cyklicznie krążących w transporcie pomiędzy siateczką śródplazmatyczną a aparatem Golgiego.

PEŁCZERZYKI OPŁASZCZONE COP I

W 1989 roku Malhotra i współpracownicy [39] po raz pierwszy opisali pęcherzyki pośredniczące w transporcie makrocząsteczek pomiędzy cysternami aparatu Golgiego, opłaszczone kompleksem białkowym, innym od znanego już wówczas opłaszczania białkami AP i klatryną. Pęcherzyki te, o średnicy około 80 nm, pokrywa kompleks białkowy nazywany COP I. Obecnie wiadomo, że pęcherzyki typu COP I uczestniczą również w transporcie wstecznym z aparatu Golgiego do siateczki śródplazmatycznej [12, 35, 59, 61]. Orci i współpracownicy [52] stwierdzili istnienie dwóch odmiennych funkcjonalnie populacji pęcherzyków COP I, transportujących różne rodzaje makrocząsteczek poprzez cysterny aparatu Golgiego (z regionu cis do trans) oraz z aparatu Golgiego do siateczki śródplazmatycznej, nie stwierdzili jednak znaczących różnic w opłaszczeniu i strukturze pęcherzyków [52]. Lowe i Kreis [38] wyróżnili pęcherzyki COP I-a (poruszające się postępowo, ang. *anterograde*) i pęcherzyki COP I-r (poruszające się wstecznie, ang. *retrograde*) różniące się zawartością transportowanych składników (ang. *cargo*) i kierunkiem transportu.

W skład opłaszczenia pęcherzyków COP I wchodzi siedem podjednostek białkowych: α (160 kDa), β (107 kDa), β' (102 kDa), γ (97 kDa), δ (57 kDa), ϵ (36 kDa), ζ (20 kDa) tworzących kompleks opłaszczający [17, 36, 38, 50, 81] (tab. 1, ryc. 2).

Wyizolowano i zsekwencjonowano cDNA kodujące wszystkie znane podjednostki kompleksu opłaszczającego COP I. Analiza sekwencji podjednostek α - i β' -COP wykazała w ich N-końcowej partii obecność pięciu lub sześciu powtarzających się 40-aminokwasowych konserwatywnych fragmentów (domen WD-40) zakończonych resztami Trp-Asp [47]. Domena WD-40 występuje również w podjednostkach β trimerycznych białek G. Lowe i Kreis [38] sugerują jej udział w wiązaniu białek opłaszczenia COP I z błoną. Ostatnie badania wskazują, że domeny WD-40 w podjednostce α -COP są niezbędne dla transportu białek z sekwencją dilizynową KKXX [16]. Rolę poszczególnych podjednostek zespołu opłaszczającego COP I podano w tabeli 1.

Istnieje znacząca homologia pomiędzy podjednostkami β -, δ - i ζ -COP a podjednostkami białek adaptorowych AP-1/AP-2, tworzącymi wraz z klatryną opłaszczenie pęcherzyków uczestniczących w transporcie zależnym od receptorów [12,

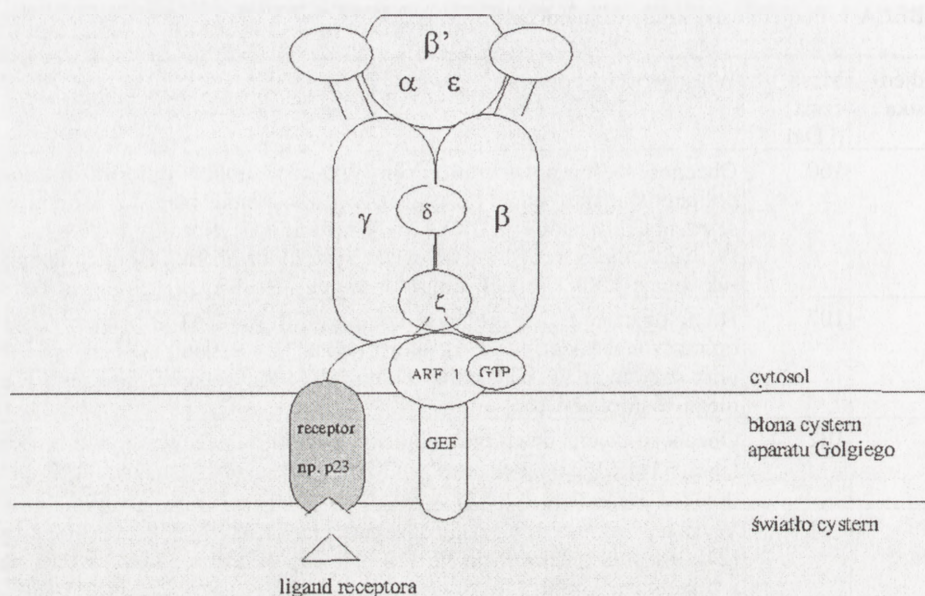
TABELA 1. Podjednostki kompleksu opłaszczającego COP I

Podjednostka	Masa cząst. [kDa]	Właściwości i rola
α	160	Obecność sześciu powtórzeń domeny WD-40 w strukturze pierwszorzędowej polipeptydu; niezbędna we wstecznym transporcie białek zależnym od sekwencji dylizynowej KKXX [16]. Wiąże się specyficznie z PtdIns(3,4,5)P ₃ [9]. Subkompleks α - β' - ϵ -COP wiąże się z błoną aparatu Golgiego poprzez sekwencję KKXX białek transbłonowych [18, 35, 36]
β	107	Homologiczna z β -adaptynami kompleksów AP-1/AP-2 pęcherzyków opłaszczonych klatryną [36]; bierze udział w wiązaniu ARF [16, 82, 83] oraz sekwencji FF białek transbłonowych błony aparatu Golgiego [18]; ulega fosforylacji [66]
β'	102	Obecność pięciu powtórzeń domeny WD-40; silne interakcje z białkiem Glo3p [16]. Subkompleks α - β' - ϵ -COP wiąże się z błoną aparatu Golgiego poprzez sekwencję KKXX białek transbłonowych [18, 35, 36]
γ	97	Wykazuje zdolność wiązania z sekwencją KKXX białek transbłonowych [24, 36] oraz z sekwencją FF [18, 24, 25]. Wiąże się także z ARF [83] i z białkiem Glo3p [16]
δ	57	Homologiczna z podjednostką μ kompleksów AP-1/AP-2 pęcherzyków opłaszczonych klatryną [12]; ulega fosforylacji [66]
ϵ	36	Wiąże się z ARF [16]. Subkompleks α - β' - ϵ -COP wiąże się z błoną aparatu Golgiego poprzez sekwencję KKXX białek transbłonowych [18, 35, 36]
ζ	20	Homologiczna z podjednostką σ kompleksów AP-1/AP-2 [12]. Uczestniczy w wiązaniu sekwencji FF białek transbłonowych [18]

17]. Homologia dotyczy nie tylko sekwencji aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym poszczególnych podjednostek, ale także organizacji molekularnej subkompleksu β - γ - δ - ζ -COP i niektórych interakcji między podjednostkami [16] (ryc. 2).

Spośród siedmiu podjednostek wchodzących w skład opłaszczania COP I, jedynie w podjednostkach β - i δ -COP fosforylacji ulega grupa hydroksylowa seryny [66]. Fosforylacja reguluje prawdopodobnie wiązanie kompleksu białek z błoną aparatu Golgiego.

Białka kompleksu opłaszczającego mogą (*in vivo*) być związane z błoną lub występować w postaci wolnej w cytosolu. W wysokich stężeniach soli lub w obecności bezwodnika kwasu dimetylomaleinowego następuje rozpad kompleksu opłaszczającego na mniejsze subkompleksy: trimer α - β' - ϵ -COP, dimery β - δ i γ - ζ [18, 36, 37, 53]. Na podstawie analizy rekombinowanych podjednostek stwierdzono silne interakcje pomiędzy podjednostkami α - i β' -COP, α - i ϵ -, β - i δ -COP oraz pomiędzy γ - i ζ -COP [16, 17]. Oddziaływania te odgrywają zasadniczą rolę w organizowaniu się opłaszczania na błonie aparatu Golgiego (ryc. 2). Kolejne etapy tego procesu



RYCINA 2. Struktura kompleksu opłaszczającego COP I i jego asocjacja z błoną aparatu Golgiego (zmodyfikowane wg [16,83])

to asocjacja kompleksu opłaszczającego COP I zachodząca w cytosolu, związanie czynnika ARF 1 z błoną aparatu Golgiego i rekrutacja kompleksu COP I na błonie [38, 63], co następnie inicjuje proces sferycznego wypuklenia błony i tworzenia pęcherzyka [38, 57].

Asocjacja podjednostek w funkcjonalny kompleks zachodzi *in vivo* potranslacyjnie, w ciągu 1–2 godzin. Czas półtrwania kompleksu wynosi 28 godzin [37]. Jedyną podjednostką występującą *in vivo* jako samodzielny monomer jest podjednostka ζ -COP. Nie stwierdzono także istnienia w komórce subkompleksów (dimerów i trimerów) [37, 53].

Dla asocjacji podjednostek kompleksu opłaszczającego COP I wymagana jest obecność małego białka z aktywnością GTP-azową, tzw. czynnika ADP-rybozylacji (ARF 1), o masie cząsteczkowej około 20 kDa, mirystylowanego na N-końcu [26, 38, 81]. Czynniki ARF może występować w dwóch formach: aktywnej, związanej z GTP i zdolnej do wiązania z błoną aparatu Golgiego oraz w formie nieaktywnej, cytosolowej, związanej z GDP. Brefeldyna A (BFA) uniemożliwia wymianę GDP na GTP, hamując tym samym asocjację podjednostek kompleksu opłaszczającego [37]. Natomiast GTP γ S stabilizuje czynniki ARF w formie związanej z GTP, czyli aktywnej.

Wiązanie kompleksu opłaszczającego z błoną aparatu Golgiego zachodzi dzięki interakcjom jego podjednostek z sekwencjami sygnałowymi: dilizynową KKXX

oraz difenylalaninową FF, obecnymi w cytosolowych domenach białek transbłonowych transportowanych przy udziale pęcherzyków COP I [8, 18, 36, 37, 67]. Zagadnienie to zostanie omówione w dalszej części artykułu.

UDZIAŁ CZYNNIKA ARF W WIĄZANIU KOMPLEKSU OPŁASZCZAJĄCEGO Z BŁONĄ APARATU GOLGIEGO

Utworzenie pęcherzyka opłaszczonego COP I, jak już wspomniano wcześniej, wymaga oprócz obecności białek kompleksu opłaszczonego również aktywnej (tj. związanej z GTP) formy czynnika ARF 1 [26, 37, 38, 60, 81]. Wymiana GDP na GTP jest katalizowana przez białkowy czynnik wymiany nukleotydów wrażliwy na brefeldynę A, tzw. GEF [10, 26].

W połowie lat dziewięćdziesiątych stwierdzono, że ARF 1 jest aktywatorem fosfolipazy D (PLD) błon aparatu Golgiego [32], która katalizuje rozpad fosfatydylocholiney do choliney i kwasu fosfatydowego, co prowadzi do zwiększenia płynności błony. Czynniki ARF 1 decyduje więc o wiązaniu się kompleksu opłaszczonego z błonami o określonym składzie lipidowym [32, 33]. Stwierdzono również, że ARF nie jest niezbędny dla zainicjowania tworzenia opłaszczenia COP I na błonach aparatu Golgiego z wysoką konstitutywną aktywnością PLD lub ze znaczną zawartością kwasu fosfatydowego [33].

Znaczenie aktywacji fosfolipazy D w interakcji COP I z błoną aparatu Golgiego nie zostało potwierdzone w doświadczeniach Stamnesa i współpracowników, według których brak jest wzrostu poziomu kwasu fosfatydowego na etapie tworzenia i odpączkowania opłaszczonych pęcherzyków COP I [70].

Zhao i współpracownicy [82] podtrzymują natomiast hipotezę o strukturalnej roli czynnika ARF w tworzeniu opłaszczonych pęcherzyków COP I. Komponenty kompleksu opłaszczonego oddziałują bezpośrednio z ARF 1 w trakcie tworzenia opłaszczenia błony aparatu Golgiego. Zdolność do wysokospecyficznego wiązania z ARF 1 wykazują podjednostki β -COP I [16, 82] oraz γ -COP I [83]. Prawdopodobnie efektywne wiązanie opłaszczenia COP I z błoną cystern aparatu Golgiego wymaga biwalentnej interakcji – podjednostki β i/lub γ z ARF 1 oraz trimery α - β '- ϵ i/lub γ -COP I z cytosolową domeną białek z sekwencją dilizynową KKXX, niezbędną dla powrotu tych białek do siateczki śródplazmatycznej [8, 83] (ryc. 2).

Pepperkok i współpracownicy [54] stwierdzili, że hydroliza GTP związanego z ARF 1 do GDP jest niezbędna dla właściwego sortowania transportowanych białek do pęcherzyka COP I, ARF przypuszczalnie pełni więc rolę w regulacji oddziaływania kompleksu opłaszczonego z transportowanymi białkami i w ich sortowaniu.

Aktywność GTP-azowa ARF 1 jest również niezbędna dla zrzućenia białkowego opłaszczenia pęcherzyka, co w konsekwencji umożliwia fuzję pęcherzyka z błoną przedziału docelowego. Zrzucanie opłaszczania poprzedza hydroliza GTP do GDP i odłączenie nieaktywnego ARF od błony pęcherzyka [38, 60, 74]. $GTP\gamma S$ (nie podlegający hydrolizie) stabilizuje ARF w formie aktywnej i przyczynia się do nagromadzenia opłaszczonych pęcherzyków w komórce, a w konsekwencji prowadzi do rozpadu struktury aparatu Golgiego [39]. Aktywność GTP-azową czynnika ARF stymulują białka GAP (*GTPase activating protein*), np. białko Glo3p odkryte w komórkach drożdży [14].

Specyficzność fuzji pozbawionego opłaszczania pęcherzyka zapewniają transbłonowe białka SNARE (v-SNARE w błonie pęcherzyka i t-SNARE w błonie docelowej). Białka te krążą cyklicznie pomiędzy przedziałami błonowymi w komórce [48, 57].

Zarówno aktywacja PLD przez czynnik ARF 1, jak i stymulacja aktywności GTP-azowej ARF wymagają obecności fosfatydyloinozytołofosforanu $PtdIns(4, 5)P_2$ [23, 33]. Sugeruje się także, że oddziaływanie pomiędzy α -COP a $PtdIns(3,4,5)P_3$ jest istotne dla regulowania rekrutacji opłaszczania COP I na odpowiedniej błonie [9]. Fosfatydyloinozytole odgrywają również rolę w transporcie pęcherzykowym zachodzącym z udziałem pęcherzyków opłaszczonych klatryną i białkami adaptorowymi AP [13].

W transporcie z udziałem opłaszczonych pęcherzyków niezbędne są także małe białka Rab z aktywnością GTP-azową. Znanych jest około trzydzieści różnych białek Rab. Są one zlokalizowane na cytosolowej powierzchni pęcherzyków transportujących i błon struktur subkomórkowych. Białka Rab współpracują z białkami v-SNARE i t-SNARE w tworzeniu kompleksu v/t-SNARE, niezbędnego dla zainicjowania procesów fuzji błon. W transporcie wstecznym przy udziale pęcherzyków COP I pomiędzy cysternami aparatu Golgiego oraz pomiędzy regionem cis aparatu Golgiego a przedziałem pośrednim zaangażowane jest m.in. białko Rab 6 [10]. Rola różnych białek Rab w procesach transportu opisana została w pracy Martinez i Goud [40].

PEŁCZERZYKI OPŁASZCZONE COP II

Transport postępowy białek i lipidów transbłonowych z miejsca syntezy w siateczce śródplazmatycznej do aparatu Golgiego inicjuje proces oddzielenia się z wyspecjalizowanych regionów ER pęcherzyków opłaszczonych kompleksem białek cytosolowych COP II, dążących w kierunku cystern regionu cis aparatu Golgiego [5, 6, 28, 60, 63] (ryc. 1).

Badania nad komponentami opłaszczenia COP II prowadzono początkowo głównie na komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Wszystkie białka pierwotnie zidentyfikowane u drożdży mają odpowiadające im homologi w komórkach ssaków [cyt. za 73].

Pęcherzyki opłaszczone COP II tworzą się w wyniku asocjacji określonego zestawu białek na cytosolowej powierzchni błony ER. W komórkach *Saccharomyces cerevisiae* zidentyfikowano początkowo pięć białek niezbędnych dla utworzenia opłaszczenia: kompleks Sec31p-Sec13p, kompleks Sec23p-Sec24p oraz małe monomeryczne białko G-Sar1p [6, 28, 60] (ryc. 3).

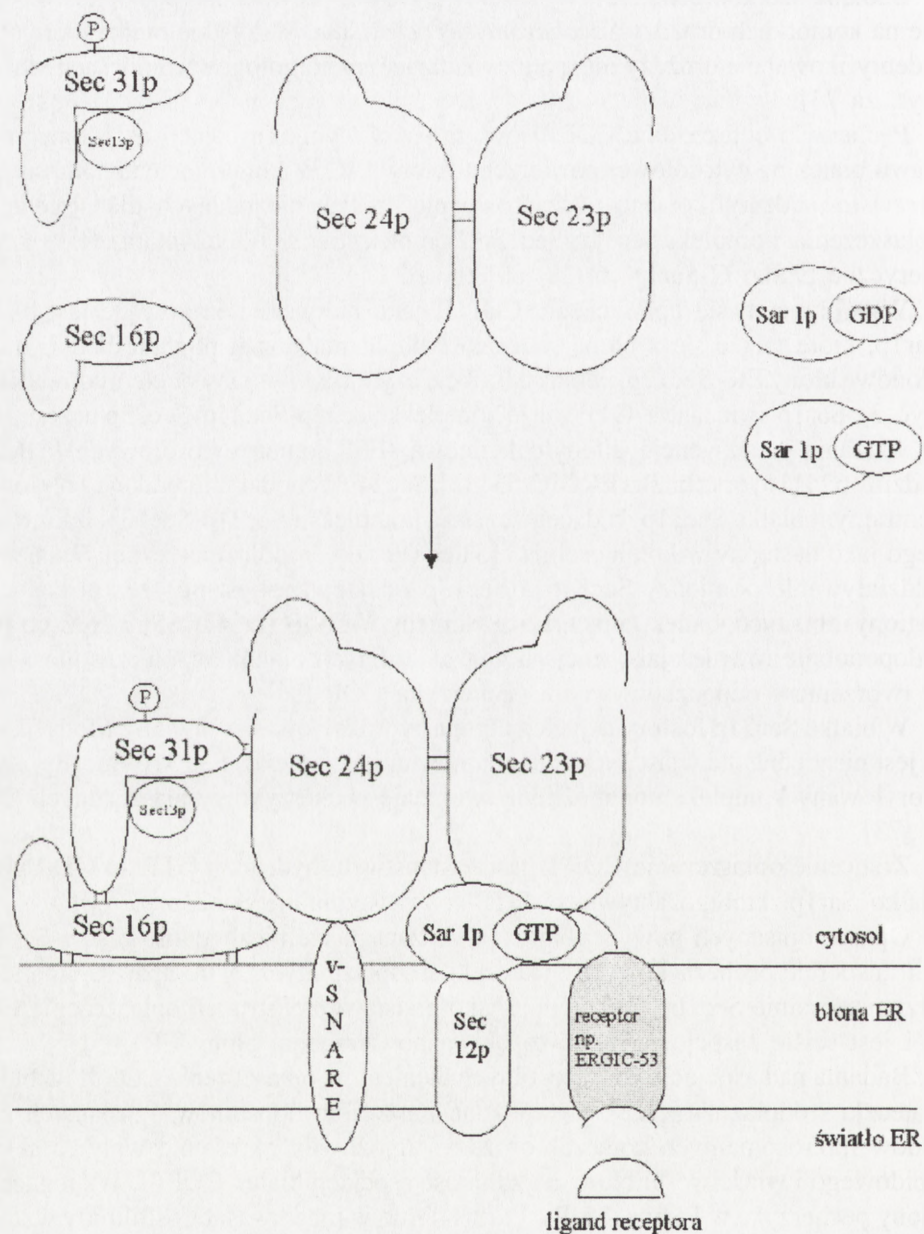
W tworzącym się opłaszczeniu COP II jako pierwsze rekrutowane jest białko Sar1p, które wiąże się z błoną siateczki śródplazmatycznej poprzez białko transbłonowe błony ER- Sec12p, pełniące funkcję czynnika wymiany nukleotydów (GEF) (ryc. 3). Sar1p związane z GTP wiąże kompleks Sec23p-Sec24p. Sec23p uczestniczy w wiązaniu z sekwencją difenylalaninową (FF) domen cytosolowych białek z rodziny p24 [15] oraz białka ERGIC-53 [31]. Sec24p wchodzi w interakcje z regionem centralnym białka Sec31p, będącego częścią kompleksu Sec31p-Sec13p, rekrutowanego jako następny w kolejności na błonie siateczki śródplazmatycznej. Wzajemne oddziaływanie pomiędzy Sec31p a Sec13p realizowane jest poprzez N-końcowe regiony obu tych białek, zawierające domeny WD-40 [6, 47, 65] i służące prawdopodobnie również jako miejsca wiązania innych białek współuczestniczących w tworzeniu i odpączkowywaniu pęcherzyka COP II.

W białku Sec31p fosforylacji ulega grupa hydroksylowa seryny [58]. Modyfikacja ta jest niezbędna dla właściwego funkcjonowania kompleksu Sec 31p-Sec13p, defosforylowany kompleks uniemożliwia tworzenie pęcherzyków opłaszczonych COP II [73].

Zrzucenie opłaszczenia COP II jest następstwem hydrolizy GTP do GDP przez białko Sar1p, którego aktywność GTP-azową stymuluje Sec23p [6, 60].

Oprócz opisanych powyżej białek, wykazano także niezbędność białka Sec16p w transporcie pęcherzykowym z siateczki śródplazmatycznej do aparatu Golgiego. Przypuszczalnie Sec16p funkcjonuje jako podstawa konstrukcji opłaszczenia COP II i jest ściśle zasocjowane z cytosolową powierzchnią błony ER [65].

Badania nad asocjacją poszczególnych elementów opłaszczenia COP II na błonie siateczki śródplazmatycznej, prowadzone z użyciem liposomów uzyskanych z lipidów mikrosomalnych komórek drożdży, umożliwiły określenie wpływu składu lipidowego i właściwości błony na zdolność asocjacji białek COP II. Wzbogacenie błony pęcherzyka w PtdIns(4,5)P₂, PtdIns4P lub w inne kwaśne fosfolipidy wzmacniało intensywność oddziaływania opłaszczenia COP II z błoną. Ponadto stwierdzono, że asocjacja COP II na błonie liposomu powoduje zateżnienie niektórych białek v-SNARE w obrębie pęcherzyka, na skutek oddziaływania białek v-SNARE z białkami COP II [41, 68].



RYCINA 3. Asocjacja elementów opłaszczenia COP II z błoną siateczki śródplazmatycznej (zmodyfikowane wg [55, 65, 68])

W świetle błon siateczki śródplazmatycznej, w pobliżu miejsc tworzenia opłaszczonych pęcherzyków, zachodzi selektywne sortowanie białek i lipidów przeznaczonych do transportu i pakowanie ich w pęcherzyki COP II. Przykładem selektywności jest fakt, iż białka specyficzne dla ER, np. białko BiP, nie występują w pęcherzykach COP II [4]. Selekcję i zagęszczanie makrocząsteczek umożliwiają między innymi ich oddziaływania z białkami opłaszczenia [2, 3] oraz z białkami krążącymi cyklicznie pomiędzy siateczką śródplazmatyczną i aparatem Golgiego, wykazującymi właściwości receptorowe [7, 62].

Powrót białek i lipidów ulegających w aparacie Golgiego modyfikacjom, lecz niezbędnych dla odbudowy błon siateczki śródplazmatycznej lub makromolekuł omyłkowo przekazanych do aparatu Golgiego, zapewniają pęcherzyki COP I-r poruszające się w kierunku wstecznym [50, 60]. Pomiedzy ER a cysternami regionu cis aparatu Golgiego istnieje złożona struktura odpowiedzialna za koordynację transportu postępowego i wstecznego, właściwe sortowanie transportowanych białek i lipidów oraz powstawanie odpowiednich pęcherzyków opłaszczonych – jest to tzw. przedział pośredni (IC, ERGIC lub VTCs) [4, 5, 38, 71].

PRZEDZIAŁ POŚREDNI

Przedział pośredni (IC) utworzony jest przez morfologicznie zróżnicowane pęcherzyki i elementy tubularne łączące się między sobą, zlokalizowane w pobliżu miejsc odpączkowania pęcherzyków COP II z siateczki śródplazmatycznej [5, 28] (ryc. 1).

W temperaturze 15°C w komórkach dochodzi do akumulacji błon IC. Błony tego przedziału ulegają przemieszczeniu do centralnych regionów aparatu Golgiego po przeniesieniu do temperatury 37°C [cyt. za 5].

IC stanowi unikalny przedział różniący się zarówno strukturalnie, jak i biochemicznie od siateczki śródplazmatycznej i aparatu Golgiego. Powstaje w komórce *de novo* ze zlewania się pęcherzyków COP II pączkujących z błony ER i fuzji pęcherzyków ze stałym rdzeniem tubularnym [4, 20]. Jedną z cech biochemicznych tego przedziału jest obecność lektynopodobnych białek rozpoznających wysokomannozowe oligosacharydy, co sugeruje, iż zachodzi tu również sortowanie N-glikozylowanych białek [5].

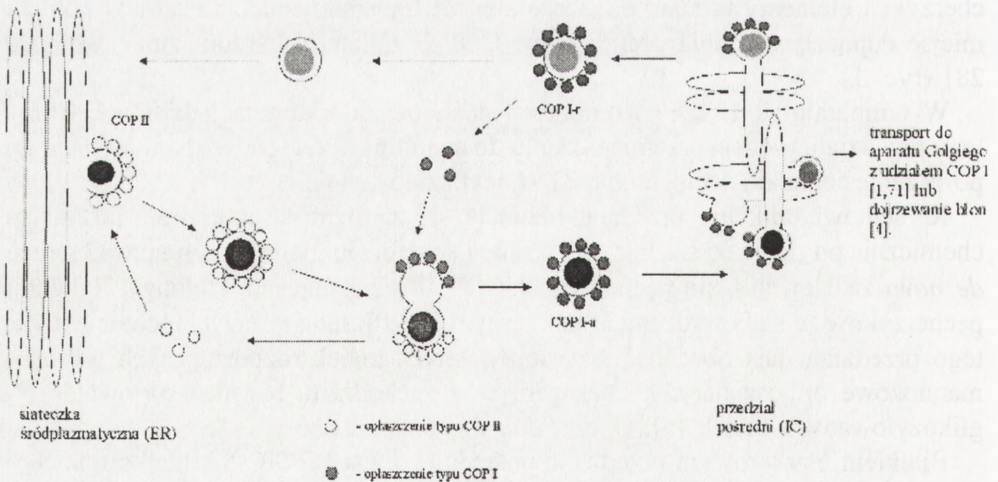
Białkiem markerowym przedziału pośredniego jest ERGIC-53, białko transbłonowe, gromadzone w pęcherzykach COP II podczas eksportu z ER i krążące cyklicznie pomiędzy ER i IC [31, 78]. Przeciwciała przeciwko cytosolowej domenie ERGIC-53 wywołują zablokowanie transportu z ER do aparatu Golgiego [75].

Przedział pośredni jest strukturą dynamiczną, podlegającą ciągłym zmianom składu w wyniku fuzji z pęcherzykami COP II i wymianie opłaszczenia COP II na

COP I, co ukierunkowuje transport białek i lipidów w stronę cystern cis aparatu Golgiego lub wstecznie do siateczki śródplazmatycznej [1, 28, 59, 71] (ryc. 4). Dla wymiany opłaszczenia COP II na COP I i jednoczesnej segregacji transportu niezbędna jest obecność białka ERGIC-53, prawdopodobnie wspólnie z białkami z rodziny p24 [78].

Transport z przedziału pośredniego do aparatu Golgiego odbywa się przy udziale pęcherzykowo-tubularnych struktur opłaszczonych białkami COP I [1, 4, 59, 71] lub też w drodze stopniowego, kierunkowego „dojrzwania” błon (ang. *directed maturation, cisternal maturation*) od IC poprzez cysterny cis i pośrednie do regionu trans aparatu Golgiego [5, 20].

Istotną rolę w transporcie z siateczki śródplazmatycznej do aparatu Golgiego odgrywa także system mikrotubul. Umożliwiają one migrację i interakcje pomiędzy różnymi elementami pęcherzykowymi i tubularnymi oraz cysternami aparatu Golgiego, niejednokrotnie znacznie od siebie oddalonymi [4, 5]. Potraktowanie komórek winblastyną lub kolchicyną (inhibitory podziałów mitotycznych), wywołującymi rozpad mikrotubul i rozproszenie cystern aparatu Golgiego w obrębie cytosolu, powoduje zaburzenia transportu wewnątrzkomórkowego, w tym również procesów zachodzących z udziałem struktur aparatu Golgiego [43, 76, 77].



RYCINA 4. Wymiana kompleksów białek opłaszczających (zmodyfikowane wg [5])

SEKWENCJE SYGNAŁOWE

Sortowanie i zateżanie białek w przedziałach błonowych oraz ich transport uwarunkowane są obecnością sekwencji sygnałowych w białkach rozpuszczalnych i transbłonowych, transportowanych następnie przy udziale pęcherzyków COP I i COP II [11, 51, 75] (tab. 2). Rolę sekwencji sygnałowych w wewnątrzkomórkowym transporcie pęcherzykowym po raz pierwszy wykazano dla pęcherzyków opłaszczonych klatryną i białkami adaptorowymi AP [42, 64, 79, przeglądowa praca w języku polskim: 56].

Najwcześniej zidentyfikowaną sekwencją sygnałową w transporcie pomiędzy siateczką śródplazmatyczną a aparatem Golgiego jest motyw H/KDEL (HDEL u drożdży, KDEL u ssaków) obecny w C-końcowym odcinku rozpuszczalnych białek rezydujących w świetle siateczki śródplazmatycznej. Sekwencja ta jest sygnałem niezbędnym dla zatrzymania białek w obrębie ER (tzw. sygnał retencji) lub ich powrotu do ER, np. z aparatu Golgiego, gdzie uległy obróbce potranslacyjnej. Przeniesienie sekwencji H/KDEL na C-końcową domenę lizozymu (białka sekrecyjnego) powoduje, że enzym ten odnajdywany jest w świetle ER [75].

Sortowanie białek zawierających motyw H/KDEL odbywa się przy udziale receptora sekwencji KDEL (KDEL-R, białko p23), związanego z błonami i krążącego cyklicznie pomiędzy siateczką śródplazmatyczną a aparatem Golgiego [72]. W komórkach ssaków KDEL-R jest białkiem o masie cząsteczkowej 26 kDa, o rozbudowanej domenie luminalnej wiążącej ligand, z siedmioma domenami transbłonowymi i krótkim cytosolowym odcinkiem C-końcowym, który zawiera dwa

TABELA 2. Sekwencje sygnałowe białek [dane według 18, 21, 30, 31, 46, 51, 67, 75]

Sekwencja	Rola	Przykłady białek
H/KDEL	sygnał powrotu białek rozpuszczalnych do siateczki śródplazmatycznej lub ich zatrzymywania w świetle ER	Sec 20, Sed 4
KKXX	sygnał odzyskiwania i powrotu białek transbłonowych do ER	ERGIC-53
XXRR	sygnał odzyskiwania i powrotu białek transbłonowych do ER	reduktaza HMG-koenzymu A, Emp24p, p24
FF	sygnał eksportu białek transbłonowych z ER	wszystkie białka rodziny p24, ERGIC-53
DXE	sygnał eksportu białek transbłonowych z ER	glikoproteina wirusa <i>vesicular stomatitis</i> (VSV-G)
LV	sygnał niezbędny dla eksportu niektórych białek z ER	Emp24p, gp25l, hp24d
VV	?	chop24a, yp24c, hp24a

rodzaje sekwencji sygnałowych: jedną opartą na dwóch resztach lizyny (KKXX) oraz drugą, difeniloalaninową (FF) [67]. Optymalne wiązanie białek do receptora zachodzi w kwaśnym pH, a ich uwalnianie jest regulowane zmianami pH [75].

Sekwencja dilizynowa KKXX, zlokalizowana w domenie cytosolowej C-końca białek transbłonowych, jest uniwersalnym sygnałem ich odzyskiwania i warunkuje powrót tych białek do ER z dowolnego etapu transportu wewnątrzkomórkowego [21, 30]. Motyw dilizynowy jest konserwatywny, wykazuje znaczną homologię w komórkach zarówno drożdży, jak i ssaków [21]. Sekwencję sygnałową opartą na dwóch resztach lizyny zidentyfikowano w łańcuchach polipeptydowych wielu białek [8, 75]. W przypadku nielicznych białek dla efektywnego transportu wstecznego do ER wymagana jest jedynie obecność dwóch reszt aminokwasów zasadowych, co dopuszcza możliwość zamiany lizyny na argininę. W przypadku białek, które zawierają w cytosolowej domenie N-terminalnej sekwencję opartą na argininie XXRR, podstawienie tych reszt lizyną nie jest możliwe bez upośledzenia funkcjonowania transportu wstecznego [18, 75].

Sekwencja difeniloalaninowa (FF) występuje w obrębie regionów cytosolowych białek transbłonowych wraz z motywem KKXX lub niezależnie od niego. Sygnał FF jest niezbędny dla eksportu białek z siateczki śródplazmatycznej [31], jest miejscem wiążącym podjednostki Sec 23p opłaszczenia COP II oraz podjednostki zespołu opłaszczającego COP I [15, 18, 31, 67]. Obecność obydwu sekwencji, difeniloalaninowej i dilizynowej, w domenie cytosolowej białek krążących pomiędzy siateczką śródplazmatyczną i aparatem Golgiego warunkuje dwukierunkowy ich transport [15, 18, 67].

Zarówno sekwencja FF, jak i KKXX uczestniczy w wiązaniu kompleksu opłaszczającego COP I z błoną aparatu Golgiego. Jednak dane dotyczące wiązania kompleksu lub jego podjednostek z tymi sekwencjami są niejednoznaczne. Badania Lowe i Kreisa [36] wykazały, że miejsce wiązania z sekwencją KKXX znajduje się w obrębie trimery α - β' - ϵ -COP I [18, 36], natomiast β -, γ - i ϵ -COP I odpowiedzialne są za interakcje z sekwencją FF [18, 67]. Zmienione genetycznie podjednostki α - i β' -COP I tracą zdolność wiązania KKXX [35], podczas gdy mutacje w genach kodujących podjednostki δ i ζ nie zmieniają zdolności kompleksu COP I do interakcji z sekwencją KKXX [12]. Najnowsze doniesienia wskazują, że miejsce wiązania sekwencji dilizynowej znajduje się w obrębie podjednostki α -COP I [16].

Odmienne wyniki uzyskali Harter i współpracownicy [24, 25], według których podjednostka γ -COP I jest jedyną podjednostką wchodzącą w interakcje z motywem KKXX oraz FF.

Badania nad wiązaniem białek opłaszczenia COP I z niektórymi antybiotykami aminoglikozydowymi wskazują na obecność w obrębie kompleksu opłaszczającego przynajmniej dwóch miejsc wiążących sekwencję dilizynową [29]. Być może jedno z tych miejsc stanowi podjednostka trimery α - β' - ϵ -COP I, a drugie – podjednostka γ , co częściowo wyjaśniałoby sprzeczne wyniki uzyskane przez różne grupy badaczy.

W ostatnich latach opisano kolejną sekwencję sygnałową, opartą na dwóch resztach aminokwasów kwaśnych: kwasu asparaginowego i glutaminowego **DXE**. Sekwencję tę zlokalizowano na cytosolowym C-końcu różnych białek transbłonowych [5, 51] i wykazano jej niezbędność dla efektywnego eksportu białek z siateczki śródplazmatycznej oraz ich gromadzenia w pęcherzykach opłaszczonych COP II.

Sugeruje się udział domeny DXE w procesach zateżania transportowanych białek. Niezależny od motywu DXE etap polegałby na selekcji makrocząsteczek do tworzących się pęcherzyków COP II, natomiast ich zateżanie byłoby uzależnione od obecności sekwencji DXE [51].

BIAŁKA CYKLICZNIE KRAŻĄCE POMIĘDZY SIATECZKĄ ŚRÓDPLAZMATYCZNĄ I APARATEM GOLGIEGO

W dwukierunkowym transporcie makromolekuł pomiędzy siateczką śródplazmatyczną i aparatem Golgiego współuczestniczą krążące cyklicznie białka. Z ich udziałem zachodzi również właściwe sortowanie białek i lipidów do odpowiednich pęcherzyków opłaszczonych COP I lub COP II [18, 22, 45, 49, 62, 67, 69] (ryc. 4). Białka uczestniczące w powyższych procesach są białkami transmembranowymi, z rozbudowaną domeną luminalną, krótkim odcinkiem transbłonowym oraz krótką, konserwatywną domeną cytosolową z sekwencją(ami) sygnałową(y)mi zdolną do interakcji z białkami kompleksów opłaszczających [15, 18, 31, 36, 67]. W tabeli 3 zebrano dane dotyczące lokalizacji i funkcji wybranych białek.

Najliczniejszą i najlepiej poznaną grupą białek cyklicznie krążących pomiędzy siateczką śródplazmatyczną i aparatem Golgiego jest rodzina białek p24 o m.c.z. 23–27 kDa.

Domeny cytosolowe białek rodziny p24 zawierają sekwencje sygnałowe: KKXX, XXRR (lub zbliżone) oraz sekwencję difenyloalaninową FF [15, 18, 49, 67]. Reszty fenyloalaniny są zazwyczaj poprzedzone dodatkową fenyloalaniną lub innym aminokwasem hydrofobowym. W tabeli 4 podano sekwencje C-końca dla wybranych przedstawicieli białek z rodziny p24 [dane wg 18]. Białka powracające do ER zawierają tylko sekwencję KKXX (lub zbliżoną), natomiast białka krążące zawierają dodatkowo zawsze sekwencję FF. Obecność reszt kwasu glutaminowego i glutaminy w domenie transbłonowej białek z rodziny p24 moduluje funkcjonowanie sekwencji sygnałowej FF domeny cytosolowej i może odgrywać rolę w ich oligomeryzacji [19].

TABELA 3. Białka krążące cyklicznie pomiędzy siateczką śródplazmatyczną i aparatem Golgiego (przykłady)

Białko	Występowanie	Główna lokalizacja	Transport	Sekwencja w domenie cytosolowej		Rodzaj wiązającego optyczczenia	Właściwości i funkcja
				KKXX	zbliżona do KXXX		
p23	ssaki	błony system cis aparatu Golgiego	ER ↔ ap. Golgiego	-	+	COP I	receptor białek z sekwencją KDEI; udział we właściwej organizacji i funkcjonowaniu aparatu Golgiego [18, 49, 55, 67, 72]
Erd2p	drożdże	siateczka śródplazmatyczna	ER ↔ ap. Golgiego	+	-	COP I	homologiczne z p23 [72]
p24	ssaki	błony system cis aparatu Golgiego	IC ↔ ap. Golgiego	-	+	COP I	tworzy heterodimer z p23, niezbędny dla właściwego transportu [18, 22]
Emp24p	drożdże	siateczka śródplazmatyczna	ER ↔ ap. Golgiego	-	+	COP II	eksport z ER warunkuje motyw LV w domenie cytosolowej; tworzy heterodimer z Erv25p; homologiczne z p24 [7, 18, 46, 62]
ERGIC-53 (p53/p58)	ssaki: p53 – człowiek p58 – szczur	przedział pośredni (IC)	ER ↔ ap. Golgiego	+	-	COP II	glikoproteina z wysokim powinowactwem do resektantowych; receptor sekretorycznych glikoprotein; wymagany przy wymianie oplaszczenia COPII na COPI [31, 44, 78]

Opisano liczne białka z rodziny p24 z błon siateczki śródplazmatycznej i aparatu Golgiego komórek ssaków (p23, p24) oraz z błon drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (Emp24p, Erv25p, Erp1p-Erp6p) wykazujące wysoki stopień homologii [7, 18, 45, 49, 55, 62].

Białka krążące pomiędzy ER i aparatem Golgiego pełnią dwojaką rolę w transporcie wewnątrzkomórkowym:

- wiążą się z białkami opłaszczenia COP I oraz COP II i umożliwiają utworzenie prawidłowych, funkcjonalnych pęcherzyków opłaszczonych [15, 49, 67, 69];
- uczestniczą w sortowaniu oraz właściwym kierowaniu ligandów transportowanych pomiędzy ER a aparatem Golgiego (funkcja receptorowa). Kluczową rolę w wiązaniu ligandów pełnią rozbudowane i zróżnicowane domeny luminalne tych białek [18, 45, 49, 62].

Do rodziny białek p24 należy między innymi białko p23 (homolog drożdżowego Erd2p), identyczne w komórkach ssaków z receptorem (KDEL-R) białek rozpuszczalnych z sekwencją H/KDEL [72]. Białko to lokalizuje się głównie w błonie cystern regionu cis aparatu Golgiego i krąży pomiędzy ER i aparatem Golgiego [49, 67]. Wykazano wiązanie białka p23 z kompleksem opłaszczającym COP I za pośrednictwem domeny cytosolowej receptora. Domena ta posiada sekwencję sygnałową zbliżoną do KKXX oraz sekwencję difenyloalaninową FF. Wiązanie z białkami opłaszczenia odbywa się za pośrednictwem motywu FF [18, 49, 67], chociaż w większości transportowane białka asocjują z opłaszczeniem COP I raczej poprzez sekwencję KKXX [24, 36]. Białko p23 przyczynia się ponadto do zmian morfologii błon cystern regionu cis aparatu Golgiego i jest niezbędne dla właściwej organizacji i funkcjonowania aparatu Golgiego [55].

Białko p24 zostało zidentyfikowane głównie jako komponent pęcherzyków COP I [18]. Białko to tworzy kompleks wraz z p23 i w tej postaci krąży pomiędzy IC i aparatem Golgiego [22]. W domenie cytosolowej białka p24 stwierdzono obecność motywu sygnałowego XXRR oraz FF. Ta ostatnia sekwencja umożliwia interakcje domeny cytosolowej białka z kompleksem opłaszczającym COP I [18].

Kolejnym przedstawicielem rodziny p24 jest białko Emp24p, odkryte w komórkach drożdży, homologiczne z białkiem p24 ssaków. Jest ono kompo-

TABELA 4. Sekwencje domen cytosolowych wybranych białek z rodziny p24 [dane wg 18]

Białko	Sekwencja
hp24c	...QVFYLR RRFF KAKK LIE
yp24g	...QVNYLKNY F KT KHII
ap24b	...QFWHLK TF FQ KKLI
gp25l	...QMKSLK NF IA KKLV
hp24d	...QMRHLK SFF EAK LV
yp24c	...QLRYLKN F V KQLV
yp24d	...QMKHLG KF V KQIL
chop24a	...QIYYLKR FF EVR VV
hp24a	...QIFYLXR FF EVR VV
Emp24p	...QIYYLR RR FE VTSLV
ap24a	...QVYLLR RF E KLGMSRV
hp24b	...QVLLIK SFF E KRPISRAVES
yp24b	...QVLLIQ FL T GRQKNYV
yp24c	...QALIIQ FF T SROKKNYV
yp24f	...QIAILE FF RES RKHNV

nentem pęcherzyków opłaszczonych COP II. Mutacje w genie kodującym Emp24p prowadzą w komórkach drożdży do zaburzeń w transporcie określonych białek sekrecyjnych z siateczki śródplazmatycznej do aparatu Golgiego [62]. Domena cytosolowa Emp24p zawiera sekwencje sygnałowe XXRR oraz FF, nie stwierdzono natomiast obecności motywu KKXX [18]. Analiza mutacji w regionie cytosolowym doprowadziła do stwierdzenia, że obecność reszt leucyny i waliny (LV) jest niezbędna dla eksportu białka z ER. Z kolei reszty fenyloalaniny (FF) nie wpływają bezpośrednio na transport, ale osłabiają efekt sygnału LV [46]. Być może sekwencja LV jest nowym sygnałem dla efektywnego transportu z siateczki śródplazmatycznej do aparatu Golgiego.

Emp 24p występuje w komórkach drożdży w postaci heterodimeru z białkiem Erv25p. Brak funkcjonalnego kompleksu Emp24p-Erv25p powoduje zaburzenia w transporcie białek sekrecyjnych [7]. Stwierdzono także interakcję kompleksu Emp24p-Erv25p z transportowanymi w pęcherzykach COP II białkami, co sugeruje funkcję receptorową kompleksu i jego udział w sortowaniu i zatężaniu transportowanego materiału [45].

Innym białkiem krążącym cyklicznie pomiędzy ER i aparatem Golgiego, choć nie należącym do rodziny p24, jest białko ERGIC-53 (p53/p58) wyizolowane z komórek ssaków. Białko jest transbłonową lektyną o wysokim powinowactwie do reszt mannozowych, lokalizuje się w obrębie przedziału pośredniego [78]. Domena cytosolowa ERGIC-53 zawiera dwie sekwencje sygnałowe: KKXX i FF, których współistnienie pozwala na cykliczne krążenie ERGIC-53 pomiędzy przedziałami [31]. Prawdopodobnie białko to pełni rolę receptora sekrecyjnych glikoprotein transportowanych z ER do aparatu Golgiego z udziałem pęcherzyków opłaszczonych COP II [31, 44]. Niektóre glikoproteiny nie wymagają jednak funkcjonalnej formy ERGIC-53 dla wydajnej sekrecji [80].

PODSUMOWANIE

W artykule przedstawione zostały wybrane zagadnienia związane z transportem makromolekuł syntetyzowanych w siateczce śródplazmatycznej. Omówiono proces zagęszczania ich i wydzielania z określonych przedziałów ER w postaci pęcherzyków opłaszczonych białkami COP II.

W tubularno-pęcherzykowym przedziale pośrednim IC, zlokalizowanym pomiędzy błonami ER a regionem cis aparatu Golgiego, zachodzi dalsza segregacja i dojrzewanie białek oraz zmiana typu opłaszczenia COP II na COP I-a lub COP I-r, co zapewnia przeniesienie zawartości pęcherzyków z opłaszczeniem COP I-a (z udziałem systemu mikrotubul oraz białek uczestniczących w transporcie i pro-

cesach fuzji – zagadnienia nie omawiane) do cystern cis, pośrednich i trans aparatu Golgiego oraz powrót zawartości pęcherzyków typu COP I-r do ER.

W artykule omówiono w zarysie dynamikę formowania się kompleksów opłaszczających COP I i COP II oraz właściwości białek cyklicznie krążących pomiędzy ER, IC i aparatem Golgiego.

LITERATURA

- [1] ARIDOR M, BANNYKH SI, ROWE T, BALCH WE. Sequential coupling between COPII and COPI vesicle coats in endoplasmic reticulum to Golgi transport. *J Cell Biol* 1995; **131**: 875–893.
- [2] ARIDOR M, WEISSMAN J, BANNYKH S, NUOFFER C, BALCH WE. Cargo selection by the COPII budding machinery during export from the ER. *J Cell Biol* 1998; **141**: 61–70.
- [3] ARIDOR M, BANNYKH SI, ROWE T, BALCH WE. Cargo can modulate COPII vesicle formation from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1999; **274**: 4389–4399.
- [4] BANNYKH SI, BALCH WE. Membrane dynamics at the endoplasmic reticulum – Golgi interface. *J Cell Biol* 1997; **138**: 1–4.
- [5] BANNYKH SI, NISHIMURA N, BALCH WE. Getting into Golgi. *Trends in Cell Biol* 1998; **8**: 21–25.
- [6] BARLOWE C. COPII and selective export from the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1404**: 67–76.
- [7] BELDEN WJ, BARLOWE C. Erv25p, a component of COPII-coated vesicles, forms a complex with Emp24p that is required for efficient endoplasmic reticulum to Golgi transport. *J Biol Chem* 1996; **271**: 26939–26946.
- [8] BREMSER M, NICKEL W, SCHWEIKERT M, RAVAZZOLA M, AMHERDT M, HUGHES CA, SOLLNER TH, ROTHMAN JE, WIELAND FT. Coupling of coat assembly and vesicle budding to packaging of putative cargo receptors. *Cell* 1999; **96**: 495–506.
- [9] CHAUDHARY A, GU QM, THUM O, PROFIT AA, QI Y, JEYAKUMAR L, FLEISCHER S, PRESTWICH GD. Specific interaction of Golgi coatomer protein α -COP with phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate. *J Biol Chem* 1998; **273**: 8344–8350.
- [10] CHAVRIER P, GOUD B. The role of ARF and rab GTPases in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol* 1999; **11**: 466–475.
- [11] COLE NB, ELLENBERG J, SONG J, DiEULIIS D, LIPPINCOTT-SCHWARTZ J. Retrograde transport of Golgi-localized proteins to the ER. *J Cell Biol* 1998; **140**: 1–15.
- [12] COSSON P, DEMOLLIERE C, HENNECKE S, DUDEN R, LETOURNEUR F. Delta- and zeta-COP, two coatomer subunits homologous to clathrin-associated proteins, are involved in ER retrieval. *EMBO J* 1996; **15**: 1792–1798.
- [13] DeCAMILLI P, EMR SD, McPHERSON PS, NOVICK P. Phosphoinositides as regulators in membrane traffic. *Science* 1996; **271**: 1533–1539.
- [14] DOGIC D, de CHASSEY B, PICK E, CASSEL D, LEFKIR Y, HENNECKE S, COSSON P, LETOURNEUR F. The ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein Glo3p is involved in ER retrieval. *Eur J Cell Biol* 1999; **78**: 305–310.
- [15] DOMINGUEZ M, DEJGAARD K, FULLEKRUG J, DAHAN S, FAZEL A, PACCAUD JP, THOMAS DY, BERGERON JJM, NILSSON T. gp25L/emp24/p24 protein family members of the cis-Golgi network bind both COPI and II coatomer. *J Cell Biol* 1998; **140**: 751–765.
- [16] EUGSTER A, FRIGERIO G, DALE M, DUDEN R. COPI domains required for coatomer integrity, and novel interactions with ARF and ARF-GAP. *EMBO J* 2000; **19**: 3905–3917.

- [17] FAULSTICH D, AUERBACH S, ORCIL, RAVAZZOLA M, WEGEHINGEL S, LOTTSPREICH F, STENBECK G, HARTER C, WIELAND FT, TSCHOCHNER H. Architecture of coatomer: molecular characterization of δ -COP and protein interactions within the complex. *J Cell Biol* 1996; **135**: 53–61.
- [18] FIEDLER K, VEIT M, STAMNES MA, ROTHMAN JE. Bimodal interaction of coatomer with the p24 family of putative cargo receptors. *Science* 1996; **273**: 1396–1399.
- [19] FIEDLER K, ROTHMAN JE. Sorting determinants in the transmembrane domain of p24 proteins. *J Biol Chem* 1997; **272**: 24739–24742.
- [20] FULLEKRUG J, NILSSON T. Protein sorting in the Golgi complex. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1404**: 77–84.
- [21] GAYNOR EC, HEESSEN S, GRAHAM TR, AEBI M, EMR SD. Signal-mediated retrieval of a membrane protein from the Golgi to the ER in yeast. *J Cell Biol* 1994; **127**: 653–665.
- [22] GOMMEL D, ORCI L, EMIG EM, HANNAH MJ, RAVAZZOLA M, NICKEL W, HELMS JB, WIELAND FT, SOHN K. p24 and p23, the major transmembrane proteins of COPI-coated transport vesicles, form hetero-oligomeric complexes and cycle between the organelles of the early secretory pathway. *FEBS Lett* 1999; **447**: 179–185.
- [23] HAMMOND SM, JENCO JM, NAKASHIMA S, CADWALLADER K, GU QM, COOK S, NOZAWA Y, PRESTWICH GD, FROHMAN MA, MORRIS AJ. Characterization of two alternately spliced forms of phospholipase D1. *J Biol Chem* 1997; **272**: 3860–3868.
- [24] HARTER C, PAVEL J, COCCIA F, DRAGEN E, WEGEHINGEL S, TSCHOCHNER H, WIELAND FT. Nonclathrin coat protein γ , a subunit of coatomer, binds to the cytoplasmic dilysine motif of membrane proteins of the early secretory pathway. *PNAS* 1996; **93**: 1902–1906.
- [25] HARTER C, WIELAND FT. A single binding site for dilysine retrieval motifs and p23 within the γ subunit of coatomer. *PNAS* 1998; **95**: 11649–11654.
- [26] HELMS JB, PALMER DJ, ROTHMAN JE. Two distinct populations of ARF bound to the Golgi membranes. *J Cell Biol* 1993; **121**: 751–760.
- [27] HIRST J, ROBINSON MS. Clathrin and adaptors. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1404**: 173–193.
- [28] HONG W. Protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *J Cell Sci* 1998; **111**: 2831–2839.
- [29] HUDSON RT, DRAPER RK. Interaction of coatomer with aminoglycoside antibiotics: evidence that coatomer has at least two dilysine binding sites. *Mol Biol Cell* 1997; **8**: 1901–1910.
- [30] JACKSON MR, NILSSON T, PETERSON PA. Retrieval of transmembrane proteins to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 1993; **121**: 317–333.
- [31] KAPPELER F, KLOPFENSTEIN DRC, FOGUET M, PACCAUD JP, HAURI HP. The recycling of ERGIC-53 in the early secretory pathway. *J Biol Chem* 1997; **272**: 31801–31808.
- [32] KTISTAKIS NT, BROWN HA, STERNWEIS PC, ROTH MG. Phospholipase D is present on Golgi-enriched membranes and its activation by ADP ribosylation factor is sensitive to brefeldin A. *PNAS* 1995; **92**: 4952–4956.
- [33] KTISTAKIS NT, BROWN HA, WATERS MG, STERNWEIS PC, ROTH MG. Evidence that phospholipase D mediates ADP ribosylation factor-dependent formation of Golgi coated vesicles. *J Cell Biol* 1996; **134**: 295–306.
- [34] LeBORGNE R, HOFACK B. Protein transport from the secretory to the endocytic pathway in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1404**: 195–209.
- [35] LETOURNEUR F, GAYNOR EC, HENNECKE S, DEMOLLIERE C, DUDEN R, EMR SD, RIEZMAN H, COSSON P. Coatomer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* 1994; **79**: 1199–1207.
- [36] LOWE M, KREIS TE. *In vitro* assembly and disassembly of coatomer. *J Biol Chem* 1995; **270**: 31364–31371.
- [37] LOWE M, KREIS TE. *In vivo* assembly of coatomer, the COPI coat precursor. *J Biol Chem* 1996; **271**: 30725–30730.

- [38] LOWE M, KREIS TE. Regulation of membrane traffic in animal cells by COPI. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1404**: 53–66.
- [39] MALHOTRA V, SERAFINI T, ORCI L, SHEPHERD JC, ROTHMAN JE. Purification of a novel class of coated vesicles mediating biosynthetic protein transport through the Golgi stack. *Cell* 1989; **58**: 329–336.
- [40] MARTINEZ O, GOUD B. Rab proteins. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1404**: 101–112.
- [41] MATSUOKA K, SCHEKMAN R. The use of liposomes to study COPII- and COPI-coated vesicle formation and membrane protein sorting. *Methods* 2000; **20**: 417–428.
- [42] MELLMAN I. Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996; **12**: 575–625.
- [43] MOSKALEWSKI S, THYBERG J, LOHMANDER S, FRIBERG U. Influence of colchicine and vinblastine on the Golgi complex and matrix deposition in chondrocyte aggregates. *Exp Cell Res* 1975; **95**: 440–454.
- [44] MOUSSALLI M, PIPE SW, HAURI HP, NICHOLS WC, GINSBURG D, KAUFMAN RJ. Mannose-dependent endoplasmic reticulum (ER)-Golgi intermediate compartment-53-mediated ER to Golgi trafficking of coagulation factors V and VIII. *J Biol Chem* 1999; **274**: 32539–32542.
- [45] MUNIZ M, NUOFFER C, HAURI HP, RIEZMAN H. The Emp24 complex recruits a specific cargo molecule into endoplasmic reticulum-derived vesicles. *J Cell Biol* 2000; **148**: 925–930.
- [46] NAKAMURA N, YAMAZAKI S, SATO K, NAKAMO A, SAKAGUCHI M, MIHARA K. Identification of potential regulatory elements for the transport of Emp24p. *Mol Biol Cell* 1998; **9**: 3493–3503.
- [47] NEER EJ, SCHMIDT CJ, NAMBUDRIPAD R, SMITH TF. The ancient regulatory protein family of WD-repeat proteins. *Nature* 1994; **371**: 297–300.
- [48] NICHOLS BJ, PELHAM HRB. SNAREs and membrane fusion in the Golgi apparatus. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1404**: 9–31.
- [49] NICKEL W, SOHN K, BUNNING C, WIELAND FT. p23, a major COPI-vesicle membrane protein, constitutively cycles through the early secretory pathway. *PNAS* 1997; **94**: 11393–11398.
- [50] NICKEL W, WIELAND FT. Biogenesis of COPI-coated transport vesicles. *FEBS Lett* 1997; **413**: 395–400.
- [51] NISHIMURA N, BANNYKH S, SLABOUGH S, MATTESON J, ALTSCHULER Y, HAHN K, BALCH WE. A di-acidic (DXE) code directs concentration of cargo during export from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1999; **274**: 15937–15946.
- [52] ORCI L, STAMNES M, RAVAZZOLA M, AMHERDT M, PERRELET A, SOLLNER T, ROTHMAN JE. Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles. *Cell* 1997; **90**: 335–349.
- [53] PAVEL J, HARTER C, WIELAND FT. Reversible dissociation of coatamer: functional characterization of a β/δ -coat protein subcomplex. *PNAS* 1998; **95**: 2140–2145.
- [54] PEPPERKOK R, WHITNEY JA, GOMEZ M, KREIS TE. COPI vesicles accumulating in the presence of a GTP restricted Arf1 mutant are depleted of anterograde and retrograde cargo. *J Cell Sci* 2000; **113**: 135–144.
- [55] ROJO M, EMERY G, MARJOMAKI V, McDOWALL AW, PARTON RG, GRUENBERG J. The transmembrane protein p23 contributes to the organization of the Golgi apparatus. *J Cell Sci* 2000; **113**: 1043–1057.
- [56] ROSZEK K, GNIOT-SZULŻYCKA J. Wielorakie formy pęcherzyków opłaszczonych klatryną w zależnym od receptorów transporcie i segregacji makromolekuł. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 295–314.
- [57] ROTHMAN JE. Mechanism of intracellular protein transport. *Nature* 1994; **372**: 55–63.
- [58] SALAMA NR, CHUANG JS, SCHEKMAN RW. Sec31 encodes an essential component of the COPII coat required for transport vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 1997; **8**: 205–217.

- [59] SCHEEL J, PEPPERKOK R, LOWE M, GRIFFITHS G, KREIS TE. Dissociation of coatomer from membranes is required for brefeldin A-induced transfer of Golgi enzymes to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 1997; **137**: 319–333.
- [60] SCHEKMAN R, ORCI L. Coat proteins and vesicle budding. *Science* 1996; **271**: 1526–1533.
- [61] SCHEKMAN R, MELLMAN I. Does COPI go both ways? *Cell* 1997; **90**: 197–200.
- [62] SCHIMMOLLER F, SINGER-KRUGER B, SCHRODER S, KRUGER U, BARLOWE C, RIEZMAN H. The absence of Emp24p, a component of ER-derived COPII-coated vesicles, causes a defect in transport of selected proteins to the Golgi. *EMBO J* 1995; **14**: 1329–1339.
- [63] SCHMID SL, DAMKE H. Coated vesicles: a diversity of form and function. *FASEB J* 1995; **9**: 1445–1453.
- [64] SCHMID SL. Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu Rev Biochem* 1997; **66**: 511–548.
- [65] SHAYWITZ DA, ESPENSHADE PJ, GIMENO RE, KAISER CA. COPII subunit interactions in the assembly of the vesicle coat. *J Biol Chem* 1997; **272**: 25413–25416.
- [66] SHEFF D, LOWE M, KREIS TE, MELLMAN I. Biochemical heterogeneity and phosphorylation of coatomer subunits. *J Biol Chem* 1996; **271**: 7230–7236.
- [67] SOHN K, ORCI L, RAVAZZOLA M, AMHERDT M, BREMSER M, LOTTSPEICH F, FIEDLER K, HELMS JB, WIELAND FT. A major transmembrane protein of Golgi-derived COPI-coated vesicles involved in coatomer binding. *J Cell Biol* 1996; **135**: 1239–1248.
- [68] SPRINGER S, SCHEKMAN R. Nucleation of COPII vesicular coat complex by endoplasmic reticulum to Golgi vesicle SNAREs. *Science* 1998; **281**: 698–700.
- [69] SPRINGER S, CHEN E, DUDEN R, MARZIOCH M, ROWLEY A, HAMAMOTO S, MERCHANT S, SCHEKMAN R. The p24 proteins are not essential for vesicular transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS* 2000; **97**: 4034–4039.
- [70] STAMNES M, SCHIAVO G, STENBECK G, SOLLNER T, ROTHMAN JE. ADP-ribosylation factor and phosphatidic acid levels in Golgi membranes during budding of coatomer-coated vesicles. *PNAS* 1998; **95**: 13676–13680.
- [71] STEPHENS DJ, LIN-MARQ N, PAGANO A, PEPPERKOK R, PACCAUD JP. COPI-coated ER-to-Golgi transport complexes segregate from COPII in close proximity to ER exit sites. *J Cell Sci* 2000; **113**: 2177–2185.
- [72] TANG BL, WONG SH, QI XL, LOW SH, HONG W. Molecular cloning, characterization, subcellular localization and dynamics of p23, the mammalian KDEL receptor. *J Cell Biol* 1993; **120**: 325–328.
- [73] TANG BL, ZHANG T, LOW DYH, WONG ET, HORSTMANN H, HONG W. Mammalian homologues of yeast Sec 31p. *J Biol Chem* 2000; **275**: 13597–13604.
- [74] TANIGAWA G, ORCI L, AMHERDT M, RAVAZZOLA M, HELMS JB, ROTHMAN JE. Hydrolysis of bound GTP by ARF protein triggers uncoating of Golgi-derived COP-coated vesicles. *J Cell Biol* 1993; **123**: 1365–1371.
- [75] TEASDALE RD, JACKSON MR. Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996; **12**: 27–54.
- [76] THYBERG J, MOSKALEWSKI S. Microtubules and the organization of the Golgi complex. *Exp Cell Res* 1985; **159**: 1–16.
- [77] THYBERG J, MOSKALEWSKI S. Role of microtubules in the organization of the Golgi complex. *Exp Cell Res* 1999; **246**: 263–279.
- [78] TISDALE EJ, PLUTNER H, MATTESON J, BALCH WE. p53/58 binds COPI and is required for selective transport through the early secretory pathway. *J Cell Biol* 1997; **137**: 581–593.
- [79] TROWBRIDGE IS, COLLAWN JF, HOPKINS CR. Signal dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annu Rev Cell Biol* 1993; **9**: 129–161.
- [80] VOLLENWEIDER F, KAPPELER F, ITIN C, HAURI HP. Mistargeting of the lectin ERGIC-53 to the endoplasmic reticulum of HeLa cells impairs the secretion of a lysosomal enzyme. *J Cell Biol* 1998; **142**: 377–389.

- [81] WATERS MG, SERAFINI T, ROTHMAN JE. Coatomer: a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature* 1991; **349**: 248–251.
- [82] ZHAO L, HELMS JB, BRUGGER B, HARTEK C, MARTOGLIO B, GRAF R, BRUNNER J, WIELAND FT. Direct and GTP-dependent interaction of ADP ribosylation factor 1 with coatomer subunit β . *PNAS* 1997; **94**: 4418–4423.
- [83] ZHAO L, HELMS JB, BRUNNER J, WIELAND FT. GTP-dependent binding of ADP-ribosylation factor to coatomer in close proximity to the binding site for dilysine retrieval motifs and p23. *J Biol Chem* 1999; **274**: 14198–14203.

Redaktor prowadzący – Bożena Kamińska-Kaczmarek

Otrzymano: 27.12.2000 r.

Przyjęto: 10.06.2001 r.

Adres autora: ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń

Warunki prenumeraty kwartalnika PBK

Prenumerata na rok 2002

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 2002 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 W-wa;
Bank Polska Kasa Opieki SA, IV O/Warszawa 12401053-40006576-2700-401112-001.
Cena prenumeraty rocznika na rok 2002: dla instytucji (bibliotek) wynosi 90 zł, a dla odbiorców indywidualnych 30 zł.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 2002 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.

Wskazówki przygotowania rycin 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 ryciny, 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. Rysunki, schematy zdjęcia i wykresy w podpisach i w powołaniach w tekście powinny nosić nazwę rycina (ryc.) i być numerowane kolejno.

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 2001 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.

Streszczenia artykułów z bieżących zeszytów Postępów Biologii Kórnki można znaleźć w Internecie pod adresem: www.pbkom.pl – natomiast z wcześniejszych roczników pod adresem: www.mol.uj.edu.pl/pbk – póki nie zostaną przeniesione pod nowy adres.

Komunikat

POSITIONS IN ONCOGENESIS RESEARCH

Pre-doctoral and postdoctoral positions are available to investigate the molecular mechanisms of carcinogenesis including DNA damage/repair. Successful candidates are sought to join a team of researchers involved in the investigation of oncogenic tyrosine kinases and development of novel anti-tumor approaches. Please contact:

Dr Tomasz SKORSKI

Center of Biotechnology

College of Science and Technology, Temple University

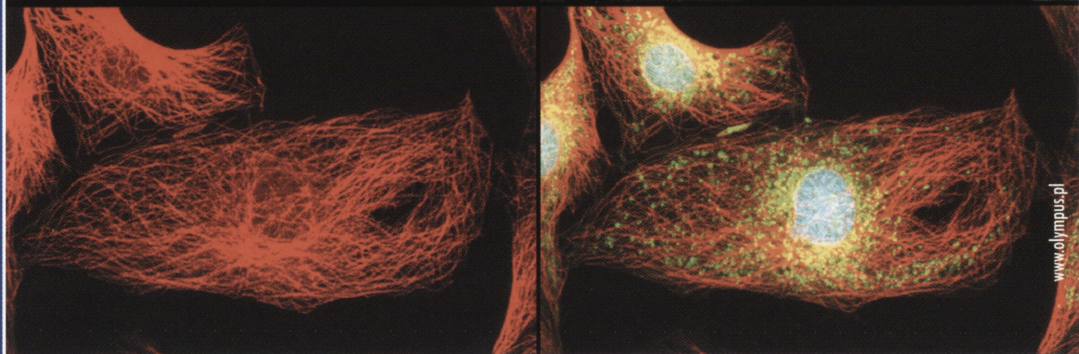
Bio-Life Sciences Bldg, Room 419

1900 N. 12th Street, Philadelphia, PA 19122

Tel (215) 204-8847; Fax (215) 204-1009

E-mail: tskorski@astro.temple.edu

Mikroskopy konfokalne Seria **FLUOVIEW 300/500**



NOWOCZESNE ROZWIĄZANIE DLA UŻYTKOWNIKÓW INDYWIDUALNYCH I GRUP BADAWCZYCH



FV300 druga generacja systemu osobistego oferowana w zaawansowanej konfiguracji przy atrakcyjnej cenie. Wyższa jakość obrazu – grafika 12 bitowa, rozdzielczość 2048x2048 pikseli. Wysoka szybkość skanowania – do 4 ramek/sekundę w rozdzielczości 512x512. Łatwe i przyjazne dla użytkownika oprogramowanie.



FV500 w pełni zautomatyzowany system do różnorodnych zastosowań. Możliwość użycia laserów UV, światła widzialnego i podczerwonego poprzez 3 zintegrowane porty. Dostępne aż do 5 detektorów do symultanicznej obserwacji pojedynczych kanałów. W pełni zautomatyzowana akwizycja obrazu z możliwością sterowania wszystkimi funkcjami mikroskopu AX70 PROVIS.

Więcej informacji pod adresem: Olympus Optical Polska sp. z o.o., ul. Świętojeńska 5/7, 00-236 Warszawa, tel. +48 (22) 860 00 77, fax +48 (22) 831 04 53, e-mail: mikroskopy.polska@olympus-europa.com, www.olympus.pl



OLYMPUS

THE VISIBLE DIFFERENCE

<http://rcin.org.pl>

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, niepublikowane 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 odpowiedzialnej 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. 160) powinna być przysłana na dyskietce 3,5" jako plik (file) Windows lub ASCII. Pierwsza strona nienumerowana 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 rycin. 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). Następną stroną 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 rycin, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, ryc. 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 zestawiać 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 rycin 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 blyszczącym papierze. **Barwne ryciny i zdjęcia są płatne.** Wymiary poszczególnych rycin, 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 niezmięnionej formie. Wszystkie załączniki, np. wykaz skrótów, muszą mieć na odwrocie nazwisko I. autora i oznaczeniem góry i dołu ilustracji. 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 odtbitki 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 wraz z rycinami na dyskietce	
Jest zgoda osób, których informacje niepubli-		z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego	
owane są zamieszczone w tekście artykułu	tak	z komputera IBM	tak nie
		Odpowiadam za całość pracy opisanej w zał. maszyn.	tak nie

Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w "Postęпах Biologii Komórki" przechodzi na własność Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji.

podpisy wszystkich autorów

TREŚĆ – CONTENTS

W tym zeszycie PKB	295
KUBIAK J. Z.: Rak i cykl komórkowy Cancer and cell cycle	297
LUBERDA Z.: Współczesne poglądy dotyczące wpływu reaktywnych form tlenu na funkcje plemników u ssaków Present conception regarding the effect of reactive oxygen species on functions of mammalian spermatozoa	309
WOJCIECHOWSKA M.: Symptomy programowanej śmierci komórek podczas rozwoju roślin The symptoms of programmed cell death during plant development	317
JÓZEFOWSKI S., MARCINKIEWICZ J.: Biosynteza oraz właściwości immunomodulacyjne lipoksyn – metabolitów kwasu arachidonowego Biosynthesis and immunomodulatory properties of lipoxins – metabolites of arachidonic acid	335
KOSZAŁKA P., BIGDA J.: Wpływ czynnika martwicy nowotworu (TNF) na łożysko naczyniowe nowotworów Influence of tumor necrosis factor (TNF) on tumor vasculature	351
KRZEŚLAK A., LIPIŃSKA A.: Transport jądrowo-cytoplazmatyczny białek i kwasów rybonukleinowych Nucleocytoplasmic transport of proteins and ribonucleic acids	373
WYROBIEC G., STĘPIEŃ M.: Mała tkanka – duża siła. Tkanka tłuszczowa brunatna: budowa, występowanie, znaczenie Small tissue – large strength. Brown adipose tissue: structure, existence and significance	395
TRZECIAK A.: Uszkodzenia DNA w komórkach ssaków DNA damage in mammalian cells	407
FIEDOROW P., PACAK A.: Wykorzystanie analizy sekwencji DNA w badaniach filogenetycznych i taksonomicznych mszaków Application of DNA sequence analysis to phylogenetic and taxonomic studies of bryophytes	431
ROSZEK K., GNIOT-SZULŻYCKA J.: Transport makromolekuł pomiędzy siateczką śródpłazmatyczną a aparatem Golgiego. Rola pęcherzyków COPI i COPII oraz przedziału pośredniego Transport of macromolecules between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. The role of COPI- and COPII-coated vesicles and the intermediate compartment	443
Warunki prenumeraty i wskazówki przygotowania rycin i streszczeń do publikacji w PBK Komunikat	467 468